

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040597**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.30

(21) Номер заявки
202090501

(22) Дата подачи заявки
2018.08.30

(51) Int. Cl. **C11B 1/02** (2006.01)
C11B 1/04 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОТДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ОТ ЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПИДОСОДЕРЖАЩЕЙ
БИОМАССЫ**

(31) **62/554,359; 17196348.1**

(32) **2017.09.05; 2017.10.13**

(33) **US; EP**

(43) **2020.06.22**

(86) **PCT/EP2018/073323**

(87) **WO 2019/048327 2019.03.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭВНИК ОПЕРЕЙШЕНС ГМБХ
(DE); ДИЭСЭМ АЙПИ ЭССЕТС Б.В.
(NL)**

(72) Изобретатель:
**Баль Михаэль, Байзер Марк, Либерт
Йохен, Пфайфер Хольгер, Рабе
Кристиан (DE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **US-A1-2016289592
US-A1-2012059180
JP-A-H08275793
WO-A1-2012109642**

(57) Настоящее изобретение относится к способу отделения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, от липидосодержащей биомассы путем применения ацетона.

040597

B1

040597

B1

Настоящее изобретение относится к способу отделения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, от липидосодержащей биомассы, с применением ацетона.

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. Оказалось, что также некоторые штаммы 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 из клеток оказалось особенной проблемой. Наиболее эффективным методом выделения масла являлось применение органических растворителей, подобных гексану. Но применение органических растворителей, подобных гексану, приводит к формированию опасных условий работы, требует применения дорогостоящего взрывобезопасного оборудования и для него необходимо внедрение дорогостоящего способа регенерации растворителя во избежание загрязнения окружающей среды.

В попытке избежать применения органических растворителей, которые приводят к формированию опасных условий работы, в качестве эффективного альтернативного пути выделения масла было обнаружено высаливание масла с помощью больших количеств хлорида натрия. Но применение больших количеств хлорида натрия приводит к образованию побочного продукта, представляющего собой делипидизированную биомассу, который по причине высокого содержания соли невозможно применять в качестве кормового ингредиента, поэтому способ является недостаточно рациональным. Кроме того, высокая концентрация соли приводит к быстрой коррозии применяемого оборудования из стали.

Таким образом, целью настоящего изобретения являлось обеспечить эффективный способ выделения липида, в частности липида, содержащего PUFA, из липидосодержащих клеток, в частности организмов из отряда Thraustochytriales, и одновременно избежать необходимости не только в органических растворителях, которые приводят к формированию опасных условий работы, но дополнительно избежать необходимости в высоких количествах солей для осуществления эффективного выделения масла из клеток.

Дополнительной целью настоящего изобретения являлось обеспечить способ выделения липида, в частности липида, содержащего PUFA, из липидосодержащих клеток, в частности организмов из отряда Thraustochytriales, и одновременно обеспечить получение делипидизированной биомассы, которую можно применять коммерческим образом, предпочтительно в области сельского хозяйства.

Оказалось, что очень эффективное отделение липидов от клеточного дебриса, содержащего водную фазу, можно осуществлять, если в качестве растворителя для выделения масла из биомассы применять ацетон. В отличие от гексана, ацетон не приводит к формированию опасных условий работы, и его дополнительным преимуществом оказалось то, что его можно легко удалить после выделения масла из липидизированной биомассы. Благодаря его неожиданно простому отделению и регенерации, ацетон можно повторно использовать в способе и, таким образом, предусматривается рациональный экологический способ выделения по настоящему изобретению.

Дополнительным преимуществом предложенного способа по сравнению со способами выделения масла, которые раскрыты в уровне техники, является то, что его можно осуществить достаточно быстро, в частности, также при нейтральных значениях pH, т.е. способ является менее затратным и занимает меньше времени по сравнению с текущими способами выделения масла, раскрытыми в уровне техники.

Таким образом, первый объект настоящего изобретения представляет собой способ отделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), от дебриса биомассы, предусматривающий следующие стадии:

- a) получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий PUFA;
- b) лизирование клеток биомассы;
- c) добавление к суспензии, полученной на стадии (b), ацетона до достижения конечного количества, составляющего от 25 до 47,5 вес.% ацетона;
- d) тщательное перемешивание суспензии, полученной на стадии (c);
- e) отделение легкой фазы, содержащей масло и ацетон, полученной на стадии (d), от тяжелой фазы, содержащей воду, ацетон, соль и клеточный дебрис.

