



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК(11) **120509**(13) **C2**

C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C11B 1/02 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
B01D 61/02 (2006.01)
C12R 1/73 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)
C12R 1/88 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 10359**
(22) Дата подання заявки: **22.04.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.12.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **MI2014A000761**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.04.2014**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **IT**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2017, Бюл.№ 1**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.12.2019, Бюл.№ 24**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/IB2015/052935, 22.04.2015**

(72) Винахідник(и):
**Мільо Роберта (IT),
Куккетті Даньєла (IT),
Родігьєро Валентіна (IT)**
(73) Власник(и):
**ЕНІ С.П.А.,
P. LE E. Mattei, 1, I-00144 Roma, Italy (IT)**
(74) Представник:
Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA а201505711, пріор. 28.12.2012, публ. 25.09.2015
WO 2012/052368 A1, 26.04.2012
Singh R. Hybrid membrane systems for water purification: Technology, systems design and operations / R. Singh. – Elsevier, 2005. - P. 151-153
Galafassi S. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast Rhodotorula graminis / S. Galafassi, D. Cucchetti, F. Pizza, G. Franzosi, D. Bianchi, C. Compagno // Bioresource technology. – 2012. – Vol. 111. – P. 398-403.

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПІДІВ З БІОМАСИ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання ліпідів з біомаси, яка включає принаймні один полісахарид. Біомасу піддають гідролізу з одержанням суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу, яку видаляють з суміші. У першому ферментаційному пристрої готують інокулянт, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм, та проводять ферментацію для одержання першого ферментаційного бульйону. Першу водну фазу та перший ферментаційний бульйон подають до другого ферментаційного пристрою і проводять ферментацію з одержанням другого ферментаційного бульйону. Принаймні частину другого ферментаційного бульйону піддають мікрофільтрації з одержанням першого ретентату і першого пермеату. Перший ретентат подають до другого ферментаційного пристрою, а перший

UA 120509 C2

пермеат піддають очищенню з одержанням другого пермеату і другого ретентату, який подають до другого ферментаційного пристрою. Наприкінці ферментації у другому ферментаційному пристрої другий ферментаційний бульйон піддають сепарації з одержанням водного розчину ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, і другої водної фази. При цьому вказані мікрофільтрацію і очищення проводять безперервно протягом зазначеної ферментації, що проводиться у другому ферментаційному пристрої.

