

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091368** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.08.27

(51) Int. Cl. **C12P 7/64** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(54) **СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ ЛИПИДСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ**

(31) **62/608,073; 18156840.3**

(32) **2017.12.20; 2018.02.15**

(33) **US; EP**

(86) **PCT/EP2018/085606**

(87) **WO 2019/121752 2019.06.27**

(71) Заявитель:
**ЭВОНИК ОПЕРЕЙШЕНС ГМБХ
(DE); ДИЭСЭМ АЙПИ ЭССЕТС Б.В.
(NL)**

(72) Изобретатель:

**Хайнинг Мартин (DE), Джонсон
Майкл Бенджамин (US), Либерт
Йохен, Пфайфер Хольгер (DE)**

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу выделения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из биомассы, содержащей липиды, который предусматривает стадию деэмульгирования в реакторе непрерывного действия.

202091368
A1

202091368

A1

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ ЛИПИДСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ

Настоящее изобретение относится к способу выделения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из биомассы, содержащей липиды, который
5 предусматривает стадию деэмульгирования в реакторе непрерывного действия.

Липиды, содержащие PUFA (полиненасыщенные жирные кислоты), представляют высокий интерес в кормовой, пищевой и фармацевтической промышленности. Вследствие чрезмерного вылова рыбы существует большая необходимость в альтернативных источниках липидов, содержащих PUFA, помимо рыбьего жира.
10 Оказалось, что вдобавок к некоторым штаммам дрожжей и водорослей, в частности, клетки микроводорослей, например, из отряда Thraustochytriales, являются очень хорошим источником липидов, содержащих PUFA.

Но в отношении микробных организмов и, в частности, клеток организмов из отряда Thraustochytriales, которые продуцируют липиды, содержащие PUFA, выделение масла
15 из клеток оказалось особенной проблемой. Наиболее эффективным методом выделения масла являлось применение органических растворителей, подобных гексану. Но применение органических растворителей приводит к опасным условиям работы, требует применения дорогостоящего взрывобезопасного оборудования, и для него необходимо осуществление дорогостоящего способа извлечения растворителя во
20 избежание загрязнения окружающей среды.

В попытке избежать применения органических растворителей в качестве эффективного альтернативного метода выделения масла было обнаружено высаливание масла при использовании больших количеств хлорида натрия. Но применение больших количеств хлорида натрия приводит к образованию побочного продукта, представляющего собой
25 делипидизированную биомассу, который по причине высокого содержания соли невозможно использовать в качестве кормового ингредиента, поэтому способ не является достаточно рациональным. Кроме того, высокая концентрация соли приводит к быстрой коррозии применяемого оборудования из стали.

Таким образом, целью настоящего изобретения являлось обеспечение эффективного способа выделения липида, в частности липида, содержащего PUFA, из липидсодержащих клеток, в частности, организмов из отряда Thraustochytriales, и одновременного отсутствия необходимости не только в органических растворителях, но дополнительного отсутствия необходимости в высоких количествах солей для осуществления эффективного выделения масла из клеток.

Дополнительной целью настоящего изобретения являлось обеспечение способа выделения липида, в частности липида, содержащего PUFA, из липидсодержащих клеток, в частности, организмов из отряда Thraustochytriales, и одновременного обеспечения делипидизированной биомассы, которую можно использовать коммерческим образом, предпочтительно в области сельского хозяйства.

Обнаружено, что можно осуществлять эффективное выделение липида из биомассы, если биомассу, в частности, после лизирования, инкубируют с конкретным количеством эквивалентов основания, предпочтительно при низком щелочном значении pH и при температуре не более 100°C. Путем поддержания температуры намного ниже 100°C можно препятствовать, по меньшей мере по существу, омылению сложных эфиров жирных кислот.

Было очень неожиданно обнаружить в данном контексте, что если конкретное, четко определенное количество эквивалентов основания добавляют к количеству биомассы, содержащейся в суспензии, которое не должно быть ни слишком низким, ни слишком высоким, то тогда pH и температура и даже время воздействия, по-видимому, не играют важной роли в осуществлении эффективного деэмульгирования. Это означает, что отделение масла от остаточной биомассы можно проводить при очень мягких условиях в отношении содержащихся PUFA, а также при очень экономичных условиях, поскольку низкая температура и малый период времени воздействия означают низкое потребление энергии и, кроме того, экономию времени.

Способы деэмульгирования биомассы, содержащей липиды, обычно проводят в качестве периодического способа, что значит, что деэмульгирование обычно проводят в закрытом сосуде, в частности, в закрытом сосуде с устройством для перемешивания, и после завершения деэмульгирования все содержимое сосуда высвобождают в качестве продукта реакции за один раз.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что деэмульгирование биомассы, содержащей липиды, можно проводить в качестве непрерывного способа, что значит, что деэмульгирование можно проводить путем непрерывной подачи в реакционный сосуд непрерывного типа суспензии биомассы, содержащей лизированные липиды, и путем непрерывного удаления деэмульгированной суспензии из реакционного сосуда непрерывного типа.

Данная процедура непрерывного деэмульгирования является особенно желательной с коммерческой точки зрения вследствие коротких периодов инкубирования, необходимых для обеспечения полного деэмульгирования суспензии. Проведение деэмульгирования в непрерывном режиме обеспечивает возможность применения реакционного сосуда меньшего размера по сравнению с таковым для периодической процедуры при обеспечении такого же показателя превращения и, таким образом, обеспечивает экономию пространства и уменьшение затрат на оборудование.

Таким образом, первой целью настоящего изобретения является способ выделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), из биомассы, который предусматривает следующие стадии:

- a) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий виды PUFA;
- b) необязательно лизирование клеток биомассы;
- 20 c) концентрирование суспензии до общего содержания сухого вещества (TDM), составляющего от 20 до 60 вес. %, если суспензия характеризуется более низким содержанием TDM;
- d) добавление в целом от 7,5 до 25 моль, предпочтительно от 8,5 до 22 моль, в частности, от 10 до 20, более предпочтительно от 11 до 18, предпочтительнее всего от 25 12 до 17 моль эквивалента основания к 10 кг общего содержания сухого вещества, содержащегося в суспензии;
- e) подача в реактор непрерывного действия суспензии со временем пребывания в гидродинамических условиях от 1 до 36 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов, более предпочтительно от 2 до 12 часов, предпочтительнее всего от 2 до 6 часов, при

температуре от 20°C до 100°C, предпочтительно от 25, 30, 40, 50 или 60°C до 100°C, более предпочтительно от 65°C до 95°C, в частности, от 70 до 90°C;

f) отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис.

5 Если не указано иное, то в соответствии с настоящим изобретением значение pH на стадиях (d) и (e) предпочтительно поддерживают на уровне ниже 11,5, предпочтительно на уровне ниже 11, более предпочтительно на уровне ниже 10,5, предпочтительно в диапазоне от 8 до 11,5, более предпочтительно в диапазоне от 9 до 11, в частности, в диапазоне от 10 до 11. Это осуществляют путем добавления
10 основания на стадии (d) не сразу, а либо непрерывно, либо последовательно, в результате чего можно избежать превышения указанных значений pH.

В способах в соответствии с настоящим изобретением стадии (d) и (e) приводят к разрушению эмульсии на легкую фазу, содержащую масло, и тяжелую фазу, содержащую воду, клеточный дебрис и соли. Данное разрушение эмульсии также
15 называется «деэмульгированием» в контексте данного применения.

Таким образом, дополнительной целью настоящего изобретения также является способ выделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), из биомассы, который предусматривает следующие стадии:

a) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий виды PUFA;
20

b) необязательно лизирование клеток биомассы;

c) концентрирование суспензии до общего содержания сухого вещества (TDM), составляющего от 20 до 60 вес. %, если суспензия характеризуется более низким содержанием TDM;

25 d) регулирование значения pH суспензии от 8 до 11,5, предпочтительно от 9 до 11, в частности, от 10 до 11;

e) подача в реактор непрерывного действия суспензии со временем пребывания в гидродинамических условиях от 1 до 36 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов, более

предпочтительно от 2 до 12 часов, предпочтительнее всего от 2 до 6 часов, при температуре от 20°C до 100°C, предпочтительно от 25, 30, 40, 50 или 60°C до 100°C, более предпочтительно от 65°C до 95°C, в частности, от 70 до 90°C;

5 f) отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис.

Время пребывания в гидродинамических условиях представляет собой коэффициент отношения объема реактора непрерывного действия к объему потока, проходящего через реактор непрерывного действия.

10 Предпочтительно на стадиях (b) и (c) способов по настоящему изобретению суспензию непрерывно перемешивают с применением мешалки и/или перемешивающего устройства. В частности, можно использовать перемешивание с низким усилием сдвига и/или перемешивание в аксиальном направлении, в частности, как раскрыто в WO 2015/095694. Импеллеры, подходящие для перемешивания, включают, в частности, импеллеры с прямыми лопастями, лопастные импеллеры Раштона, аксиально-поточные
15 мешалки, радиально-поточные мешалки, импеллеры с вогнутыми лопастями на диске, высокоэффективные импеллеры, пропеллерные мешалки, лопастные мешалки, турбинные мешалки и их комбинации.