На стадии (c) предпочтительно добавляют ацетон до достижения конечного количества, составляющего от 27,5 до 45,0, в частности от 30,0 до 42,5, более предпочтительно от 30,0 до 40,0 вес.% ацетона.

Предпочтительно на стадиях (b), (c) и (d) способа суспензию непрерывно перемешивают с применением мешалки и/или перемешивающего устройства. На стадиях (c) и/или (d) способа предпочтительно применяют перемешивание с низким усилием сдвига и/или перемешивание в аксиальном направлении, в частности, как раскрыто в WO 2015/095694. Импеллеры, подходящие для перемешивания перед осуществлением стадий (c) и/или (d) и в ходе них, включают, в частности, импеллеры с прямыми лопастями,

лопастные импеллеры Раштона, аксиально-поточные мешалки, радиально-поточные мешалки, импеллеры с вогнутыми лопастями на диске, высокоэффективные импеллеры, пропеллерные мешалки, лопастные мешалки, турбинные мешалки и их комбинации.

Предпочтительно обработке ацетоном, т.е. стадии (с)-(е), осуществляют при температуре от 10 до 50°C, более предпочтительно от 15 до 40°C, наиболее предпочтительно от 18 до 35°C, в частности, при температуре, приблизительно соответствующей комнатной.

Лизирование клеток биомассы можно осуществлять с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, в частности 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 "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 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 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 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), Cellucast (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, нейрамидаз, галактозидаз, альфа-маннозидаз, глюкуронидаз, гиалуронидаз, пуллулазаз, глюкоцеребозидаз, галактозилцерамидаз, ацетилгалктозаминидаз, фукозидаз, гексозаминидаз, идуронидаз, мальтаз-глюкоамилаз, ксиланаз (например, Xylanase Plus (Dyadic), Pentopan (Novozymes)), бета-глюканаз (например, Vinoflow Max (Novozymes), Brewzyme LP (Dyadic)), манназаз и их комбинаций. Протеаза может быть выбрана из сериновых протеаз, треониновых протеаз, цистеиновых протеаз, аспаргат-протеаз, металлопротеаз, глутаминовых протеаз, алкалаз (субтилизинов) и их комбинаций. Хитиназа может представлять собой хитотриозидазу. Пектиназа может быть выбрана из пектолиаз, пектозимов, полигалактуроназ 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, составляющим от 6,5 до 8,5, предпочтительно от 7,0 до 8,0, в частности приблизительно 7,5, таким образом, уровень pH, применяемый на данной стадии, составляет от 6,5 до 8,5, в частности 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:

i) нагревание суспензии (а) до температуры от 50 до 70°C, предпочтительно до температуры от 55 до 65°C, и добавление фермента, разрушающего клеточные стенки, к ферментационному бульону, и регулирование при необходимости pH до соответствующего значения, при котором фермент работает надлежащим образом;

ii) поддержание температуры и pH 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 от двух до четырех часов.

На стадии (i) фермент можно добавлять до или после нагревания суспензии и/или до или после регулирования уровня pH. Аналогично нагревание суспензии можно осуществлять до или после регулиро-

вания уровня pH. Однако в предпочтительном варианте осуществления фермент добавляют после нагревания суспензии и после регулирования уровня pH, если регулирование уровня pH вообще является необходимым. В очень предпочтительном варианте осуществления все действия осуществляют более или менее одновременно.

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

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла осуществляют в отношении суспензии, характеризующейся содержанием сухого вещества от 30 до 60 вес.%, предпочтительно от 35 до 55 вес.%, в частности от 40 до 50 вес.%. Это можно осуществлять либо путем получения суспензии с соответственно высоким содержанием биомассы на стадии (a), либо путем концентрирования суспензии, полученной путем лизирования клеток биомассы на стадии (b). Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, после лизирования клеток биомассы и перед добавлением ацетона суспензию концентрируют до общего содержания сухого вещества, составляющего от 30 до 60 вес.%, более предпочтительно от 35 до 55 вес.%, в частности от 40 до 50 вес.%.

Концентрирование суспензии предпочтительно осуществляют путем выпаривания воды при температуре не выше 100°C, предпочтительно от 70 до 100°C, более предпочтительно от 80 до 90°C, до достижения общего содержания сухого вещества от 30 до 60 вес.%, более предпочтительно от 35 до 55 вес.%, в частности от 40 до 50 вес.%.

Концентрирование суспензии предпочтительно осуществляют в выпарном аппарате с принудительной циркуляцией (например, доступном от GEA, Германия) с обеспечением быстрого удаления воды.

