

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039406**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.01.24**

(21) Номер заявки  
**201792301**

(22) Дата подачи заявки  
**2003.06.20**

(51) Int. Cl. *C12P 7/64* (2006.01)  
*A23D 9/02* (2006.01)  
*A23L 33/115* (2016.01)  
*A23L 31/15* (2016.01)

---

(54) **СПОСОБ ПАСТЕРИЗАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И МАСЛА ИЗ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК**

---

(31) **02254262.5; 02258713.3**

(32) **2002.06.19; 2002.12.18**

(33) **EP**

(43) **2018.12.28**

(62) **201100701; 2003.06.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДСМ Ай Пи ЭССЕТС Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:  
**Схап Альберт, Веркулин Данил (NL)**

(74) Представитель:  
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.  
(RU)**

(56) WO-A2-1997037032  
EP-A1-0522470  
EP-A1-1178103  
RU-C1-2120998

---

(57) Раскрывается усовершенствованный способ пастеризации для пастеризации микробных клеток. Способ включает три стадии: первую стадию нагревания, вторую стадию плато, на которой клетки выдерживают при (максимальной и) постоянной температуре, и третью стадию охлаждения. Обе стадии нагревания и охлаждения являются быстрыми при нагревании клеток от 40 до 80°C в течение не более 30 мин на стадии нагревания. Скорость нагревания составляет по меньшей мере 0,5°C/мин и во время охлаждения по меньшей мере -0,5°C/мин. Максимальная температура на стадии плато составляет от 70 до 85°C. При представлении протокола пастеризации в виде графика зависимости времени (t, мин) от температуры (T, °C) получают трапецию, имеющую площадь менее 13000°C·мин. Это приводит не только к меньшим вложениям энергии (и таким образом снижению затрат), но также к лучшему качеству (и менее окисленному) масла, имеющему значение перекисного числа (POV) менее 1,5 и значение анизидинового числа (AnV) менее 1,0.

---

**B1**

**039406**

**039406  
B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к способу пастеризации микробных клеток, который включает нагревание клеток при температуре в пределах от 40 до 70°C не более чем в течение 30 мин. Скорость нагревания во время проведения способа пастеризации может составлять по меньшей мере 0,5°C/мин. Способ пастеризации может включать три стадии, а именно стадию нагревания, стадию плато (где клетки выдерживают при постоянной температуре) и стадию охлаждения. Если представить протокол пастеризации графически, то площадь под кривой зависимости времени (в минутах) от температуры (°C) составляет меньше 13000°C-мин. После пастеризации можно экстрагировать полиненасыщенную жирную кислоту (PUFA), такую как арахидоновая кислота, или масло из микробных клеток. Масло может иметь низкое значение перекисного числа (POV) и/или низкое значение анизидинового числа (AnV).

Введение.

Полиненасыщенные жирные кислоты, или PUFA, распространены в природе, и самые разнообразные PUFA продуцируются различными одноклеточными микроорганизмами (водорослями, грибами и т.д.). Одной особенно важной PUFA является арахидоновая кислота (ARA), которая представляет одну из ряда полиненасыщенных кислот с длинной цепью (LC-PUFA). В химическом отношении арахидоновая кислота представляет собой цис-5,8,11,14-эйкозатетраеновую кислоту (20:4) и относится к семейству (n-6) LC-PUFA.

Арахидоновая кислота является одним из основных предшественников самых разнообразных биологически активных веществ, известных под общим названием эйкозаноиды, группы, включающей простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Также арахидоновая кислота является одним из компонентов липидной фракции женского молока, и полагают, что она является необходимой для оптимального развития нервной системы младенцев. Арахидоновая кислота имеет широкий ряд различных применений, включая применение в детских молочных смесях, продуктах питания и кормах для животных.

Заявка WO-A-97/37032 (Gist-Brocades) относится к получению PUFA-содержащего масла из пастеризованной биомассы микробных клеток. Однако не раскрывается быстрое нагревание до, или охлаждение от, температуры, при которой проводят пастеризацию.

Кроме того, не придается значения общему количеству энергии, используемой во время проведения способа пастеризации.

Обе заявки WO-A-00/15045 и WO-A-01/67886 относятся к применению грибов Mucorales при получении продуктов питания. Первый из данных документов относится к необходимости снижения содержания РНК перед включением клеток в продукты питания, и предлагается использовать стадию нагревания. Можно провести одну пастеризацию или тепловой шок. Во втором документе предлагается исключить проведение стадии нагревания в целях снижения содержания РНК и заменить на выдерживание клеток грибов в ферментере и "созревание".

Международная заявка на патент № PCT/EP01/08902 относится к способу получения масляных смесей объединением неочищенного  $\omega_6$  и неочищенного  $\omega_3$ , содержащего PUFA масла, с получением масляной смеси и затем очисткой неочищенной смеси масел.

Известны способы, включающие нагревание биомассы или микробных клеток. Также известно из заявки № WO-A-97/37032, что микробные клетки можно пастеризовать перед экстракцией из них PUFA в виде масла. Однако авторы настоящего изобретения установили, что с помощью нового способа пастеризации можно улучшить качество масла, которое экстрагируют из пастеризованных клеток. В частности, полученное масло в меньшей степени окисляет или окисляется и имеет низкие значения перекисного числа (POV) и/или анизидинового числа (AnV). Кроме того, заявители установили, что данный новый способ пастеризации является более эффективным, поскольку для его проведения требуется меньше энергии. Следовательно, способ является преимущественным, поскольку с его помощью можно не только улучшить качество масла, но и снизить его стоимость, поскольку требуются меньшие затраты энергии.

### Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет график зависимости температуры (°C) от времени (мин) для трех протоколов проведения пастеризации (А и С по изобретению, В представлен для сравнения);

фиг. 2 - график зависимости температуры (°C) от времени (мин) для пастеризации при трех различных температурных плато (40, 70 и 85°C);

фиг. 2 и 4 - графики зависимости значения AnV (и POV для фиг. 3) от времени (ч);

фиг. 5 - график зависимости POV (мэкв/кг) и AnV от температуры (°C) для пастеризации при двух значениях времени (выдерживания/плато) (8 и 300 с);

фиг. 6 и 7 - графики зависимости температуры (°C) от времени (мин) при двух значениях времени (выдерживания/плато) (8 с - для фиг. 6, 5 мин - для фиг. 7) при пяти различных значениях температуры (60, 80, 100, 120 и 140°C).

### Описание изобретения

Следовательно, изобретение обеспечивает усовершенствованный способ пастеризации микробных клеток. Помимо меньших затрат энергии способ пастеризации по изобретению позволяет получать продукт лучшего качества.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к способу пастеризации микробных клеток, где способ включает нагревание клеток при температуре (включающей) в пределах от 40 до (60°C или) 70°C в течение не более 30 мин или нагревание клеток со скоростью по меньшей мере 0,5°C/мин. Следовательно, данный аспект обеспечивает быстрое нагревание микробных клеток во время пастеризации, и подобная высокая скорость нагревания ранее не была раскрыта в данной области. Несмотря на то что в данной области представлены значения температуры пастеризации, не оценивается или не обсуждается скорость нагревания или тот факт, что данный параметр является важным, и относительно высокая скорость пастеризации может обеспечить преимущества. Фактически высокие значения скорости нагревания являются противоинтуитивными, поскольку можно ожидать, что они приводят к окислению или разрушению иным путем PUVA или масла, которое можно экстрагировать из клеток.

Второй аспект настоящего изобретения относится к способу пастеризации микробных клеток, где способ включает протокол пастеризации, включающий (по меньшей мере) три стадии. Они представляют собой: (первую) стадию нагревания, (вторую) стадию плато (при которой микробные клетки выдерживают при желаемой температуре или где клетки выдерживают при постоянной и/или максимальной температуре) и (третью) стадию охлаждения. Данный аспект изобретения относится к протоколу трехстадийной пастеризации. Если данный протокол представить в виде графика зависимости времени от температуры, то получится трапеция.