На стадии (d) способов по настоящему изобретению добавление эквивалентов основания к суспензии также можно проводить при непрерывном перемешивании
20 суспензии с помощью мешалки или перемешивающего устройства, в частности, путем использования перемешивания с низким усилием сдвига и/или перемешивания в аксиальном направлении, как раскрыто выше. Но в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перемешивание суспензии с эквивалентами основания проводят в статическом смесителе, т. е. без применения классической
25 мешалки или перемешивающего устройства. Добавление эквивалентов основания может происходить в том же сосуде, где проводят лизис клеток, или в отдельном сосуде после необязательной стадии лизирования. В качестве альтернативы, стадию (d) также можно проводить в реакторе непрерывного действия, в частности, в статическом смесителе, который образует часть реактора непрерывного действия.

30 На стадии (e) способов по настоящему изобретению также возможно перемешивание суспензии с помощью мешалки или перемешивающего устройства – например, это

- может быть выполнено с помощью ряда смесительных баков, – но предпочтительно не проводят никакого перемешивания или встряхивания суспензии, поскольку перемешивание посредством диффузии является достаточным и предпочтительным на стадии (e). Но, как было указано ранее, в предпочтительном варианте осуществления
- 5 настоящего изобретения статический смеситель можно использовать в качестве части реактора непрерывного действия для перемешивания суспензии с основанием, так что в данном варианте осуществления подходящей альтернативой является подача в реактор двух отдельных потоков – основного потока суспензии с одной стороны и вспомогательного потока раствора основания с другой стороны.
- 10 Суспензию, предпочтительно после добавления основания, непрерывно подают в реактор непрерывного действия, и деэмульгированный продукт реакции непрерывно выходит из реактора непрерывного действия через другое отверстие. Реактор непрерывного действия содержит предпочтительно два отверстия – впускное отверстие для подачи в реактор суспензии и выпускное отверстие для получения
- 15 деэмульгированного продукта реакции. Реактор непрерывного действия предпочтительно представляет собой реактор колонного типа, трубчатый реактор, реактор с перегородками и поворотами корпуса или реактор идеального вытеснения. Подачу в реактор суспензии предпочтительно осуществляют с применением насоса, например, ротационного насоса или нагнетательного насоса. Нагревание реактора
- 20 можно проводить, например, с применением теплообменной рубашки, окружающей реакционный сосуд. Подходящие с коммерческой точки зрения реакторы непрерывного действия, которые предпочтительно применяют в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно имеют диаметр от приблизительно 1 м^3 до приблизительно 100 м^3 , в частности, от приблизительно 5 м^3 до приблизительно 60 м^3 .
- 25 Поскольку неожиданно реакцию можно проводить эффективно при значениях температуры ниже 80°C , отдельной целью настоящего изобретения также является способ выделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), из биомассы, который предусматривает следующие стадии:
- a) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид,
- 30 содержащий виды PUFA;
- b) необязательно лизирование клеток биомассы;

- с) концентрирование суспензии до общего содержания сухого вещества (TDM), составляющего от 20 до 60 вес. %, предпочтительно от 25 до 60 вес. %, более предпочтительно от 30 до 55 вес. %, если суспензия характеризуется более низким TDM;
- 5 d) добавление в целом от 7,5 до 25 моль, предпочтительно от 8,5 до 22 моль, в частности, от 10 до 20, более предпочтительно от 11 до 18, предпочтительнее всего от 12 до 17 моль эквивалента основания к 10 кг общего содержания сухого вещества, содержащегося в суспензии;
- е) подача в реактор непрерывного действия суспензии со временем пребывания в гидродинамических условиях от 1 до 36 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов, более предпочтительно от 2 до 12 часов, предпочтительнее всего от 2 до 6 часов, при температуре от 20°C до ниже 80°C, предпочтительно от 25 до 60°C;
- 10 f) отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис.
- 15 Поскольку неожиданно реакцию можно проводить эффективно при pH ниже 9,0, дополнительной целью настоящего изобретения также является способ выделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), из биомассы, который предусматривает следующие стадии:
- а) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий виды PUFA;
- 20 b) необязательно лизирование клеток биомассы;
- с) концентрирование суспензии до общего содержания сухого вещества (TDM), составляющего от 20 до 60 вес. %, предпочтительно от 25 до 60 вес. %, более предпочтительно от 30 до 55 вес. %, если суспензия характеризуется более низким
- 25 TDM;
- d) регулирование значения pH суспензии в диапазоне от 8 до ниже 9;
- е) подача в реактор непрерывного действия суспензии со временем пребывания в гидродинамических условиях от 1 до 36 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов, более

предпочтительно от 2 до 12 часов, предпочтительнее всего от 2 до 6 часов, при температуре от 20°C до ниже 80°C, предпочтительно от 25 до 60°C;

f) отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис.

5 В соответствии с настоящим изобретением, термин «эквивалент основания» принимает во внимание факт, что в действительности существуют не только одновалентные, но также двух- или поливалентные основания, и они могут применяться в соответствии с настоящим изобретением. В случае, если применяют двухвалентное основание вместо
10 одновалентного основания или в дополнение к нему, то лишь половина молярного количества данного двухвалентного основания подлежит применению, чтобы воспроизвести то же количество эквивалентов основания по сравнению с количеством одновалентного основания, которое подлежало бы применению; в случае, если применяют трехвалентное основание, то лишь третья часть молярного количества одновалентного основания подлежит применению и т. д. В случае, если применяют
15 одновалентное основание, например, гидроксид натрия, количество эквивалентов основания является идентичным количеству основания.

Весовое количество основания можно легко рассчитать на основании молярного количества путем применения молярного веса основания. Например, в случае очень предпочтительного основания в виде гидроксида натрия молярный вес равняется
20 40 г/моль. Это означает, что один моль гидроксида натрия соответствует 40 г гидроксида натрия.

Предпочтительные основания, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, выбраны из гидроксидов, в частности, гидроксида натрия, гидроксида лития, гидроксида калия и/или гидроксида кальция, карбонатов, в частности карбоната
25 натрия, карбоната калия и/или карбоната магния, и/или бикарбонатов, в частности бикарбоната лития, бикарбоната натрия и/или бикарбоната калия. В очень предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения основание, применяемое в соответствии с настоящим изобретением, исключительно или почти исключительно представляет собой гидроксид натрия. Вследствие легкости
30 использования основания предпочтительно применяют в жидкой форме, в частности, в виде концентрированных растворов, где концентрация основания в растворе

предпочтительно находится в диапазоне от 10 до 60 вес. %, в частности в диапазоне от 20 до 50 вес. %.

В соответствии с настоящим изобретением после обеспечения суспензии согласно стадии (а) предпочтительно проводят стадию лизирования. Стадия лизирования может
5 быть исключена, если, например, из-за применяемых условий ферментации клетки или их большая часть уже лизированы или легко разрушаемы на одной последующих стадий процедуры без какой-либо определенной стадии лизирования.

Лизирование клеток биомассы согласно стадии (b) можно проводить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, в частности
10 ферментативно, механически, физически или химически, или путем применения их комбинаций.

В зависимости от времени воздействия и/или степени применяемой силы, может быть получена композиция, содержащая исключительно лизированные клетки, или композиция, содержащая смесь клеточного дебриса и интактных клеток. Термин
15 «лизированная липидсодержащая биомасса» в такой мере относится к суспензии, которая содержит воду, клеточный дебрис и масло, высвобожденные клетками биомассы, но, помимо этого, также может предусматривать дополнительные компоненты, в частности соли, интактные клетки, дополнительные количества лизированных клеток, а также компоненты ферментационной среды, в частности
20 питательные вещества. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лишь небольшие количества интактных клеток, в частности менее 20%, предпочтительно менее 10%, более предпочтительно менее 5% (относительно общего количества интактных клеток, присутствующих перед лизированием клеток биомассы) присутствуют в лизированной биомассе после стадии лизирования клеток.

Лизирование клеток можно осуществлять, например, с применением пресса Френча для клеток, ультразвукового диспергатора, гомогенизатора, микрофлюидизатора, шаровой
25 мельницы, стержневой мельницы, шаровой мельницы с галькой, бисерной мельницы, измельчающих валков с усиленной подачей, центробежно-ударной мельницы, промышленного измельчителя, смесителя с высоким усилием сдвига, лопастного
30 смесителя и/или политронного гомогенизатора.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лизирование клеток включает ферментативную обработку клеток с помощью применения фермента, разрушающего клеточные стенки.

