



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123436

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/02 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)
C12R 1/88 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2018 01047
(22) Дата подання заявки: 05.08.2016
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.04.2021
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 102015000042925
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 06.08.2015
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: ІТ
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.05.2018, Бюл.№ 9
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.04.2021, Бюл.№ 14
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/ІВ2016/054734, 05.08.2016

(72) Винахідник(и):
Бортоло Росселла (ІТ),
Б'янкі Даніеле (ІТ),
Балдассаре Маріо (ІТ)
(73) Володілець (володільці):
ЕНІ С.П.А.,
Piazzale E. Mattei, 1, 00144 Roma, Italy (ІТ)
(74) Представник:
Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2010069516 A2, 24.06.2010
WO 2012052368 A1, 26.04.2012
US 2014004579 A1, 02.01.2014
Espinosa-Gonzalez Isabel et al, "Hydrothermal treatment of oleaginous yeast for the recovery of free fatty acids for use in advanced biofuel production" / Irnayuli R. Sitepu a,b, Luis A. Garay a, Ryan Sestric c, David Levin c, David E. Block, J. Bruce German a, Kyria L. Boundy-Mills // Journal of biotechnology. - Elsevier science publishers. - Amsterdam, NL. - 14.07.2014. - vol. 187. - P. 10-15
Irnayuli R. Sitepu et al, "Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production" / Isabel Espinosa-Gonzalez, Archana Parashar, David C. Bressler // Biotechnology advances. - GB. - 01.11.2014. - vol. 32, no. 7. - P. 1336 - 1360

(54) СПОСІБ КОНЦЕНТРУВАННЯ КЛІТИННОЇ СУСПЕНЗІЇ, ЯКА МІСТИТЬ СЛИЗОВУ БІОМАСУ ЖИРОВИХ ДРІЖДЖІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу концентрування клітинної суспензії, яка містить біомасу жирних дріжджів, отриманих в результаті бродіння у ферментаційному бульйоні в умовах, які дозволяють внутрішньоклітинне накопичення ліпідів; та вказаної біомаси, яка містить значні кількості слизового матеріалу.

UA 123436 C2

Цей винахід належить до біотехнологічної галузі та стосується способу концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів.

Більш докладно кажучи, винахід стосується способу концентрування, метою якого є полегшення наступного процесу екстракції внутрішньоклітинних ліпідів; клітинної суспензії, яка містить біомасу жирних дріжджів, отриману в результаті бродіння у ферментаційному бульйоні в умовах, які дозволяють відбуватися внутрішньоклітинному накопиченню ліпідів; зазначеної біомаси, яка відрізняється тим, що містить значні кількості слизового матеріалу.

Отримані мікробіологічним шляхом ліпіди може бути зручно застосовано для отримання біопластика або як проміжні сполуки для синтезу, зокрема у так званій галузі "зеленої хімії" або для отримання біопалив, як-то, наприклад, "біодизель" або "зелений дизель", які може бути застосовано як окремо, так і в суміші з іншими паливами для автомобілів.

Для цих типів застосувань, мікробіологічне вироблення ліпідів запропоновано, як корисна альтернатива існуючим способам їх отримання з поновлюваних джерел. Щодо застосування рослинних олій слід зазначити, що мікробіологічні процеси є незалежними від кліматичних або географічних факторів та не конкурують з сільськогосподарським застосуванням ґрунту для отримання джерел харчування. Іншою перевагою цих процесів є те, що вони полягають у застосуванні здатності мікроорганізмів швидко відтворюватися з допомогою не дуже дорогих субстратів, як-то, наприклад, похідних гідролізу лігноцелюлозних матеріалів.

В галузі мікробіологічного вироблення ліпідів особливо перспективними є жирні дріжджі, тобто дріжджі, які в особливих умовах культивування є здатними до накопичення ліпідів в кількостях, які дорівнюють або перевищують 25 % від їх сухої маси.

Застосування жирних дріжджів для отримання ліпідів є частиною відомої галузі техніки.

У Міжнародній Патентній Публікації WO 2012/052368, наприклад, описано процес отримання ліпідів з жирних дріжджів, вибраних з роду *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Trigonopsis*, *Candida*, *Torulopsis* та *Pichia* з допомогою процесів бродіння у присутності розведених цукрових субстратів, отриманих в результаті гідролізу лігноцелюлозних біомас, які містять принаймні один полісахарид. Цей процес полягає у наступному: піддання цієї біомаси, яка містить принаймні один полісахарид кислотному гідролізу з отриманням першої суміші, яка містить першу тверду фазу та першу водну фазу; завантаження цієї першої водної фази у пристрій для бродіння у присутності принаймні одного штаму жирних дріжджів з отриманням першого ферментаційного бульйону, який містить першу жирну клітинну біомасу; застосування кислого або ферментативного гідролізу цієї першої твердої фази з отриманням другої суміші, яка містить другу тверду фазу та другу водну фазу; завантаження цієї другої водної фази до пристрою для бродіння в присутності першого ферментаційного бульйону з отриманням другого ферментаційного бульйону, який містить другу жирну клітинну біомасу з ліпідним вмістом; застосування мікрофільтрації до принаймні частини цього другого ферментаційного бульйону з отриманням ретентату та пермеату; завантаження цього ретентату до зазначеного пристрою для бродіння.

Отримані таким чином ліпіди може бути корисним чином застосовано для отримання біодизеля або "зеленого дизеля", які може бути застосовано або в чистому вигляді або в суміші з іншими автомобільними паливами.

Однак слід зазначити, що застосування ліпідів мікробіологічного походження, як для отримання біопалив, як-то, наприклад, біодизеля або "зеленого дизеля", так і також, як проміжних продуктів синтезу, зокрема у так званій галузі "зеленої хімії", конкурує із застосуванням палив та хімічних проміжних продуктів викопного походження, отриманих з допомогою процесів, які майже завжди є більш економічно зручнішими. Отже, зберігається велика зацікавленість у дослідженні процесів, спроможних скоротити витрати, потрібні для вироблення ліпідів біологічного та зокрема мікробіологічного походження, а також збільшити їх вихід.

Один з найважливіших критичних аспектів стосується того, що об'ємна продуктивність (тобто кількість ліпідів, яку можна одержати на одиницю об'єму середовища для бродіння) у разі їх мікробіологічного вироблення є обмеженою та загальним чином меншою за 100 г / л, тому промислове застосування цих виробничих процесів передбачає вживання значних об'ємів бродіння цих жирних мікроорганізмів. Ці великі об'єми клітинної суспензії повинні бути обробленими природним шляхом для відновлення отриманої біомаси та відновлення вилучення ліпідів на обладнанні великого розміру та з високими витратами на його налаштування та технологічні процеси.

Способи екстракції ліпідів з жирних мікроорганізмів також є добре відомими в цій галузі.

У Міжнародній Патентній Публікації WO 2012/078852, наприклад, описано процес екстракції тригліцеридів з мікроводоростей шляхом теплової обробки клітинної біомаси у кислому

середовищі та у присутності полярного розчинника, застосованого з метою підтримання належного стану клітинної стінки та сприяння наступній екстракції з неполярним розчинником.

Майже всі процеси екстракції ліпідного вмісту з біомасами жирних мікроорганізмів передбачають застосування попередньої операції вилучення цих біомас з культуральних середовищ наприкінці процесу бродіння, яку здійснюють з допомогою фізичних засобів, як-то, наприклад, фільтрації, флокуляції або центрифугування.

Зрозуміло, що існують певні виключення: одне з них, наприклад, наведено в Патентній Заявці WO 2001/053512, в якій описано процес екстракції ліпідів з мікроорганізмів, яку може бути здійснено безпосередньо у культуральному середовищі у ферментері після лізису біомаси.