Третий аспект изобретения относится к способу пастеризации микробных клеток, где способ включает применение такого протокола пастеризации, что площадь под кривой зависимости времени (мин) от температуры (°C) составляет менее 13000°C·мин. На графике зависимости времени от температуры площадь представляет количество энергии, затрачиваемой на нагревание клеток во время проведения способа пастеризации. Было установлено, что быстрое нагревание и/или быстрое охлаждение (которые соответствуют первой и третьей стадиям второго аспекта, соответственно) могут обеспечить преимущества такие, как лучшее качество масла. Кроме того, количество энергии, необходимой для проведения способа пастеризации, можно снизить по сравнению со способами пастеризации, описанными в данной области. Следовательно, данный третий аспект относится к затрате энергии, необходимой для проведения способа пастеризации.

Четвертый аспект изобретения относится к способу пастеризации микробных клеток, где способ включает (нагревание клеток и далее) выдерживание клеток при повышенной температуре ( $T$ , °C) в течение времени ( $t$ , мин), например на стадии плато, где значение произведения  $tT$  (т.е. умножение параметров времени и температуры, например во время стадии плато) находится в пределах от 140 до 100800°C·мин. Как очевидно, понятно, что данный четвертый аспект аналогичен второму аспекту в том отношении, что он включает стадию плато. В данном случае клетки можно выдерживать при постоянной или максимальной температуре. Следовательно, произведение  $tT$  может представлять собой площадь под кривой зависимости времени от температуры для данной стадии плато.

Первый аспект - быстрое нагревание.

В данном аспекте клетки нагревают таким образом, что температура клеток изменяется от 40 до 70°C (или 60°C) в течение не более 30 мин (например, не более 15 мин). Предпочтительно время, необходимое для нагревания от 40 до 70°C, занимает не более 40-50 мин. Альтернативно или дополнительно клетки нагревают со скоростью по меньшей мере 0,5°C/мин. Конечно, микробные клетки могут стартовать (или начать нагреваться) при температуре ниже 40°C. Например, клетки могут находиться при комнатной или окружающей температуре. Клетки могут находиться при температуре ферментации такой, как 30±5°C. Таким образом, клетки могут находиться при температуре в пределах от 20 до 40°C такой, как 23-27°C (или от 25-29°C до 32-37°C), когда начинается нагревание (пастеризация). В некоторых случаях микробные клетки можно охладить, например, после окончания ферментации. Таким образом, клетки могут иметь (на старте) температуру в пределах от 5 до 10°C, например от 7 до 9°C, когда начинается нагревание.

Микробные клетки можно нагревать таким образом, чтобы их температура была выше (60°C или) 70°C. Таким образом, это значение может быть не конечной температурой микробных клеток во время пастеризации. Фактически клетки можно нагревать до температуры выше (60°C или) 70°C. Температура может повышаться до значения в пределах от 70 до 90°C, 110 или 130°C, например от 75 до 87°C и оптимально от 78 до 84°C. Следовательно, максимальная температура во время пастеризации может находиться в данных пределах, но для некоторых воплощений может достигать 100, 120 или 140°C. Предпочтительно, клетки поддерживаются или выдерживаются при данной (максимальной) температуре.

Следовательно, очевидно понятно, что клетки можно нагревать при температуре ниже или начиная от 40°C до температуры 70°C или выше. Пределы от 40 до 70°C могут обеспечить "выстрел" в более широком пределе значений температуры нагревания, для которого можно (и, следовательно, рассчитать) определить период времени (и, следовательно, скорость).

Можно рассчитать, что нагревание (от 40 до 70°C в течение 30 мин) соответствует скорости 1°C/мин. Однако скорость может быть несколько ниже, чем это требуется, и в первом аспекте быстрое нагревание означает, что скорость нагревания является выше 0,5°C/мин. Предпочтительно скорость со-

ставляет по меньшей мере 0,6, 1,0 или даже 1,5°C/мин. Однако предусматриваются особенно высокие значения скорости нагревания в зависимости от оборудования и объема, или массы микробных клеток, которые подвергаются нагреванию. Так, значения скорости нагревания выше 2,0 или даже 2,5°C/мин также находятся в объеме изобретения.

Особенно высокие значения скорости нагревания можно получить с использованием специального оборудования. Оно позволяет достичь высокой температуры в короткий период времени и таким образом свести до минимума любое окисление или разрушение PUFA, или масла из микробных клеток, которые затем можно выделить. Так, может иметь место нагревание до максимальной температуры, равной 140, 150 или даже 160°C. Предпочтительно нагревание проводят до температуры от 100 до 180°C, например от 120 до 160°C, предпочтительно от 130 до 150°C. При использовании быстрых нагревателей данные значения температуры можно обеспечить особенно быстро, например, в течение менее одной минуты (30 с). Подобных значений температуры можно достичь в течение 20, 30, 40 и 50 с или обеспечить в течение 150, 175, 200, 225 или 250 с. Однако данных значений температуры можно достичь так очень быстро, например в течение 2, 4, 6, 8 или 10 с, например при использовании инфузионного нагревателя или при использовании относительно небольших проб. Таким образом, можно достичь значений скорости нагревания до 50, 100, 150 и даже 200°C в мин. Также возможны несколько меньшие значения скорости нагревания от 5-10°C до 50-60°C в мин, например от 15 до 45°C в мин.

Было установлено, что подобное быстрое нагревание во время быстрой пастеризации является не только более эффективным и требующим меньших затрат энергии, но оказалось, что оно является по меньшей мере одним фактором, ответственным за получение масла из микробных клеток лучшего качества (при экстракции из клеток после пастеризации).

Второй аспект - протокол трехстадийной пастеризации.

Первой стадией может быть стадия нагревания. Она фактически соответствует быстрому нагреванию, описанному в первом аспекте изобретения, и, следовательно, все признаки и характеристики первого аспекта применимы к первой стадии (нагреванию) второго аспекта с соответствующими, необходимыми изменениями.

Второй стадией является период, когда клетки находятся на плато (при температуре). Так, клетки можно выдерживать при определенной желаемой температуре (с допуском плюс или минус 1, 2, 5 или даже 10°C) для желаемого периода времени. Таким образом, клетки выдерживают при постоянной температуре. Предпочтительно данная температура (или пределы температуры) на стадии плато является максимальной температурой, достигаемой во время пастеризации. Температура на стадии плато (и/или максимальная температура во время пастеризации) предпочтительно составляет по меньшей мере 70°C. Она может быть ниже 90 или 100°C, преимущественно в пределах от 70 до 85°C, например от 70 до 77°C. Альтернативно она может находиться в пределах 80-160°C, например 100-140°C.

Продолжительность стадии плато или период времени, при котором клетки выдерживают при желаемой или максимальной температуре, может составлять от 5 с до 90 мин, например от 1 или 10 до 80 мин, например от 20 до 70 мин. Оптимально данный период времени составляет от 40 или 50 до 60 или 70 мин, например от 45 до 65 мин, преимущественно от 55 до 63 мин. Также возможны короткие периоды времени от 8 с до 5 мин.

Третьей стадией является стадия охлаждения. Предпочтительно клетки охлаждают до температуры, которая является аналогичной или находится в пределах, указанных для начала нагревания (или первой стадии). Предпочтительно микробные клетки охлаждают и/или нагревают линейно (на первой и/или третьей стадиях соответственно), т.е. при построении графика зависимости времени от температуры режим охлаждения или нагревания представляет (примерно) прямую линию. Клеткам дают возможность охладиться, или их можно охладить активно, например, при использовании теплообменника или охлаждающих веществ, например (понижая) до окружающей температуры или комнатной температуры, или ниже.

Предпочтительно скорость охлаждения составляет по меньшей мере 0,4, 0,6, 1,0 или 1,5°C/мин. Данные значения представляют достижимые скорости охлаждения, когда клеткам самим дают возможность охладиться. Однако возможны более высокие значения скорости охлаждения, особенно, если применяется активное охлаждение. Так, являются достижимыми скорости охлаждения, равные по меньшей мере 2,0, 2,5, 3,0 и даже 3,5°C/мин. Однако возможны более высокие значения скорости охлаждения, такие как выше 5°C/мин, например от 7 или 10°C/мин до 50 или 60°C/мин, предпочтительно от 15 до 45°C/мин.