В соответствии с настоящим изобретением фермент, разрушающий клеточные стенки, предпочтительно выбран из протеаз, целлюлаз (например, Cellustar CL (Dyadic), Fibrezyme G2000 (Dyadic), Celluclast (Novozymes), Fungamyl (Novozymes), Viscozyme L (Novozymes)), гемицеллюлаз, хитиназ, пектиназ (например, Pectinex (Novozymes)), сахараз, мальтаз, лактаз, альфа-глюкозидаз, бета-глюкозидаз, амилаз (например, Alphastar Plus (Dyadic); Termamyl (Novozymes)), лизоцимов, нейраминидаз, галактозидаз, альфа-маннозидаз, глюкуронидаз, гиалуронидаз, пуллулاناза, глюкоцереброзидаз, галактозилцерамидаз, ацетилгалактозаминидаз, фукозидаз, гексозаминидаз, идуронидаз, мальтаз-глюкоамилаз, ксиланаз (например, Xylanase Plus (Dyadic), Pentopan (Novozymes)), бета-глюканаз (например, Vinoflow Max (Novozymes), Brewzyme LP (Dyadic)), маннаназ и их комбинаций. Протеаза может быть выбрана из сериновых протеаз, треониновых протеаз, цистеиновых протеаз, аспартат-протеаз, металлопротеаз, глутаминовых протеаз, алкалаз (субтилизинов) и их комбинаций. Хитиназа может представлять собой хитотриозидазу. Пектиназа может быть выбрана из пектолиаз, пектозимов, полигалактураназа и их комбинаций.

Соответствующий уровень pH для использования фермента зависит от pH-оптимума фермента.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения применяют фермент с pH-оптимумом от 7,0 до 8,0, в частности приблизительно 7,5, таким образом, уровень pH, применяемый на данной стадии, составляет от 7,0 до 8,0, предпочтительно от 7,3 до 7,7. Предпочтительный фермент, который можно применять в данном диапазоне pH, представляет собой алкалазу.

Фермент предпочтительно добавляют в виде концентрированного ферментного раствора, предпочтительно в количестве от 0,01 до 1,5 вес. %, более предпочтительно в количестве от 0,03 до 1,0 вес. %, наиболее предпочтительно в количестве от 0,05 до 0,5 вес. % относительно количества добавляемого концентрированного ферментного раствора относительно общего количества суспензии после добавления концентрированного ферментного раствора.

В очень предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лизирование клеток осуществляют следующим образом:

- 5 i) нагревание суспензии (а) до температуры от 50°C до 70°C, предпочтительно до температуры от 55°C до 65°C, и добавление фермента, разрушающего клеточную стенку, в суспензию, и регулирование при необходимости рН до соответствующего значения, при котором фермент работает надлежащим образом;
- 10 ii) поддержание температуры и рН в диапазонах, указанных в (i), в течение по меньшей мере одного часа, предпочтительно в течение по меньшей мере двух часов, более предпочтительно в течение периода времени, составляющего от двух до четырех часов.

На стадии (i) фермент может быть добавлен до или после нагревания суспензии и/или до или после регулирования уровня рН. Аналогично нагревание суспензии можно осуществлять до или после регулирования уровня рН. Однако в предпочтительном варианте осуществления фермент добавляют после нагревания суспензии и после 15 регулирования уровня рН, если регулирование уровня рН вообще является необходимым. В очень предпочтительном варианте осуществления все действия проводят более или менее одновременно.

Предпочтительно на стадиях (i) и (ii) суспензию непрерывно перемешивают с использованием мешалки и/или перемешивающего устройства.

- 20 В соответствии с настоящим изобретением деэмульгирование проводят в отношении суспензии, характеризующейся содержанием сухого вещества от 20 до 60 вес. %, предпочтительно от 25 до 60 вес. %, в частности от 30 до 55 вес. % или от 30 до 45 вес. %. Это можно осуществлять либо путем обеспечения суспензии с 25 соответственно высоким содержанием биомассы на стадии (а), либо путем концентрирования суспензии, в частности, после лизирования клеток биомассы. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения после 30 необязательного лизирования клеток биомассы и перед стадией деэмульгирования суспензию концентрируют до общего содержания сухого вещества, составляющего от 20 до 60 вес. %, более предпочтительно от 25 до 60 вес. %, в частности от 30 до 55 вес. %, наиболее предпочтительно от 30 до 50 вес. % или от 30 до 45 вес. %.

Концентрирование суспензии предпочтительно осуществляют путем выпаривания воды при температуре не выше 100°C, предпочтительно от 70°C до 100°C, более предпочтительно от 80°C до 90°C, до достижения общего содержания сухого вещества от 20 до 60 вес. %, более предпочтительно от 25 до 60 вес. %, в частности от 30 до 55 вес. % или от 30 до 45 вес. %.

Концентрирование суспензии предпочтительно осуществляют в выпарном аппарате с принудительной циркуляцией (например, доступном от GEA, Германия) с обеспечением быстрого удаления воды. Альтернативно или в дополнение концентрирование можно осуществлять с помощью выпаривания с падающей пленкой, тонкопленочного выпаривания и/или ротационного выпаривания.

В целом регулирование значения рН можно осуществлять в соответствии с настоящим изобретением путем применения либо оснований, либо кислот, известных специалистам в данной области техники. Уменьшение уровня рН можно проводить, в частности, путем применения органических или неорганических кислот, таких как серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, борная кислота, хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, перхлорная кислота, гипохлористая кислота, хлористая кислота, фторсерная кислота, гексафторфосфорная кислота, уксусная кислота, лимонная кислота, муравьиная кислота, или их комбинаций. Поскольку желательно избегать высокого содержания хлорида, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в способе по настоящему изобретению не применяют хлористоводородную кислоту или применяют лишь небольшие ее количества. В соответствии с настоящим изобретением серная кислота представляет собой предпочтительное вещество для уменьшения значения рН. Увеличение значения рН можно осуществлять, в частности, путем применения органических или неорганических оснований, таких как гидроксиды, в частности гидроксид натрия, гидроксид лития, гидроксид калия и/или гидроксид кальция, карбонаты, в частности карбонат натрия, карбонат калия или карбонат магния, и/или бикарбонаты, в частности бикарбонат лития, бикарбонат натрия и/или бикарбонат калия. Вследствие легкости использования кислоты и основания предпочтительно применяют в жидкой форме, в частности в виде концентрированных растворов, при этом концентрация кислоты или основания в растворе предпочтительно находится в

диапазоне от 10 до 55 вес. %, в частности в диапазоне от 20 до 50 вес. %. В частности, серную кислоту также предпочтительно применяют в концентрированной форме.

Способ в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно предусматривает в качестве дополнительной стадии собирание липида, содержащего виды PUFA, из
5 деэмульгированной композиции, полученной на стадии (e), т. е. отделение легкой фазы, содержащей масло, от тяжелой фазы, содержащей воду, соли и клеточный дебрис.

Отделение легкой фазы от тяжелой фазы можно проводить при значениях pH, свойственных для суспензии, полученной на стадии (e). Но предпочтительно отделение легкой фазы от тяжелой фазы проводят при значениях pH от 5,5 до 8,5, более
10 предпочтительно от 6,0 до 8,0, в частности, от 6,5 до 7,5. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перед проведением отделения легкой фазы от тяжелой фазы значение pH регулируют, как описано выше, в случае если суспензия, полученная на стадии (e), характеризуется значением pH за пределами данного диапазона. Перед началом отделения легкой фазы
15 от тяжелой фазы нейтрализованную композицию, полученную таким образом, можно перемешивать при данном нейтрализованном значении pH от нескольких минут до не более чем нескольких часов.

Отделение легкой фазы, содержащей масло, от тяжелой фазы, содержащей воду, соли и клеточный дебрис, предпочтительно осуществляют с помощью механических средств и
20 предпочтительно при температуре 60-90°C, более предпочтительно 70-80°C и предпочтительно при значении pH предпочтительно 6-9, более предпочтительно 7-8,5. Термин «механические средства», в частности, относится к способам фильтрации и центрифугирования, известным специалистам в данной области техники.

После отделения маслосодержащей легкой фазы масло, содержащее PUFA, полученное
25 таким образом, можно дополнительно обрабатывать с применением способов, известных специалистам в данной области техники, в частности путем применения рафинирования, обесцвечивания, дезодорирования и/или вымораживания.

Особенное преимущество способа по настоящему изобретению заключается в том, что его можно осуществлять без применения какого-либо органического растворителя, в
30 частности, без применения какого-либо полярного или неполярного органического растворителя. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения не применяют органические растворители, в частности полярные или неполярные органические растворители, или применяют лишь небольшие их количества для выделения масла, содержащего PUFA, из биомассы. Традиционные органические растворители представляют собой гексан и этанол.

- 5 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения применяют менее 2 вес. % неполярных органических растворителей, более предпочтительно менее 1, 0,5 или 0,1 вес. %. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вообще не применяют неполярный органический растворитель. В очень предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения применяют менее 2 вес. % органических растворителей, как правило, особенно предпочтительно менее 1, 0,5 или 0,1 вес. %. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вообще не применяют органических растворителей.

