



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.12.20

(21) Номер заявки

202090440

(22) Дата подачи заявки

2018.07.18

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

(54) УЛУЧШЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПИДОВ ПУТЕМ ОГРАНИЧЕНИЯ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ДВУХ ИСТОЧНИКОВ ЛИМИТИРУЮЩИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

(31) 62/546,808; 17192347.7

(32) 2017.08.17; 2017.09.21

(33) US; EP

(43) 2020.07.17

(86) PCT/EP2018/069454

(87) WO 2019/034354 2019.02.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭВОНИК ОПЕРЕЙШЕНС ГМБХ
(DE); ДиЭсЭм АйПи ЭССЕТС Б.В.
(NL)

(72) Изобретатель:

Буржа Адам, Корона Джим, Гарсиа
Хосе Р., Майя Гонсалу Оливейра (US),
Приферт Хорст, Виндау Иоаким (DE),
Заводский Габриэль (SK)

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(56) US-A1-2012272566

SUN UNA ET AL.: "Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of Schizochytriumsp", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 159, May 2014 (2014-05), pages 199-206, XP028646306, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2014.02.106, abstract, paragraphs [2.2.], [3.1.]; figures 1, 2

US-A1-2009209014

L.D. ZHU ET AL.: "Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae

as a Biodiesel Feedstock", BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 2016, 8792548, 20 September 2016 (2016-09-20), pages 1-8, XP055461472, ISSN: 2314-6133, DOI: 10.1155/2016/8792548, paragraph [3.4.]; table 1

ANITA N. JAKOBSEN ET AL.: "Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid Aurantiochytrium sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 80, no. 2, 17 June 2008 (2008-06-17), pages 297-306, XP019623690, ISSN: 1432-0614, abstract, page 300, right-hand column, paragraph 1 figures 4, 5; table 1

ALVAREZ-DIAZ PABLO DAVID ET AL.: "Lipid Production of Microalga Ankistrodesmus falcatus Increased by Nutrient and Light Starvation in a Two-Stage Cultivation Process", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 174, no. 4, 14 August 2014 (2014-08-14), pages 1471-1483, XP036270113, ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/S12010-014-1126-5 [retrieved on 2014-08-14], abstract, page 1473, paragraph 3; table 1, page 1476 - page 1478; figure 1; table 2

PRAVEENKUMAR RAMASAMY ET AL.: "Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalgae Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production", BIOMASS AND BIOENERGY, vol. 37, February 2012 (2012-02), pages 60-66, XP028887706, ISSN: 0961-9534, DOI: 10.1016/J.BIOMBIOE.2011.12.035, abstract, paragraph [3.5]; figures 1, 2; tables 1, 2

(57) Изобретение направлено на способ улучшенного получения липидов путем ограничения по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ во время ферментации клеток, продуцирующих липиды.

Настоящее изобретение направлено на способ улучшенного получения липидов путем ограничения по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ во время ферментации клеток, продуцирующих липиды.

Было показано, что некоторые эукариотические микробы (такие как водоросли; грибы, включая дрожжи; и простейшие) являются хорошими продуцентами полиненасыщенных жирных кислот в ферментерах. В частности, было показано, что высокие количества PUFA (полиненасыщенных жирных кислот) могут быть получены, когда штаммы сначала культивируют до высокой плотности клеток, а в качестве второй стадии иницируют улучшенное получение липида путем уменьшения количества таких источников лимитирующих питательных веществ, как источник азота, или путем уменьшения количества растворенного кислорода в среде (WO 01/54510).

Исходя из данного уровня техники, целью настоящего изобретения было обеспечение способа, предусматривающего еще более повышенные показатели выхода полиненасыщенных жирных кислот.

Неожиданно было обнаружено, что лучшие показатели выхода PUFA можно получить, если уменьшить не только количество одного источника лимитирующих питательных веществ, но и если, в дополнение, уменьшить количество дополнительного источника лимитирующих питательных веществ во время ферментации клеток, продуцирующих липиды, при этом такие источники лимитирующих питательных веществ предпочтительно являются источником азота и источником фосфата.

Таким образом, первой целью настоящего изобретения является способ получения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из микроорганизмов, предпочтительно эукариотических микроорганизмов, способных продуцировать липиды в количестве по меньшей мере приблизительно 10 вес.% от их биомассы, который включает фазу увеличения плотности биомассы и фазу продуцирования липидов, включающий:

а) добавление во время фазы увеличения плотности биомассы к ферментационной среде, содержащей указанные микроорганизмы, источника углерода и по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ со скоростью, достаточной для увеличения плотности биомассы указанной ферментационной среды по меньшей мере до 50 г/л; и

б) прекращение или снижение в значительной степени подачи по меньшей мере двух из указанных источников лимитирующих питательных веществ в фазе продуцирования липидов, при поддержании подачи источника углерода.

Применяемый в данном документе термин "источник лимитирующих питательных веществ" относится к источнику питательного вещества (включая само питательное вещество), необходимому для роста и клеточного деления микроорганизма, когда лимитирующее питательное вещество истощается из среды для роста, его отсутствие в дальнейшем существенно ограничивает рост или размножение микроорганизма. Однако, поскольку другие питательные вещества (и источник углерода) все еще присутствуют в большом количестве, организм может продолжать производить и накапливать внутриклеточные и/или внеклеточные продукты, в частности липиды.

Такие лимитирующие источники питательных веществ включают источники азота, источники фосфата, источники витаминов (такие как источники витамина B2, источники пантотената, источники тиамина), источники микроэлементов-металлов (такие как источники цинка, источники меди, источники кобальта, источники никеля, источники железа, источники марганца, источники молибдена) и источники макроэлементов-металлов (такие как источники магния, источники кальция, источники натрия, источники калия), источники диоксида кремния и их смеси.

Указанные источники микроэлементов-металлов и источники макроэлементов-металлов включают сульфатные и хлоридные соли этих металлов (такие как $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 ; K_2SO_4 ; KCl и Na_2SO_4) и их смеси.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанные "источники по меньшей мере двух лимитирующих питательных веществ" представляют собой источник азота и источник фосфата. В этом предпочтительном варианте осуществления также в дополнение к источнику(ам) азота и источнику(ам) фосфата подача дополнительных источников лимитирующих питательных веществ может быть прекращена или в значительной степени уменьшена в фазе продуцирования липидов, но предпочтительно другие источники лимитирующих питательных веществ присутствуют в большом количестве в фазе продуцирования липидов.