Предпочтительная скорость нагревания и/или охлаждения предпочтительно поддерживается по меньшей мере на уровне 10, 20 или 30°C/мин, хотя в некоторых воплощениях ее можно достичь по меньшей мере в пределах от 40 до 50°C/мин.

Очевидно, понятно, что при быстрой стадии нагревания и быстрой стадии охлаждения количество энергии, используемой при пастеризации, уменьшается. Данное обстоятельство приводит не только к экономии затрат, но также может не оказывать отрицательного влияния на качество (конечное) масла из микробных клеток, фактически оно оказывает положительное действие на масло.

Третий аспект - площадь под кривой зависимости времени от температуры (затраты энергии).

Из второго аспекта становится очевидным, что, если протокол пастеризации по изобретению пред-

ставить в виде графика зависимости времени от температуры, то он имеет форму трапеции. Первая (нагревание) и третья (охлаждение) стадии могут быть треугольной по форме, в то время как средняя или вторая (плато) стадия (предмет четвертого аспекта) представляет (как правило) прямоугольник. Площадь под кривой зависимости времени от температуры представляет количество энергии, вложенной в систему. При разделении протокола пастеризации на три части можно высчитать площадь графика и, следовательно, затраты энергии.

В третьем аспекте площадь под кривой зависимости времени (в мин) от температуры (в °C) составляет ниже 13000°C·мин. Однако достигаются значения ниже и возможны значения ниже 11000, 10000, 9000, 8000 и даже 1000°C·мин. В предпочтительных аспектах изобретения данные значения могут составлять не более 7000, 6000 или 800°C·мин. На представленном графике время отложено на оси x (или горизонтальной оси, или абсциссе), и 0°C представляет исходную точку. Температура, следовательно, будет откладываться на оси y (или вертикальной оси, или ординате), и 0°C представляет исходную точку.

После нагревания микробных клеток до температуры пастеризации они могут охладиться сами (или их можно охладить). Как правило, клетки охлаждаются до комнатной или окружающей температуры или по меньшей мере до температуры ниже 30°C. Следовательно, имеется период времени не только для нагревания клеток до температуры в пределах от 30 до 60°C, но также период времени для охлаждения клеток от 60 до 30°C. Можно суммировать два периода времени для получения общего периода нагревания и охлаждения в пределах 30-60°C и обратно до 30°C. Предпочтительно данный общий период времени составляет менее 150 мин, например менее 120 или 100 мин. Однако при меньших пробах можно достичь более коротких периодов времени, и общий период времени (от 30 до 60°C и обратно до 30°C) может составлять менее 70, 50 и даже 30 мин.

Четвертый аспект - протокол пастеризации со стадий плато.

Данный протокол может быть одним по второму аспекту, где имеется (например, первая) стадия нагревания и (например, вторая) стадия охлаждения и средняя стадия плато (например, вторая или средняя, или промежуточная). Однако это не является обязательным, и предусматриваются для включения другие протоколы пастеризации. Четвертый аспект относится к предпочтительным признакам данной стадии плато. Все признаки и характеристики второго (и других) аспектов относятся к четвертому аспекту с соответствующими, необходимыми изменениями.

Все клетки поддерживают и выдерживают при определенной желаемой температуре (с допуском плюс или минус 1, 2, 5 или даже 10°C) для температуры (T, °C) в течение времени (t, мин). Данные два параметра можно перемножить с получением произведения tT. Оно преимущественно составляет от 140 или 280 до 50000 или 100800°C·мин. Предпочтительно данное произведение равняется от 500, 1000, 2000 или 3000 или даже 6000 до 10000, 18000 или 25000°C·мин. Оптимальное значение произведения tT находится в пределах от 2000 до 6000, например от 3000 до 5000, оптимально от 4000 до 4500°C·мин. В некоторых воплощениях произведение tT составляет от 13 до 900, например от 100 или 200 до 700 или 800, оптимально от 300 или 400 до 600 или 700°C·мин.

Таким образом, аналогично третьему аспекту, понятно, что произведение tT представляет собой площадь под кривой зависимости времени от температуры клеток при их выдерживании при повышенной температуре. Таким образом, произведение tT фактически представляет площадь под кривой только для стадии плато (но не стадии нагревания или охлаждения).

Экстракция PUFA.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к способу получения PUFA из микробных клеток, где способ включает пастеризацию клеток по одному из первого, второго, третьего или четвертого аспектов изобретения, описанных ранее, и экстракцию и/или выделение PUFA из пастеризованных клеток.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к маслу из микробных клеток, которое может содержать по меньшей мере 40% арахидоновой кислоты (ARA) и/или может иметь содержание триглицеридов, равное по меньшей мере 90%. Масло может иметь значение POV менее 2,5, 1,5, 0,8, 0,6 или даже 0,5, и/или значение AnV менее 1,0. Масло готовят способом по пятому аспекту.

Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA) и масла из микробных клеток.

PUFA может представлять собой одну PUFA или две, или более различных PUFA. Каждая PUFA может происходить из семейства n-3 или n-6. Предпочтительно это C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> или C<sub>22</sub> PUFA. Она может представлять собой PUFA по меньшей мере с 18 атомами углерода и/или по меньшей мере с 3 или 4 двойными связями. PUFA можно обеспечить в виде свободной жирной кислоты, соли, в виде эфира жирной кислоты (например, метилового или этилового эфира), в виде фосфолипида и/или в виде моно-, ди- или триглицерида.

Подходящие (n-3 и n-6) PUFA включают

докозагексаеновую кислоту (DHA, 22: 6 Ω 3), соответственно из водорослей или грибов, таких как (динофлагеллаты) *Syngnathodinium* или (грибы) *Thraustochytrium*;

γ-линоленовую кислоту (GLA, 18:3 Ω 6);

α-линоленовую кислоту (ALA, 18:3 Ω 3);

конъюгированную линоленовую кислоту (октадекадиеновую кислоту, CLA);

дигомо- $\gamma$ -линоленовую кислоту (DGLA, 20:3  $\Omega$  6);  
 арахидоновую кислоту (ARA, 20:4  $\Omega$  6); и  
 эйкозапентаеновую кислоту (EPA, 20:5  $\Omega$  3).

Предпочтительные PUFA включают арахидоновую кислоту (ARA), докозагексаеновую кислоту (DHA), эйкозапентаеновую кислоту (EPA) и/или  $\gamma$ -линоленовую кислоту (GLA). В частности, ARA является предпочтительной.

PUFA могут продуцироваться клетками, пастеризованными способом по изобретению, такими как микробные клетки. Последние могут представлять собой бактерии, водоросли, грибы или дрожжи. Грибы являются предпочтительными, предпочтительно порядка Mucorales, например *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Pythium* или *Entomophthora*. Предпочтительным источником ARA является *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* или *Pythium insidiosum*. Водоросли могут представлять собой динофлагеллаты и/или включают *Porphyridium*, *Nitzschia* или *Cryptocodinium* (например, *Cryptocodinium cohnii*). Дрожжи включают таковые, относящиеся к родам *Pichia* или *Saccharomyces*, такие как *Pichia ciferrii*. Бактерии могут быть представителями рода *Propionibacterium*. Масло из микробных клеток может быть жидким (при комнатной температуре).

Предпочтительно, чтобы большая часть PUFA находилась в виде триглицеридов. Так, предпочтительно, чтобы по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60% или оптимально по меньшей мере 70% PUFA находилось в виде триглицеридов. Однако количество триглицеридов может быть выше, например, оно может составлять по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, оптимально по меньшей мере 95 или 98% масла. Из данных триглицеридов, предпочтительно, чтобы по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 50% и оптимально по меньшей мере 60% PUFA находилось в  $\alpha$ -положении глицерина (находящегося в скелете триглицерида), также известного как 1- или 3-положение. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 30%, оптимально по меньшей мере 40% PUFA находилось в  $\beta$  (2)-положении.