- 15 Дополнительное преимущество способа по настоящему изобретению заключается в том, что можно осуществлять очень эффективное отделение масла от оставшейся биомассы без добавления хлорида натрия, который обычно применяют для высаливания масла из биомассы. Предпочтительно способ может быть осуществлен вообще без добавления хлоридных солей, наиболее предпочтительно без добавления каких-либо солей для высаливания масла. Однако небольшие количества хлоридных солей, в частности хлорида натрия, могут присутствовать в суспензии из-за ферментационной среды, применяемой для выращивания биомассы.

- 20 Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения не применяют хлорид натрия или применяют лишь небольшие его количества для улучшения выделения масла. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения для выделения масла из биомассы применяют менее 1 вес. % хлорида натрия, более предпочтительно применяют менее 0,5 или 0,2 вес. % хлорида натрия, наиболее предпочтительно менее 0,1 или 0,05 вес. %, при этом вес. % относится к общему весу композиции после добавления хлорида натрия.

- 30 В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вообще не применяют хлоридных солей или применяют лишь небольшие их количества для улучшения выделения масла. В данном варианте осуществления для

выделения масла из биомассы применяют предпочтительно менее 1 вес. % хлоридных солей, более предпочтительно менее 0,5 или 0,2 вес. % хлоридных солей, наиболее предпочтительно менее 0,1 или 0,05 вес. %, при этом вес. % относится к общему весу композиции после добавления хлоридных солей.

- 5 В очень предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, как правило, не применяют солей или применяют лишь небольшие их количества для улучшения выделения масла. В данном варианте осуществления для выделения масла из биомассы применяют предпочтительно менее 1 вес. % солей, более предпочтительно применяют менее 0,5 или 0,2 вес. % солей, наиболее предпочтительно менее 0,1 или
- 10 0,05 вес. %, при этом вес. % относится к общему весу композиции после добавления солей.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают очень эффективное отделение масла, содержащегося в биомассе, от клеточного дебриса и других веществ, содержащихся в суспензии, в частности ферментационном бульоне. С помощью

15 способов по настоящему изобретению предпочтительно более 80 вес. %, в частности более 90 вес. % масла, содержащегося в биомассе, может быть отделено от биомассы и выделено путем применения очень экономичных и рациональных условий.

«Хлорид» в соответствии с настоящим изобретением относится к количеству выявляемого хлора. Количество присутствующего хлора может быть определено с

20 помощью, например, элементного анализа в соответствии с DIN EN ISO 11885. Хлор присутствует в форме солей, которые называются «хлоридами». Содержание хлорида, упомянутого в соответствии с настоящим изобретением, также называемого «хлорид-ионами», – относится исключительно к количеству выявляемого хлора, а не к количеству всей хлоридной соли, которая содержит, помимо хлорид-иона, также

25 катионный противоион.

Общее содержание сухого вещества (TDM) предпочтительно определяют с помощью гравиметрического анализа. Для осуществления этого образец гомогенной суспензии с определенным объемом взвешивают до и после лиофильной сушки. Остаточный вес высушенного образца соответствует общему содержанию сухого вещества,

30 содержащегося в этом определенном объеме суспензии.

Выход высвобожденного масла предпочтительно определяют с помощью анализа сложного метилового эфира жирной кислоты (FAME). Для осуществления этого липиды в образце сначала омыляют с помощью КОН. После этого свободные жирные кислоты метилируют с помощью MeOH. Метилированные жирные кислоты затем
5 можно определять и количественно характеризовать посредством газовой хроматографии с применением внутреннего стандарта.

В особенно предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению водную фазу, содержащую воду, соли, остаточное масло и клеточный дебрис, которую получают в качестве побочного продукта на стадии сбора масла, описанной выше,
10 превращают в высушенную биомассу путем высушивания биомассы до обеспечения общего содержания сухого вещества более 90 вес. %.

Превращение тяжелой фазы, содержащей воду, соли, оставшееся масло и клеточный дебрис, которую получают в качестве побочного продукта на стадии сбора масла, в высушенную биомассу путем высушивания биомассы до обеспечения общего
15 содержания сухого вещества более 90 вес. % можно осуществлять различными путями.

В очень предпочтительном варианте превращение проводят путем концентрирования тяжелой фазы до обеспечения содержания сухого вещества, составляющего 30-50 вес. %, предпочтительно 35-45 вес. %, и путем последующей распылительной грануляции биомассы посредством грануляции в псевдооживленном слое. Путем
20 осуществления этого – очень эффективным образом можно получать биомассу с предпочтительными свойствами. Распылительная грануляция, осуществляемая с применением средств для грануляции в псевдооживленном слое, более подробно раскрыта в EP13176661.0.

Концентрирование тяжелой фазы до обеспечения содержания сухого вещества 30-
25 50 вес. % предпочтительно проводят путем выпаривания растворителей, в частности путем выпаривания под вакуумом, и/или путем использования роторного испарителя, тонкопленочного испарителя или испарителя с падающей пленкой. Пригодной альтернативой выпариванию растворителей является обратный осмос.

В качестве альтернативы распылительной грануляции другие способы высушивания, в
30 частности, другие способы конвективной сушки, такие как туннельная сушка или распылительная сушка, в частности сушка с форсуночным распылением, или способы

контактной сушки, такие как барабанная сушка, или способы сушки излучением, такие как инфракрасная сушка, концентрированной тяжелой фазы будут выступать в качестве применимых альтернатив, при этом путем применения данных способов обычно получают частицы с меньшим или большим диаметром.

- 5 В соответствии с настоящим изобретением в ходе процесса высушивания для предотвращения слеживания к биомассе можно необязательно добавлять средство против слеживания, в частности диоксид кремния, предпочтительно гидрофобный или гидрофильный диоксид кремния. Для этой цели суспензию, содержащую биомассу, а также диоксид кремния предпочтительно распыляют в определенную зону сушки.
- 10 Альтернативно или дополнительно биомассу можно смешивать с средством против слеживания после проведения процесса высушивания. В отношении применения диоксида кремния в качестве средства против слеживания представлена ссылка, в частности, на заявку на патент EP13187631.0.

- Превращение мелкозернистого порошка в крупнозернистый не содержащий пыли продукт можно осуществлять с помощью способов грануляции. Традиционные органические или неорганические вспомогательные средства или носители, такие как крахмал, желатин, производные целлюлозы или подобные вещества, которые, как правило, применяются в пищевой переработке или кормовой переработке в качестве связующих средств, гелеобразующих средств или загустителей, необязательно можно
- 15
- 20 применять в данном последовательном способе грануляции. Дополнительные вспомогательные средства, которые предпочтительно применяются в соответствии с настоящим изобретением, раскрыты в WO 2016/050560, при этом карбоксиметилцеллюлоза представляет собой особенно предпочтительное связующее средство.

- 25 После высушивания и необязательно гранулирования и/или просеивания биомассы высушенную биомассу предпочтительно хранят или упаковывают.

Биомасса в виде частиц по настоящему изобретению также как и водные суспензии по настоящему изобретению могут использоваться различными путями. Например, их можно применять с целью получения пищевого продукта или кормового продукта.

- 30 Альтернативно их можно применять непосредственно в качестве пищевого продукта или кормового продукта.

Дополнительным объектом настоящего изобретения, таким образом, кроме того, является способ получения кормового продукта или пищевого продукта, в котором применяют биомассу в виде частиц и/или водную суспензию в соответствии с настоящим изобретением, и их предпочтительно смешивают с дополнительными ингредиентами кормового продукта или пищевого продукта.

Клетки биомассы, содержащие PUFA, предпочтительно представляют собой микробные клетки или растительные клетки. Предпочтительно клетки способны к продуцированию PUFA благодаря поликетидсинтазной системе. Поликетидсинтазная система может представлять собой эндогенную систему или, благодаря генетической инженерии, экзогенную систему.

Растительные клетки, в частности, могут быть выбраны из организмов семейств Brassicaceae, Elaeagnaceae и Fabaceae. Клетки организмов семейства Brassicaceae могут быть выбраны из рода Brassica, в частности из масличного рапса, масличной репы и горчицы сарептской; клетки организмов семейства Elaeagnaceae могут быть выбраны из рода Elaeagnus, в частности из вида Oleae europaea; клетки семейства Fabaceae могут быть выбраны из рода Glycine, в частности из вида Glycine max.

Микробные организмы, которые содержат липид, содержащий PUFA, широко описаны в уровне техники. В данном контексте применяемые клетки могут, в частности, представлять собой клетки, которые естественным образом уже продуцируют PUFA (полиненасыщенные жирные кислоты); однако они также могут представлять собой клетки, которые в результате осуществления подходящих способов генетической инженерии или благодаря случайному мутагенезу демонстрируют улучшенное продуцирование PUFA, или их вообще сделали способными к продуцированию PUFA. Продуцирование PUFA может быть ауксотрофным, миксотрофным или гетеротрофным.