Як вже було зазначено, процес екстракції ліпідів з жирних мікроорганізмів звичайно полягає у застосуванні попереднього етапу вилучення клітинної біомаси з культурального середовища.

Наприклад, в Міжнародній Патентній Публікації WO 2012/052368 після бродіння передбачено отримання біомаси, яка складається з клітин жирних дріжджів, із застосуванням тангенціальної мікрофільтрації.

Аналогічно, в Патентній Заявці Італії MI2014A000761 описано процес отримання ліпідів з жирової біомаси з допомогою бродіння, після якого цю біомасу, яка містить ліпіди, вилучають шляхом центрифугування.

З іншого боку, у US 2001/0046691 жирову біомасу повністю зневоднюють, переміщуючи клітинну суспензію, яка надходить з ферментеру до нагрітої барабанної сушарки, що таким чином призводить до випарювання водного вмісту цієї суспензії.

Однак слід зазначити, що деякі жирові дріжджі, як-то, наприклад, дріжджі видів *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon* тощо можуть виробляти біологічні емульгатори та поверхнево-активні речовини (як описано, наприклад, у роботі R. Shepherd, J. Rockey, I.W. Sutherland and S. Roller in "Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods" ("Отриманий з мікроорганізмів новий біоемульгатор для харчового застосування") (1995), J. Biotechnol., vol. 40 pages 207-217), які надають рідким культурам цих мікроорганізмів характерного слизового природного стану. Зокрема вироблення цих слизових субстанцій відбувається у разі досягнення великих концентрацій біомаси під час процесів бродіння в промисловому масштабі.

Також часто було спостережено, що поверхнево-активні властивості цих субстанцій роблять важким вилучення мікроорганізмів, які їх виробляють, з культурального середовища.

У деяких дослідженнях (наприклад, у роботах K. Pavlova, L. Koleva, M. Kratchanova, I. Panchev "Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast" ("Вироблення дріжджами екзополісахариду та його характеристика") (2004), World J. of Microbiol. & Biotechnol., vol. 20, pages 435-439 та I.N.A. Van Bogaert, J. Zhang, W. Soetaert "Microbial synthesis of sophorolipids" ("Мікробний синтез софороліпідів") (2011) Process Biochemistry, vol. 46, pages 821-833) було виявлено, що біосинтез цих слизових субстанцій у частини жирних мікроорганізмів може бути стимульовано з допомогою тих саме умов культивування, яких було застосовано для сприяння накопичення ліпідів. Це означає, що часто можна виявити існування кореляції між накопиченням ліпідів та виробництвом слизових речовин до такої міри, що мікроорганізми, які виробляють більше ліпідів, також є такими, яких, завдяки утворенню цих речовин, буде більш складно вилучити з культурального середовища.

В цих випадках клітинна маса фактично може набувати щільності, яка відповідно буде дорівнювати щільності культурального середовища, тим самим запобігаючи відокремленню рідкої та твердої фаз з допомогою таких способів, як-то, наприклад, седиментація або центрифугування, в основі яких застосовано існування різниці щільності між фазами, які необхідно відокремити.

Відповідно, вироблення слизових субстанцій мутантними мікроорганізмами, здатними до надлишкового вироблення ліпідів викликає утворення стійких емульсій, які унеможливають вилучення мікробних клітин з ферментаційного бульйону із застосуванням відомих в цій галузі способів. Прикладом жирних дріжджів, які виробляють слизові субстанції є мутантний штам жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, описаний в Патентній Заявці MI2014A002292.

В інших випадках, отримання слизового матеріалу може супроводжуватися значним зростанням в'язкості ферментаційного бульйону в ферментері, як це може бути спостережено, наприклад, для певних високопродуктивних культур (які мають концентрацію біомаси, яка дорівнює або перевищує 80 г біомаси на літр культури) дріжджів видів *Cryptococcus* або *Trichosporon*, що може викликати труднощі не лише під час процесів концентрування, але навіть у фазі вилучення ферментаційного бульйону з ферментерів та перенесення його до систем відокремлення або обробки для екстракції ліпідів.

Заявник розглянув проблему знаходження способу відновлення слизової біомаси жирних дріжджів з ферментаційного бульйону із застосуванням концентрування бактеріальної суспензії, яка містить цю слизову біомасу в суттєво зменшеному обсязі, вважаючи, що звичайно застосовані для цієї мети в промисловій практиці способи та технічні прийоми виявилися

5 неефективними.

Як вже було зазначено, висока в'язкість ферментаційного бульйону та/або зменшення різниці щільності між фазами ферментаційного бульйону може зробити застосування одного лише центрифугування взагалі неефективним для вилучення жирних біомас з культурального середовища.

10 Серед способів, застосованих для концентрування клітинних суспензій можна відзначити фільтрацію на плоских мембранах або на фільтрах, які обертаються, але отримані з допомогою жирних мікроорганізмів слизові субстанції можуть швидко перекрити пори цих фільтрів, таким чином унеможливаючи проникнення до них водної фази. З іншого боку, застосування спеціальних добавок (так званих попередніх покриттів або допоміжних фільтруючих засобів),

15 окрім слабкої корисності також може бути недоцільним, оскільки це негативно впливає на подальшу екстракційну обробку ліпідів. Ці добавки фактично є твердими матеріалами, наприклад, матеріалами на основі похідних целюлози або глини, які, залишаючись поглиненими в біомасі, можуть створити проблеми у наступній фазі екстракції ліпідів (наприклад, викликання непроникності фільтрів, утворення твердого осаду чи перешкод при застосуванні pomp тощо).

20 Так само, додавання до ферментаційного бульйону флокулянтів або засобів, які сприяють седиментації біомаси може в цих випадках виявитися неефективним, оскільки вони є неспроможними сприяти відокремленню біомаси з рідкої фази ферментаційного бульйону. Крім того, природа певних флокулянтів може бути несумісною з наступним процесом екстракції ліпідів через високу афінність цих субстанцій з застосованими в екстракції розчинниками. На практиці ці продукти може бути екстраговано разом з внутрішньоклітинними ліпідами, отже вони є домішками, які треба усунути перед застосуванням самих ліпідів.

25

Тангенційна мікрофільтрація, зокрема у разі застосування системи стороннього пульсуючого протитиску для компенсації зменшення швидкості потоку через забруднення мембран може бути ефективним способом концентрації клітинних суспензій з великим вмістом слизових біомас; однак навіть цей спосіб не має реального промислового втілення через те, що потік, який проходить крізь фільтри після короткочасного їх застосування також починає раптово зменшуватися, що зрештою призводить до неприйняттого зростання часу обробки.

30

Нарешті слід зазначити, що хоча ефективного концентрування клітинних суспензій з високим вмістом слизу можна досягти з допомогою способів, які передбачають випарювання води з ферментаційного бульйону (як-то, наприклад, барабанне сушіння біомаси, ліофілізація або сушіння розпиленням), проте ці способи потребують великого споживання енергії та у будь-якому разі здійснення загального концентрування наявних у ферментаційному бульйоні компонентів може бути несумісним з наступним процесом екстракції або із застосуванням екстрагованих ліпідів.

35

40 Заявник розробив позбавлений від перелічених вище недоліків спосіб концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів.

Цей спосіб полягає у тепловій обробці клітинної суспензії жирних дріжджів у середовищі з кислим рН в умовах, які не викликають руйнування клітин з метою сприяння утворенню цієї клітинної суспензії у концентрованому вигляді із застосуванням відомих в цій галузі способів, наприклад, центрифугування.

45

Застосування способу за винаходом призводить до отримання численних переваг.