Масло из микробных клеток может содержать по меньшей мере 10, 35, 40 или 45% или более желаемой PUFA, такой как арахидоновая кислота. Оно может иметь содержание триглицеридов по меньшей мере 90%. Предпочтительно масло из микробных клеток имеет содержание триглицеридов в пределах от 90 до 100%, например по меньшей мере 96%, предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% и оптимально выше 99,5%. Как правило, масло из микробных клеток будет иметь содержание эйкозапентаеновой кислоты (EPA) ниже 5%, предпочтительно ниже 1% и более предпочтительно ниже 0,5%. Масло может иметь содержание каждой  $C_{20}$ ,  $C_{20:3}$ ,  $C_{22:0}$  и/или  $C_{24:0}$  полиненасыщенной жирной кислоты (PUFA) на уровне менее 5%, менее 2%, менее 1%. Содержание свободных жирных кислот (FFA) может составлять  $\leq 0,4$ , 0,2 или 0,1. Масло может включать незначительно или совсем не включать GLA и/или DGLA.

Масло из микробных клеток может быть неочищенным маслом. Его можно экстрагировать из клеток с использованием растворителя, такого как двуокись углерода в сверхкритическом состоянии, гексан или изопропанол.

Способ пастеризации.

Как правило, пастеризацию проводят после окончания ферментации. В предпочтительном воплощении пастеризация будет завершать ферментацию, поскольку тепло во время пастеризации будет приводить к гибели клеток. Следовательно, пастеризации можно подвергать ферментационный бульон (или клетки в жидкой (водной) среде), хотя ей можно подвергать микробную биомассу, полученную из бульона. В последнем случае пастеризация может иметь место, пока еще микробные клетки находятся в ферментере. Предпочтительно пастеризация имеет место перед любой последующей обработкой микробных клеток, например грануляционным измельчением (например, экструзией) или замешиванием.

Предпочтительно протокол пастеризации является достаточным для ингибирования или инактивации одного или более ферментов, которые могут оказывать отрицательное влияние или разрушать PUFA или масло из микробных клеток, например липазы.

По окончании ферментации ферментационный бульон можно профильтровать или обработать иначе для удаления воды или водной жидкости. После удаления воды можно получить плотный осадок из биомассы. Если пастеризация не имела места, то затем обезвоженные клетки (или плотный осадок из биомассы) можно подвергнуть пастеризации.

Способ экстракции PUFA.

Затем можно экстрагировать PUFA (или масло, как правило, содержащее PUFA) из (пастеризованных) микробных клеток. Предпочтительно его экстрагируют из (например, высушенных) гранул (например, экструдатов), содержащих клетки. Экстракцию можно проводить с использованием растворителя. Предпочтительно используют неполярный растворитель, например  $C_{1-8}$ , предпочтительно  $C_{2-6}$  алкан, например гексан. Можно применять двуокись углерода (в жидкой форме, например, в сверхкритическом состоянии).

Предпочтительно растворителю дают просочиться через высушенные гранулы. Подходящие методы грануляции и экструзии микроорганизмов и последующая экстракция масла из микробных клеток,

содержащего PUFA, описана в заявке WO-A-97/37032.

Растворителем извлекают неочищенное масло, содержащее PUFA. Данное масло можно использовать в таком состоянии без дополнительной обработки, или его можно подвергнуть одной или более стадиям рафинирования. Однако, как правило, неочищенное масло содержит растворитель, такой как растворитель, используемый для экстракции масла (например, гексан или спирт, такой как изопропиловый спирт), или масло, не подвергнутое одной (или предпочтительно всем) последующей стадии рафинирования. Подходящие методы рафинирования описаны в заявке на международный патент № PCT/EP01/08902 (содержание данного документа и всех других, представленных здесь, включено здесь в виде ссылки). Например, масло можно подвергнуть одной или более стадиям рафинирования, которые могут включать обработку кислотой или дегуммирование, обработку щелочью или удаление свободных жирных кислот, отбеливание или удаление пигментов, фильтрацию, фракционирование охлаждением (или охлаждение, например, для удаления насыщенных триглицеридов), дезодорацию (или удаление свободных жирных кислот) и/или осветление фильтрованием (или удаление нерастворимых в масле веществ). Все данные стадии очистки описаны подробнее в PCT/EP01/08902 и их можно применять на стадиях, описанных в настоящей заявке с соответствующими, необходимыми изменениями.

Полученное масло особенно подходит для пищевых целей, и его можно добавлять к продуктам питания (для человека) или кормам (для животных). Примеры включают молоко, детские молочные смеси, лечебные напитки, хлеб и корм для животных.

Микробные клетки.

Клетки микробов (или микроорганизмов), используемые в настоящем изобретении, могут быть любыми из описанных ранее, особенно в разделе, посвященном PUFA и маслам из микробных клеток. Они могут включать, или способны продуцировать, PUFA или масло, и соответственно содержащее PUFA масло можно экстрагировать или выделить из клеток. Они могут находиться в нитчатной форме, как грибы или бактерии, или в виде единичных клеток, подобно дрожжам, водорослям и бактериям. Клетки могут включать микроорганизмы, такие как дрожжи, грибы, бактерии, или водоросли. Предпочтительными грибами являются таковые, относящиеся к порядку Mucorales, например, гриб может представлять таковой родов *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* или *Aspergillus*. Предпочтительными грибами являются виды *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* и *Aspergillus terreus*.

В отношении дрожжей, то предпочтительно они представляют таковые, относящиеся к родам *Pichia* (например, вид *Pichia ciferrii*) или *Saccharomyces*.

Бактерии могут быть представителями рода *Propionibacterium*.

Если клетки происходят из водорослей, то предпочтительно это динофлагеллаты, и/или они относятся к роду *Cryptocodinium*. Предпочтительными являются водоросли вида *Cryptocodinium cohnii*.

Нагревание.

Его можно проводить нагреванием (клеток) непосредственно или опосредованно. Если нагревание является непосредственным, то его можно проводить пропуском пара в ферментер. При опосредованном способе можно воздействовать на среду посредством теплообменника, стенок ферментера или нагревательных спиралей, или внешнего теплообменника, такого как пластинчатый теплообменник.

Как правило, пастеризация имеет место в ферментере, в котором проводят ферментацию. Однако для некоторых микроорганизмов (таких как бактерии) часто является предпочтительным вначале удалить клетки из резервуара и затем проводить пастеризацию. Пастеризация может иметь место перед другими обработками микроорганизмов, например высушиванием или грануляцией.

В результате пастеризации, как правило, погибает большая часть или, если не все, микроорганизмы. После пастеризации погибает по меньшей мере 95, 96 или даже 98% всех микроорганизмов, т.е. которые становятся нежизнеспособными.

Подкисление.

В некоторых случаях желательно уменьшить риск роста пастеризованных клеток. При этом одной возможностью является подкисление клеток подходящей кислотой. Таким образом, для предупреждения роста микроорганизмов может быть желательным довести клетки до значения pH в пределах 3-4. Однако можно использовать более широкие пределы pH в зависимости от клеток и, таким образом, pH можно довести до 2-5, оптимально до предела примерно от 3,3 до 3,7.

Подкисление клеток можно проводить перед пастеризацией. Однако предпочтительно проводить его после.

Значение pH можно установить любыми способами или любой подходящей кислотой. Предпочтительно проводить его с использованием фосфорной кислоты, такой как 85%, или разбавленная 55% или 33% фосфорная кислота.

Перекисное число (POV).

Предпочтительно значение POV масла из микробных клеток находится в пределах от 4 до 8 или 12, особенно для неочищенного масла. Однако POV может быть не более 3,0, 2,5 или 2,0. Однако можно получить значительно более низкие значения POV при использовании способа по изобретению, и данные значения могут быть ниже 1,5 или ниже 1,0. Можно получить значения ниже 0,8 или 0,6 и даже ниже 0,4. Значения POV (из воплощений) находятся в пределах от 1,3 (или 0,8) до 0,4. Перекисное число POV

обычно выражается в виде мэкв/кг.

Анизидиновое число (AnV).

Данное число является показателем содержания альдегидов. Предпочтительно значение анизидинового числа масла из микробных клеток составляет от 5, 6, 7 или 10 до 15, 20 или 25, особенно для неочищенного масла. Преимущественно AnV равняется не более 20, например не более 15. Оно может составлять не более 10 или даже не более 5. Предпочтительно значение POV и/или AnV относятся в большей мере к неочищенному маслу, чем рафинированному. Значения AnV (в предпочтительных примерах) находятся в пределах от 15 до 5, необязательно от 12 до 7.