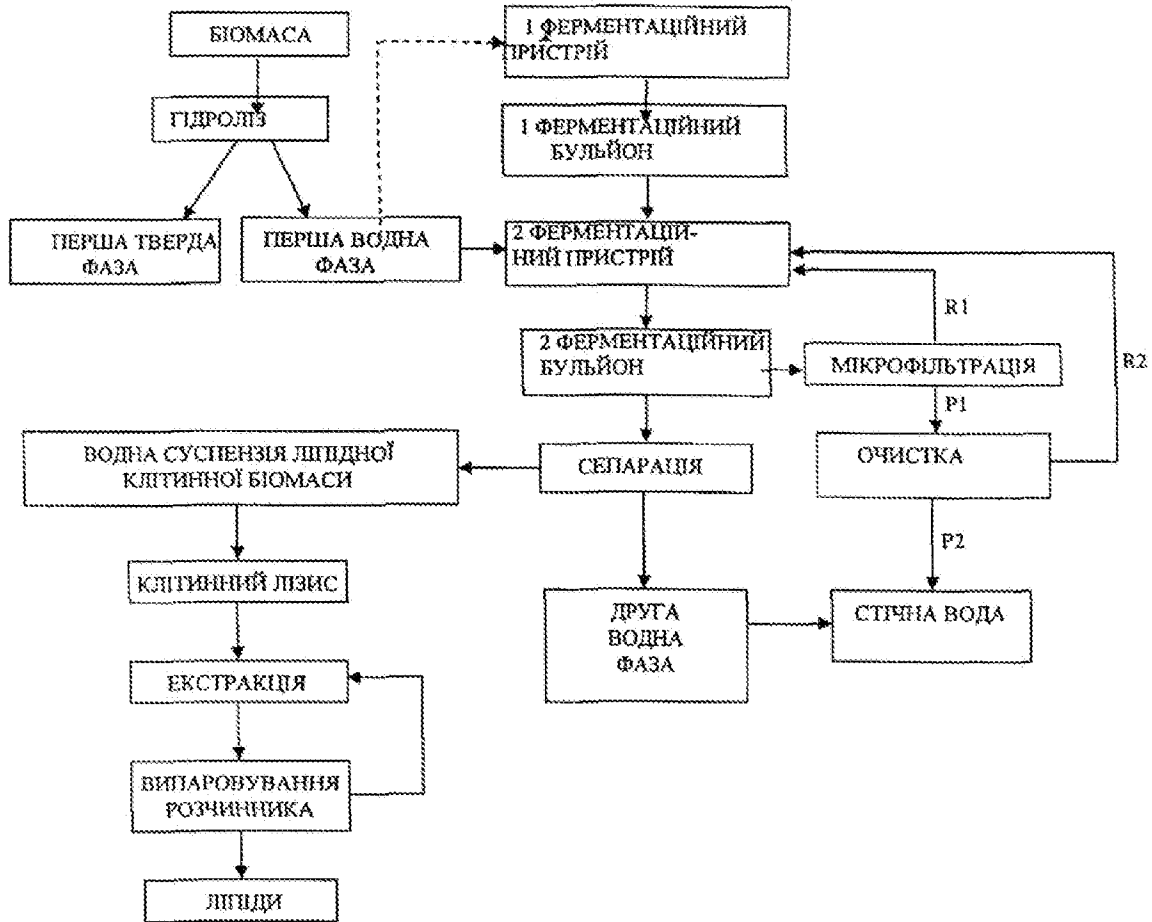


Fig. 1

Даний винахід стосується способу одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид.

Більш конкретно, даний винахід стосується способу одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, який передбачає піддання зазначеної біомаси, що
5 включає принаймні один полісахарид, гідролізу для одержання суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу; приготування інокулята, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм, в першому ферментаційному пристрої для одержання першого ферментаційного бульйону; подання зазначеної першої водної фази і зазначеного першого ферментаційного бульйону в другий ферментаційний пристрій для одержання другого
10 ферментаційного бульйону; піддання принаймні частини другого ферментаційного бульйону мікрофільтрації для одержання першого ретентату і першого пермеату; подання зазначеного першого ретентату у зазначений другий ферментаційний пристрій; піддання зазначеного першого пермеату очищенню для одержання другого пермеату і другого ретентату; подання зазначеного другого ретентату у зазначений другий ферментаційний пристрій; наприкінці такої
15 ферментації, піддання зазначеного другого ферментаційного бульйону сепарації для одержання водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, і другої водної фази, причому зазначені мікрофільтрацію і очищення виконують безперервно протягом ферментації.

Одержані таким чином ліпіди переважно застосовуються у виробництві біопалива, наприклад, біодизелю або зеленого дизелю, які можуть застосовуватися як такі або у суміші із
20 іншими видами палива для транспортних засобів.

В цілому, біомасу визначають як будь-яку речовину органічного, рослинного або тваринного походження, яку можна використовувати для потреб енергетики, наприклад, в якості сировини для виробництва біопалива і/або біопального, або в якості компонентів, які можна додавати до палива і/або біопального. Таким чином, біомаса може бути джерелом відновлюваної енергії,
25 альтернативно до традиційної сировини з корисних копалин, які звичайно використовують у виробництві палива і/або пального. Зокрема, з цією метою звичайно застосовують лігноцелюлозну біомасу.

Виробництво цукрів з біомаси, зокрема, із лігноцелюлозної біомаси, відомо з рівня техніки.

Лігноцелюлозна біомаса - це складна структура, яка містить три основних компоненти:
30 целюлоза, геміцелюлоза і лігнін. Відносні кількості можуть варіюватися в залежності від типу застосовуваної біомаси. Наприклад, у рослин такі кількості можуть варіюватися в залежності від виду та віку рослини.

Целюлоза - це основна складова лігноцелюлозної біомаси, що, як правило, наявна в кількостях від 30 мас.% до 60 мас.% від загальної маси лігноцелюлозної біомаси. Целюлоза
35 складається з молекул глюкози (приблизно від 500 до 10000 одиниць), зв'язаних разом β -1,4-глюкозидним зв'язком. Утворення водневих зв'язків між ланцюгами призводить до утворення кристалічних областей, що надає волокнам рослин сили та пружності. В природі це явище зустрічається в такій формі тільки у одноклітинних рослинах, наприклад, у бавовні і льоні, в той час як в деревних рослинах завжди зустрічається у комбінації із геміцелюлозою і лігніном.

Геміцелюлоза, яка, як правило, наявна в кількостях в діапазоні від 10 мас.% до 40 мас.% від загальної маси лігноцелюлозної біомаси, має форму відносно короткого (від 10 до 200 молекул)
40 і розгалуженого, комбінованого полімера, утвореного як цукрами, що мають шість атомів вуглецю (глюкоза, манноза, галактоза), так і цукрами, що мають п'ять атомів вуглецю (ксилоза, арабіноза). Деякі важливі властивості даних рослинних волокон обумовлені наявністю геміцелюлози, принциповою є властивість сприяння насиченню зазначених рослинних волокон при наявності води, що спричиняє їх набухання. Геміцелюлоза додатково має адгезивні властивості, через що проявляє тенденцію до цементування або набуття рогоподібної
45 консистенції, що виявляється у набутті вказаними рослинними волокнами твердості і у більш повільному насиченні вологою.