Таким образом, предпочтительным объектом настоящего изобретения является способ получения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из микроорганизмов, предпочтительно эукариотических микроорганизмов, способных продуцировать липиды в количестве по меньшей мере приблизительно 10 вес.% от их биомассы, который включает фазу увеличения плотности биомассы и фазу продуцирования липидов, включающий:

а) добавление во время фазы увеличения плотности биомассы к ферментационной среде, содержащей указанные микроорганизмы, источника углерода и по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ со скоростью, достаточной для увеличения плотности биомассы указанной

ферментационной среды по меньшей мере до 50 г/л; и

b) прекращение или снижение в значительной степени подачи по меньшей мере двух из указанных источников лимитирующих питательных веществ в фазе продуцирования липидов, при поддержании подачи источника углерода, при этом указанные по меньшей мере два источника лимитирующих питательных веществ представляют собой источник азота и источник фосфата.

При прекращении или снижении в значительной степени подачи указанных по меньшей мере двух из указанных источников лимитирующих питательных веществ доступное количество указанных источников лимитирующих питательных веществ опускается до концентраций, при которых микроорганизмы, продуцирующие липиды, испытывают недостаток указанных источников лимитирующих питательных веществ. Это означает, что микроорганизмы могут поглощать больше тех источников лимитирующих питательных веществ, которые доступны в среде, т.е. подача источников лимитирующих питательных веществ является ниже, чем количество источников лимитирующих питательных веществ, которые микроорганизмы могут потреблять. Недостаток первого из таких по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ обычно инициирует фазу продуцирования липидов в случае, если инициация фазы продуцирования липидов ранее не инициировалась другими способами.

В соответствии с настоящим изобретением источник азота может быть органическим, неорганическим или их смесью. Предпочтительными источниками азота в соответствии с настоящим изобретением являются аммиак, мочевины, нитрат, нитрит, аминокислоты, в частности глутамат, неорганические соли аммония, более предпочтительно аммоний сульфат или гидроксид аммония, и наиболее предпочтительно гидроксид аммония и их смеси. Источник азота может также быть обеспечен в форме сложной среды, такой как пептон или дрожжевой экстракт, предпочтительно содержащей компоненты, как указано ранее.

Основной или единственный источник азота более предпочтительно выбран из аммиака и неорганических солей аммония и представляет собой, прежде всего, в основном или только аммиак или в основном или только гидроксид аммония.

В соответствии с настоящим изобретением "основной источник азота" означает, что соответствующий источник обеспечивает по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 90% молярных эквивалентов азота.

Предпочтительными источниками фосфата в соответствии с настоящим изобретением являются фосфорная кислота и неорганические фосфатные соли, такие как фосфат аммония, фосфат кальция, фосфат натрия или фосфат калия или соответствующие соли гидрофосфата и дигидрофосфата и их смеси. Также источник фосфата может быть обеспечен в форме сложной среды, предпочтительно содержащей компоненты, как уже было указано ранее.

Основной или единственный источник фосфата предпочтительно выбран из фосфорной кислоты и неорганических фосфатных солей, в частности дигидрофосфата калия, и их смесей.

Соответственно, "основной источник фосфата" означает, что соответствующий источник фосфата обеспечивает по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 90% молярных эквивалентов фосфата.

Ограничение первого из этих по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ предпочтительно инициирует фазу продуцирования липидов. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением инициацию фазы продуцирования липидов в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения определяют как момент, когда во время ферментации концентрация первого из этих по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ в среде опускается ниже 0,01 моль/л.

В более общем смысле инициация фазы продуцирования липидов соответствует моменту, когда дальнейший рост микроорганизмов по сути прекращается и вместо этого микроорганизмы начинают активно накапливать липиды в клетках. Как указано ранее, фаза продуцирования липидов необязательно должна быть инициирована снижением концентрации источника лимитирующих питательных веществ. В качестве альтернативы она может быть инициирована, например, также путем ограничения количества растворенного кислорода в ферментационной среде.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения количества обоих указанных двух источников лимитирующих питательных веществ опускаются до концентраций во время ферментации, так что микроорганизмы, продуцирующие липиды, в среде испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ в течение по меньшей мере 30% продолжительности фазы продуцирования липидов, предпочтительно в течение по меньшей мере 40, 50 или 60% продолжительности фазы продуцирования липидов, наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 70, 80 или 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

В данном документе микроорганизмы в среде предпочтительно испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 30% продолжительности фазы продуцирования липидов, предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40, 50 или 60 % продолжительности фазы продуцирования липидов, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 70, 80 или 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

В качестве альтернативы или в дополнение, микроорганизмы в среде предпочтительно испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 30 ч фазы продуцирования липидов, предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40, 50 или 60 ч фазы продуцирования липидов, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 70, 80 или 90 ч фазы продуцирования липидов.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрации обоих указанных двух источников лимитирующих питательных веществ опускаются ниже 0,01 моль/л, предпочтительно ниже 0,005 моль/л, в частности, ниже 0,003 моль/л и/или ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ во время ферментации соответственно.

В данном документе концентрации указанных обоих источников лимитирующих питательных веществ предпочтительно опускаются ниже 0,01 моль/л, более предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, до нуля и/или ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ, в течение 40 ч, предпочтительно в течение 30 ч, более предпочтительно в течение 20 ч после инициации фазы продуцирования липидов. Поскольку предпочтительна инициация фазы продуцирования липидов иницируется, когда концентрация первого по меньшей мере из двух источников лимитирующих питательных веществ опускается ниже 0,01 моль/л, это означает, что концентрация второго источника лимитирующих питательных веществ предпочтительно опускается ниже 0,01 моль/л, предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, до нуля и/или ниже предела обнаружения, на период времени до 40 ч, предпочтительно до 30 ч, в частности, до 20 ч позже, чем опускается концентрация первого источника лимитирующих питательных веществ.

В качестве альтернативы или в дополнение, концентрации указанных обоих источников лимитирующих питательных веществ находятся ниже 0,01 моль/л, предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, равняются нулю и/или находятся ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере во время завершения второй половины фазы продуцирования липидов, более предпочтительно по меньшей мере в течение всего промежутка, соответствующего заключительным 60, 70 или 80% продолжительности фазы продуцирования липидов.