Цей спосіб, наприклад, дозволяє відокремити слизову біомасу, яка містить інтактні клітини жирних дріжджів, тобто здійснити це по суті без руйнування клітинних мембран цих дріжджів або феномену клітинного лізису, тим самим уникаючи розсіювання інтересуючи ендоклітинних ліпідів.

50

Для цілей винаходу, клітини жирних дріжджів клітинної суспензії вважаються інтактними до такої міри, доки вміст ліпідів ферментаційного бульйону, відокремлений з клітинної суспензії наприкінці процесу відповідно до способу винаходу, як буде докладніше описано нижче (Приклад 5), буде суттєво дорівнювати нулю.

55

Інша важлива перевага полягає в тому, що концентрація отриманої за способом винаходу клітинної суспензії дозволяє вилучення з клітинної біомаси разом з водною фазою також сполук, які спочатку є наявними у ферментаційному бульйоні або які утворюються в результаті бродіння та можуть пошкодити або зменшити ефективність наступної екстракційної обробки ліпідів.

60 Додаткова важлива перевага цього способу полягає в тому, що об'єм клітинної суспензії може бути значно зменшено, що тим самим дозволяє здійснити наступну екстракційну обробку

ліпідів у зменшеному обсязі, з помітною економією щодо потрібного для цього обладнання та реагентів (наприклад, розчинників) та технологічних витрат.

Для цілей винаходу концентрацію біомаси у клітинній суспензії визначено, як суху масу біомаси по відношенню до одиниці об'єму суспензії. Зокрема, термін "суха маса" біомаси стосується маси клітин, які знаходяться у відомому об'ємі клітинної суспензії, визначеної шляхом зважування вищезазначених клітин після повного усунення вмісту води з допомогою теплової обробки у вентильованій сушильній шафі при 105 °C до отримання сталого значення маси (приблизно протягом 24 годин). Отже ця маса може мати відношення до 1 л клітинної суспензії та отримана таким чином концентрація є наведеною у г/л або вона може мати відношення до 100 г клітинної суспензії та в цьому разі концентрація біомаси є наведеною у відсотковому вигляді відносно загальної маси суспензії (% "сухої маси" або % с. м.).

Додаткові характеристики та переваги винаходу будуть зрозумілими з наступного детального опису та прикладів втілення, які не є обмежувачими.

Для цілей цього опису та наступної Формули Винаходу, визначення числових діапазонів завжди включає граничні значення, якщо тільки не зазначено іншого.

Для цілей цього опису та наступної Формули Винаходу, наведені відсоткові значення стосуються масової частки, якщо тільки не зазначено іншого.

Для цілей цього опису та наступної Формули Винаходу, термін "містить" також включає терміни "суттєво складається з" або "складається з".

Для цілей винаходу, термін "ліпіди" стосується категорії субстанцій, молекули яких головним чином містять аліфатичний вуглеводневий ланцюг та які розчинюються у неполярних органічних розчинниках та погано розчинюються у воді. Ліпіди утворюють важливу групу молекул, існуючих у живих клітинах та охоплюють, наприклад, жири, олії, віски, ефіри воску, стерини, терпеноїди, ізопреноїди, каротиноїди, полігідроксиалканоати, жирні кислоти, жирні спирти, естери жирних кислот, фосфоліпіди, гліколіпіди, сфіноліпіди та ацилгліцерини, як-то моногліцериди, дигліцериди та тригліцериди.

Для цілей винаходу та з окремим посиланням на культури мікроорганізмів та зокрема на культури дріжджів, термін "слиз" стосується комплексу органічних субстанцій, подібних до гелю та здатних утримувати рідину, які відрізняються в'язкою та еластичною консистенцією. Слиз може, наприклад, складатися з сумішей полісахаридів, гліколіпідів, ліпопептидів, глікопептидів, полісахаридно-ліпідних комплексів та полісахаридно-білкових комплексів. У деяких випадках дріжджові культури з високим вмістом слизу відрізняються великою в'язкістю, яка дорівнює або перевищує 15 мПа·с (К. Pavlova, L. Koleva, M. Kratchanova, I. Panchev "Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast" ("Вироблення дріжджами екзополісахариду та його характеристика") (2004), World Journal of Microbiol & Biotechnol., vol 20 pages 435-439).

Для цілей винаходу, термін "слизовий мікроорганізм" стосується мікроорганізму, який виробляє слиз у природних або у фізіологічних умовах або в умовах метаболічного стресу або у присутності специфічних субстратів та/або у певних умовах бродіння. Культивування слизових мікроорганізмів призводить до отримання "слизових біомас".

Для цілей винаходу, термін "біодизель" стосується палива для дизельних двигунів, яке містить алкільні естери (наприклад метилові, пропілові або етилові естери) довголанцюгових жирних кислот, які походять з біологічних джерел.

Для цілей винаходу, термін "зелений дизель" стосується палива для дизельних двигунів, яке містить продукти гідрування або деоксигенації ліпідів, отриманих з біологічних джерел у присутності водню та принаймні одного каталізатора.

Для цілей винаходу, термін "біопластик" стосується типу прийнятного для вторинної переробки пластика, поновлюваної сировини біологічного походження або який є біологічно розкладаним або має обидві властивості.

Для цілей винаходу, термін "поновлюваний сировинний матеріал" стосується композиції, яку принаймні частково отримано з джерела та/або внаслідок процесу, який через природні особливості або внаслідок діяльності людини вважається "невичерпним", тобто поновлюється з часом, отже майже нескінченно може бути прийнятним для застосування.

Для цілей винаходу, вираз "жировий мікроорганізм" стосується мікроорганізму, здатного до накопичення ліпідів, масова частка яких дорівнює або перевищує 25 % від клітинної сухої маси. Жирові дріжджі також є жировими мікроорганізмами.

Певні варіанти жирових дріжджів можуть бути здатними до накопичення ліпідів, масова частка яких буде дорівнювати або перевищувати 40 % від клітинної сухої маси. У певних умовах жирові дріжджі можуть накопичувати ліпіди, масова частка яких буде переважно дорівнювати або перевищувати 60 % від клітинної сухої маси.

Для цілей винаходу, виразами "культивування" та "культура" позначено процеси, з допомогою яких клітини мікроорганізму зростають та відтворюються в умовах, контрольованих людиною. "Бродіння" жирових дріжджів, здійснене у певних втіленнях винаходу, належить до процесів, визначених вищезазначеними виразами.

5 Для цілей винаходу, виразами "ферментаційне (або культуральне) середовище (або бульйон)" позначено рідину або гель, отриманий для підтримання росту мікроорганізмів, наприклад, клітин жирових дріжджів.

10 Для цілей винаходу, термін "біомаса" стосується комбінації клітин та/або клітинного матеріалу, отриманого з рослин, тварин або мікроорганізмів. У переважному аспекті, біомасу може бути отримано з клітин та/або клітинного матеріалу, отриманого від грибків, бактерій, дріжджів, пліснявих грибів та мікроводоростей. Зазначені біомаси зазвичай можуть мати природне походження. У деяких втіленнях винаходу ці біомаси можуть складатися з природних мутантів, індукованих мутантів або генетично модифікованих організмів. Вказані біомаси переважно отримують з допомогою бродіння або інших режимів культивування.

15 Предметом винаходу є спосіб концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів та вищезазначений спосіб полягає у застосуванні наступних операцій:

а) культивування цих жирових дріжджів у ферментаційному бульйоні, яке призводить до отримання клітинної суспензії, яка містить зазначену слизову біомасу;

20 б) піддання отриманої у операції а) клітинної суспензії тепловій обробці з температурою 95-120 °C та обробці кислотою, яка призводить до отримання обробленої клітинної суспензії, яка містить цю слизову біомасу з інтактними жировими дріжджовими клітинами;

25 в) концентрування отриманої у операції б) обробленої клітинної суспензії, яке полягає у застосуванні операції відокремлення принаймні частини цього ферментаційного бульйону, яке призводить до отримання концентрованої клітинної суспензії.