Биомасса предпочтительно содержит клетки, которые продуцируют PUFA гетеротрофно. Клетки в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно выбраны из водорослей, грибов, в частности, дрожжей, бактерий или простейших. Более предпочтительно клетки представляют собой микробные водоросли или грибы.

Подходящие клетки продуцирующих масло дрожжей представляют собой, в частности, штаммы *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* и *Lipomyces*.

5 Подходящие клетки продуцирующих масло микроводорослей и подобных водорослям микроорганизмов представляют собой, в частности, микроорганизмы, выбранные из царства *Stramenopiles* (также называемого *Heterokonta*). Микроорганизмы царства *Stramenopiles*, в частности, могут быть выбраны из следующих групп микроорганизмов: *Hamatores*, *Proteromonads*, *Opalines*, *Developayella*, *Diplophrys*, *Labrinthulids*, *Thraustochytrids*, *Biosecids*, *Oomycetes*, *Hypochytridiomycetes*, *Commation*,
10 *Reticulosphaera*, *Pelagomonas*, *Pelagococcus*, *Ollicola*, *Aureococcus*, *Parmales*, диатомовые водоросли, *Xanthophytes*, *Phaeophytes* (бурые водоросли), *Eustigmatophytes*, *Raphidophytes*, *Synurids*, *Axodines* (включая *Rhizochromulinales*, *Pedinellales*, *Dictyochales*), *Chrysomeridales*, *Sarcinochrysidales*, *Hydrurales*, *Hibberdiales* и *Chromulinales*. Другие предпочтительные группы микроводорослей включают членов
15 группы зеленых водорослей и динофлагеллятов, включая членов из рода *Crypthecodinium*.

Биомасса в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит клетки организмов из таксона *Labyrinthulomycetes* (*Labyrinthulea*, лабиринтуломицеты грибы, лабиринтулы), в частности клетки организмов из семейства *Thraustochytriaceae*, и
20 предпочтительно по сути состоит из таких клеток. Семейство *Thraustochytriaceae* (*Thraustochytrids*) включает роды *Althomia*, *Aplanochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Botryochytrium*, *Elnia*, *Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Thraustochytrium* и *Ulkenia*. Биомасса, в частности, предпочтительно содержит клетки организмов из родов *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*,
25 *Schizochytrium* или *Thraustochytrium*, главным образом организмы из рода *Schizochytrium*.

В соответствии с настоящим изобретением полиненасыщенная жирная кислота (PUFA) предпочтительно представляет собой высоконенасыщенную жирную кислоту (HUFA).

30 Клетки, присутствующие в биомассе, предпочтительно характеризуются тем, что они содержат по меньшей мере 20% по весу, предпочтительно по меньшей мере 30% по

весу, в частности по меньшей мере 35% по весу PUFA, в каждом случае в пересчете на сухое вещество клеток.

В соответствии с настоящим изобретением термин "липид" включает фосфолипиды; свободные жирные кислоты; сложные эфиры жирных кислот; триацилглицерины; 5 стерины и сложные эфиры стеринов; каротиноиды; ксантофилы (например, оксикаротиноиды); углеводороды; полученные из изопреноидов соединения и другие липиды, известные специалисту в данной области техники. Термины «липид» и «масло» применяют взаимозаменяемо в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления большинство липидов в данном случае 10 присутствует в форме триглицеридов, предпочтительно по меньшей мере 50% по весу, в частности по меньшей мере 75% по весу, и в особенно предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 90% по весу присутствующих липидов присутствуют в клетке в форме триглицеридов.

В соответствии с настоящим изобретением подразумевается, что полиненасыщенные 15 жирные кислоты (PUFA) означают жирные кислоты, имеющие по меньшей мере две, в частности, по меньшей мере три двойные С-С-связи. В соответствии с настоящим изобретением высоконенасыщенные жирные кислоты (HUFA) являются предпочтительными среди PUFA. В соответствии с настоящим изобретением подразумевается, что HUFA означают жирные кислоты, имеющие по меньшей мере 20 четыре двойные С-С-связи.

PUFA могут присутствовать в клетке в свободной форме или в связанной форме. Примеры наличия в связанной форме представляют собой фосфолипиды и сложные эфиры PUFA, в частности моноацил-, диацил- и триацилглицериды. В 25 предпочтительном варианте осуществления большинство PUFA присутствует в форме триглицеридов, предпочтительно по меньшей мере 50% по весу, в частности по меньшей мере 75% по весу, и в особенно предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 90% по весу присутствующих PUFA присутствуют в клетке в форме триглицеридов.

Предпочтительными PUFA являются омега-3 жирные кислоты и омега-6 жирные 30 кислоты, при этом омега-3 жирные кислоты являются особенно предпочтительными. В данном документе предпочтительными омега-3 жирными кислотами являются

эйкозапентаеновая кислота (EPA, 20:5 ω -3), в частности (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновая кислота, и докозагексаеновая кислота (DHA, 22:6 ω -3), в частности (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновая кислота.

В очень предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения
5 применяют клетки, в частности штамм *Schizochytrium*, который продуцирует значительное количество EPA и DHA одновременно, при этом DHA предпочтительно продуцируется в количестве по меньшей мере 20 вес. %, предпочтительно в количестве по меньшей мере 30 вес. %, в частности в количестве от 30 до 50 вес. %, и EPA
10 продуцируется в количестве по меньшей мере 5 вес. %, предпочтительно в количестве по меньшей мере 10 вес. %, в частности в количестве от 10 до 20 вес. % (относительно общего количества липида, содержащегося в клетках, соответственно).
Продуцирующие DHA и EPA штаммы *Schizochytrium* могут быть получены с помощью последовательного мутагенеза с последующим соответствующим отбором мутантных штаммов, которые демонстрируют преимущественное продуцирование EPA и DHA и
15 конкретное соотношение EPA:DHA. Любое химическое или нехимическое (например, ультрафиолетовое (UV) излучение) средство, способное к индуцированию генетического изменения в отношении клетки дрожжей, может применяться в качестве мутагена. Такие средства могут применяться отдельно или в комбинации друг с другом, и химические средства могут применяться в чистом виде или с растворителем.

20 Предпочтительные виды микроорганизмов рода *Schizochytrium*, которые продуцируют одновременно EPA и DHA в значительных количествах, как указано выше, депонированы под № доступа ATCC PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 или PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215.

Суспензия биомассы в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно
25 характеризуется плотностью биомассы, составляющей по меньшей мере 80 или 100 г/л, в частности плотностью биомассы от 80 до 250 г/л, в частности от 80 до 200 г/л, более предпочтительно плотностью биомассы, составляющей по меньшей мере 120 или 140 г/л, в частности по меньшей мере 160 или 180 г/л (в пересчете на содержание сухого вещества), и предпочтительно представляет собой ферментационный бульон.

30 Таким образом, суспензия может быть получена путем культивирования и выращивания подходящих клеток в ферментационной среде в условиях, при которых PUFA продуцируются микроорганизмом.

Способы получения биомассы, в частности биомассы, которая содержит клетки, содержащие липиды, в частности PUFA, в частности с помощью организмов из отряда Thraustochytriales, подробно описаны в уровне техники (см., например, WO91/07498, WO94/08467, WO97/37032, WO97/36996, WO01/54510). Как правило, продуцирование

5 происходит у клеток, которые культивируют в ферментере в присутствии источника углерода и источника азота одновременно с рядом дополнительных веществ, таких как минералы, которые обеспечивают рост микроорганизмов и продуцирование PUFA. В

данном контексте могут быть достигнуты значения плотности биомассы, составляющие более 100 грамм на литр, и значения скорости продуцирования,

10 составляющие более 0,5 грамм липида на литр в час. Способ предпочтительно осуществляют с помощью процесса, известного как периодический способ с подпиткой, т. е. осуществляется постепенная подпитка источниками углерода и азота в

ходе ферментации. Когда желаемое количество биомассы получено, продуцирование липидов может быть индуцировано различными действиями, например путем

15 ограничения источника азота, источника углерода или содержания кислорода или комбинаций данных действий.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки выращивают до тех пор, пока они не достигнут плотности биомассы, составляющей по

20 меньшей мере 80 или 100 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 120 или 140 г/л, в частности, по меньшей мере 160 или 180 г/л (в пересчете на общее содержание сухого вещества). Такие способы раскрыты, например, в US 7732170.

Предпочтительно клетки подвергают ферментации в среде с низкой соленостью, в частности, чтобы избежать коррозии. Этого можно достичь с применением не

содержащих хлора солей натрия в качестве источника натрия вместо хлорида натрия,

25 таких как, например, сульфат натрия, карбонат натрия, гидрокарбонат натрия или кальцинированная сода. Предпочтительно хлорид применяют в ферментационной смеси в количествах менее 3 г/л, в частности, менее 500 мг/л, особенно предпочтительно менее 100 мг/л.