Выделение масла из лизированной биомассы с помощью ацетона в основном работает в широком диапазоне значений pH. Но поскольку выделение масла лучше работает при кислых значениях pH, в частности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла проводят при кислых значениях pH, в частности при значениях pH от 2,5 до 6,8, более предпочтительно при значениях pH от 3,0 до 6,0. Таким образом, при необходимости, в этом особенно предпочтительном варианте осуществления значения pH регулируют до значения, составляющего от 2,5 до 6,8, в частности от 3,0 до 6,0, перед добавлением ацетона.

В частности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла проводят при значениях pH от 2,5 до 4,0, более предпочтительно при значениях pH от 2,5 до 3,5.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла проводят при значениях pH от 5,0 до 6,0.

В дополнительном особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла проводят при значениях pH от 7,5 до 8,5.

В дополнительном особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения выделение масла проводят при значениях pH от 10,0 до 11,0.

В целом регулирование значения pH можно осуществлять в соответствии с настоящим изобретением путем применения либо оснований, либо кислот, известных специалистам в данной области техники. Уменьшение уровня pH 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 pH. Увеличение значения pH 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.%.

Способ в соответствии с настоящим изобретением в качестве дополнительной стадии включает отделение легкой фазы, содержащей масло и ацетон, полученной на стадии (d), от тяжелой фазы, содержащей воду, ацетон, соль и клеточный дебрис.

Отделение легкой фазы от тяжелой фазы предпочтительно осуществляют с помощью механических средств и предпочтительно при температуре 10-50°C, более предпочтительно 15-40°C, наиболее предпочтительно 18-35°C, в частности при температуре, приблизительно соответствующей комнатной. Термин "механические средства", в частности, относится к способам фильтрации и центрифугирования, известным специалистам в данной области техники.

Отделение легкой фазы от тяжелой фазы можно проводить при значениях рН, присутствующих в суспензии, полученной на стадии (d). Но предпочтительное отделение легкой фазы от тяжелой фазы проводят при значениях рН от 5,5 до 8,5, более предпочтительно от 6,0 до 8,0, в частности от 6,5 до 7,5. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перед осуществлением отделения легкой фазы от тяжелой фазы значение рН регулируют, как показано выше.

После отделения легкой фазы, содержащей масло и ацетон, ацетон можно легко отделить от масла, содержащего PUFA, путем испарения растворителя. Неожиданно, испарение растворителя работает настолько эффективно, что в масле не остается выявляемых количеств ацетона.

Отделение растворителя предпочтительно осуществляют при температуре от 40 до 56°C и предпочтительно при пониженном давлении, составляющем менее 500 мбар, в частности менее 200 мбар, что можно реализовать с помощью вакуумного насоса. В качестве альтернативы или дополнения, ацетон можно отделять от масла путем воздействия на легкую фазу током инертного газа, предпочтительно азота.

В дальнейшем очищенное масло, полученное таким образом, можно дополнительно обрабатывать путем применения способов, известных специалистам в данной области техники, в частности рафинирования, обесцвечивания, дезодорирования и/или вымораживания.

Особенное преимущество способа по настоящему изобретению заключается в том, что его можно осуществлять без применения каких-либо токсичных органических растворителей, подобных гексану, поэтому данный метод является безвредным для окружающей среды.

Дополнительное преимущество способа по настоящему изобретению заключается в том, что можно реализовать очень эффективное отделение масла от оставшейся биомассы без добавления хлорида натрия, который обычно применяют для высаливания масла из биомассы. Предпочтительно способ можно осуществлять 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.

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. В частности, в случае данного варианта осуществления это означает, что суспензия, применяемая в способе в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно содержит хлорид натрия в количестве менее 2 вес.%, более предпочтительно менее 1 вес.%, в частности менее 0,5 или 0,3 вес.%, наиболее предпочтительно в количестве менее 0,1 или 0,05 вес.%.

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. В частности, в случае данного варианта осуществления это означает, что суспензия, применяемая в способе в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно содержит хлорид, в частности хлоридные соли, в количестве менее 2 вес.%, более предпочтительно менее 1 вес.%, в частности менее 0,5 или 0,3 вес.%, наиболее предпочтительно в количестве менее 0,1 или 0,05 вес.%.