Застосовані жирові дріжджі є переважно вибраними з групи, яка складається згідно Yarrowia, Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Trigonopsis, Torulopsis, Lipomyces, Pichia, Rhodotorula, Rhodosporidium та їх консорціум, переважно Trichosporon, Cryptococcus, Rhodosporidium або їх консорціум.

30 Вищевказані дріжджі переважно накопичують ліпіди в кількості, яка дорівнює або перевищує 25 %, переважно яка дорівнює або перевищує 40 %, більш переважно яка дорівнює або перевищує 60 %, більш переважно яка дорівнює або перевищує 70 % від їх сухої маси.

У переважному аспекті, ці жирові дріжджі може бути представлено клітинами дріжджів Rhodosporidium azoricum DSM 29495.

35 Цей мутантний штам жирових дріжджів Rhodosporidium azoricum DSM 29495 було отримано з допомогою способів мутагенезу in vitro, як описано у заповненій Заявником Патентній Заявці Італії MI2014A002292 та від дикого штамів Rhodosporidium azoricum він відрізняється значно підвищеним виходом отриманих внаслідок внутрішньоклітинного накопичення ліпідів у разі його культивування у збагаченому джерелами азоту ферментаційному бульйоні.

40 Бульйони для бродіння можуть охоплювати розчини цукрів, отримані з крохмалистих рослин або цукрових фруктів (цукри першої генерації). У іншому втіленні може бути застосовано бульйони, які містять цукри, отримані з допомогою гідролітичної та цукрифікаційної обробки неїстівних лігноцелюлозних біомас (цукри другої генерації).

45 У переважному аспекті винаходу, ферментаційний бульйон, в якому відбувається бродіння жирових дріжджів може бути отримано в результаті гідролізу лігноцелюлозних біомас.

50 Для цілей винаходу, терміни "лігноцелюлозний матеріал" та "лігноцелюлозна біомаса" стосуються складної структури рослинного походження, яка містить целюлозу, геміцелюлозу та лігнін. З цього матеріалу отримують цукри з допомогою відомих в цій галузі способів фізико-хімічної та ферментативної обробки та ці продукти може бути застосовано, як джерела вуглецю в процесах бродіння мікроорганізмів для виробництва спиртів та/або ліпідів.

55 У переважному аспекті винаходу, цукри, отримані з крохмалистих рослин або цукрових фруктів (цукри першої генерації) або цукри, отримані з допомогою гідролітичної та цукрифікаційної обробки неїстівних лігноцелюлозних біомас (цукри другої генерації) завантажують до ферментеру, інокульованого прекультурою жирових дріжджів. На додачу до цукрів, до ферментеру також може бути завантажено й інші поживні речовини, як-то вітаміни, солі або азотисті сполуки. Застосований у вищезазначеній операції а) ферментаційний бульйон, потрібний для способу за винаходом переважно отримують шляхом гідролізу лігноцелюлозних біомас.

60 Протягом вищезазначеної операції б) під час якої клітинну суспензію піддають тепловій та кислотній обробці, вищезазначену суспензію може бути підтримано без перемішування або її

може бути піддано повільному, періодичному або безперервному перемішуванню. У переважному аспекті клітинну суспензію можна зберігати з повільним перемішуванням.

Теплову обробку переважно здійснюють протягом часу, який складає 3-12 годин, переважно протягом часу в межах 4-8 год.

5 Теплову обробку переважно здійснюють з температурою в межах 100-110 °С. Еквівалентну обробку може бути отримано із застосуванням різних комбінацій часу та температури. Чим вище буде температура термічної обробки, тим, наприклад, буде меншою необхідна кількість часу. Зокрема, у переважному аспекті винаходу, теплову обробку може бути здійснено при 100 °С протягом приблизно 8 годин. У додатковому переважному аспекті винаходу цю теплову
10 обробку може бути здійснено при 110 °С протягом приблизно 4 години.

Слід зазначити, що вищезазначена теплова обробка відрізняється від інших відомих в цій галузі описаних теплових обробок та/або операцій попередніх обробок, як-то вказані операції попередньої обробки, метою яких є "пастеризація" біомас жирових мікроорганізмів, яка дозволяє їх зберігати протягом тривалих періодів часу перед екстракцією внутрішньоклітинних ліпідів. Ці операції попередньої обробки здійснюють протягом дуже зменшених періодів часу,
15 виключаючи операції підкислення за стандартною схемою. Зазначені операції пастеризаційної обробки фактично виявилися абсолютно неефективними для концентрування клітинних суспензій, які містять слизові біомаси жирових дріжджів.

Спосіб винаходу, навпаки, відрізняється наявністю синергічної дії, пов'язаної з обробкою шляхом підкислення, поєднаної з тепловою обробкою протягом відповідно встановленого часу, що неочікувано дозволило здійснити концентрування зазначених клітинні суспензій без будь-яких труднощів.

Під час підкислювальної обробки за винаходом рН клітинної суспензії може знаходитися в межах 1,5-6,0 та переважно в межах 2,0-4,5.

25 Обробку підкисленням може бути здійснено під час теплової обробки. У переважному аспекті, перед цією підкислювальною обробкою здійснюють теплову обробку.

Обробку підкисленням переважно здійснюють шляхом додавання органічної або неорганічної кислоти Бронстеда, переважно неорганічної кислоти.

Ця кислота є переважно вибраною з групи, яка містить оцтову кислоту, соляну кислоту, азотну кислоту, фосфорну кислоту, сірчану кислоту, борну кислоту, фтористоводневу кислоту, бромистоводневу кислоту, молочну кислоту, мурашину кислоту, пропіонову кислоту або їх суміші та більш переважно сірчану кислоту.
30

Слід зазначити, що застосована у способі за винаходом кислота може мати будь-яку концентрацію, отже вона може бути кислотою, розведеною у воді або концентрованою кислотою та переважно вона є концентрованою кислотою.
35

Кінцева концентрація цієї кислоти, тобто її концентрація у повному об'ємі клітинної суспензії наприкінці обробки підкисленням переважно може знаходитися в межах 0,05-0,5 % (маса/об'єм) та переважно може знаходитися в межах 0,2-0,3 % (маса/об'єм).

Фахівець в цій галузі може визначити найбільш прийнятну кінцеву концентрацію кислоти, маючи на увазі, що показник рН суспензії клітин в кінці додавання зазначеної кислоти повинен бути в зазначених вище межах.
40

Переважно вищезазначену операцію с) концентрування клітинної суспензії може бути здійснено з допомогою спонтанного осадження або під дією сил гравітації, з допомогою сифонування, випарювання у вакуумі, ліофілізації, флокуляції, мікрофільтрації або центрифугування та переважніше цю операцію здійснюють шляхом центрифугування. У
45 окремому переважному аспекті, операцію с) може бути здійснено шляхом переривчастого або безперервного центрифугування. В останньому разі може бут застосовано декантерну центрифугу з переливним відокремленням рідини або планшетну центрифугу.