Лігнін, як правило, присутній в кількостях в діапазоні від 10 мас.% до 30 мас.% у розрахунку на загальну масу біомаси лігноцелюлози. Основна його функція полягає в зв'язуванні і скріпленні разом різних рослинних волокон таким чином, щоб забезпечити компактність і міцність рослин, і додатково забезпечити захист від комах, патогенів, пошкоджень і ультрафіолетового світла. Він головним чином використовується як паливо, але в даний час
50 також широко використовується в промисловості в якості диспергуючого агента, затверджувача, емульгатора, для пластмасових шаруватих матеріалів, коробок і гумових виробів. Крім того, він може також бути хімічно оброблений із отриманням ароматичних сполук, таких як ванілін, п-гідроксибензальдегід, які може бути використано у фармацевтичній хімії, або в косметичній чи харчовій промисловості.

Щоб поліпшити перетворення лігноцелюлозної біомаси в продуктах для енергетичних

потреб, відоме піддання вказаної біомаси попередній обробці для відокремлення лігніну і для гідролізу целюлози і геміцелюлози до моносахаридів, таких як глюкоза і ксилози. Зазначені цукри можуть бути використані в якості джерела вуглецю в процесах ферментації в присутності мікроорганізмів для отримання спиртів і/або ліпідів.

5 Наприклад, міжнародна патентна заявка WO 2009/108773 описує спосіб попередньої обробки біомаси лігноцелюлози, що включає: попередню обробку лігноцелюлозної біомаси в першому реакторі під тиском, що відрізняється тим, що лігноцелюлозну біомасу піддають гідролізу; випускають лігноцелюлозну біомасу з згаданого першого реактора під тиском і подають її під тиском до ущільнювального пристрою, що має першу муфту під тиском, з'єднану з випускним отвором згаданого першого реактора під тиском; здійснюють підтримання парової фази в зазначеному першому реакторі під тиском шляхом нагнітання пари в нього, причому інжектована пара забезпечує теплову енергію біомаси лігноцелюлози; здійснюють промивання лігноцелюлозної біомаси в нижній по потоку області зазначеного першого реактора під тиском або зазначеного ущільнювального пристрою під тиском, випускання рідини з розчиненими похідними геміцелюлози, одержаними з лігноцелюлозної біомаси із зазначеного першого реактора під тиском або із зазначеного ущільнювального пристрою під тиском; випускають лігноцелюлозну біомасу з ущільнювального пристрою під тиском через другу муфту високого тиску в другий реактор під тиском, що відрізняється тим, що лігноцелюлозну біомасу витримують при тиску вище, ніж у першому реакторі під тиском; в зазначеному другому реакторі під тиском, витримують лігноцелюлозну клітинну біомасу з парою або водяною парою шляхом інжекції пари або водяної пари в зазначений другий реактор під тиском; швидко скидають тиск, застосований до витриманої в воді лігноцелюлозної біомаси, для забезпечення парового вибуху в клітинах лігноцелюлозної біомаси, і проводять очищення лігноцелюлозної біомаси. Зазначений спосіб уможливорює отримання цукрів, які можуть бути використані для отримання спиртів (наприклад, етанолу).

У міжнародній патентній заявці WO 2012/042544 описана композиція біомаси, що містить тверду речовину, рідину, кількість C5-цукрів на основі кількості арабіанів і ксиланів і мономерів, димерів, олігомерів, полімерів арабінози і ксилози, що наявні в рідкій і твердій речовині в композиції, кількість C6 цукрів в розрахунку на кількість глюкану, що включає мономери, димери, олігомери і полімери глюкану, що наявні в рідині і в твердій речовині, і фурфуролу, який відрізняється тим, що композиція додатково має 24-годинну доступність гідролітичного ферменту у принаймні 30 %. Зазначену композицію одержуть шляхом парового вибуху. Цукри, отримані після гідролізу, можуть бути використані для виробництва етанолу.

Міжнародна заявка на видачу патенту WO 2009/063138 описує спосіб одержання ліпідів або сумішей ліпідів з органічного матеріалу, що включає полісахарид, який обраний з групи, що включає целюлозу, геміцелюлозу, крохмаль, всі вказані матеріали, їх суміші або продукти розпаду, або не крохмальний полісахарид, що відрізняється тим, що передбачає: (а) обробку органічного матеріалу речовиною, обраної з групи, до якої входять: (i) вода, (ii) кислота, і (iii) луг, із послідовним відділенням преципітату і одержанням фільтрату, і піддання преципітату, одержаного такою обробкою, механічному або термомеханічному помелу як такому або в присутності води, кислоти або луга, і сепарацію преципітату і фільтрату і, альтернативно, піддання преципітату один або декілька разів обробці згідно будь-якого з пунктів (i), (ii) або (iii) і/або помелу, і (b) контактування ліпідуютьуючого мікроорганізму із фільтратом, одержаним таким чином, або із різними одержаними фільтратами або з преципітатом, або із будь-якою їх комбінацією, і, необов'язково, із контактуванням ліпідуютьуючого мікроорганізму із одержаним таким способом фільтратом або різними одержаними фільтратами або із преципітатом, або із будь-якою їх комбінацією і, необов'язково, із органічним матеріалом, в культуральному середовищі, так що клітини мікроорганізму починають продукувати ліпід, і (c) відновлення ліпідів. Одержані таким чином ліпіди можна застосовувати для виробництва біопалива.