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 0,05 вес.%, при этом весовой процент относится к общему весу композиции после добавления солей. В частности, в случае данного варианта осуществления это означает, что суспензия, применяемая в способе в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно содержит соли в целом в количестве, составляющем менее 2 вес.%, более предпочтительно менее 1 вес.%, в частности менее 0,5 или 0,3 вес.%, наиболее предпочтительно в количестве, составляющем менее 0,1 или 0,05 вес.%.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают очень эффективное отделение масла, содержащегося в биомассе, от клеточного дебриса и других веществ, содержащихся в ферментационном бульоне. Путем применения способов по настоящему изобретению можно отделить от биомассы и выделить предпочтительно более 80 вес.%, в частности более 90 вес.% масла, содержащегося в биомассе.

"Хлорид" в соответствии с настоящим изобретением относится к количеству выявляемого хлора. Количество присутствующего хлора можно определять с 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 катионный противоион.

Способ в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать в качестве стадии предварительной обработки пастеризацию суспензии биомассы перед осуществлением лизиса клеток. Пастеризацию предпочтительно осуществляют в течение периода времени, составляющего от 5 до 120 мин, в частности от 20 до 100 мин, при температуре от 50 до 121°C, в частности от 50 до 70°C.

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

Клетки растений, в частности, могут быть выбраны из клеток организмов из семейств Brassicaceae, Elaeagnaceae и Fabaceae. Клетки организмов семейства Brassicaceae могут быть выбраны из таковых рода Brassica, в частности из таковых масличного рапса, масличной репы и горчицы сарептской; клетки организмов семейства Elaeagnaceae могут быть выбраны из таковых рода Elaeagnus, в частности из таковых вида Olea europaea; клетки организмов семейства Fabaceae могут быть выбраны из таковых рода Glycine, в частности из таковых 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 вследствие случайного мутагенеза 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 одноклеточные водоросли или грибы.

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

Подходящие клетки продуцирующих масло микроводорослей и подобных водорослям микроорганизмов представляют собой, в частности, клетки микроорганизмов, выбранных из типа Stramenopiles (также называемого Heterokonta). Микроорганизмы типа Stramenopiles, в частности, могут быть выбраны из следующих групп микроорганизмов: Namatores, протеромонады, опалины, Developayella, Diplophrys, лабиринтулиды, траустохитриды, Bioseccids, оомицеты, гифохитриомицеты, Commation, Reticulosphaera, Pelagomonas, Pelagococcus, Ollicola, Aureococcus, Parmales, диатомовые водоросли, ксантофиты, феофиты (бурые водоросли), эустигматофиты, рафидофиты, синуриды, аксоидины (включая Rhizochromulinales, Pedinellales, Dictyochales), Chrysomeridales, Sarcinochrysidales, Hydrurales, Hibberdiales и Chromulinales. Другие предпочтительные группы микроводорослей включают членов группы зеленых водорослей и динофлагеллятов, включая членов из рода Cryptocodium.

Биомасса в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит клетки организмов из таксона Labyrinthulomycetes (Labyrinthulea, лабиринтуломицетовые грибы, лабиринтулы), в частности клетки организмов из семейства Thraustochytriaceae, и предпочтительно по сути состоит из таких клеток. Семейство Thraustochytriaceae (траустохитриды) 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, 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).

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; стеринны и сложные эфиры стериннов; 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 присутствует в форме триглицеридов, при этом 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 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 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 предпочтительном варианте осуществления большинство PUFA присутствует в форме триглицеридов, при этом 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 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 применяют клетки, в частности клетки штамма *Schizochytrium*, которые продуцируют одновременно значительное количество EPA и DHA, 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 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 конкретное соотношение EPA:DHA. Любое химическое или нехимическое (например, ультрафиолетовое (UV) излучение) средство, способное индуцировать генетическое изменение в клетке 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.

Предпочтительные виды микроорганизмов рода *Schizochytrium*, которые продуцируют одновременно EPA и DHA в значительных количествах, как указано выше, депонированы под номер 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 характеризуется плотностью биомассы, составляющей по меньшей мере 80 или 100 г/л, предпочтительно по меньшей мере 120 или 140 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 160 или 180 г/л (в пересчете на содержание сухого вещества). Суспензия в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой ферментационный бульон. 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, организмов из отряда *Thraustochytriales*, подробно описаны в уровне техники (см., например, WO91/07498, WO94/08467, WO97/37032, WO97/36996, WO01/54510). Как правило, продуцирование происходит у клеток, которые культивируют в ферментере в присутствии источника углерода и источника азота, вместе 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 г/л, и значения скорости продуцирования, 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 необходимое количество биомассы получено, продуцирование липидов может быть индуцировано различными действиями, например путем 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 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 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, таких как, например, сульфат натрия, карбонат натрия,

гидрокарбонат натрия или кальцинированная сода. Предпочтительно, при ферментации хлорид применяют 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 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 мочевину.