В качестве альтернативы или в дополнение, концентрации указанных обоих источников лимитирующих питательных веществ находятся ниже 0,01 моль/л, предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, равняются нулю и/или находятся ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 20 ч ферментации, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40 ч ферментации, в частности, по меньшей мере в течение последних 60 ч ферментации.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения во время фазы продуцирования липидов никакие дополнительные количества по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ, в частности источника(ов) азота и источника(ов) фосфата, не добавляют вообще. Тем не менее, поскольку истощение этих источников лимитирующих питательных веществ необязательно происходит в одно то же время, также в этом варианте осуществления настоящего изобретения возможно и вероятно, что концентрации обоих по меньшей мере из двух источников лимитирующих питательных веществ опускаются ниже 0,01 моль/л в различные моменты времени. Но из-за того, что подача указанных источников лимитирующих питательных веществ прекращается на фазе продуцирования липидов, концентрации указанных источников лимитирующих питательных веществ предпочтительно опускаются до нуля во время ферментации в данном варианте осуществления настоящего изобретения.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения подачу одного по меньшей мере из двух источников лимитирующих питательных веществ прекращают до того, как прекращают подачу второго по меньшей мере из двух источников лимитирующих питательных веществ. В частности подачу второго источника лимитирующих питательных веществ можно остановить в период времени до 30 ч позже, в частности, в период времени до 20 или до 10 ч позже, чем подача первого источника лимитирующих питательных веществ.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения подача источников лимитирующих питательных веществ продолжалась в фазе продуцирования липидов даже после уменьшения их концентраций, более или менее во время завершённой фазы продуцирования липидов. В данном варианте осуществления источники лимитирующих питательных веществ добавляют в таких небольших количествах, что клетки не переключаются обратно на фазу роста. Это предпочтительно осуществляют путем подачи указанных источников лимитирующих питательных веществ в таких количествах, что клетки все еще испытывают недостаток этих источников лимитирующих питательных веществ, предпочтительно в данном документе источники лимитирующих питательных веществ не превышают концентрацию 0,01 моль/л, в частности, концентрацию 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно концентрацию 0,003 моль/л, в фазе продуцирования липидов. Преимущество данного варианта осуществления заключается в том, что продолжительная подача этих компонентов в небольших количествах в фазе продуцирования липидов может помочь избежать метаболического стресса в клетках и с помощью этого можно

избежать накопления активных форм кислорода (ROS) внутри клеток, тем самым препятствуя возможному увеличению окислительного разрушения липидов, содержащихся в клетках.

Добавление указанных источников лимитирующих питательных веществ и источника углерода может быть в форме периодической, периодической подпитываемой, непрерывной, болюсной и/или полунепрерывной процедуры. Подача одного или более источников лимитирующих питательных веществ может также быть объединена с подачей углеродной подпитки. "Подача" источников лимитирующих питательных веществ и источника углерода предусматривает как активную, так и пассивную подачу. Это означает, например, что, если источник(и) лимитирующих питательных веществ и/или источник углерода присутствуют в достаточном количестве в порционной среде в начале ферментации, они необязательно должны активно подаваться во время ферментации. Соответственно, "подача прекращена" означает, что соответствующее соединение(я) больше не доступно(ы) в среде.

Но в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере добавление источника углерода проводят активно во время ферментации, предпочтительно даже после инициации фазы продуцирования липидов.

В следующих предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно раскрыто, где по меньшей мере два источника лимитирующих питательных веществ представляют собой источник азота и источник фосфата.

В одном из таких предпочтительных вариантов осуществления концентрации как источника(ов) азота, так и источника(ов) фосфата такие низкие, что микроорганизмы, продуцирующие липиды, в среде испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ в течение по меньшей мере 30% продолжительности фазы продуцирования липидов, предпочтительно в течение по меньшей мере 40, 50 или 60% продолжительности фазы продуцирования липидов, наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 70, 80 или 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

В данном документе микроорганизмы в среде предпочтительно испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 30% продолжительности фазы продуцирования липидов, предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40, 50 или 60% продолжительности фазы продуцирования липидов, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 70, 80 или 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

В качестве альтернативы или в дополнение, микроорганизмы в среде предпочтительно испытывают недостаток обоих указанных источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 30 ч фазы продуцирования липидов, предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40, 50 или 60 ч фазы продуцирования липидов, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 70, 80 или 90 ч фазы продуцирования липидов.

В еще одном из таких предпочтительных вариантов осуществления количество источника(ов) азота уменьшается ниже концентрации $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующей в случае аммония в качестве источника азота 0,1 г/л аммония) и количество источника(ов) фосфата уменьшается ниже концентрации $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующей 0,5 г/л фосфата) во время ферментации, предпочтительно в течение временного промежутка не более чем 40 ч, более предпочтительно не более чем 30 ч, в частности, не более чем 20 или 10 ч.

В данном документе количество источника(ов) азота предпочтительно уменьшается ниже концентрации $2,8 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующей в случае аммония в качестве источника азота 0,05 г/л аммония) и количество источника(ов) фосфата предпочтительно уменьшается ниже концентрации $5,4 \times 10^{-4}$ моль/л (соответствующей 0,05 г/л фосфата), предпочтительно в течение временного промежутка не более чем 40 ч, более предпочтительно не более чем 30 ч, в частности, не более чем 20 или 10 ч.

В данном документе фаза продуцирования липидов предпочтительно иницируется либо первым ограничением количества источника(ов) азота, либо первым ограничением количества источника(ов) фосфата, либо (более или менее) одновременным ограничением количества источника(ов) азота и источника(ов) фосфата.

Молярные концентрации, указанные в описании, относятся к одновалентному источнику(ам) азота и фосфата. Очевидно, что в случае применения мультивалентного источника азота или фосфата в качестве альтернативы или в дополнение к одновалентному источнику азота или фосфата, должна применяться только соответствующая доля указанной молярной концентрации. Например, в случае двухвалентного источника должна применяться только половина молярной концентрации и т.д. Кроме того, также очевидно, что в случае, когда сложные среды, содержащие такие источники азота или фосфата, применяют в качестве альтернативы или в дополнение к одновалентному источнику азота или фосфата, то тогда количество источника азота или фосфата, содержащееся в сложной среде, является пригодным для расчета.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения количество как источника(ов) азота, так и источника(ов) фосфата уменьшается до нуля и/или ниже предела обнаружения этих соединений в течение временного промежутка не более чем 40 ч, предпочтительно не более чем 30 ч, более предпочтительно не более чем 20 или 10 ч.