Якщо концентрацію клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів після теплової обробки та підкислювальної обробки за цим способом здійснюють шляхом центрифугування, то це центрифугування може бути здійснено з прискоренням в межах 1000-6000 x g, переважно в межах 2000-5000 x g та більш переважно в межах 3000-4000 x g.
50

Після центрифугування, слизова біомаса, яка складається з жирових дріжджів може утворювати осад на дні контейнера для центрифугування або її може бути концентровано у шар, який плаває на поверхні культурального середовища. В цьому разі, прозорий нижній шар, який складається з ферментаційного бульйону може бути відокремлено від плаваючої біомаси з допомогою всмоктуючого сифону або шляхом усунування цього прозорого нижнього шару з допомогою клапану, відповідно розташованого на дні контейнера.
55

Слід зазначити, що спосіб за винаходом дозволяє отримати концентровану клітинну суспензію, яка містить інтактні клітини жирових дріжджів, тобто клітини, позбавлені будь-яких
60

руйнувань. Як фактично було показано (див. наведений тут Приклад 5), у ферментаційному бульйоні, відокремленому з біомаси наприкінці процесу відповідно за зазначеним способом не може бути виявлено присутності ліпідів.

Без бажання бути пов'язаними з будь-якою конкретною теорією, передбачається, що спосіб за винаходом сприяє руйнуванню слизових субстанцій, наявних на поверхні дріжджових клітин, полегшуючи таким чином агрегацію тих самих клітин та сприяючи їх відокремленню від ферментативного бульйону. З уникненням руйнування клітинних стінок було досягнуто подвійної переваги, яка полягала у запобіганні розсіювання внутрішньоклітинних ліпідів через їх витік у культуральне середовище та у обмеженні вмісту біологічного та органічного матеріалу у водній фазі, що збільшило б індекс COD (хімічного споживання кисню) та могло б вимагати особливої обробки відпрацьованого середовища перед його утилізацією.

Завдяки способу за винаходом, після відокремлення принаймні частини ферментаційного бульйону у операції с) цього способу, концентрація біомаси в отриманій клітинній суспензії може знаходитися в межах 19,0-35,0 % та переважно в межах 21,0-30,0 % (масова частка сухих речовин).

Після концентрування клітинної суспензії, яка містить біомасу жирових дріжджів під час процесу за способом винаходу, вищезазначену біомасу може бути піддано руйнації (лізису) з наступною екстракцією ліпідів з допомогою будь-якого з відомих в цій галузі способів.

Відповідно до способу, описаного, наприклад, у Патентній Заявці WO 2012/052368, біомасу може бути перенесено у автоклав, в якому її може бути піддано додатковій 4-годинній тепловій обробці при 140 °C, таким чином викликаючи її лізис. Потім отриману суспензію може бути перенесено у реактор та піддано екстракції з принаймні одним полярним органічним розчинником, який не змішується з водою (наприклад етил-трет-бутиловий етер, метил-ізо-бутил-кетон, етилацетат) або з принаймні одним неполярним органічним розчинником (наприклад, ізооктан, гексан або суміші лінійних або розгалужених парафінів, число атомів карбону в яких складає 5-10, бензен, толуол або ксилен), чистим або в суміші з водорозчинними полярними розчинниками (наприклад, етанол, пропанол, ізопропанол).

Після екстракції в органічному розчиннику, отриману з клітин суміш тригліцеридів може бути виділено шляхом випарювання самого органічного розчинника.

Аналіз ліпідної фракції може бути здійснено з допомогою хроматографічних способів, наприклад, газової хроматографії або високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у відповідності з відомими у цій галузі процесами.

З допомогою цих аналітичних способів було виявлено, що принаймні 90 % накопичених у клітинах жирових дріжджів ліпідів представлено тригліцеридами, переважно гліцериновими естерами жирних кислот, які мають 8-24 атомів карбону, як-то, наприклад, пальмітинової кислоти, стеаринової кислоти, олеїнової кислоти та α -лінолевої кислоти.

Іншими ліпідами, які також можуть бути наявними, є фосфоліпіди, моногліцериди, дигліцериди, вільні жирні кислоти або їх суміші.

Ліпіди, отримані відповідно до процесу, який є предметом винаходу може бути корисним чином застосовано, як похідні синтезу, зокрема у так званій галузі "зеленої хімії". Їх також може бути піддано переестерифікації в присутності принаймні одного спирту, який має 1-4 атомів карбону, переважно метанолу або етанолу та принаймні одного кислого або основного каталізатора з метою отримання гліцерину та алкілових естерів, зокрема метилових та етилових естерів (біодизель).

Як варіант, ці ліпіди може бути піддано гідруванню/деоксигенації у присутності водню та принаймні одного каталізатора з метою отримання "зеленого дизеля". Процеси гідрування/деоксигенації є відомими в цій галузі та їх описано, наприклад, у Патентній Заявці ЄС EP 1 728 844.

Для кращої ілюстрації винаходу та для його практичного втілення нижче наведено деякі необмежуючі приклади.

Приклад 1: бродіння жирових дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495

Нижче надано приклад отримання клітинної суспензії жирових дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495.

200 мл середовища YEPD (10 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л пептодину, 20 г/л глюкози) попередньо стерилізували в автоклаві протягом 45 хв. при 80 °C та налили у колбу об'ємом 1 л.

Отриманий таким чином початковий ферментаційний бульйон було інокульовано зразком штаму жирових дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495.

Цю прекультуру спочатку зберігали протягом доби при 30 °C з перемішуванням (200 об./хв.), а потім її перенесли у ферментер об'ємом 20 л, який містив 8 л середовища, яке містило глюкозу (50 г/л), тверді частинки зерен кукурудзи (5 г/л), дріжджовий екстракт (2 г/л), KH_2PO_4 (6

г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 г/л), NaCl (0,06 г/л), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,06 г/л) та було попередньо стерилізовано протягом 45 хв. при 80 °С.

Цю першу культуру у ферментері зберігали протягом 24 годин при 30 °С в аеробних умовах (продування стерильним повітрям зі швидкістю 1 л/хв) із застосуванням перемішування зі змінною швидкістю від 600 до 900 об./хв., яку змінювали з повітряним потоком для підтримання концентрації розчиненого кисню (DO_2) на межі 30 % від значення насичення.

В кінці доби отриману клітинну суспензію з допомогою перистальтичної помпи перенесли у ферментер об'ємом 200 л, який містив 80 л середовища, яке містило глюкозу (80 г/л), тверді частинки зерен кукурудзи (8 г/л), дріжджовий екстракт (3,2 г/л), KH_2PO_4 (6 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 г/л), NaCl (0,06 г/л), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,06 г/л), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8 г/л) та було попередньо стерилізовано при 121 °С протягом 20 хв.

Цю другу культуру у ферментері також зберігали при 30 °С протягом 24 годин. в аеробних умовах (продування стерильним повітрям зі швидкістю 1 л/хв.) із застосуванням перемішування зі змінною швидкістю від 600 до 900 об./хв., яку змінювали з повітряним потоком для підтримання концентрації розчиненого кисню (DO_2) на межі 30 % від значення насичення та з показником рН, який дорівнював приблизно 5,0 та який у разі необхідності було доведено шляхом додавання кількох крапель розчину 5 М КОН або 10 % H_2SO_4 (об'єм/об'єм).

В кінці доби вміст залишкової глюкози було визначено відповідно до відомих в цій галузі процесів, наприклад із застосуванням ферментативного мембранного аналізатора, як-то біохімічного аналізатора YSI 2900, або з допомогою іонообмінної хроматографії (аніонообмінна хроматографія високої роздільної здатності з імпульсним амперометричним визначенням (HPLC-PAD) із застосуванням хроматографа Dionex, обладнаного колонкою Carborac PA100 з градієнтом гідроксиду натрію та ацетатом натрію в якості протиіону.

Потім до ферментеру приєднали два резервуари та в один з них завантажили стерильний розчин глюкози (614 г/л), який подавали до ферментеру безперервно з середньою швидкістю потоку 1 л/год. відповідно до кінетики споживання мікроорганізму в культурі з метою підтримання в неї постійної концентрації глюкози на позначці 30 г/л. У другий резервуар налили стерильний розчин дріжджового екстракту (80 г/л) та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (200 г/л), який також подавали до ферментеру безперервно з середньою швидкістю потоку 400 мл/год.