Кроме того, для обеспечения положительного эффекта в отношении ферментации, также можно добавлять неорганические или органические соединения фосфора и/или известные стимулирующие рост вещества, такие как, например, дрожжевой экстракт или жидкий кукурузный экстракт.

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 занимает до примерно 100 ч.

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 времени, составляющего от 5 до 80 мин, в частности от 20 до 60 мин.

Аналогично, после завершения ферментации могут быть добавлены антиоксиданты с целью защиты PUFA, присутствующих в биомассе, от окислительного разрушения. В данном контексте предпочтительные антиоксиданты представляют собой ВНТ, ВНА, ТВНА, этоксихин, 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.

Непромытый клеточный бульон, содержащий микробные клетки (*Schizochytrium* sp.) при плотности биомассы более 100 г/л, нагревали до 60°C в перемешиваемом сосуде. После нагревания суспензии уровень pH регулировали до 7,5 путем применения каустической соды (50 вес.% раствора NaOH) перед добавлением алкалазы (Alcalase® 2.4 FG (Novozymes)) в жидкой форме в количестве 0,5 вес.% (по весу бульона). Смешивание продолжали в течение 3 ч при 60°C. После этого смесь лизированных клеток переносили в выпарной аппарат с принудительной циркуляцией (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.%.

Затем отбирали фракции концентрированной смеси лизированных клеток и регулировали pH до конкретного значения с применением либо NaOH, либо H₂SO₄, в результате чего получали алиquotы со значениями pH, составляющими 3,1, 5,6, 8,1 и 10,4.

После этого алиquotы полученных фракций перемешивали с разными количествами ацетона, которые добавляли к этим алиquotам при комнатной температуре. После добавления ацетона, полученные суспензии тщательно перемешивали с применением вихревого смесителя. После перемешивания проводили разделение фаз с применением центрифуги.

После центрифугирования в первую очередь определяли, была ли получена маслосодержащая фаза. Если маслосодержащая фаза была получена, определяли количество масла, содержащегося в данной фазе, по сравнению с начальным общим количеством масла, содержащимся в биомассе. Результаты раскрыты в следующих таблицах.

Таблица 1. Экстракция ацетоном при pH 3,1

Ацетон [вес. %]	27,5	30	32,5	35	37,5	40	42,5	45	47,5
Лизированный бульон [г]	29,0	28,2	27,3	26,0	25,0	24,2	23,1	22,1	21,2
Ацетон [г]	11,1	12,5	13,2	14,1	15,4	16,6	17,2	18,6	19,2
Выделенное масло [вес. %]	88,3	84,8	75,2	81,0	74,3	72,1	78,1	60,4	61,3

Таблица 2. Экстракция ацетоном при pH 5,6

Ацетон [вес. %]	27,5	30	32,5	35	37,5	40	42,5	45	47,5
Лизированный бульон [г]	29,1	28,0	27,0	26,2	25,1	24,1	23,1	22,0	21,0

Ацетон [г]	11,1	12,2	13,3	14,1	15,1	16,1	17,1	18,0	19,2
Выделенное масло [вес. %]	73,3	74,7	65,6	73,7	71,2	60,9	70,6	64,6	34,7

Таблица 3. Экстракция ацетоном при pH 8,1

Ацетон [вес. %]	25	27,5	30	32,5	37,5	40	42,5	45	47,5
Лизированный бульон [г]	30,1	29,2	28,1	27,3	25,0	24,2	23,0	22,0	21,0
Ацетон [г]	10,1	11,3	12,2	13,4	15,0	16,2	17,0	18,2	19,8
Выделенное масло [вес. %]	54,8	61,3	67,2	52,1	61,3	61,3	41,0	45,2	36,0

Таблица 4. Экстракция ацетоном при pH 10,4

Ацетон [вес. %]	25	27,5	30	35	37,5	40	42,5	45	47,5
Лизированный бульон [г]	30,0	29,0	28,0	26,1	25,0	24,1	23,0	22,0	21,0
Ацетон [г]	10,3	11,0	12,3	14,4	15,1	16,1	17,1	18,1	19,0
Выделенное масло [вес. %]	68,1	62,1	51,5	62,3	47,3	71,0	57,2	62,5	76,0

Как можно узнать из таблицы, ацетон оказался хорошим средством для выделения масла из биомассы, если количество ацетона находилось в диапазоне от 25,0 до 47,5 вес.%, что было рассчитано на основании конечной суспензии, полученной после добавления ацетона. Если количество ацетона находилось в этом диапазоне, то маслосодержащая фаза наблюдалась в верхней части центрифугированной суспензии, которая помимо масла также содержала небольшие количества ацетона и воды. В случае если количество ацетона было либо выше 47,5, либо ниже 25,0 вес.%, разделение фаз не наблюдалось.