Неочищенные масла по сравнению с рафинированными.

Некоторые различия между данными двумя маслами представлены ниже. Каждое неочищенное или рафинированное масло может иметь один или более признаков в последующей таблице соответственно для неочищенного или рафинированного масла. Как правило, неочищенное масло содержит антиоксидант (например, токоферол, аскорбилпальмитат)

| Соединение   | Предпочтительно<br>(для<br>неочищенного<br>масла) | Неочищенное<br>масло          | Рафинированное<br>Масло                              |
|--|---|-------------------------------|--|
| Неомыляющиеся<br>вещества                                      | $\leq 3,5\%$<br>(мас./мас)                        | 2,5%<br>(мас./мас)            | 1,8 (мас./мас)                                       |
| Растворитель<br>(например,<br>гексан)                          | $< 2000 \text{ млн}^{-1}$                         | 100-2000<br>$\text{млн}^{-1}$ | Не<br>детектируется<br>или $\leq 1 \text{ млн}^{-1}$ |
| Фосфолипиды, %   |   | 2-3,5                         | 0, 05  |
| Свободные<br>жирные кислоты,<br>такие как олеиновая<br>кислота | $< 1\%$   | 0,2%                          | 0,08%  |
| POV  | $\leq 10 \text{ мэкв/кг}$                         | 6 мэкв/кг                     | 1,4 мэкв/кг  |
| Нерастворимые<br>вещества                                      | $< 0,5\%$   | 0,1%                          | –  |
| Фосфор   | $< 1000 \text{ мг/кг}$                            | 5 мг/кг                       |  |
| Кремний  | $< 500 \text{ млн}^{-1}$                          | 100 $\text{млн}^{-1}$         | 24 $\text{млн}^{-1}$                                 |
| Мышьяк   | $< 0,5 \text{ мг/кг}$                             | $< 0,04 \text{ мг/кг}$        | $< 0,5 \text{ мг/кг}$                                |
| Кадмий   | $< 0,2 \text{ мг/кг}$                             | $< 0,02 \text{ мг/кг}$        | $< 0,1 \text{ мг/кг}$                                |
| Ртуть  | $< 0,4 \text{ мг/кг}$                             | $< 0,4 \text{ мг/кг}$         | $< 0,04 \text{ мг/кг}$                               |
| Свинец   | $< 0,1 \text{ мг/кг}$                             | $< 0,1 \text{ мг/кг}$         | $< 0,1 \text{ мг/кг}$                                |
| Медь   | $< 0,2 \text{ мг/кг}$                             | $< 0,2 \text{ мг/кг}$         | $< 0,02 \text{ мг/кг}$                               |
| Влага и летучие<br>вещества                                    | $< 1,0\%$   | 0,5                           | $< 0,02\%$   |
| Фосфатиды<br>(P/ $\text{млн}^{-1}$ )                           |   | 50-100                        | $< 10$   |

Соответственно неочищенное масло по настоящему изобретению может иметь один или более следующих признаков:

- (a) содержание неомыляющихся веществ от 2,0 до 3,5% (мас./мас.);
- (b) содержание растворителя (например, гексана) от 10, 50 или 100  $\text{млн}^{-1}$  до 1000, 1500 или 2000  $\text{млн}^{-1}$ ;
- (c) содержание свободных жирных кислот от 0,1 или 0,2 до 1%, например 0,2-0,6 или 0,3-0,5%;
- (d) значение POV от 2, 3, 4 или 6 до 10;
- (e) содержание фосфора по меньшей мере 2, 3 или 5 мг/кг;
- (f) содержание кремния от 50 или 100 до 500  $\text{млн}^{-1}$ ; и/или
- (g) содержание воды менее 1% или от 0,5 до 1 или 2%.

Применения масел и PUFA.

Шестой аспект изобретения относится к композиции, содержащей масло по пятому аспекту, и где является подходящим одно или более других (дополнительных) веществ. Композиция может представлять собой продукт питания и/или пищевую добавку для животных или людей. В воплощениях по изобретению, которые предназначены для потребления человеком, масла могут быть обеспечены как подходящие для потребления человеком, как правило, рафинированием или очисткой масла, полученного из микробных клеток.

Композиция может представлять собой детскую молочную смесь или продукт питания (для человека). В данном случае состав молочной смеси можно скорректировать таким образом, что она будет включать аналогичные количества липидов или PUFA, которые имеются в обычном женском молоке.



Это может включать смешивание масла из микробных клеток по изобретению с другими маслами для получения соответствующей композиции.

Композиция может представлять собой корм или добавку для животных и рыб. Подобные корма и добавки можно скармливать любым сельскохозяйственным животным, в частности овцам, крупному рогатому скоту и птице. Кроме того, корма или добавки можно скармливать водным организмам, предназначенным для разведения, например рыбам и панцирным водным животным. Таким образом, композиция может содержать одно или более кормовых веществ или ингредиентов для подобных животных.

Масло по изобретению можно продавать непосредственно как масло и в соответствующей упаковке, как правило, в разовых алюминиевых бутылках, покрытых изнутри эпоксифенольным лаком и продутых азотом. Масло может содержать один или более антиоксидантов (например, токоферол, витамин Е, пальмитат), каждый, например, в концентрации от 50 до 800 млн<sup>-1</sup>, например от 100 до 700 млн<sup>-1</sup>.

Подходящие композиции могут включать фармацевтическую или ветеринарную композиции, например, для перорального введения, или косметические композиции. Масло можно принимать как такое или можно инкапсулировать, например, в оболочку и, таким образом, оно может быть в виде капсул. Оболочка или капсулы могут содержать желатин и/или глицерин. Композиция может включать другие ингредиенты, например флаворанты (например, флаворанты с запахом и вкусом лимона и лайма), или фармацевтически приемлемый или приемлемый для ветеринарии носитель или наполнитель.

Предпочтительные признаки и характеристики одного аспекта изобретения применимы к другому аспекту с соответствующими, необходимыми изменениями.

Далее изобретение будет описано с помощью примеров при обращении к последующим примерам, которые представлены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения.

#### Пример 1.

Полагают, что окисление во время получения масла из микробных клеток, содержащего PUFA, происходит в результате ферментативной активности. Пастеризацию рассматривали в качестве способа, снижающего вероятность окисления во время обработки микробных клеток для получения из них масла. Было установлено, что степень стабилизации зависит от условий пастеризации.

Следовательно, проводили ряд опытов для определения того, какие условия пастеризации могут оказывать влияние на уровень окисления и, в частности, значение перекисного числа (POV) масла. Перекисное число определяли с использованием стандартной методики, подробно описанной в AOCS: Cd8-53.

При постановке опытов следовали следующему протоколу: ферментация, хранение, пастеризация, экстракция (масла из микробных клеток), анализ масла.

Грибы *Mortierella alpina* культивировали в ферментере. Ферментацию проводили в течение примерно 148 ч. *M. alpina* продуцировали PUFA, называемую арахидоновой кислотой (ARA). Биомассу извлекали из ферментера и хранили (при температуре ниже -18°C).

Пробы биомассы *M. alpina* отбирали из ферментационного бульона при ее сохранении в ферментере и сразу же замораживали.

Тестировали различные протоколы пастеризации. Пастеризацию проводили при трех различных значениях температуры, а именно 40, 70 и 85°C. Затем следовали три стадии с первой стадией быстрого нагревания с последующей стадией плато (второй или средней стадией) при желаемой температуре, которая была максимальной используемой температурой. Затем следовала стадия быстрого охлаждения (третья). Различные пробы биомассы находились на средней стадии (плато) в течение трех различных временных периодов, а именно 1, 2 и 24 ч.

После пастеризации получали масло из микробных клеток с использованием влажной экстракции. Данную пробу биомассы фильтровали, отжимали (под давлением) и экстрагировали масло.

Затем масло из микробных клеток анализировали, в основном определяли перекисное число (POV) с использованием метода AOCS. В некоторых пробах определяли содержание ARA. Результаты анализа показывали, что масло, полученное из микробных клеток, содержало примерно 420 г ARA на кг.