Определение количества аммиака/аммония предпочтительно проводят в образце реакционной сре-

ды посредством УФ-спектроскопии следующим образом. Аммиак/аммоний подвергают реакции в присутствии глутаматдегидрогеназы, 2-оксоглутарата и NADH с L-глутаматом, NAD⁺ и водой. Поскольку количество окисленного NADH является стехиометрическим по отношению к количеству аммиака/аммония, присутствующего в образце, путем сравнения количества NADH до и после реакции можно определить количество аммиака/аммония. Количество NADH может быть определено с помощью светопоглощения при 334, 340 или 365 нм. Подходящим коммерчески доступным набором для определения количества аммиака/аммония является набор для анализа r-Biopharm Ammonium (Roche Diagnostics, Швейцария).

Определение количества фосфата предпочтительно проводят в образце реакционной среды посредством колориметрии следующим образом. Фосфат вводят в реакцию с молибдатом аммония с образованием фосфомолибдата аммония. Фосфомолибдат аммония затем дополнительно восстанавливают с помощью восстанавливающего средства для получения стабильного восстановленного гетерополимолибдатного комплекса со смешанной валентностью $\text{PO}_4[\text{Mo(V)O}_3]_4[\text{Mo(VI)O}_3]_8^{17-}$. Скорость изменения поглощения полученного голубого гетерополимолибдатного комплекса пропорциональна концентрации фосфата, который изначально содержался в образце. Колометрическое определение количества фосфата можно проводить с применением BioProfile Chemistry Analyzer 300 (Nova Biomedical, Уолтем, США).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота всегда находится ниже $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующая в случае аммония в качестве источника азота 0,1 г/л аммония) и концентрация источника(ов) фосфата всегда находится ниже $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующая 0,5 г/л фосфата) по меньшей мере в течение заключительных 50 или 70%, предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 80%, более предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 90% периода фазы продуцирования липидов.

В данном документе в особом варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота всегда находится ниже $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л и концентрация источника(ов) фосфата всегда находится ниже $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л во время завершённой фазы продуцирования липидов.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота всегда находится ниже $2,8 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующая в случае аммония в качестве источника азота 0,05 г/л аммония) и концентрация источника(ов) фосфата всегда находится ниже $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствующая 0,05 г/л фосфата) по меньшей мере в течение заключительных 50 или 70%, предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 80%, более предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 90% периода фазы продуцирования липидов.

В данном документе в особом варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота всегда находится ниже $2,8 \times 10^{-3}$ моль/л и концентрация источника(ов) фосфата всегда находится ниже $5,4 \times 10^{-4}$ моль/л во время завершённой фазы продуцирования липидов.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота и источника(ов) фосфата равняется нулю и/или всегда находится ниже предела обнаружения по меньшей мере в течение заключительных 50 или 70%, предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 80%, более предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 90% периода фазы продуцирования липидов.

В данном документе в особом варианте осуществления настоящего изобретения концентрация источника(ов) азота и источника(ов) фосфата всегда равняется нулю и/или находится ниже предела обнаружения этих соединений, в частности с применением способов, указанных ранее, во время завершённой фазы продуцирования липидов.

Как в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения источник(и) азота и источник(и) фосфата не добавляют после того, как источник(и) азота и источник(и) фосфата потребляются микроорганизмами, следует принять во внимание, что концентрация источника(ов) азота и источника(ов) фосфата действительно равняется нулю или по меньшей мере почти нулю в этом более предпочтительном варианте осуществления во время завершённой фазы продуцирования липидов или по меньшей мере в течение заключительных 70, 80 или 90% периода времени фазы продуцирования липидов.

Предпочтительный период времени фазы продуцирования липидов составляет от 50 до 150 ч, более предпочтительно от 70 до 130 ч, в частности, от 90 до 110 ч.

Микроорганизмы, которые продуцируют липиды, содержащие PUFA, широко описаны в предшествующем уровне техники. Предпочтительно они являются эукариотическими микроорганизмами. В данном контексте применяемые клетки могут, в частности, представлять собой клетки, которые естественным образом уже продуцируют PUFA; однако они также могут представлять собой клетки, которые в результате осуществления подходящих способов генетической инженерии или благодаря случайному мутагенезу демонстрируют улучшенное продуцирование PUFA, или их вообще сделали способными к продуцированию PUFA. Продуцирование PUFA может быть автотрофным, миксотрофным или гетеротрофным. Предпочтительно микроорганизмы способны к продуцированию PUFA благодаря системе, подобной поликетидсинтазной системе. Система, подобная поликетидсинтазной системе, может пред-

ставлять собой эндогенную систему или благодаря генетической инженерии, экзогенную систему.

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. Подходящие клетки продуцирующих масло дрожжей представляют собой, в частности, штаммы *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* и *Lipomyces*. Более предпочтительно клетки представляют собой клетки микробных водорослей, микроводорослей или грибов.

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

Биомасса в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит клетки организмов из таксона Labyrinthulomycetes (Labyrinthulea, лабиринтуломицеты грибы, лабиринтулы), в частности клетки организмов из семейства Thraustochytriaceae, и предпочтительно по сути состоит из таких клеток. Семейство Thraustochytriaceae (также называемое Thraustochytrids) включает роды Althomia, Aplanochytrium, Aurantiochytrium, Botryochytrium, Elnia, Japonochytrium, Oblongichytrium, Parietichytrium, Schizochytrium, Sicyoidochytrium, Thraustochytrium и Ulkenia. Биомасса, в частности, предпочтительно содержит клетки организмов из родов Aurantiochytrium, Oblongichytrium, 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), в частности высоконенасыщенную жирную кислоту с длинной цепью (1cHUFA).

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, более предпочтительно по меньшей мере 40% 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; диацилглицерины; моноацилглицерины; 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 настоящего изобретения большинство липидов присутствует в форме триацилглицеринов, 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 триацилглицерины. В предпочтительном варианте осуществления большинство PUFA присутствует в форме триацилглицеринов, 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 триацилглицеринов.

Предпочтительно липиды, содержащиеся в клетках, содержат PUFA в количестве более 15 вес.%, предпочтительно более 20, 25 или 30 вес.%, более предпочтительно более 35 или 40 вес.%, еще более предпочтительно более 45 или 50 вес.% и наиболее предпочтительно более 55 вес.%.

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 штамм *Schizochytrium*, который продуцирует значительное количество ЕРА и ДНА одновременно, при этом ДНА 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 ЕРА 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 ДНА и ЕРА штаммы *Schizochytrium* могут быть получены с помощью последовательного мутагенеза с последующим соответствующим отбором мутантных штаммов, которые демонстрируют преимущественное продуцирование ЕРА и ДНА и конкретное соотношение ЕРА:ДНА при определенных условиях культивирования. Любое химическое или нехимическое (например, ультрафиолетовое (УФ) излучение) средство, способное к индуцированию генетического изменения в отношении микробной клетки, 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. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Предпочтительные виды микроорганизмов рода *Schizochytrium*, которые продуцируют одновременно ЕРА и ДНА, депонированы под номером доступа ATCC PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, PTA-9698, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 или PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215.