Подходящие источники углерода представляют собой как спиртовые, так и

30 неспиртовые источники углерода. Примеры спиртовых источников углерода представляют собой метанол, этанол и изопропанол. Примеры неспиртовых

источников углерода представляют собой фруктозу, глюкозу, сахарозу, мелассу, крахмал и кукурузную патоку.

Подходящие источники азота представляют собой как неорганические, так и органические источники азота. Примеры неорганических источников азота представляют собой нитраты и соли аммония, в частности сульфат аммония и гидроксид аммония. Примеры органических источников азота представляют собой аминокислоты, в частности глутамат и мочевины.

Кроме того, также можно добавлять неорганические или органические соединения фосфора и/или известные стимулирующие рост вещества, такие как, например, дрожжевой экстракт или жидкий кукурузный экстракт, чтобы иметь положительный эффект в отношении ферментации.

Предпочтительно клетки подвергают ферментации при значении pH от 3 до 11, в частности от 4 до 10, и предпочтительно при температуре, составляющей по меньшей мере 20°C, в частности от 20 до 40°C, особенно предпочтительно по меньшей мере 30°C. Типичный процесс ферментации длится до примерно 100 часов.

После завершения ферментации клетки можно пастеризовать с целью уничтожения клеток и деактивации ферментов, которые могут способствовать разрушению липидов. Пастеризации предпочтительно достигают путем нагревания биомассы до температуры от 50 до 121°C, предпочтительно от 50 до 70°C, в течение периода от 5 до 150 минут, в частности от 20 до 100 минут.

Аналогично после завершения ферментации могут быть добавлены антиоксиданты с целью защиты PUFA, присутствующих в биомассе, против окислительного разрушения. В данном контексте предпочтительные антиоксиданты представляют собой ВНТ, ВНА, ТВНА, этоксиин, бета-каротин, витамин Е, в частности токоферол, и витамин С. Антиоксидант, если применяется, предпочтительно добавляют в количестве от 0,001 до 0,1 вес. %, предпочтительно в количестве от 0,002 до 0,05 вес. % относительно общего количества ферментационного бульона после добавления антиоксиданта.

ДЕМОНСТРАЦИОННЫЕ ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение суспензии для применения в испытаниях в отношении деэмульгирования

Непромытый клеточный бульон, содержащий микробные клетки (*Schizochytrium* sp.) при плотности биомассы более 100 г/л нагревали до 60°C в перемешиваемом сосуде.

5 После нагревания суспензии доводили значение pH до 7,5 путем применения каустической соды (50 вес. % раствор NaOH) перед добавлением алкалазы (Alcalase® 2.4 FG (Novozymes)) в жидкой форме в количестве 0,5 вес. % (по весу бульона). Перемешивание продолжали в течение 3 часов при 60°C. После этого смесь лизированных клеток переносили в выпарной аппарат с принудительной циркуляцией

10 (полученный от GEA, Германия) и нагревали до температуры 85°C. Концентрировали смесь в выпарном аппарате с принудительной циркуляцией до достижения общего содержания сухого вещества, составляющего приблизительно 30 вес. %.

Пример 2. Влияние количества добавляемых эквивалентов основания на высвобождение масла

15 Чтобы испытать значение количества добавляемых эквивалентов основания в отношении эффективности высвобождения масла из биомассы, тестировали влияние добавления различных количеств каустической соды к биомассе в отношении высвобождения масла. Отношение добавленных эквивалентов основания к общему содержанию сухого вещества изображено в таблице 1 также как и количество

20 высвобождаемого благодаря добавлению каустической соды масла. Все эксперименты проводили с применением одного литра ферментативно обработанного и затем концентрированного ферментационного бульона с использованием биореактора с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Общее содержание сухого вещества образцов составляло 30 вес. %. Деэмульгирование

25 проводили в течение 24 часов при температуре 80°C. Суспензию перемешивали при 300 об./мин. Каустическую соду добавляли в начале за один раз. Через 24 часа деэмульгированные композиции нейтрализовали до pH 7,5. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли

30 количество EPA и DHA в супернатанте.

Таблица 1. Влияние количества добавляемого NaOH на количество высвобождаемого масла

Добавляемое количество NaOH [моль/10 кг TDM]	10	12,5	15	22,5
Добавляемое количество NaOH [вес. %/TDM]	4	5	6	9
Выход [вес. %]	90,8	91,9	93,4	87,7

Результаты демонстрируют, что можно получить очень хорошие показатели выхода высвобождаемого масла даже при довольно малых количествах добавляемых эквивалентов основания без добавления органических растворителей или солей, таких как хлорид натрия. Кроме того, становится ясно, что есть соотношение добавляемого эквивалента основания и общего содержания сухого вещества, при котором может быть получен максимально увеличенный выход. Дополнительное увеличение количества эквивалентов основания за пределами этого соотношения не увеличивает выход, а приводит даже к худшим результатам по сравнению с меньшими количествами добавляемых эквивалентов основания. Наилучшие результаты получали при количестве, составляющем 12,5 и 15 моль NaOH на 10 кг TDM.

Пример 3. Влияние количества добавляемых эквивалентов основания на высвобождение масла

Чтобы дополнительно испытать значение количества добавляемых эквивалентов основания в отношении эффективности высвобождения масла из биомассы, тестировали влияние добавления различных количеств каустической соды к биомассе в отношении высвобождения масла. Отношение добавленных эквивалентов основания к общему содержанию сухого вещества изображено в таблице 2 также как и количество высвобождаемого благодаря добавлению каустической соды масла. Все эксперименты проводили с применением одного литра ферментативно обработанного и затем концентрированного ферментационного бульона с использованием биореактора с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Общее содержание сухого вещества образцов составляло 30,5 вес. %. Деэмульгирование проводили в течение 24 часов при температуре 80°C. Суспензию перемешивали при 300 об./мин. Каустическую соду добавляли постепенно, в три этапа, с сохранением низкого значения pH. Через 24 часа деэмульгированные композиции нейтрализовали до pH 7,5. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем

центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и ДНА в супернатанте.

Таблица 2. Влияние количества добавляемого NaOH на количество высвобождаемого масла

Добавляемое количество NaOH [моль/10 кг TDM]	12,5	17,5	20	22,5
Добавляемое количество NaOH [вес. %/TDM]	5	7	8	9
Выход [вес. %]	93,9	92,3	92,6	84,5

5 Результаты демонстрируют, что можно получить очень хорошие показатели выхода высвобождаемого масла даже при довольно малых количествах добавляемых эквивалентов основания без добавления органических растворителей или солей, таких как хлорид натрия. Кроме того, становится ясно, что есть соотношение добавляемого эквивалента основания и общего содержания сухого вещества, при котором может быть 10 получен максимально увеличенный выход. Дополнительное увеличение количества эквивалентов основания за пределами этого соотношения не увеличивает выход, а приводит даже к худшим результатам по сравнению с меньшими количествами добавляемых эквивалентов основания. Наилучшие результаты получали при 15 количестве, составляющем от 12,5 до 20 моль NaOH на 10 кг TDM.

Пример 4. Влияние количества добавляемых эквивалентов основания на высвобождение масла

Чтобы испытать значение количества добавляемых эквивалентов основания в отношении эффективности высвобождения масла из биомассы, тестировали влияние 20 добавления различных количеств каустической соды к биомассе в отношении высвобождения масла. Отношение добавленных эквивалентов основания к общему содержанию сухого вещества изображено в таблице 3 также как и количество высвобождаемого благодаря добавлению каустической соды масла. Все эксперименты проводили с применением одного литра ферментативно обработанного и затем 25 концентрированного ферментационного бульона с использованием биореактора с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Общее содержание сухого вещества образцов составляло 30 вес. %. Деэмульгирование проводили в течение 24 часов при температуре 80°C. Суспензию перемешивали при 300 об./мин. Каустическую соду добавляли непрерывно во избежание получения

высоких значений pH. Через 24 часа деэмульгированные композиции нейтрализовали до pH 7,5. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и ДНА в супернатанте.

- 5 Таблица 3. Влияние количества добавляемого NaOH на количество высвобождаемого масла

Добавляемое количество NaOH [моль/10 кг TDM]	10	12,5	15	17,5	20
Добавляемое количество NaOH [вес. %/TDM]	4	5	6	7	8
Выход [вес. %]	92,5	94,0	95,2	95,2	93,8

- Результаты демонстрируют, что можно получить очень хорошие показатели выхода высвобождаемого масла даже при довольно малых количествах добавляемых эквивалентов основания без добавления органических растворителей или солей, таких как хлорид натрия. Кроме того, становится ясно, что есть соотношение добавляемого эквивалента основания и общего содержания сухого вещества, при котором может быть получен максимально увеличенный выход. Дополнительное увеличение количества эквивалентов основания за пределами этого соотношения не увеличивает выход, а приводит даже к худшим результатам по сравнению с меньшими количествами добавляемых эквивалентов основания. Наилучшие результаты получали при количестве, составляющем от 12,5 до 17,5 моль NaOH на 10 кг TDM.