Далі бродіння тривало у вищезазначених умовах ще 117 годин.

В кінці бродіння клітинну суспензію (загальною масою 187 кг) було вилучено з ферментеру та потім було піддано перевіркам на її концентрування. Отримана таким чином клітинна суспензія відрізнялася концентрацією біомаси, яка дорівнювала 112,3 г/л сухої маси клітин (dw) або її суха масова частка складала 11,23 %. Масова частка загального вмісту ліпідів складала 51 % клітинної сухої маси. Крім того, ця суспензія відрізнялася своєю в'язкістю, виміряною при 30 °С з допомогою мікрівіскозиметру Stabinger SVR 3000 від Anton Paar (довжина імпульсу 1/1000), яка дорівнювала 4,1 мПа·с, щільністю, яка складала 1,023 г/см³ при 30 °С та наявністю слизу.

Приклад 2 за винаходом: перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 з допомогою теплової обробки при 100 °С та підкислювальної обробки.

Цей приклад демонструє, що теплова обробка при 100 °С разом з підкислювальною обробкою клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів є ефективною для досягнення адекватного концентрування цієї клітинної суспензії.

200 мл клітинної суспензії, отриманої відповідно із застосуванням процесу за попереднім Прикладом 1, завантажили у автоклав об'ємом 500 мл та додали 0,4 г 96 % H_2SO_4 (відповідно до концентрації кислоти, масова частка якої дорівнює 0,2 % відносно об'єму суспензії). рН отриманої суміші складав 3,2. Потім цю клітинну суспензію інкубували 8 годин при температурі 100 °С зі слабким перемішуванням. В кінці цього процесу, після охолодження, було спостережено відокремлення прозорого нижнього шару та верхньої фази, яка складалася з відокремленої клітинної біомаси.

Після охолодження клітинну суспензію було вилучено з автоклаву та завантажено у контейнери для центрифугування з наступним центрифугуванням при 3000 x g протягом 10 хв. при температурі 20 °С із застосуванням центрифуги Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed.

Наприкінці цього центрифугування, клітинну суспензію з багатими на ліпіди клітинами було піддано концентруванню у верхній "плаваючий" фазі, розташованій вище прозорого нижнього шару, який складався з ферментаційного бульйону. Після відокремлення цього прозорого нижнього шару було отримано 85,73 мл концентрованої клітинної суспензії, яка відрізнялася концентрацією біомаси, яка складала 26,2 % сухої маси, що було адекватно для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 3 за винаходом: перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 шляхом теплової обробки при температурі 110 °C та підкислювальної обробки.

Цей приклад демонструє, що теплова обробка при температурі 110 °C клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів разом з її підкислювальною обробкою також є ефективною для адекватного концентрування цієї клітинної суспензії.

200 мл клітинної суспензії, отриманої відповідно до процесу за попереднім Прикладом 1 завантажили у автоклав об'ємом 500 мл та додали 0,4 г 96 % H_2SO_4 (відповідно до концентрації кислоти, масова частка якої дорівнює 0,2 % відносно об'єму суспензії). РН отриманої суміші складав 3,2. Потім цю клітинну суспензію інкубували 8 годин при температурі 100 °C зі слабким перемішуванням. В кінці цього процесу, після охолодження, клітинну суспензію було вилучено з автоклаву та завантажено у контейнери для центрифугування з наступним центрифугуванням при 3000 x g протягом 10 хв. при температурі 20 °C із застосуванням центрифуги Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed.

Наприкінці центрифугування, клітинну суспензію з багатими на ліпіди клітинами було піддано концентруванню у верхній "плаваючий" фазі, розташованій вище прозорого нижнього шару, який складався з ферментаційного бульйону. Після відокремлення цього прозорого нижнього шару було отримано 80 мл концентрованої клітинної суспензії, яка відрізнялася концентрацією біомаси, яка складала 28,1 % сухої маси, що було адекватно для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 4 за винаходом: концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 шляхом теплової обробки при температурі 110 °C та підкислювальної обробки.

Цей приклад демонструє, що теплова обробка при температурі 110 °C разом з підкислювальною обробкою клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів, здійснена відповідно до попереднього Прикладу 3, є ефективною для адекватного концентрування цієї клітинної суспензії навіть у разі застосування у великому обсязі.

14,4 кг клітинної суспензії, отриманої відповідно до процесу за попереднім Прикладом 1 завантажили у автоклав об'ємом 20 л та додали 28,8 г 96 % H_2SO_4 (відповідно до концентрації кислоти, масова частка якої дорівнює 0,2 % відносно об'єму суспензії). РН отриманої суміші складав 3,2. Потім цю клітинну суспензію інкубували 4 години при температурі 110 °C зі слабким перемішуванням. В кінці цього процесу, після охолодження, клітинну суспензію було повністю вилучено з автоклаву та завантажено у контейнери для центрифугування з наступним центрифугуванням при 3000 x g протягом 10 хв. при 20 °C на центрифугі Beckman Coulter Avanti J-26XP, яку було обладнано ротором з фіксованим кутом JLA-8.1000.

Після центрифугування, клітинну суспензію з багатими на ліпіди клітинами було піддано концентруванню у верхній "плаваючий" фазі вищезазначеного прозорого нижнього шару, який складався з ферментаційного бульйону. Після відокремлення цього прозорого нижнього шару було отримано 7,7 кг концентрованої клітинної суспензії, яка відрізнялася концентрацією біомаси, яка складала 21,2 % сухої маси, що було адекватно для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 5 (визначення ліпідного вмісту нижнього шару, отриманого після теплової обробки при температурі 110 °C та підкислювальної обробки).

Цей приклад демонструє, що теплова обробка разом з підкислювальною обробкою дозволяє здійснити отримання клітинної суспензії, в якій клітини жирних дріжджів є інтактними, або, інакше кажучи, вона не викликає руйнування жирних клітин.

500 мл отриманого після центрифугування прозорого нижнього шару, отриманого відповідно до процесу за попереднім Прикладом 4 завантажили у покритий кожухом скляний реактор, обладнаний мішалкою та конденсатором. До зазначеного нижнього шару було додано 1 л чистого ізооктану (99,8 %) та температуру суміші довели до 80 °C, перемішуючи її, щоб досягти ідеального змішування цих двох незмішуваних рідких фаз. Потім цю суспензію інкубували ще протягом 2 годин. з цією ж саме температурою та таким саме перемішуванням. Далі її без перемішування охолодили до кімнатної температури з метою сприяння відокремленню нижньої водної фази від верхньої органічної фази, яку потім було відокремлено та зібрано у дистіляційну колбу, з якої потім вакуумним випарюванням було усунуто розчинник. Аналіз залишку, позосталого після випарювання розчинника підтвердив відсутність в ньому ліпідів.

Приклад 6 (порівняльний): перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 з допомогою центрифугування.

Спосіб концентрування клітинної суспензії за винаходом було порівняно з технічними прийомами, звичайно застосованими для практичного відновлення біомаси після бродіння з

допомогою певних перевірок зразків клітинної суспензії, отриманих в результаті процесу за Прикладом 1.

Цей приклад демонструє, що центрифугування є неефективним для адекватного концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів, якщо лише йому не передують обробка відповідно до способу за винаходом.