Способы получения биомассы, в частности биомассы, которая содержит клетки, содержащие липиды, в частности PUFA, в частности с помощью организмов из отряда *Thraustochytriales*, подробно описаны в уровне техники (см., например, WO 91/07498, WO 94/08467, WO 97/37032, WO 97/36996, WO 01/54510). Как правило, продуцирование происходит у клеток, которые культивируют в ферментере в присутствии источника углерода и источника азота одновременно с рядом дополнительных веществ, таких как минералы, которые обеспечивают рост микроорганизмов и продуцирование PUFA. В данном контексте могут быть достигнуты значения плотности биомассы, составляющие более 100 г/л, и значения скорости продуцирования, составляющие более 0,5 г липида на 1 л/ч. Способ предпочтительно осуществляют с помощью способа, известного как периодический способ с подпиткой, т.е. осуществляется постепенная подпитка источниками углерода и дополнительных питательных веществ в ходе ферментации. Когда необходимое количество биомассы получено, продуцирование липидов индуцируется, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки выращивают в фазе увеличения плотности биомассы, 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, наиболее предпочтительно по меньшей мере 200 г/л (в пересчете на содержание сухого вещества). Такие способы раскрыты, например, в US 7732170.

Определение плотности биомассы может быть осуществлено с помощью гравиметрического анализа. Для осуществления этого образец ферментационного бульона с определенным объемом взвешивают до и после лиофильной сушки. Остаточный вес высушенного образца соответствует биомассе, содержащейся в этом определенном объеме ферментационного бульона.

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 (смесь карбоната натрия и оксида натрия). Предпочтительно хлорид применяют в ферментационной смеси в количествах менее 3 г/л, в частности, менее 500 мг/л, особенно предпочтительно менее 100 мг/л.

Концентрация натрия составляет (выражается в г/л Na) предпочтительно по меньшей мере приблизительно 1 г/л, более предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 50 г/л и более предпочтительно находится в диапазоне от 2 до 25 г/л.

Подходящие источники углерода представляют собой как спиртовые, так и неспиртовые источники углерода. Примеры спиртовых источников углерода представляют собой метанол, этанол, изопропанол и глицерин. Примеры неспиртовых источников углерода представляют собой фруктозу, глюкозу, сахарозу, мелассу, крахмал, в частности кукурузный крахмал, кукурузную патоку, тростниковый сахар и свекловичный сахар. Жирные кислоты в форме жирных оксикислот, триацилглицеридов и ди- и моноацилглицеридов могут также служить в качестве источника углерода. Подходящий диапазон количества источника углерода, необходимого для конкретного микроорганизма во время процесса ферментации, хорошо известен специалисту в данной области техники.

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 15°C, в частности от 20 до 40°C, более предпочтительно по меньшей мере 24°C, в частности по меньшей мере 28°C. Типичный про-

цесс ферментации длится примерно до 200 ч. Типичная фаза продуцирования липидов в таком процессе ферментации занимает приблизительно до 100 ч.

Способы по настоящему изобретению предпочтительно предусматривают среднюю скорость получения липидов, составляющую по меньшей мере приблизительно 0,3 г/л/ч, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 0,4 г/л/ч, в частности, по меньшей мере приблизительно 0,5 г/л/ч и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 0,6 г/л/ч.

Предпочтительно способы по настоящему изобретению предусматривают среднюю скорость получения PUFA, составляющую по меньшей мере приблизительно 0,2 г PUFA/л/ч, в частности, по меньшей мере приблизительно 0,3 г PUFA/л/ч, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 0,4 г PUFA/л/ч и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 0,5 г PUFA/л/ч, где PUFA относится предпочтительно к смеси DHA и EPA.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения микроорганизмы выращивали периодическим способом с подпиткой. Периодический способ с подпиткой представляет собой способ ферментации, где один или более субстратов добавляют постепенно.

Способы по настоящему изобретению для выращивания микроорганизмов включают фазу увеличения плотности биомассы. В фазе увеличения плотности биомассы основной целью процесса ферментации является увеличение плотности биомассы в ферментационной среде с получением плотностей биомассы, описанных выше. Скорость подачи источника углерода обычно поддерживается на определенном уровне или в диапазоне, который не оказывает значительного вредного эффекта на продуктивность биомассы микроорганизмов или жизнеспособность микроорганизмов в результате недостаточных возможностей оборудования для ферментации удалять тепло и переносить газы в и из жидкого бульона.

Фаза увеличения плотности биомассы происходит во время обычной технической ферментации на различных фазах, например, ферментация может включать предпосевную стадию или ряд предпосевных стадий и посевную стадию, которая в конечном итоге переходит в производственную стадию ферментации.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения все источники лимитирующих питательных веществ, в частности источники лимитирующих азота и фосфата, постоянно присутствуют в большом количестве перед инициацией фазы продуцирования липидов, чтобы обеспечить максимальный рост биомассы. Это означает, в частности, что присутствие источников лимитирующих азота и фосфата все еще можно обнаружить в ферментационном бульоне, применяя для измерения способы, указанные ранее, когда предпосевная и посевная стадия завершены и полученный ферментационный бульон был дополнительно перенесен на следующую стадию ферментации. Однако концентрации также не должны быть слишком высокими для избегания вредных эффектов в отношении микроорганизмов. Предпочтительно перед инициацией фазы продуцирования липидов концентрация источника(ов) лимитирующего азота всегда значительно выше $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствует 0,1 г/л аммония), а концентрация источника(ов) лимитирующего фосфата всегда значительно выше $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л (соответствует 0,5 г/л фосфата).

Способы по настоящему изобретению для выращивания микроорганизмов также включают фазу продуцирования липидов. В этой фазе первичное применение субстрата микроорганизмами заключается не в повышении плотности биомассы, а скорее в применении субстрата для получения липидов. Следует понимать, что липиды также продуцируются микроорганизмами в меньшем количестве во время фазы увеличения плотности биомассы; однако, как указано выше, основной целью в фазе увеличения плотности биомассы является увеличение плотности биомассы.