Подробный протокол: ферментации и экстракции проб.

1 л ферментационного бульона извлекали из ферментера и фильтровали (фильтр Зейтца, 2 л, F-FA10). Затем полученный осадок промывали 600 мл деминерализованной воды. Сырой осадок высушивали в течение 1 мин и затем отжимали (с использованием аппарата HAFICO™, тинктурный пресс C-OAO21, 300-400 атм) при 400 бар. Затем сырой экстракт использовали для экстракции масла из микробных клеток при помощи 500 мл гексана (Merck) при комнатной температуре (20-25°C) в течение 1 ч с использованием устройства Ultra Turrax™. Затем гексан сливали. Затем оставшийся осадок промывали 250 мл свежей порции гексана (при перемешивании в течение 30 мин) при комнатной температуре. Гексан сливали и затем добавляли к ранее используемой для экстракции порции гексана.

Затем экстракт фильтровали с использованием стеклянного фильтра в комбинации со стеклянным фильтром GFA. Затем гексан выпаривали с использованием аппарата Rotavapor™ из прозрачного экстракта примерно при 50°C в течение примерно 15 мин. Затем масло переносили в герметичные стаканы, и каждый стакан с пробой продували азотом в течение 30 с. Затем стаканы с пробами закрывали и хранили при -18°C.

### Протоколы пастеризации.

Тестировали три различных протокола (А, В и С). Каждый состоял из трех стадий, первой стадии нагревания, второй стадии плато (при максимальной температуре) и третьей стадии охлаждения. В табл. 1 представлены протоколы трех режимов пастеризации.

Таблица 1

|  | Время (t, мин) | Температура (Т, °С) на время (t) | Стадия                                   | Изменение температуры на стадии (°С) | Время на стадию (мин)                         | Площадь под кривой (°С-мин) | Скорость нагревания/охлаждения (°С/мин) | Время для прохождения 40°С/70°С (мин) | Объединенный период 40°С-70°С-40°С (мин) | Площадь под кривой зависимости t от Т (°С-мин) |
|--|----------------|----------------------------------|--|--------------------------------------|---|-----------------------------|---|---------------------------------------|--|--|
| Режим А  | 0              | 25                               | Нагревание<br>Пастеризация<br>Охлаждение | 45<br>0<br>45                        | t нагр.= 75<br>t пастер.= 60<br>t охл. = 75   | 1687,5<br>4200<br>1687,5    | 0,6<br>0<br>0,6                         | 50                                    | 100                                      | 7575   |
|  | 75             | 70                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  | 135            | 70                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  | 210            | 25                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
| Режим В<br>(вне объема изобретения, для сравнения) | 0              | 25                               | Нагревание<br>Пастеризация<br>Охлаждение | 48                                   | t нагр.= 102<br>t пастер.= 60<br>t охл. = 198 | 4896<br>4320<br>4752        | 0,46<br>0<br>0,22                       | 65,11                                 | 200,11                                   | 13968  |
|  | 102            | 72                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  |                |                                  |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  |                |                                  |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
| Режим С  | 0              | 7                                | Нагревание<br>Пастеризация<br>Охлаждение | 63<br>0<br>62                        | t нагр.= 25<br>t пастер.= 60<br>t охл. = 20   | 787,5<br>4200<br>620        | 2,52<br>0<br>3,10                       | 11,90                                 | 21,58                                    | 5607,5   |
|  | 25             | 70                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  | 85             | 70                               |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |
|  | 105            | 8                                |  |                                      |   |                             |   |                                       |  |  |

Дополнительно три режима пастеризации А, В и С представлены графически на фиг. 1. Очевидно, понятно, что можно рассчитать площадь под кривой зависимости температуры (Т, °С) от времени (t, мин) для каждой из трех стадий для каждого режима и затем суммировать с получением общей площади под кривой для каждого из трех режимов. Данные расчеты дополнительно приведены в табл. 1 выше.

Перекисное число (POV) определяли для масел, полученных в результате экстракции из клеток после проведения трех протоколов пастеризации А, В и С. Значения POV экстрагированных масел соответственно составляли 8,7, 14,3 и 2,4. Режим В имел низкую скорость нагревания и низкую скорость охлаждения, и его включали только для сравнения. В результате он дал наиболее высокое значение POV, равное 14,3.

В противоположность, оба режима А и С находились в объеме изобретения. Режим А имел более высокую скорость нагревания и скорость охлаждения на первой и третьей стадиях по сравнению с режимом В. Предпочтительно по изобретению скорости нагревания и охлаждения представляют по меньшей мере таковые, представленные для режима А. Режим А давал значение POV, равное 8,7.

Однако наилучшие результаты получали с режимом С, при котором значение POV составляло только 2,4. Как можно видеть из фиг. 1, в данном случае была очень быстрая стадия нагревания и быстрая стадия охлаждения (третья).

#### Пример 2.

Опыты проводили аналогично примеру 1, за исключением того, что значения температуры пастеризации находились в более широких пределах, а именно составляли 40°С (для сравнения), 70 и 85. Режим температуры (°С) в зависимости от времени (мин) представлен на фиг. 2 и в табл. 2 ниже. Кривая в основном одинакова для всех четырех проб, но, конечно, с увеличением плато пастеризации (от 1 до 4 или 24 ч) соответственно.

Таблица 2

| 40°С  |             | 70°С  |             | 85°С  |             |
|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| Время | Температура | Время | Температура | Время | Температура |
| 0     | 10,0        | 0     | 8,0         | 0     | 7,0         |
| 10    | 27,0        | 10    | 55,0        | 10    | 40,0        |
| 20    | 40,1        | 17    | 70,0        | 20    | 66,0        |
| 25    | 40,0        | 77    | 68,2        | 30    | 79,0        |
| 40    | 41,4        | 82    | 44,3        | 40    | 83,5        |
| 50    | 41,0        | 87    | 31,3        | 100   | 79,8        |
| 80    | 38,7        | 92    | 21,8        | 105   | 55,3        |
| 85    | 27,5        | 97    | 16,0        | 110   | 38,7        |
| 90    | 19,3        | 102   | 9,7         | 115   | 26,3        |
| 95    | 14,5        |       |             | 120   | 21,0        |
| 100   | 9,7         |       |             | 125   | 15,2        |
| 110   | 7,5         |       |             | 130   | 11,3        |

Тестировали пробы из двух различных ферментации (обе с *M.alpina*) различной продолжительности. Пробы № 11-20 в табл. 3 имели несколько более длительную ферментацию, где примерно 2 м<sup>3</sup> бульона переносили в инокуляционный ферментер и ферментацию проводили в течение 48 ч без дополнительного внесения глюкозы.

После пастеризации пробы обрабатывали, начиная с фильтрования под давлением азота примерно 1 бар. Затем полученный осадок промывали производственной водой (примерно 0,6 от начального объема

бульона). Обезвоживание проводили с использованием пресса для отжима фруктов под давлением поршня 300–400 бар. Затем добавляли 500 мл свежей порции гексана и перемешивали в течение 1 мин с использованием устройства Ultra Tugrax в течение 1 мин. Затем проводили экстракцию в течение 1 ч при комнатной температуре. После фильтрования полученный осадок промывали 250 мл свежей порции гексана и полученный растворитель выпаривали в вакууме при 60–70°C. Затем продували азотом и хранили при -18°C.

Результаты представлены в табл. 3, в которой показаны первое и второе значения перекисного числа и среднее из данных двух значений, а также значение анизидинового числа (AnV). На фиг. 3 и 4 также показано уменьшение POV и AnV (соответственно для более короткой и более продолжительной ферментации).