Более того, оказалось, что выделение масла, по-видимому, происходит лучше при кислых значениях pH.

После отделения маслосодержащей фазы остаточные воду и ацетон можно легко удалить путем испарения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отделения липида, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), от дебриса биомассы, предусматривающий следующие стадии:

- получение суспензии биомассы, содержащей клетки, которые содержат липид, содержащий PUFA;
- лизирование клеток биомассы;
- добавление к суспензии, полученной на стадии (b), ацетона до достижения конечного количества, составляющего от 25 до 47,5 вес.% ацетона;
- тщательное перемешивание суспензии, полученной на стадии (c);
- отделение легкой фазы, содержащей масло и ацетон, полученной на стадии (d), от тяжелой фазы, содержащей воду, ацетон, соль и клеточный дебрис.

2. Способ по п.1, где на стадии (c) к суспензии биомассы добавляют ацетон до достижения конечного количества, составляющего от 27,5 до 45,0, в частности от 30,0 до 42,5, предпочтительно от 30,0 до 40,0 вес.% ацетона.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где перемешивание суспензии на стадии (d) осуществляют путем встряхивания, смешивания и/или перемешивания с помощью вихревого смесителя.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лизирование клеток биомассы осуществляют ферментативно, механически, химически и/или физически.

5. Способ по п.4, где лизирование клеток биомассы предусматривает ферментативную обработку клеток с помощью фермента, разрушающего клеточные стенки.

6. Способ по п.5, где лизирование клеток биомассы осуществляют следующим образом:

i) нагревание суспензии биомассы до температуры от 50 до 70°C, предпочтительно до температуры от 55 до 65°C, добавление фермента, разрушающего клеточные стенки, к ферментационному бульону и регулирование, при необходимости, pH до соответствующего значения, при котором фермент работает надлежащим образом;

ii) поддержание температуры и pH 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.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где после лизирования клеток суспензию концентрируют до общего содержания сухого вещества, составляющего от 30 до 60 вес.%, более предпочтительно от 35 до 55 вес.%, в случае если суспензия характеризуется более низким содержанием сухого вещества.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадии (с)-(е) осуществляют при температуре от 10 до 50°C, предпочтительно от 15 до 40°C, более предпочтительно от 18 до 35°C, в частности при температуре, приблизительно соответствующей комнатной.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где перед добавлением ацетона в соответствии со стадией (с), значение pH регулируют до кислотного, в частности до значения pH от 2,5 до 6,8, предпочтительно до значения pH от 3,0 до 6,0, в случае если суспензия характеризуется другим значением pH.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где отделение легкой фазы, содержащей масло и ацетон, от тяжелой фазы, содержащей воду, ацетон, соль и клеточный дебрис, осуществляют с помощью механических средств и предпочтительно при значениях pH от 5,5 до 8,5, более предпочтительно от 6,0 до 8,0.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий в качестве дополнительной стадии отделение ацетона от масла, содержащего PUFA.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где суспензия характеризуется плотностью биомассы, составляющей по меньшей мере 80, 100, 120 или 140 г/л.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где клетки, которые содержат липид, содержащий PUFA, выбраны из клеток водорослей, грибов, простейших, бактерий, микроводорослей, растений и их смесей.

14. Способ по п.12, где микроводоросли выбраны из типа Stramenopiles, в частности из семейства траустохитриды, предпочтительно из рода Schizochytrium.

15. Способ по любому из пп.5-13, где фермент, разрушающий клеточные стенки, выбран из протеаз, целлюлаз, гемицеллюлаз, хитиназ, пектиназ, сахараз, мальтаз, лактаз, альфа-глюкозидаз, бета-глюкозидаз, амилаз, лизоцимов, нейраминидаз, галактозидаз, альфа-маннозидаз, глюкуронидаз, гиалуронидаз, пуллуланаз, глюкоцереброзидаз, галактозилцерамидаз, ацетилгалактозаминидаз, фукозидаз, гексозаминидаз, идуронидаз, мальтаз-глюкоамилаз, бета-глюканаз, маннаназ и их комбинаций.