Уровень растворенного кислорода (DO) в ферментационной среде во время фазы увеличения плотности биомассы составляет предпочтительно по меньшей мере приблизительно 8% насыщения и предпочтительно от 10 до 20% насыщения, во время фазы получения растворенный кислород в ферментационной среде обычно поддерживается в том же диапазоне, что и в фазе увеличения плотности биомассы, но может также уменьшаться приблизительно до 3% насыщения или меньше. В начале ферментации уровень DO может достигать насыщения или быть близок к нему, и по мере роста микробов он может снижаться до этих низких установленных значений DO. В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения уровень растворенного кислорода, представленный количественно, в ферментационной среде варьируется во время процесса ферментации.

Количество растворенного кислорода, присутствующего в ферментационной среде, можно контролировать путем контроля количества кислорода в свободном пространстве ферментера, путем увеличения или уменьшения скорости аэрации, путем контроля скорости, с которой ферментационную среду взбалтывают (или перемешивают), или путем контроля обратного давления в среде, или путем комбинации этих параметров. Например, высокая скорость взбалтывания (или перемешивания) и/или высокая скорость аэрации приводят к относительно большому количеству растворенного кислорода в ферментационной среде, чем низкая скорость взбалтывания и/или низкая скорость аэрации.

После завершения ферментации клетки можно пастеризовать с целью уничтожения клеток и деактивации ферментов, которые могут способствовать разрушению липидов. Пастеризации предпочтитель-

но достигают путем нагревания биомассы до температуры от 50 до 121°C, предпочтительно от 50 до 70°C, в течение периода 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, против окислительного разрушения. В данном контексте предпочтительные антиоксиданты представляют собой ВНТ, ВНА, ТВНА, галлат, пропилгаллат, этоксикин, бета-каротин, витамин Е и витамин С. Антиоксидант, при применении, предпочтительно добавляют в количестве от 0,01 до 2% по весу.

Любые известные в настоящее время способы выделения могут использоваться для выделения микроорганизмов из ферментационной среды, включая центрифугирование, фильтрацию, ультрафильтрацию, декантацию и выпаривание растворителя.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения после ферментации эукариотических микроорганизмов происходит процесс восстановления липидов. Извлечение липидов может, например, включать удаление воды из указанной ферментационной среды для получения сухих микроорганизмов и последующее выделение указанных липидов из указанных сухих микроорганизмов. Стадия удаления воды может включать высушивание ферментационного бульона либо непосредственно, либо после концентрации ферментационного бульона в барабанной сушилке или в грануляторе с кипящим слоем без предварительного центрифугирования.

В качестве альтернативы способ извлечения липидов может также включать обработку ферментационного бульона для пермеабилзации, лизиса или разрушения микробных клеток и последующее извлечение липидов из ферментационного бульона путем гравитационного разделения и предпочтительно центрифугирования с или без помощи водорастворимого растворителя для помощи в разрушении эмульсии липид/вода. Способы лизиса клеток в ферментационном бульоне, например, описаны в WO 2001/053512, WO 2002/010423, WO 2011/153246, WO 2015/095694 и WO 2015/095696. Предпочтительные способы извлечения липидов после того, как клетки пермеабилизовали, разрушали или лизировали в ферментационном бульоне (что позволяет разрушать липидную эмульсию и извлекать богатую липидами фракцию) включают способ обезмасливания, указанный в WO 96/05278. В этом способе водорастворимое соединение, например спирт или ацетон, добавляют к эмульсии масло/вода для разрушения эмульсии и полученную смесь отделяют путем гравитационного разделения, например центрифугирования. Этот способ может также быть модифицирован для применения других средств (водо- и/или липодорастворимых) для разрушения эмульсии.

Микроорганизмы, извлеченные из них липиды, биомасса, оставшаяся после экстракции липидов, или их комбинации могут использоваться непосредственно в качестве пищевого ингредиента, такого как ингредиент в напитках, соусах, молочных продуктах (таких как молоко, йогурт, сыр и мороженое) и мучных изделиях; пищевая добавка (в формах капсулы или таблетки); корм или кормовая добавка для любого животного, чье мясо или продукты употребляются людьми; пищевая добавка, включая детское питание и детскую смесь; и фармацевтические препараты (применение в прямой или вспомогательной терапии).

Термин "животное" означает любой организм, принадлежащий к царству "Животные", и включает, без ограничения, любое животное, из которого получают мясо птицы, морепродукты, говядину, свинину или баранину. Морепродукты получают, без ограничения, из рыб, креветок и моллюсков.

Термин "продукты" включает любой продукт, отличный от мяса, полученного из этих животных, включая, без ограничения, яйца, молоко или другие продукты. При кормлении этих животных полиненасыщенные липиды могут быть включены в мясо, молоко, яйца или другие продукты этих животных для увеличения содержания таких липидов.

Примеры

Пример 1. Получение липидосодержащей биомассы *Schizochytrium* sp ATCC PTA-9695 путем однократного ограничения количества аммиака при переходе в фазу продуцирования липидов в процессе основной ферментации.

Культуры инокулировали 10% (вес./вес.) ATCC PTA-9695 из посевной стадии ферментации и клетки культивировали в течение приблизительно 192 ч в 10 л ферментерах с начальным количеством 7,5 л и конечным количеством 10 л. Во время ферментации подавали раствор декстрозы 85% (вес./об.) для поддержания концентрации глюкозы приблизительно 50 г/л в ферментационном бульоне. В фазе образования биомассы (приблизительно 60 ч времени ферментации) концентрацию аммиака в бульоне поддерживали в диапазоне от 0,2 до 0,4 г/л. Через определенные промежутки времени раствор KH_2PO_4 добавляли для поддержания концентрации фосфата от 0,5 до 2 г/л в течение всего времени ферментации. Заданное значение pH поддерживали путем титрования с аммиачной водой в ферментере. После приблизительно 60 ч ферментации было решено инициировать переход в фазу получения маслянистых фракций путем прекращения титрования аммиачной воды, что привело к полному истощению аммиака из бульона, и вместо этого переключались на титрование с NaOH, в то время как титрование KH_2PO_4 поддерживали. В частности, фосфат поддерживали во время фазы получения маслянистых фракций при концентрации приблизительно 0,5 г/л во время одного прогона и при концентрации приблизительно 1,5 г/л во время

другого прогона. Уровень растворенного кислорода (DO) поддерживали при 20% насыщения или выше в бульоне во время всего процесса ферментации. DO контролировали с помощью скорости мешалки.

Стартовая среда основного ферментера характеризовалась следующим составом.