Пример 5. Влияние количества добавляемых эквивалентов основания на высвобождение масла

- 20 Чтобы испытать значение количества добавляемых эквивалентов основания в отношении эффективности высвобождения масла из биомассы, тестировали влияние добавления различных количеств каустической соды к биомассе в отношении высвобождения масла. Отношение добавленных эквивалентов основания к общему содержанию сухого вещества изображено в таблице 4 также как и количество высвобождаемого благодаря добавлению каустической соды масла. Все эксперименты проводили с применением одного литра ферментативно обработанного и затем концентрированного ферментационного бульона с использованием биореактора с 25 четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Общее содержание сухого вещества образцов составляло 35,5 вес. %.

Деэмульгирование проводили в течение 24 часов при температуре 80°C. Суспензию перемешивали при 300 об./мин. Каустическую соду добавляли непрерывно во избежание получения высоких значений pH. Через 24 часа деэмульгированные композиции нейтрализовали до pH 7,5. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и DNA в супернатанте.

Таблица 4. Влияние количества добавляемого NaOH на количество высвобождаемого масла

Добавляемое количество NaOH [моль/10 кг TDM]	10	12,5	15	17,5	20
Добавляемое количество NaOH [вес. %/TDM]	4	5	6	7	8
Выход [вес. %]	88,5	91,8	91,0	89,0	87,0

Результаты демонстрируют, что можно получить очень хорошие показатели выхода высвобождаемого масла даже при довольно малых количествах добавляемых эквивалентов основания без добавления органических растворителей или солей, таких как хлорид натрия. Кроме того, становится ясно, что есть соотношение добавляемого эквивалента основания и общего содержания сухого вещества, при котором может быть получен максимально увеличенный выход. Дополнительное увеличение количества эквивалентов основания за пределами этого соотношения не увеличивает выход, а приводит даже к худшим результатам по сравнению с меньшими количествами добавляемых эквивалентов основания. Наилучшие результаты получали при количестве, составляющем от 12,5 до 15 моль NaOH на 10 кг TDM.

Пример 6. Влияние температуры, общего содержания сухого вещества, количества каустической соды и скорости перемешивания на высвобождение масла

Чтобы испытать влияние и взаимозависимость температуры, общего содержания сухого вещества (TDM), количества эквивалентов основания и скорости перемешивания на высвобождение масла, проводили испытания с применением ферментативно обработанных ферментационных бульонов, которые концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до достижения общего содержания сухого вещества 25, 30 или 35 вес. %. Испытания проводили в биореакторе с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Объем

концентрированных суспензий, применяемых в испытаниях, составлял 1 л для каждого образца. В испытаниях общее количество добавляемых эквивалентов основания варьировалось от 5 до 7 вес. %, при этом деэмульгирование проводили при 70, 80 или 90°C. В качестве эквивалента основания добавляли NaOH в жидкой форме (20 вес. % раствор NaOH) за один раз в начале стадии деэмульгирования. Деэмульгирование осуществлялось при скорости мешалки 100, 550 или 1000 об./мин. в течение 24 часов. Через 24 часа полученные композиции нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и DHA в супернатанте.

Таблица 5. Влияние температуры, TDM и скорости перемешивания на выход высвобождаемого масла

Температура [°C]	70	70	90	90	70	70	90	90	80	80
TDM [вес. %]	25	35	25	35	25	35	25	35	30	30
Количество NaOH [вес. % на TDM]	5	7	7	5	7	5	5	7	6	6
Количество NaOH [моль/10 кг TDM]	12,5	17,5	17,5	12,5	17,5	12,5	12,5	17,5	15	15
Скорость мешалки [об./мин.]	100	100	100	100	1000	1000	1000	1000	550	550
Выход [вес. %]	90,3	96,2	82,9	95,5	76,6	93,1	93,1	90,0	94,9	93,9

Как можно видеть, при 35 вес. % TDM всегда можно получать очень хорошие результаты, т. е. выход масла, составляющий по меньшей мере 90 вес. %, даже при довольно большом количестве эквивалентов основания и довольно низкой температуре. Напротив, при TDM лишь 25 вес. % результаты могут стать значительно хуже, если количество эквивалента основания является довольно высоким, в частности, когда температура является довольно низкой.

20 Пример 7. Влияние температуры на высвобождение масла

Чтобы испытать значение температуры в отношении высвобождения масла, проводили испытания с использованием ферментативно обработанных ферментационных бульонов, которые концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до обеспечения общего содержания сухого вещества 33 вес. %. Испытания проводили в биореакторе с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Объем концентрированных суспензий,

применяемых в испытаниях, составлял 1 л для каждого образца. В каждом испытании добавляли одинаковое общее количество эквивалента основания (6 вес. % NaOH на TDM, т. е. 15 моль NaOH на 10 кг TDM), при этом деэмульгирование проводили при 40, 50 или 90°C. Добавляли эквивалент основания в жидкой форме (20 вес. % раствор NaOH) за один раз в начале стадии деэмульгирования. Деэмульгирование осуществлялось при скорости мешалки 300 об./мин. в течение 24 часов. Через 24 часа полученную композицию нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и DNA в супернатанте.

Таблица 6. Влияние температуры на выход высвобождаемого масла

Температура [°C]	40	50	90
Выход [вес. %]	85,4	87,6	93,0

Оказалось, что даже при низких температурах, таких как 40°C или 50°C, можно осуществлять очень эффективное высвобождение масла, если добавлять соответствующее количество эквивалентов основания.

Пример 8. Деэмульгирование при очень низких температурах

Чтобы дополнительно испытать значение температуры в отношении высвобождения масла, проводили испытания с использованием ферментативно обработанных ферментационных бульонов, которые концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до обеспечения общего содержания сухого вещества 33,5 вес. %. Испытания проводили в биореакторе с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Объем применяемых концентрированных суспензий составлял 1 л для каждого образца. В каждом испытании добавляли одинаковое общее количество эквивалента основания (6 вес. % NaOH на TDM, т. е. 15 моль NaOH на 10 кг TDM), при этом деэмульгирование проводили при 30 или 40°C. Добавляли эквивалент основания в жидкой форме (20 вес. % раствор NaOH) за один раз в начале стадии деэмульгирования. Деэмульгирование осуществлялось при скорости мешалки 300 об./мин. в течение 24 часов. Через 24 часа полученную композицию нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной

суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и DHA в супернатанте.

Таблица 7. Влияние температуры на выход высвобождаемого масла

Температура [°C]	30	40
Выход [вес. %]	85,8	84,6

- 5 Оказалось, что даже при температурах вплоть до 30°C можно осуществлять эффективное высвобождение масла, если добавлять соответствующее количество эквивалентов основания.

Пример 9. Влияние времени деэмульгирования на высвобождение масла

- Чтобы испытать значение времени воздействия в отношении высвобождения масла, проводили испытания с использованием ферментативно обработанных ферментационных бульонов, которые концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до обеспечения общего содержания сухого вещества 36,2 вес. %. Испытания проводили в сосуде для перемешивания. Объем применяемых концентрированных суспензий составлял 300 л для каждого образца. В каждом испытании добавляли одинаковое общее количество эквивалента основания (6 вес. % NaOH на TDM, т. е. 15 моль NaOH на 10 кг TDM) и поддерживали температуру при 80°C. Эквивалент основания добавляли постепенно в жидкой форме (20 вес. % раствор NaOH) в ходе воздействия, в результате чего значение pH суспензии никогда не превышало pH 9,5. Периоды времени воздействия варьировались от 4 до 23 часов. После инкубирования полученную композицию нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и DHA в супернатанте.

Таблица 8. Влияние времени деэмульгирования на выход высвобождаемого масла

Время воздействия [ч.]	4	9	13	23
Выход [вес. %]	90,5	92,0	92,0	91,3

Оказалось, что неожиданно можно выделить почти одинаковое количество масла при периодах времени воздействия, варьирующихся от 4 до 23 часов. Это означает, что

довольно короткие периоды времени воздействия уже обеспечивают очень хорошие показатели выхода, в результате чего можно избежать более длительной продолжительности и потребляющих энергию периодов инкубирования.

Пример 10. Применение $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в качестве основания при деэмульгировании

- 5 Ферментативно обработанные ферментационные бульоны концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до обеспечения общего содержания сухого вещества 34 вес. %. Испытания проводили в биореакторе с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудах BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Объем применяемых концентрированных суспензий составлял один литр для каждого образца.
- 10 Деэмульгирование проводили при температуре 80°C и при времени воздействия 24 часа. Суспензии перемешивали при 300 об./мин. К суспензии добавляли либо 10,6 моль эквивалентов основания, либо 14,0 моль эквивалентов основания $\text{Ca}(\text{OH})_2$ на 10 кг общего содержания сухого вещества. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ добавляли постепенно в суспендированной форме (20 вес. % $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в воде) в ходе воздействия, в результате
- 15 чего значение pH суспензии никогда не превышало pH 9,5. После инкубирования полученную композицию нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и ДНА в супернатанте.
- 20 Таблица 9. Влияние количества добавляемого $\text{Ca}(\text{OH})_2$ на количество высвобождаемого масла

Добавляемое количество $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [моль/10 кг TDM]	10,6	14,0
Добавляемое количество $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [вес. %/TDM]	3,9	5,2
Добавляемое количество $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [г]	13,3	17,8
Выход [вес. %]	90,2	90,1

- Как можно видеть, увеличение количества $\text{Ca}(\text{OH})_2$ от 10,6 до 14,0 моль на 10 кг общего содержания сухого вещества не оказывало влияния на выход высвобождаемого
- 25 масла. Добавление одинакового количества эквивалентов основания приводит к сходным хорошим результатам, как и в случае NaOH.