Міжнародна заявка на винахід WO 2010/149859 описує спосіб виробництва жиру, який відрізняється тим, що передбачає такі стадії: контактування у культуральному середовищі рідкої фази і залишків клітинної маси або їх суміші, або будь-яких їх фракцій, одержаних сепарацією, до або після відновлення жиру або під час відновлення жиру із одноклітинної маси, одержаної способом одержання одноклітинної олії, із мікроорганізмом, що може продукувати жир, і/або контактування, у культуральному середовищі, одноклітинної суспензії або клітинної маси, одержаної способом одержання одноклітинної олії, або рідкої фази, одержаної вказаним способом, або суспензії клітин мікроорганізмів, що одержана іншим способом, або їх суміші або фракції або фракцій, одержаних у такий спосіб, із мікроорганізмом, здатним продукувати жир, та уможливлення продукування жиру організмом, і відновлення одержаного жиру або подання

маси мікроорганізмів для одержання одноклітинної олії. Одержаний таким способом жир може застосовуватись у виробництві біопалива.

Американська патентна заявка США 2008/0102176 описує спосіб екстракції рослинних жирів, що включає: подрібнення целюлозної сировини на множину частинок 1-2 мм в діаметрі; занурення часток в сірчану кислоту концентрації 1 % -2 % для підкислення зазначених частинок для посилення гідролізу і доведення величини pH до $4,5 \pm 0,5$; видалення підкислених частинок з сірчаної кислоти, додавання целюлази і олеогенних дріжджів послідовно до підкислених частинок із ферментацією протягом 8-9 днів при температурі від 25 °C-30 °C і вологості 85 %-90 %; додавання аліфатичного вуглеводню як розчинника в продукти ферментації для вилучення жирів, з отриманням таким чином суміш екстракції; і видалення підкислених частинок, що залишилися в суміші для екстракції, відділення жирів від розчинника шляхом перегонки з отриманням сирової олії. Переважно целюлази отримують з *Trichoderma Viride* і олеогенних дріжджів *Rhodotorula glutinis*. Жири, отримані таким чином, можуть бути перетворені на біодизельне паливо після етерифікації.

Da і та ін. описують виробництво біодизельного палива з олеогенних дріжджів в статті "Одержання біодизелю з олеогенних дріжджів *Rhodotorula glutinis* із можливістю асиміляції ксилози", опублікованій в "African Journal біотехнології" (2007), Vol. 6 (18), стор. 2130-2134. У цій статті лігноцелюлозну біомасу подрібнюють і піддають кислотному гідролізу в присутності сірчаної кислоти. Отримані таким чином цукри використовують в якості джерел вуглецю в процесі ферментації в присутності штаму *Rhodotorula glutinis*, виділеного заздалегідь, який також здатний використовувати пентози, зокрема, ксилозу, для отримання олій, які потім екстрагують шляхом екстракції в апараті Сокслета і піддають переетерифікації з отриманням біодизельного палива.

У міжнародній патентній заявці WO 2010/046051 описаний спосіб отримання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, який включає:
- піддання вказаної біомаси кислотному гідролізу в присутності водного розчину принаймні однієї органічної кислоти, що має від C7 до C20 атомів вуглецю, в основному від C9 до C15 атомів вуглецю, при температурі в діапазоні від 80 °C до 160 °C, з отриманням першої суміші, яка містить першу тверду фазу і першу водну фазу;
- Піддання зазначеної першої суміші гідролізу із отриманням другої суміші, що включає другу тверду фазу і другу водну фазу;
- піддання зазначеної другої водної фази ферментації в присутності принаймні одних олеогенних дріжджів із отриманням ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди.

Одержані таким чином ліпіди переважно застосовують у виробництві біодизелю або зеленого дизелю, що можуть застосовуватись як такі або у суміші із іншими видами палива для транспортних засобів.

Міжнародна заявка на винахід WO 2012/052368 описує спосіб одержання ліпідів із біомаси, що включає принаймні один полісахарид, який передбачає:

- піддання зазначеної біомаси, що включає принаймні один полісахарид, кислотному гідролізу із одержанням першої суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу;
- подання принаймні першої водної фази у ферментаційний пристрій за наявності принаймні одних жирових дріжджів, із одержанням першого ферментаційного бульйону, що включає першу клітинну ліпідну біомасу;
- піддання зазначеної першої твердої фази кислотному гідролізу або ферментаційному гідролізу із одержанням другої суміші, що містить другу тверду фазу і другу водну фазу;
- подання зазначеної другої водної фази до зазначеного другого ферментаційного пристрою в присутності зазначеного першого ферментаційного бульйону, що включає другу ліпідну клітинну біомасу, яка включає ліпіди;
- піддання принаймні частини зазначеного другого ферментаційного бульйону мікрофільтрації із одержанням ретентату і пермеату;

- подання зазначеного ретентату до зазначеного другого ферментаційного пристрою.