14 мл клітинної суспензії, отриманої, як описано у Прикладі 1, завантажили у мірну центрифужну пробірку та піддали 5-хвилинному центрифугуванню у центрифугі Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed (3000 x g, температура 20 °C). Наприкінці центрифугування було спостережено відокремлення 2 мл прозорого нижнього шару, тоді як позосталий об'єм (12 мл, який складав 85,7 % у об'ємному відношенні) залишався непрозорим. Потім цю клітинну суспензію було піддано концентруванню, яке тривало 1,16 годин з досягненням концентрації біомаси, яка складала 13,1 % сухої маси. Ця величина не була адекватною для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 7 (порівняльний): перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 з допомогою теплової обробки та центрифугування.

Цей приклад демонструє, що застосування однієї лише звичайної теплової обробки ферментаційного бульйону перед центрифугуванням є неефективним для адекватного концентрування суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів.

200 мл клітинної суспензії, отриманої, як описано у Прикладі 1, завантажили в автоклав об'ємом 500 мл та інкубували при температурі 110 °C протягом 4 годин зі слабким перемішуванням.

В кінці інкубування 14 мл підданої тепловій обробці клітинної суспензії завантажили у мірну центрифужну пробірку та піддали 5-хвилинному центрифугуванню на центрифугі Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed (3000 x g, температура 20 °C). Наприкінці центрифугування було спостережено відокремлення 0,5 мл прозорого нижнього шару, тоді як позосталий об'єм (13,5 мл, який складав 96,4 % у об'ємному відношенні) залишався непрозорим. Потім цю клітинну суспензію було піддано концентруванню, яке тривало 1,04 години з досягненням концентрації біомаси, яка складала 11,6 % сухої маси. Ця величина не була адекватною для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 8 (порівняльний): перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 шляхом додавання кислоти та центрифугування.

Цей приклад демонструє, що застосування однієї лише обробки кислотою без теплової обробки клітинної суспензії перед центрифугуванням є неефективним для адекватного концентрування цієї клітинної суспензії.

200 мл клітинної суспензії, отриманої, як описано у Прикладі 1, завантажили у колбу об'ємом 500 мл та додали 0,4 г 96 % H_2SO_4 (відповідно до концентрації кислоти, масова частка якої дорівнює 0,2 % відносно об'єму суспензії). pH отриманої суміші складав 3,2. Потім цю колбу розташували у орбітальній мішалці (MPM Instruments) з температурою, встановленої на позначці 30 °C та інкубували зі слабким перемішуванням протягом 8 годин.

В кінці інкубування 14 мл обробленої клітинної суспензії завантажили у мірну центрифужну пробірку та піддали 5-хвилинному центрифугуванню на центрифугі Thermo-Scientific IEC-CL31R Multispeed (3000 x g, температура 20 °C). Наприкінці центрифугування жодної відокремленої фази не було спостережено, що свідчить про те, що здійснена обробка не є адекватною для отримання бажаного рівня концентрованої клітинної суспензії.

Приклад 9 (порівняльний): перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 з допомогою тангенціальної мікрофільтрації.

Цей приклад демонструє, що застосування тангенціальної мікрофільтрації, подібно до центрифугування, є неефективним для адекватного концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів, якщо лише вона не передують процесу обробки із застосуванням способу за винаходом.

93,6 кг клітинної суспензії, отриманої, як описано у Прикладі 1 було піддано тангенціальній мікрофільтрації із застосуванням мембранної роздільної установки Hydro Air HAR P19 в режимі "зворотної пульсації" та 0,2 мкм керамічних мембран.

Процес мікрофільтрації було здійснено протягом 6 годин при кімнатній температурі зі швидкістю потоку, яка складала 8000 л/год., внаслідок чого було отримано 40,5 кг ретентату (концентрованої клітинної суспензії) та 53,1 кг пермеату (позбавленого клітин бульйону для бродіння). Отримана концентрована клітинна суспензія відрізнялася концентрацією біомаси, яка

складала 195 г/л (суха масова частка складала 19,5 %). Це значення вже є практично адекватним для цілей подальшого процесу екстракції ліпідів.

Однак під час мікрофільтрації потік пермеату зменшився від початкового значення у 60 кг·год.⁻¹·м⁻² до показника у приблизно 10 кг·год.⁻¹·м⁻². Цей кінцевий потік пермеату є дуже повільним для зручного застосування у промисловому процесі.

Застосована клітинна суспензія містила слизову біомасу дріжджів *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495, яка імовірно й спричинила погіршення характеристик застосованої в процесі мікрофільтрації фільтрувальної мембрани. Навіть якщо фактично наприкінці процесу мікрофільтрації мембрани було відновлено відповідно за інструкціями виробника, промиваючи їх 150 л дистильованої води протягом приблизно 5 годин з наступним 5-годинним промиванням їх 60 л розчину NaOH, масова частка якого складала 0,5 % та кінцевим 5-годинним промиванням додатковими 150 л дистильованої води, потік пермеату не вдалося відновити до характеристичних значень для цієї мембрани.

Як висновок слід зазначити, що навіть якщо тангенціальна мікрофільтрація виявиться ефективною для концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів, цей спосіб практично не може бути застосовано у промисловому процесі через погіршення властивостей пристрою після одиначної обробки.

Приклад 10 (порівняльний): перевірка концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495 з допомогою флокуляції.

Цей приклад демонструє, що флокуляція, подібно до центрифугування та тангенціальної мікрофільтрації, є неефективною для адекватного концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів, якщо лише вона не передувє процесу обробки із застосуванням способу за винаходом.

200 мл клітинної суспензії, отриманої, як описано у Прикладі 1, завантажили у мірний циліндр об'ємом 500 мл та додали до неї катіонну флокуляційну суспензію на основі поліакриламід (BASF Zetag® 9068FS), причому це додавання було здійснено дуже повільно та з обережним перемішуванням при кімнатній температурі (20 °C); перебіг процесу флокуляції було спостережено після додавання 0,5 г флокулянту відповідно з дозуванням, яке складало приблизно 2,5 кг/м³ суспензії. Ця кількість вважалася надмірною для застосування у промислових процесах насамперед через те, що в будь-якому випадку ефективність обробки не була задовільною. Наприкінці додавання флокулянту було відокремлено фактично лише 50 мл прозорого ферментаційного бульйону з відповідним концентруванням біомаси у клітинній суспензії від початкової масової частки сухого матеріалу у 11,3 % до 15,0 %. Ця величина також не була адекватною для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Приклад 11: екстракція ліпідів з концентрованої клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирних дріжджів.

Цей приклад демонструє, що до отриманої з допомогою способу за винаходом концентрованої клітинної суспензії може бути корисним чином застосовано процес екстракції внутрішньоклітинних ліпідів.

5,9 кг концентрованої клітинної суспензії, отриманої у відповідності з попереднім Прикладом 4, що було відповідно 1,25 кг сухої клітинної маси, завантажили у автоклав об'ємом 20 л та інкубували 4 години. при 140 °C.

Наприкінці процесу обробки отриману суспензію завантажили у покритий кожухом скляний реактор об'ємом 30 л, обладнаний мішалкою та конденсатором.

Потім до суспензії було додано 3 л (що дорівнювало 2073 г) чистого ізооктану (99,8 %), температуру було налаштовано до 80 °C та суміш перемішували таким чином, щоб гарантувати ідеальне перемішування цих двох незмішуваних фаз. Далі суміш інкубували ще протягом 2 год. в цих температурних умовах та умовах перемішування, після чого її охолодили до кімнатної температури (20 °C) без перемішування з метою сприяння відокремленню підлеглої водної фази від верхньої органічної фази, яку було відокремлено та зібрано у відповідному контейнері.

Процес екстракції з ізооктаном, який тривав 2 год. з температурою 80 °C та перемішуванням потім було повторено ще два рази із застосуванням для кожного циклу тієї ж саме кількості нового ізооктану. Органічні фази всіх трьох процесів екстракції було об'єднано в одному контейнері з наступним випарюванням розчинника. Отриманий після усунення розчинника залишок було зважено та піддано аналізу з обчисленням ліпідного вмісту, який складав 620,3 г, що відповідало екстракційному виходу з масовою часткою 98 % від загальної теоретичної кількості.