Соединение	Формула	Концентрация		Необязательные диапазоны
Сульфат натрия	NaSO ₄	г/л	8,8	0-25, 2-20 или 3-10
Хлорид натрия	NaCl	г/л	0,625	0-25, 0,1-10 или 0,5-5
Хлорид калия	KCl	г/л	1	0-5, 0,25-3 или 0,5-2
Сульфат магния	MgSO ₄ * 7H ₂ O	г/л	5	0-10, 2-8 или 3-6
Сульфат аммония	(NH ₄ +)2SO ₄	г/л	0,42	0-10, 0,25-5 или 0,05-3
Хлорид кальция	CaCl ₂ * 2H ₂ O	г/л	0,29	0,1-5, 0,15-3 или 0,2-1
Дрожжевой экстракт		г/л	1	0-20, 0,1-10 или 0,5-5
Монофосфат калия	KH ₂ PO ₄	г/л	1,765	0,1-10, 0,5-5 или 1-3
После автоклава (металлы)				
Лимонная кислота	C ₆ H ₈ O ₇ * H ₂ O	мг/л	46,82	0,1-5000, 10-3000 или 40-2500
Сульфат железа (II)+	FeSO ₄ * 7H ₂ O	мг/л	10,3	0,1-100, 1-50 или 5-25
Хлорид марганца	MnCl ₂ * 4H ₂ O	мг/л	3,1	0,1-100, 1-50 или 2-25
Сульфат цинка	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	мг/л	9,3	0,01-100, 1-50 или 2-25
Молибдат натрия	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	мг/л	0,04	0-1, 0,001-0,1 или 0,01-0,1
Сульфат меди	CuSO ₄ * 5H ₂ O	мг/л	2,07	0,01-100, 0,5-50 или 1-25

Сульфат никеля	NiSO ₄ * 6H ₂ O	мг/л	2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
После автоклава (витамины)				
Тиамин*HCL	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	мг/л	9,75	0,1-100, 1-50 или 5-25
Пантотенат кальция, D(+)	C ₁₈ H ₃₂ Ca ₁₄ N ₂ O ₁₀	мг/л	3,33	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
Биотин 1% D(+)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	мг/л	0,003 58	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
После автоклава (углерод)				
Декстроза	C ₆ H ₁₂ O ₆	г/л	30	5-150, 10-100 или 20-50
Подача азота	Подача азота посредством направленного добавления	Необязательные диапазоны		
NH ₄ OH (28-30% вес./вес.)	23,6 мл/л	0-150, 10-100 или 15-50		

Условия культивирования были следующими.

Параметр	Значение	Необязательные диапазоны	Примечание
Температура	22,5°C	18-30; 20-27; 22-25	
Растворенный кислород (DO)	≥ 20%	10-100; 15-75; 20-60	
pH	7,0	6,5-7,5; 6,7-7,3; 6,8-7	Контролировали путем добавления аммиачной воды или NaOH

После общего времени ферментации 192 ч процесс ферментации останавливали путем нагревания бульона до 60°C в течение 20 мин, что останавливало метаболизм клеток. Затем определяли общее количество масла, продуцированного клетками. Оказалось, что прекращение подачи азота с одновременным поддержанием подачи фосфата при концентрациях приблизительно 500 или приблизительно 1500 мг/л приводит к конечному общему содержанию жиров в клетках, составляющему 47 и 43% соответственно.

Пример 2. Получение липидосодержащей биомассы *Schizochytrium* sp ATCC PTA-9695 путем однократного ограничения количества PO₄ при переходе в фазу продуцирования липидов в процессе основной ферментации.

Культуры инокулировали 10% (вес./вес.) ATCC PTA-9695 из посевной стадии ферментации и клетки культивировали в течение приблизительно 192 ч в 10 л ферментерах с начальным количеством 7,5 л и конечным количеством 10 л. Во время ферментации подавали раствор декстрозы 85% (вес./об.) для поддержания концентрации глюкозы приблизительно 50 г/л в ферментационном бульоне. В фазе образова-

ния биомассы (приблизительно 60 ч времени ферментации) концентрацию фосфата в бульоне поддерживали в диапазоне от 500 до 2000 мг/л путем добавления раствора KH_2PO_4 через определенные интервалы времени. Для инициации фазы получения маслянистых фракций, обеспечивали непрерывное снижение концентрации PO_4 до тех пор, пока он не был полностью истощен из бульона. Концентрацию аммиака поддерживали во время всего процесса ферментации и, в частности, во время фазы получения маслянистых фракций в диапазоне от 0,2 до 0,4 г/л. Заданное значение pH поддерживали путем титрования с аммиачной водой в ферментере или путем титрования комбинации аммиачной воды и NaOH. Уровень растворенного кислорода (DO) поддерживали при 20% насыщения или выше в бульоне во время всего процесса ферментации. DO контролировали с помощью скоростью мешалки.

Стартовая среда основного ферментера характеризовалась следующим составом.

Соединение	Формула	Концентрация		Диапазоны
Сульфат натрия	NaSO_4	г/л	8,8	0-25, 2-20 или 3-10
Хлорид натрия	NaCl	г/л	0,625	0-25, 0,1-10 или 0,5-5
Хлорид калия	KCl	г/л	1	0-5, 0,25-3 или 0,5-2
Сульфат магния	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	г/л	5	0-10, 2-8 или 3-6
Сульфат аммония	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	г/л	0,42	0-10, 0,25-5 или 0,05-3
Хлорид кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	г/л	0,29	0,1-5, 0,15-3 или 0,2-1
Дрожжевой экстракт		г/л	1	0-20, 0,1-10 или 0,5-5
Монофосфат калия	KH_2PO_4	г/л	1,765	0,1-10, 0,5-5 или 1-3
После автоклава (металлы)				
Лимонная кислота	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	мг/л	46,82	0,1-5000, 10-3000 или 40-2500
Сульфат железа (II)+	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг/л	10,3	0,1-100, 1-50 или 5-25
Хлорид марганца	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	мг/л	3,1	0,1-100, 1-50 или 2-25
Сульфат цинка	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг/л	9,3	0,01-100, 1-50 или 2-25

Молибдат натрия	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *	мг/л	0,04	0-1, 0,001-0,1 или 0,01-0,1
Сульфат меди	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	мг/л	2,07	00,1-100, 0,5-50 или 1-25
Сульфат никеля	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	мг/л	2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
После автоклава (витамины)				
Тиамин*HCL	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	мг/л	9,75	0,1-100, 1-50 или 5-25
Пантотенат кальция, D(+)	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{Ca}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}$	мг/л	3,33	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
Биотин 1% D(+)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	мг/л	0,003 58	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
После автоклава (углерод)				
Декстроза	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	г/л	30	5-150, 10-100 или 20-50
Подача фосфата	Подача фосфата посредством направленного добавления	Диапазон		
Раствор KH_2PO_4 (8,75% вес./вес.)	40 мл/л	5-150, 15-100 или 20-75		

Условия культивирования были следующими.