Одержані таким чином ліпіди переважно застосовують у виробництві біодизелю або зеленого дизелю, що можуть застосовуватись як такі або у суміші із іншими видами палива для транспортних засобів.

Заявка Італії на винахід MI2012A002249 описує спосіб одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, який передбачає:

- піддання зазначеної біомаси, що включає принаймні один полісахарид, гідролізу для одержання суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу;
- підготовка інокуляту, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм у першому ферментаційному пристрої для одержання першого ферментаційного бульйону;

- подання зазначеної першої водної фази і зазначеного першого ферментаційного бульйону у другий ферментаційний пристрій для одержання другого ферментаційного бульйону;
- піддання зазначеного другого ферментаційного бульйону сепарації для одержання водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, у другу водну фазу;

5 - піддання зазначеної водної фази зворотному осмосу для одержання пермеату і ретентату;

 - подання зазначеного ретентату у перший ферментаційний пристрій або у другий ферментаційний пристрій, переважно у зазначений перший ферментаційний пристрій.

10 Одержані таким чином ліпіди можуть переважно застосовуватись у виробництві біодизелю або зеленого дизелю, що можуть застосовуватись як такі або у суміші із іншими видами палива для транспортних засобів.

 Зниження вартості одержання ліпідів з біомаси є дуже важливим, зокрема, якщо ліпіди згодом застосовуються у виробництві біопалива, наприклад, біодизелю або зеленого дизелю, оскільки зазначені види біопалива конкурують із паливом з корисних копалин, що мають нижчу вартість, і вивчення нових способів, які можуть знизити вартість, а також покращити вихід ліпідів, все ще викликає великий інтерес.

 Заявник, відтак, стикнувся з проблемою необхідності віднайдення способу виробництва ліпідів, які можна застосовувати для виробництва біопалива, наприклад, біодизеля або зеленого дизеля, що може знижувати вартість процесів переробки і покращувати вихід ліпідів.

20 Заявником встановлено, що одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, можна переважно здійснювати способом, який передбачає піддання зазначеної біомаси, що включає принаймні один полісахарид, гідролізу для одержання суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу; готування інокуляту, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм, у першому ферментаційному пристрої для одержання першого ферментаційного бульйону; подання зазначеної першої водної фази та зазначеного першого ферментаційного бульйону до другого ферментаційного пристрою для одержання другого ферментаційного бульйону; піддання принаймні частини зазначеного другого ферментаційного бульйону мікрофільтрації для одержання першого ретентату і першого пермеату; подання зазначеного першого ретентату до зазначеного другого ферментаційного пристрою; піддання зазначеного першого пермеату очищенню для одержання другого пермеату і другого ретентату;

25 подання зазначеного другого ретентату до зазначеного другого ферментаційного пристрою; наприкінці ферментації, піддання зазначеного другого ферментаційного бульйону сепарації для одержання водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, і другої водної фази; причому вказану мікрофільтрацію та очищення виконують безперервно протягом ферментації.

30 Даний спосіб забезпечує ряд переваг. Наприклад, оскільки мікрофільтрацію та очищення виконують безперервно протягом ферментації, такий спосіб дозволяє:

- підтримувати об'єм зазначеного другого ферментаційного бульйону у зазначеному другому ферментаційному пристрої на постійному рівні і збільшувати концентрацію ліпідної клітинної маси у зазначеному другому ферментаційному бульйоні;

40 - відібрати частину води (тобто, перший пермеат) від зазначеного другого ферментаційного бульйону для зниження температури (наприклад, потік при температурі ферментації видаляють, а потік нижчої температури подають в пристрій ферментації);

- застосовувати вказані ферментовані розчини цукру, які можна більше, ніж звичайно, розводити, і які доступні за зниженою ціною;

45 - відновлювати цукри, а також інші органічні і неорганічні речовини, що застосовуються у ферментації (наприклад, нітрати, фосфати), які містяться в першому пермеаті, і повторно піддавати їх обробці при ферментації (наприклад, другий ретентат), із відповідним зменшенням витрат на виробництво;

50 - застосовувати лігноцелюлозний гідролізат (тобто, першу водну фазу), що має вищий вміст токсичних сполук, наприклад, фурфуралу (F), 5-гідроксиметилфурфуралу (ГМФ), що можуть діяти як інгібітори зросту мікроорганізмів, що звичайно застосовуються у ферментації, відтак, без необхідності приділяти особливу увагу способам гідролізу біомаси;

- працювати із нижчими об'ємами наприкінці ферментації;

55 - одержати ліпіди із підвищеним виходом [наприклад, вихід ліпідів більше або еквівалентно 25 % від загальної кількості цукрів, що використовуються для ферментації, такий вихід ліпідів підрахований в грамах одержаних ліпідів на грам цукру, що застосовувався для ферментації].