Приклад 12: бродіння жирних дріжджів *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

Цей наведений приклад стосується отримання клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

200 мл середовища YEPD (10 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л пептодину, 20 г/л глюкози) попередньо стерилізували в автоклаві протягом 45 хв. при 80 °C та завантажили у колбу об'ємом 1 л.

Отриманий таким чином початковий ферментаційний бульйон було інокульовано зразком штаму жирових дріжджів *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

Потім культуру зберігали при одну добу при температурі 30 °C зі швидкістю перемішування 200 об./хв., після чого її завантажили у ферментер об'ємом 20 л, який містив 6 л середовища, яке містило 100 г/л глюкози, 5 г/л твердих частинок зерен кукурудзи, 2 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 г/л KH_2PO_4 , 0,3 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 г/л NaCl та 0,06 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та було попередньо стерилізовано при 80 °C протягом 45 хв.

Цю культуру у ферментері зберігали при 30 °C протягом 24 год. в аеробних умовах (продування стерильним повітрям зі швидкістю 1 л/хв.) та перемішували зі змінною швидкістю від 600 до 900 об./хв., яку змінювали з повітряним потоком для підтримання концентрації розчиненого кисню (DO_2) на межі 30 % від значення насичення та з показником pH, який дорівнював приблизно 5,0 та який у разі необхідності було доведено шляхом додавання кількох крапель розчину 5 M KOH або 10 % H_2SO_4 (об'єм/об'єм).

В кінці доби до середовища у ферментері було додано ще 32,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 200 мл рідкого кукурудзяного екстракту. Потім до ферментеру було приєднано резервуар, який містив стерильний розчин глюкози з концентрацією 600 г/л та цей розчин почали безперервно подавати у ферментер зі змінною швидкістю потоку в межах 50-100 мл/год., відповідно до кінетики споживання мікроорганізму у культурі, підтримуючи таким чином постійну концентрацію глюкози в культурі на позначці 30 г/л.

Далі процес бродіння тривав у вищезазначених умовах протягом загального часу, який складав 140 годин.

Наприкінці цього процесу з ферментеру було вилучено клітинну суспензію загальною кількістю 8,6 л, яка відрізнялася концентрацією біомаси, яка складала 118 г/л сухої маси продукту або 11,8 % сухої маси та загальним вмістом ліпідів, масова частка якого складала 66 % відносно сухої маси клітин. Крім того, ця клітинна суспензія відрізнялася своєю в'язкістю, виміряною при 30 °C з допомогою мікрівіскозиметру Stabinger SVR 3000 від Anton Paar (довжина імпульсу 1/1000), яка дорівнювала 160 мПа·с.

Приклад 13 за винаходом: концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 шляхом теплової обробки при температурі 110 °C та підкислювальної обробки.

Цей приклад демонструє, що теплова обробка при температурі 110 °C разом з підкислювальною обробкою за винаходом є також ефективною для адекватного концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жирових дріжджів *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

200 мл клітинної суспензії, отриманої відповідно до процесу за попереднім Прикладом 12 завантажили у автоклав об'ємом 500 мл та додали до неї 0,4 г 96 % H_2SO_4 (відповідно до концентрації кислоти, масова частка якої дорівнює 0,2 % відносно об'єму суспензії). pH отриманої суміші складав 3. Потім цю клітинну суспензію інкубували 4 години при температурі 110 °C. В кінці цього процесу, після охолодження, було виміряно в'язкість обробленої суспензії при 30 °C з допомогою мікрівіскозиметру Stabinger SVR 3000 від Anton Paar (довжина імпульсу 1/1000), яка дорівнювала 18 мПа·с.

Далі клітинну суспензію було вилучено з автоклаву, завантажено у центрифужні контейнери та піддано центрифугуванню при 3000 x g протягом 10 хв. при 20 °C на центрифугі Beckman Coulter Avanti J-26XP, яку було обладнано ротором з фіксованим кутом JLA-8.1000.

Наприкінці процесу центрифугування та відокремлення прозорого нижнього шару було отримано 80 мл концентрованої клітинної суспензії, яка відрізнялася концентрацією біомаси, суха масова частка якої складала 29,5 %, що було адекватно для цілей наступного процесу екстракції ліпідів.

Визначення ліпідного вмісту було здійснено у прозорому нижньому шарі, як описано у попередньому Прикладі 5. Також в цьому разі, здійснений аналіз залишку виявив відсутність в цьому шарі ліпідів, підтверджуючи те, що спосіб концентрування за винаходом дозволяє здійснити отримання клітинної суспензії, в якій клітини жирових дріжджів є інтактними, тобто, інакше кажучи, цей спосіб не призводить до руйнування клітин.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб концентрування клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу жиркових дріжджів, який полягає у застосуванні наступних операцій:
 - 5 а) культивування цих жиркових дріжджів у ферментаційному бульйоні, яке приводить до отримання клітинної суспензії, яка містить цю слизову біомасу;
 - б) піддання отриманої на операції а) клітинної суспензії тепловій обробці з температурою 95-120 °С та кислотній обробці, що приводить до отримання обробленої клітинної суспензії, яка містить слизову біомасу з інтактними клітинами жиркових дріжджів;
 - 10 в) концентрування отриманої на операції б) обробленої клітинної суспензії, яке полягає у застосуванні операції відокремлення принаймні частини цього ферментаційного бульйону з отриманням концентрованої клітинної суспензії.
2. Спосіб за п. 1, в якому у зазначеній операції б) вказана теплова обробка передусє вказаній кислотній обробці.
- 15 3. Спосіб за п. 1 або п. 2, в якому вказані жирові дріжджі вибрано з групи, яка складається з *Yarrowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* та їх консорціуму, переважно *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* або їх консорціуму.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, в якому ці дріжджі накопичують ліпіди з сухою масовою часткою, яка складає 25 % або більше, переважно 40 % або більше, більш переважно 60 % або більше, ще більш переважно 70 % або більше.
- 20 5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, в якому вказаний ферментаційний бульйон отримано із застосуванням гідролізу лігноцелюлозних біомас.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому вказану теплову обробку здійснюють з температурою 100-110 °С.
- 25 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому вказану теплову обробку здійснюють протягом часу 3-12 годин та переважно здійснюють протягом 4-8 годин.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, в якому рН клітинної суспензії протягом вказаної кислотної обробки складає 1,5-6,0 та переважно складає 2,0-4,5.
- 30 9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому вказану кислотну обробку здійснюють шляхом додавання органічної або неорганічної кислоти Бронстеда, переважно неорганічної кислоти.
10. Спосіб за п. 9, в якому цю кислоту вибрано з групи, яка містить оцтову кислоту, соляну кислоту, азотну кислоту, фосфорну кислоту, сірчану кислоту, борну кислоту, фтористоводневу кислоту, бромистоводневу кислоту, молочну кислоту, мурашину кислоту, пропіонову кислоту або їх суміші, переважно сірчану кислоту.
- 35 11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, в якому зазначену операцію в) концентрування клітинної суспензії здійснюють за допомогою спонтанного осадження або під дією сил гравітації, за допомогою сифонування, випарювання у вакуумі, ліофілізації, флокуляції, мікрофільтрації або центрифугування, переважно центрифугування.
- 40 12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, в якому в операції в), під час операції відокремлення принаймні частини ферментаційного бульйону, суха масова частка біомаси у вказаній отриманій клітинній суспензії складає 19,0-35,0 %, переважно 21,0-30,0 %.

45