Таблица 3

| Номер пробы | Температура пастеризации (°C) | Время пастеризации (ч) | POV1 | POV2 | POV <sub>средн.</sub> | AnV  |
|-------------|-------------------------------|------------------------|------|------|-----------------------|------|
| 1           | -                             | 0                      | 6,0  | 5,4  | 5,7                   | 25,7 |
| 2           | 40                            | 1                      | 8,8  | 8,5  | 8,6                   | 25,9 |
| 3           | 40                            | 4                      | 3,8  | 3,8  | 3,8                   | 27,1 |
| 4           | 40                            | 24                     | 2,1  | 2,2  | 2,1                   | 21,0 |
| 5           | 70                            | 1                      | 2,2  |      | 2,2                   | 30,2 |
| 6           | 70                            | 3,5                    | 1,1  | 1,1  | 1,1                   | 33,5 |
| 7           | 70                            | 22                     | 0,7  | 0,7  | 1,0                   | 15,9 |
| 8           | 85                            | 1                      | 1,2  | 1,2  | 1,2                   | 25,9 |
| 9           | 85                            | 3,3                    | 0,7  | 0,8  | 0,7                   | 27,1 |
| 10          | 85                            | 20,5                   | 0,5  | 0,5  | 0,5                   | 12,9 |
| 11          | -                             | 0                      | 5,9  | 5,4  | 5,6                   | 39,3 |
| 12          | 40                            | 1                      | 9,9  | 10,1 | 10,0                  | 38,7 |
| 13          | 40                            | 4                      | 4,8  | 4,5  | 4,6                   | 40,7 |
| 14          | 40                            | 24                     | 2,5  | 3,0  | 2,8                   | 32,3 |
| 15          | 70                            | 1                      | 2,7  | 2,8  | 2,7                   | 40,3 |
| 16          | 70                            | 3,5                    | 1,6  | 1,7  | 1,3                   | 32,7 |
| 17          | 70                            | 22                     | 1,0  | 0,9  | 1,3                   | 14,5 |
| 18          | 85                            | 1                      | 1,8  | 1,8  | 1,8                   | 39,7 |
| 19          | 85                            | 3,3                    | 1,1  | 1,1  | 1,1                   | 32,4 |
| 20          | 85                            | 20,5                   | 0,9  | 1,0  | 0,9                   | 16,1 |

Из данных таблицы следует, что без пастеризации POV составляло 5,6 или 5,7. Пастеризация при 40°C снижала значение POV, но требовалась относительно длительный период времени (такой как 24 ч) при температуре пастеризации для снижения значения POV до приемлемого значения, равного 2,1.

Использование более высоких значений температуры привело к значительно лучшему результату. Например, при пастеризации только в течение 1 ч при 70°C значение POV составляло 2,2 по сравнению с POV, равным 2,1, и соответствующему 24 ч при 40°C. Еще более лучшие результаты получали при более высоких значениях температуры, так при 85°C в течение 1 ч значение POV равнялось только 1,2. (Данные фигуры представлены для более короткой ферментации, хотя аналогичные результаты получали с клетками, выросшими при более длительной ферментации.)

Так, на фиг. 3 и 4 графически представлено изменение значений POV и AnV в зависимости от различий во времени пастеризации. Как и предполагалось, более длительная пастеризация приводила к более низким значениям AnV и POV. Однако большое значение имело использование относительно более высокой температуры во время пастеризации. Заметное снижение AnV и POV обнаруживали при увеличении температуры пастеризации ( $T_{\text{паст.}}$ ) до 70°C, и еще более низкие значения соответствовали температуре 85°C. (Верхние три линии, обозначенные крестиками, кружками и звездочками, показывают значения AnV, в то время как нижние три линии, обозначенные ромбами, квадратами и треугольниками, представляют значения POV.)

В табл. 4 ниже представлено рассчитанное произведение  $tT$  (в°C-мин) для девяти различных протоколов пастеризации (три различных температуры на стадии плато и три различных периода времени). Фактически данное произведение представляет площадь под кривой (зависимости времени  $t$ , мин от температуры  $T$ , °C) для стадии плато (после стадии нагревания, но перед стадией охлаждения).

Таблица 4

| Время (t, ч/мин) | Температура (T, °C) | 40     | 70      | 85      |
|------------------|---------------------|--------|---------|---------|
|                  | 1 (60)              |        | 2,400   | 4,200   |
| 4 (240)          |                     | 9,600  | 16,800  | 20,400  |
| 24 (1440)        |                     | 57,600 | 100,800 | 122,400 |

## Пример 3.

Последующие опыты по пастеризации проводили с использованием ферментационного бульона, проводя ферментацию в промышленном масштабе, с использованием гриба *M.alpina*, приведенного в качестве примера выше. Транспортировали непастеризованный бульон (800 л) и хранили при 4°C. Затем бульон переносили в резервуар с перемешиванием емкостью 700 л и проводили 10 различных протоколов пастеризации.

Первое, пастеризацию проводили при пяти различных (максимальных) значениях температуры, а именно 140, 120, 100, 80 и 60°C со временем выдерживания (плато) (при максимальной температуре), равным 8 с. Второе, пастеризацию проводили при 140, 120, 100, 80 и 60°C при времени выдерживания (плато) при максимальной температуре, равном 300 с.

Отбирали пробы (2 л) и затем сразу же замораживали при -18°C. Отбирали стерильные пробы (200 мл) и замораживали и из проб экстрагировали неочищенное, содержащее АРА, масло.

Пробу ферментационного бульона (1,7 л) фильтровали под давлением N<sub>2</sub> 1 бар. Осадок промывали 0,6 объемами конденсационной воды и отжимали примерно в течение 5 мин под давлением 400 кг/см<sup>2</sup>. Затем к влажному осадку добавляли n-гексан (500 мл) и перемешивали с использованием устройства Ultra Turгах при 24000 об/мин. Масло экстрагировали при комнатной температуре (примерно 21°C) в течение примерно 110 мин. Суспензию фильтровали под вакуумом при использовании фильтра для сред GF/A Ватман. Осадок промывали 250 мл свежей порции гексана. Гексан выпаривали в течение 15 мин на водяной бане при температуре примерно 60-70°C. Затем полученное масло переносили в герметичные стаканы, которые продували азотом в течение 30 с, и затем закрывали и хранили до анализа при -18°C.

На фиг. 5-7 представлены данные последующего анализа. На фиг. 6 и 7 показаны кривые зависимости времени от температуры для двух серий опытов, в первой время стадии плато (выдерживания) составляло 8 с, и во второй время стадии плато (выдерживания) составляло 5 мин, соответственно каждое для 5 значений температуры. Как следует из графиков, горизонтальная средняя линия (представляющая 8 с или 5 мин) показывает стадию плато.

На фиг. 5 представлены полученные значения POV и AnV для всех 10 режимов пастеризации. Как следует из этих данных, более низкие значения POV получали при значительно более высокой температуре, и более длительный период выдерживания (5 мин) соответствовал наиболее низким значениям POV.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микробное масло, которое включает по меньшей мере 35% полиненасыщенной жирной кислоты (PUFA) и имеет значение анизидинового числа AnV не более 25 и значение перекисного числа POV не более 3,0, полученное путем пастеризации микробных клеток, содержащих или продуцирующих PUFA, или микробного масла, содержащего PUFA, где пастеризация включает первую стадию, на которой микробные клетки нагревают от 40 до 70°C, и вторую стадию плато, на которой температура составляет от 80 до 160°C.

2. Масло по п.1, в котором PUFA представляет собой C<sub>20</sub> или C<sub>22</sub> PUFA.

3. Масло по п.2, в котором PUFA представляет собой арахидоновую кислоту (ARA), эйкозапентаеновую кислоту (EPA) или докозагексаеновую кислоту (DHA).

4. Масло по любому из пп.1-3, которое включает по меньшей мере 40% PUFA.

5. Масло по любому из пп.1-3, которое включает по меньшей мере 45% PUFA.

6. Масло по любому из пп.1-5, которое имеет AnV не более 20.

7. Масло по п.6, где масло имеет AnV не более 15.

8. Масло по любому из пп.1-7, которое экстрагируется или выделяется из клеток, которые являются грибами.

9. Масло по п.8, в котором грибы относятся к роду *Mortierella*.

10. Масло по п.9, в котором грибы относятся к виду *Mortierella alpina*.

11. Масло по п.10, в котором PUFA представляет собой арахидоновую кислоту (ARA).

12. Масло по п.1, которое представляет собой сырое или нерафинированное масло.

13. Масло по п.12, которое включает по меньшей мере 40% ARA.