Пример 11. Дезмульгирование без ферментативной обработки клеток

Чтобы испытать значение ферментативной обработки клеток в отношении высвобождения масла, проводили испытания с применением ферментационных бульонов, которые после пастеризации не обрабатывали ферментативно, а непосредственно концентрировали путем выпаривания с принудительной циркуляцией до обеспечения общего содержания сухого вещества 32,8 вес. %. Испытания проводили в биореакторе с четырьмя 2-л перемешиваемыми сосудами BIOSTAT® B-DCU (Sartorius, Германия). Объем применяемых концентрированных суспензий составлял 1 л для каждого образца. В каждом испытании добавляли одинаковое общее количество эквивалента основания (6 вес. % NaOH на TDM, т. е. 15 моль NaOH на 10 кг TDM) и проводили дезмульгирование при 90°C в течение 24 часов при скорости мешалки 300 об./мин. Эквивалент основания добавляли в жидкой форме (20 вес. % раствор NaOH) за один раз в начале стадии дезмульгирования. Через 24 часа полученную композицию нейтрализовали путем добавления серной кислоты. После нейтрализации отбирали 50-г образец гомогенизированной суспензии и осуществляли отделение клеточного дебриса путем центрифугирования при 13500 g. Затем определяли количество EPA и ДНА в супернатанте.

Оказалось, что неожиданно даже без предварительной ферментативной обработки клеток можно получать довольно хорошие показатели выхода, составляющие приблизительно 80%, если обеспечивать соответствующее количество общего содержания сухого вещества и применять соответствующее количество эквивалентов основания в ходе дезмульгирования.

Пример 12. Непрерывное дезмульгирование с применением нагреваемого реактора колонного типа

Для проведения способа дезмульгирования в непрерывном режиме в лабораторном масштабе было предоставлено следующее оборудование.

- a) Питательный бак с концентрированным лизированным бульоном, полученным в соответствии с примером 1, который характеризуется содержанием TDM, составляющим приблизительно 35 вес. %. Питательный бак нагревали до 90°C.
- b) Бак с NaOH, содержащий водный раствор NaOH (20 вес. % NaOH в воде).

с) Реактор колонного типа с теплообменной рубашкой и объемом 0,3 литра, где стеклянные гранулы расположены у впускного отверстия реактора колонного типа для имитации статического смесителя, и где реактор колонного типа нагревают до 90°C.

Эксперимент проводили следующим образом: концентрированный лизированный бульон подавали в реактор колонного типа с подаваемым потоком, составляющим 1,25 г/мин. Раствор NaOH подавали в пластиковую трубку, содержащую подаваемый бульон, незадолго до поступления на стеклянные гранулы у впускного отверстия реактора колонного типа с подаваемым потоком, составляющим 0,13 г/мин., так что бульон и основание тщательно перемешивались, после чего поступали в реактор колонного типа, в результате подаваемый поток составлял 1,38 г/мин., что соответствовало объемному потоку, составляющему 1,25 мл/мин., и времени пребывания в гидродинамических условиях, составляющему 4 часа.

После выхода из реактора колонного типа образцы отбирали и нейтрализовали до pH 6,5 путем добавления разбавленной серной кислоты (20 вес. % серной кислоты в воде) в разные моменты времени. Затем нейтрализованную суспензию центрифугировали для отделения легкой фазы, содержащей масло, от водной фазы и затем определяли количество выделенного масла.

Таблица 10. Выход выделенного масла в разные моменты времени с использованием времени пребывания в гидродинамических условиях, составляющего 4 часа

Длительность процесса [ч.]	4	20	27	44	51	68	75
Выход [вес. %]	84,8	88,9	84,7	89,7	87,9	90,5	85,7

Экспериментальные данные демонстрируют, что со временем пребывания в гидродинамических условиях, составляющим 4 часа, с течением времени можно обеспечивать постоянный достаточно эффективный выход масла (в среднем 88 вес. %), если деэмульгирование проводят в проточном реакторе непрерывного типа.

Формула изобретения

1. Способ выделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), из биомассы, предусматривающий следующие стадии:
- а) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий виды PUFA;
- б) необязательно лизирование клеток биомассы;
- в) концентрирование суспензии до общего содержания сухого вещества (TDM), составляющего от 20 до 60 вес. %, если суспензия характеризуется более низким TDM;
- г) добавление в целом от 7,5 до 25 моль, предпочтительно от 8,5 до 22 моль, в частности, от 10 до 20, более предпочтительно от 11 до 18, предпочтительнее всего от 12 до 17 моль эквивалента основания к 10 кг общего содержания сухого вещества, содержащегося в суспензии;
- д) подача в реактор непрерывного действия суспензии со временем пребывания в гидродинамических условиях от 2 до 36 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов, более предпочтительно от 2 до 12 часов, предпочтительнее всего от 2 до 6 часов, при температуре от 20°C до 100°C, предпочтительно от 25, 30, 40, 50 или 60°C до 100°C, более предпочтительно от 65°C до 95°C, в частности, от 70 до 90°C;
- е) отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис.
2. Способ по п. 1, где на стадии (д) путем добавления эквивалентов основания значение pH суспензии регулируют в диапазоне от 8 до 11,5, предпочтительно от 9 до 11.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где суспензию смешивают с эквивалентами основания в статическом смесителе, при этом статический смеситель образует часть реактора непрерывного действия или расположен непосредственно перед реактором непрерывного действия.
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где основание, которое добавляют на стадии (д), выбрано из гидроксидов, в частности, гидроксида натрия, гидроксида лития,

гидроксида калия и/или гидроксида кальция, и/или карбонатов, в частности, карбоната натрия, карбоната калия и/или карбоната магния, и/или бикарбонатов, в частности, бикарбоната лития, бикарбоната натрия и/или бикарбоната калия, где гидроксид натрия является предпочтительным, и где основание предпочтительно представлено в виде водного раствора.

5
10 5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где значение pH суспензии, выходящей из реактора непрерывного действия, регулируют в диапазоне от 5,5 до 8,5, предпочтительно от 6,0 до 8,0, перед проведением отделения легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис, в случае если суспензия, выходящая из реактора непрерывного действия, характеризуется значением pH за пределами данного диапазона.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где реактор непрерывного действия на стадии (e) представляет собой реактор колонного типа, трубчатый реактор или реактор идеального вытеснения.

15 7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где отделение легкой фазы, содержащей липиды, от тяжелой фазы, содержащей воду и клеточный дебрис, на стадии (f) проводят с помощью механических средств, в частности, путем центрифугирования или фильтрации.

20 8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где концентрирование суспензии на стадии (b) проводят путем выпаривания воды при температуре не выше 100°C, предпочтительно от 70°C до 100°C, более предпочтительно от 80°C до 90°C, предпочтительно в выпарном аппарате с принудительной циркуляцией.

25 9. Способ по любому из пп. 1-7, где суспензия, полученная на стадии (a), уже характеризуется общим содержанием сухого вещества, составляющим от 20 до 60 вес. %, предпочтительно от 25 до 60 вес. %, более предпочтительно от 30 до 55 вес. %.

30 10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где для лизирования клеток не применяют солей или применяют лишь малые их количества, где термин «малые количества» предпочтительно означает, что соли добавляют в количестве менее 0,1 г/л ферментационного бульона.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где для лизирования клеток не применяют органических растворителей или применяют лишь малые их количества, где термин «малые количества» предпочтительно означает, что органические растворители добавляют в количестве менее 0,1 г/л ферментационного бульона.
- 5 12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лизирование клеток биомассы осуществляют ферментативно, механически, химически и/или физически.
13. Способ по любому из пп. 1-8, где стадии (с) – (f) проводят без предварительного лизирования клеток биомассы.
14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где суспензию получают в виде
10 ферментационного бульона, предпочтительно с плотностью биомассы, составляющей по меньшей мере 80, 100, 120 или 140 г/л.
15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где клетки, которые содержат липид, содержащий PUFA, выбраны из водорослей, грибов, простейших, бактерий, микроводорослей, растительных клеток и их смесей, где микроводоросли
15 предпочтительно выбраны из царства Stramanopiles, в частности семейства Thraustochytrids, предпочтительно рода Schizochytrium.