 Такі ліпіди переважно застосовуються у виробництві біопалива, зокрема, біодизелю або зеленого дизелю, що можуть застосовуватись як такі або у суміші із іншими видами палива для транспортних засобів.

60 Даний винахід стосується способу одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, який передбачає:

- піддання зазначеної біомаси, що включає принаймні один полісахарид, гідролізу для одержання суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу;

- готування інокуляту, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм, у першому ферментаційному пристрої для одержання першого ферментаційного бульйону;

5 - подання зазначеної першої водної фази та зазначеного першого ферментаційного бульйону до другого ферментаційного пристрою для одержання другого ферментаційного бульйону;

- піддання принаймні частини зазначеного другого ферментаційного бульйону мікрофільтрації для одержання першого ретентату і першого пермеату;

10 - подання зазначеного першого ретентату до зазначеного другого ферментаційного пристрою;

- піддання зазначеного першого пермеату очищенню для одержання другого пермеату і другого ретентату;

15 - подання зазначеного другого ретентату до зазначеного другого ферментаційного пристрою;

- наприкінці ферментації, піддання зазначеного другого ферментаційного бульйону сепарації для одержання водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, і другої водної фази;

20 який відрізняється тим, що вказану мікрофільтрацію і очищення виконують безперервно протягом ферментації.

Для цілей даного опису і формули винаходу визначення кількісних діапазонів включає їх кінцеві діапазони, якщо спеціально не зазначено інше.

Для цілей даного опису і формули винаходу термін "включає" також включає терміни "що в основному складається з" або "що складається з".

25 В переважному варіанті даного винаходу зазначений полісахарид може бути обраний серед целюлози, геміцелюлози або їх сумішей. Целюлоза, суміші целюлози та геміцелюлози є особливо переважними.

30 В ще одному переважному варіанті втілення даного винаходу вказана біомаса, що включає принаймні один полісахарид, є лігноцелюлозною біомасою. Як вказано вище, лігноцелюлозна біомаса включає три компоненти: геміцелюлоза, целюлоза та лігнін.

Переважно вказану лігноцелюлозну біомасу можна обрати, наприклад, серед таких продуктів:

35 - продукти, одержані з культур, які вирощують спеціально для енергетичних потреб, наприклад, міскантус, просо прутневидне, очерет звичайний, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або їх переробки;

- Продукти, одержані з сільськогосподарських продуктів, наприклад, осот, гвайюла, кукурудза, соя, бавовна, льон, ріпак, цукровий очерет, пальмова олія, відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або їх переробки;

40 - продукти лісівництва або лісового господарства, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або їх переробки;

- залишки харчових і сільськогосподарських продуктів, призначених для споживання людиною або для зоотехніки;

- не піддані хімічній обробці залишки паперової промисловості;

- відходи роздільного збирання муніципальних твердих відходів (рослини, папір);

45 - водорості, наприклад, макроводорості або мікроводорості, особливо макроводорості.

Переважно вказану біомасу, що включає принаймні один полісахарид, можливо обрати серед осоту, гвайюли, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або їх переробки.

50 В переважному варіанті даного винаходу вказану біомасу, що включає принаймні один полісахарид, можна піддати попередній процедурі помелу до піддання зазначеному гідролізу. Переважно вказану біомасу, що включає принаймні один полісахарид, можливо помолоти для одержання часток з діаметром в діапазоні 0,1 мм - 10 мм, більш переважно в діапазоні від 0,5 мм до 4 мм. Частки, що мають діаметр менше 1 мм, є особливо переважними.

55 Для цілей даного винаходу гідроліз біомаси, що включає принаймні один полісахарид, можна здійснити будь-яким способом, відомим з рівня техніки. Необмежувальні приклади таких способів включають:

- теплову обробку, відому як "паровий вибух", із наступним ферментативним гідролізом, як описано, наприклад, у вищевказаній міжнародній заявці на винахід WO 2012/042544;

60 - обробку в присутності розбавлених кислот, наприклад розбавленої сірчаної кислоти, із наступним ферментативним гідролізом, як описано, наприклад, Humbrid D. et al. у "Technical

Report Nrel/Tr-5100-47764" (May 2011);

- обробка в присутності органічних кислот, наприклад 2-нафталенсульфонової кислоти, із наступним ферментативним гідролізом, як описано, наприклад, у вищевказаній міжнародній заявці на винахід WO 2010/046051.