14. Масло по п.12, которое включает по меньшей мере 45% PUFA.

15. Масло по любому из пп.12-14, которое имеет AnV не более 20.

16. Масло по п.15, которое имеет AnV не более 15.

17. Пищевой продукт для людей, содержащий масло по любому из пп.1-16.

18. Пищевая добавка для людей, содержащая масло по любому из пп.1-16.

19. Кормовой продукт для животных, содержащий масло по любому из пп.1-16.

20. Кормовая добавка для животных, содержащая масло по любому из пп.1-16.

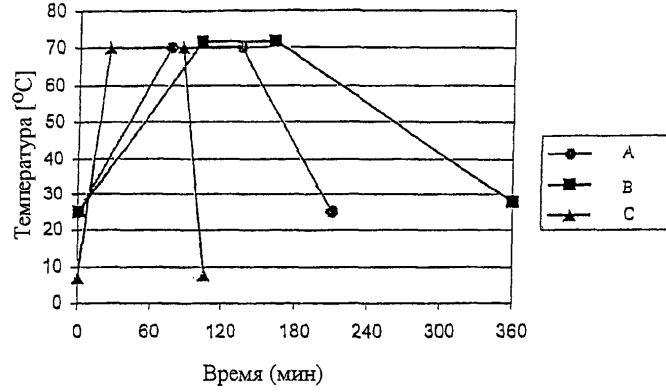
21. Детская смесь, содержащая масло по любому из пп.1-16.

22. Способ очистки неочищенного масла по любому из пп.12-16, включающий подвергание неочищенного масла одной или нескольких стадий очистки, в которых стадии очистки включают обработку кислотой или дегуммирование, обработку щелочью или удаление свободной жирной кислоты, отбелива-

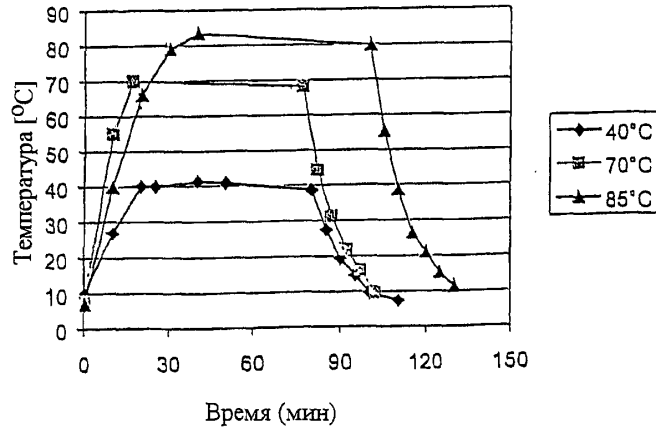
ние или удаление пигмента, фильтрацию, фракционирование охлаждением, дезодорирование и/или осветление фильтрованием.

23. Способ по п.22, который дополнительно включает добавление полученного масла в пищевые продукты человека или корма для животных.

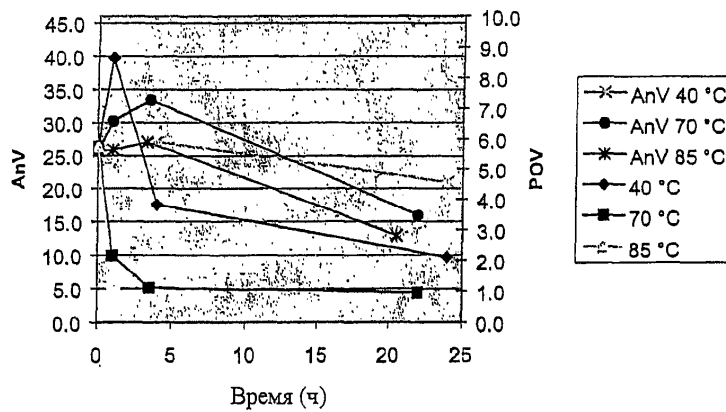
24. Способ по п.22, который дополнительно включает добавление полученного масла в детскую смесь.



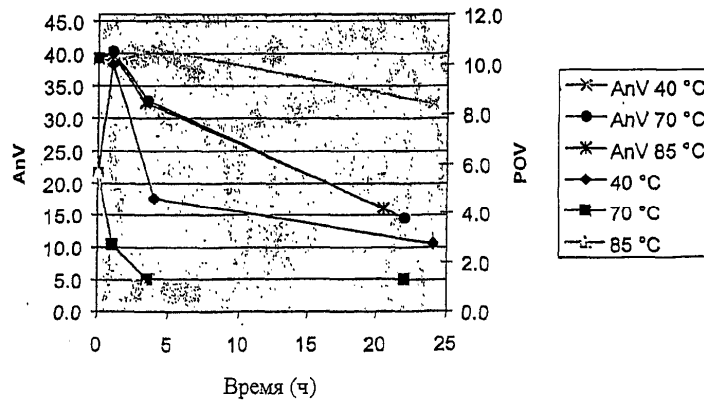
Фиг. 1



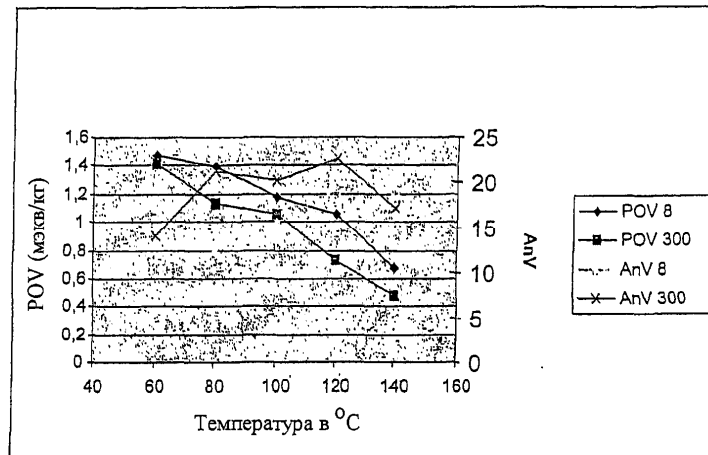
Фиг. 2



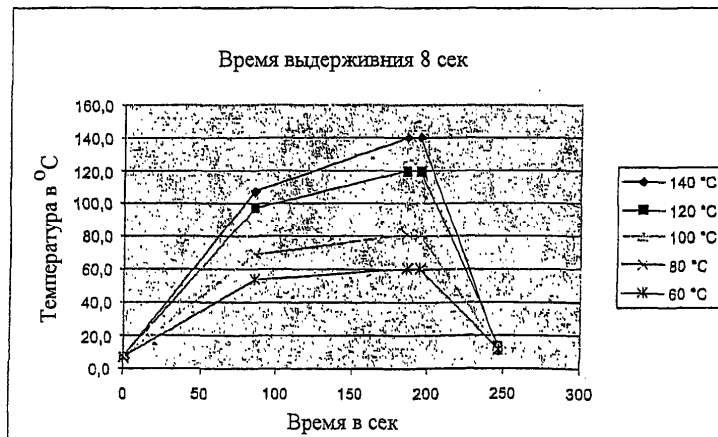
Фиг. 3



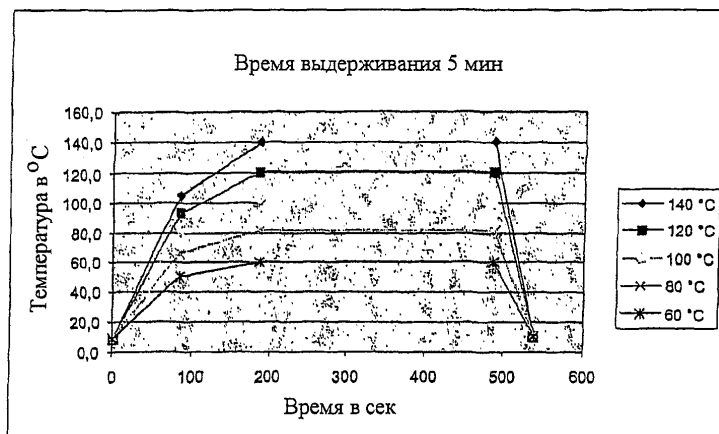
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