Параметр	Значение	Диапазоны	Примечание
Температура	22,5°C	18-30; 20-27; 22-25	
Растворенный кислород (DO)	≥ 20%	10-100; 15-75; 20-60	
pH	7,0	6,5-7,5; 6,7-7,3; 6,8-7	Контролировали путем добавления аммиачной воды и/или NaOH

После общего времени ферментации 192 ч процесс ферментации останавливали путем нагревания бульона до 60°C в течение 20 мин, что останавливало метаболизм клеток. Затем определяли общее количество масла, продуцированного клетками. Оказалось, что прекращение подачи фосфата с одновременным поддержанием подачи аммиака при концентрациях от 0,2 до 0,4 г/л приводит к конечному общему содержанию жиров в клетках, составляющему от 50 до 60%.

Пример 3. Получение липидосодержащей биомассы *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695 путем одновременного ограничения количества аммиака и фосфата при переходе в фазу продуцирования липидов в процессе основной ферментации.

Эту ферментацию проводили практически при тех же условиях, которые описаны в примере 1, с раствором KH_2PO_4 , который добавляли только в фазе образования биомассы в процессе ферментации, для поддержания концентрации фосфата в диапазоне от 500 до 2000 мг/л. После фазы образования биомассы обеспечивали непрерывное снижение концентрации фосфата без дополнительного добавления раствора KH_2PO_4 . При прекращении добавления раствора KH_2PO_4 культуру подвергали одновременному ограничению количества аммиака и фосфата. Оказалось, что прекращение как подачи фосфата, так и по-

дачи аммиака обеспечивало лучший выход конечного общего содержания жиров в клетках, а именно общего количества жиров, составляющего приблизительно 70%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из микроорганизмов, способных продуцировать липиды в количестве по меньшей мере приблизительно 10 вес.% от их биомассы, который включает фазу увеличения плотности биомассы и фазу продуцирования липидов, включающий:

а) добавление во время фазы увеличения плотности биомассы к ферментационной среде, содержащей указанные микроорганизмы, источника углерода и по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ со скоростью, достаточной для увеличения плотности биомассы указанной ферментационной среды по меньшей мере до 50 г/л; и

б) прекращение или снижение в значительной степени подачи по меньшей мере двух из указанных источников лимитирующих питательных веществ в фазе продуцирования липидов, при поддержании подачи источника углерода, где микроорганизмы выбраны из родов *Schizochytrium* и *Aurantiochytrium*, указанные по меньшей мере два источника лимитирующих питательных веществ представляют собой источник азота и источник фосфата, и концентрация обоих указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ опускается ниже 0,01 моль/л во время ферментации.

2. Способ по п.1, где концентрация указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ находится ниже 0,01 моль/л в течение по меньшей мере 30% продолжительности фазы продуцирования липидов, предпочтительно в течение по меньшей мере 40, 50 или 60% продолжительности фазы продуцирования липидов, наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 70, 80 или 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

3. Способ по п.1 или 2, где концентрация обоих указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ опускается ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, до нуля и/или ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ во время ферментации.

4. Способ по любому из пп.1-3, где концентрации указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ опускаются ниже 0,01 моль/л, более предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, до нуля и/или ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ в течение 40 ч, предпочтительно в течение 30 ч, более предпочтительно в течение 20 ч после инициации фазы продуцирования липидов.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где концентрации указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ находятся ниже 0,01 моль/л, более предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, равняются нулю и/или находятся ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение всего промежутка, соответствующего заключительным 40%, более предпочтительно по меньшей мере в течение всего промежутка, соответствующего заключительным 50%, более предпочтительно по меньшей мере в течение всего промежутка, соответствующего заключительным 60, 70 или 80% продолжительности фазы продуцирования липидов.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где концентрации указанных по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ находятся ниже 0,01 моль/л, более предпочтительно ниже 0,005 моль/л, наиболее предпочтительно ниже 0,003 моль/л, в частности, равняются нулю и/или находятся ниже предела обнаружения этих источников лимитирующих питательных веществ по меньшей мере в течение последних 20 ч ферментации, более предпочтительно по меньшей мере в течение последних 40 ч ферментации, в частности, по меньшей мере в течение последних 60 ч ферментации.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанный источник азота включает неорганическую соль аммония, в частности гидроксид аммония, или аммиак, или их смеси.

8. Способ по любому из пп.1-7, где источник фосфата включает фосфорную кислоту или неорганические фосфатные соли, в частности дигидрофосфат калия, или их смеси.

9. Способ по любому из пп.1-8, где в фазе продуцирования липидов количество источника(ов) азота уменьшается ниже концентрации $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л и количество источника(ов) фосфата уменьшается ниже концентрации $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л в течение временного промежутка не более чем 40 ч, предпочтительно не более чем 30 или 20 ч.

10. Способ по любому из пп.1-9, где в фазе продуцирования липидов количество источника(ов) азота и источника(ов) фосфата уменьшается до нуля и/или ниже предела обнаружения этих соединений в течение временного промежутка не более чем 40 ч, предпочтительно не более чем 30 ч, более предпочтительно не более чем 20 или 10 ч.

11. Способ по любому из пп.1-10, где концентрация источника(ов) азота всегда находится ниже $5,6 \times 10^{-3}$ моль/л, а концентрация источника(ов) фосфата всегда находится ниже $5,4 \times 10^{-3}$ моль/л по меньшей мере в течение заключительных 75%, предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных

80%, более предпочтительно по меньшей мере в течение заключительных 90% продолжительности фазы продуцирования липидов.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где во время фазы продуцирования липидов подачу по меньшей мере двух источников лимитирующих питательных веществ прекращают.

13. Способ по любому из пп.1-11, где во время фазы продуцирования липидов подачу по меньшей мере одного, предпочтительно всех, по меньшей мере из двух источников лимитирующих питательных веществ поддерживают.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фазу увеличения плотности биомассы проводят до тех пор, пока плотность биомассы не достигнет по меньшей мере 80 г/л, предпочтительно по меньшей мере 100 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 120 г/л, в частности, по меньшей мере 150 г/л.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где микроорганизмы способны к продуцированию липидов в количестве по меньшей мере приблизительно 20 вес.%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 вес.%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 вес.% от их биомассы.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере приблизительно 15 вес.% полученных липидов являются полиненасыщенными липидами.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