5 Такий ферментативний гідроліз можна здійснити способами, відомими з рівня техніки, наприклад, описаними в патентах США US 5,628,830, US 5,916,780, US 6,090,595, із застосуванням комерційно наявних ферментів, наприклад, Celluclast 1.5L (Novozymes), Econase CE (Rohm Enzymes), Spezyme (Genecor), Novozym 188 (Novozymes), що можуть застосовуватись окремо або в суміші.

10 Вказаний гідроліз дозволяє одержати суміш, що містить тверду фазу і водну фазу. Таку суміш піддають фільтрації або центрифугуванню для одержання першої твердої фази і першої водної фази.

Така перша тверда фаза може включати лігнін, а перша водна фаза включає принаймні один цукор, що має 5-6 атомів вуглецю, переважно ксилози і глюкози.

15 Кількість цукру, одержану після гідролізу, можна визначити способами, відомими з рівня техніки, такими як, наприклад, вискозоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), або іонно-обмінна хроматографія.

В переважному варіанті даного винаходу зазначена водна фаза може включати:

20 - кількість глюкози більше або еквівалентну 50 г/л, переважно більше або еквівалентну 100 г/л, до ліміту розчинності глюкози у зазначеній першій водній фазі;
 - кількість ксилози від 0 г/л до 200 г/л, переважно від 10 г/л до 100 г/л;
 - кількість арабінози від 0 г/л до 20 г/л, переважно від 5 г/л до 10 г/л;
 - кількість маннози від 0 г/л до 20 г/л, переважно від 2 г/л до 10 г/л;
 - кількість галактози від 0 г/л до 10 г/л, переважно від 2 г/л до 8 г/л;
 25 - кількість оцтової кислоти від 0 г/л до 8 г/л, переважно від 0 г/л до 5 г/л;
 - кількість фурфуралу (F) від 0 г/л до 2,5 г/л, переважно від 0,1 г/л до 1,5 г/л;
 - кількість 5-гідроксиметилфурфуралу (ГМФ) від 0 г/л до 4,5 г/л, переважно від 0,2 г/л до 3,5 г/л.

30 Однак, слід відзначити, що спосіб відповідно до даного винаходу уможливлює застосування певних кількостей токсичних сполук, наприклад, фурфурал (F) і 5-гідроксиметилфурфуралу (ГМФ), що більші, ніж звичайно, наприклад, можливо застосовувати кількість фурфуралу (F) в діапазоні від 0,1 г/л до 1,5 г/л і кількість 5-гідроксиметилфурфуралу (ГМФ) в діапазоні від 0,2 г/л до 3,5 г/л.

35 Для одержання вказаного інокуляту, окрім принаймні одного олеогенного мікроорганізму, принаймні один водний розчин, що включає кількість цукрів, більше або еквівалентну 40 г/л, переважно в діапазоні від 45 г/л до 60 г/л, подають до зазначеного першого ферментаційного пристрою.

40 В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному першому ферментаційному пристрої ферментацію можна здійснити при температурі в діапазоні від 20 °C до 40 °C, переважно в діапазоні від 25 °C до 35 °C.

В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному першому ферментаційному пристрої ферментацію можна здійснити протягом періоду в діапазоні від 10 годин до 36 годин, переважно в діапазоні від 12 годин до 26 годин.

45 В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному першому ферментаційному пристрої ферментацію можна здійснити при pH в діапазоні від 4,5 до 7, переважно в діапазоні від 5 до 6,7. Для підтримання pH в заданих діапазонах водний розчин принаймні однієї неорганічної основи, такої як, наприклад, натрію гідроксид, калію гідроксид, кальцію гідроксид, магнію гідроксид, або їх суміші, переважно калію гідроксид, або принаймні однієї неорганічної кислоти, такої як, наприклад, фосфорна кислота, сірчана кислота, соляна кислота, або їх суміші,
 50 можуть бути додані в кількості, достатній для одержання бажаного pH, до культурального середовища, що застосовується для ферментації.

Слід відзначити, що в способі згідно даного винаходу, зазначений водний розчин, який включає кількість цукру, більше або еквівалентну 40 г/л, переважно в діапазоні від 45 г/л до 60 г/л, може бути аліквотою першої водної фази, одержаної гідролізом біомаси, що включає
 55 принаймні один полісахарид, необов'язково розведеної для одержання бажаних кількостей цукру.

60 Коли олеогенний мікроорганізм досяг концентрації, що більше або еквівалентна 8 г/л, переважно в діапазоні від 10 г/л до 25 г/л, зазначений перший ферментаційний бульйон, у відповідності до способу згідно даного винаходу, подають до другого ферментаційного пристрою.

В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному другому ферментаційному пристрої ферментацію можна здійснити при температурі в діапазоні від 20 °С до 40 °С, переважно в діапазоні від 25 °С до 35 °С.

В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному другому ферментаційному пристрої ферментацію можна здійснити протягом періоду в діапазоні від 2 днів до 10 днів, переважно в діапазоні від 3 до 8 днів.

В переважному варіанті даного винаходу в зазначеному другому ферментаційному пристрої ферментацію можна виконати при рН в діапазоні від 4,5 до 7, переважно в діапазоні від 5 до 6,7. Для підтримання рН в бажаному діапазоні водний розчин може містити принаймні одну неорганічну основу, таку як, наприклад, гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид кальцію, гідроксид магнію або їх суміші, переважно калію гідроксид, або можна додати принаймні одна неорганічну кислоту, таку як, наприклад, фосфорна кислота, сірчана кислота, соляна кислота або їх суміші, в кількостях, необхідних для одержання бажаного рівня рН, до середовища культури, що застосовується для ферментації.

В переважному варіанті даного винаходу зазначений мікроорганізм можливо обрати серед олеогенних дріжджів, таких як *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefyr*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis* sp., *Pichia stipitis*, *Trichosporon cacaoliposimilis*, *Trichosporon oleaginosus*, *Trichosporon pullulans*, *Rhodospiridium azoricum*, *Cryptococcus curvatus*.

В переважному варіанті даного винаходу, ферментацію в зазначеному другому ферментаційному пристрої можна здійснити в один або декілька етапів, перервним способом ("попартійно"), напівбезперервним способом ("підживлення"), безперервним способом або перфузією. Переважно ферментацію в зазначеному другому ферментаційному пристрої проводять перервним способом ("попартійно") протягом перших 3 годин - 10 годин, а потім перфузією.

Для цілей даного опису і форму винаходу термін "перфузія, або перфузійний спосіб" означає, що під час ферментації в зазначеному другому ферментаційному пристрої об'єм другого культурального бульйону підтримується стабільним, оскільки принаймні частина культурального середовища, застосовуваного для ферментації, постійно заміщується другим ретентатом, одержаним очищенням, що робить можливою концентрацію клітинної біомаси. Такий "перфузійний спосіб" здійснюється вищевказаною мікрофільтрацією, що фактично безперервно здійснюється під час ферментації.

В зазначеному першому ферментаційному пристрої і в зазначеному другому ферментаційному пристрої, які є відомими з рівня техніки пристроями, ферментацію проводять в присутності культурального середовища, що звичайно застосовується для даної потреби, що включає, окрім цукрів, різноманітні поживні речовини, такі як, наприклад, азот, калію фосфат, магній, солі, вітаміни, мікроелементи.

Для збільшення виходу ліпідів можна додати до зазначеного другого ферментаційного пристрою кукурудзяний екстракт.

В переважному варіанті даного винаходу, вказаний спосіб додатково включає додавання до зазначеного другого ферментаційного пристрою кукурудзяного екстракту в кількості в діапазоні від 2 г/л до 20 г/л, переважно в діапазоні від 4 г/л до 18 г/л. Зазначений кукурудзяний екстракт може бути доданий як під час подання першої водної фази, так і після цього.

В переважному варіанті даного винаходу вказану мікрофільтрацію можна здійснити під час експоненціальної (або логарифмічної) фази зросту ліпідної клітинної біомаси.

В даному описі і формулі винаходу "експоненціальна (або логарифмічна) фаза зросту" означає фазу, в якій олеогенний мікроорганізм, застосовуваний в процесі ферментації, відтворюється на постійній швидкості (що відповідає максимальній швидкості відтворення), визначеній як генетичними характеристиками вказаного олеогенного мікроорганізму, так і факторами навколишнього середовища (наприклад, температура, склад культурального середовища). Для прикладу, щодо олеогенних мікроорганізмів, застосовуваних у нижченаведених прикладах, наприклад, *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3, експоненціальна фаза зросту становить від 3 годин до 10 годин.

В переважному варіанті даного винаходу, мікрофільтрацію можна здійснити через мембрани із середнім діаметром пор в діапазоні від 0,02 мкм до 2,0 мкм, переважно в діапазоні від 0,1 мкм до 0,8 мкм.

В переважному варіанті даного винаходу, вказану мікрофільтрацію можна здійснити із застосуванням трансмембранного тиску (ТМТ) в діапазоні від 0,05 бар до 2,5 бар, переважно в діапазоні від 0,1 бар до 2,2 бар.

Такий трансмембранний тиск (ТМТ) обчислюють у відповідності до наступного рівняння:

$$TMP = 0,5 \cdot (P_1 + P_2) - P_3$$

який відрізняється тим, що:

P_1 = тиск водної суспензії ліпідної клітинної біомаси на впускній стороні мембрани;

P_2 = тиск водної суспензії ліпідної клітинної біомаси на випускній стороні мембрани;

P_3 = тиск пермеату.

Слід відзначити, що для цілей даного винаходу вказаний трансмембранний тиск (ТМТ) можна забезпечити із застосуванням насоса, наприклад, перистальтичного, який, при застосуванні до апарату мікрофільтрації нижче випускної сторони пермеата, знижує тиск на випускню поверхню мембрани, продукуючи позитивний трансмембранний тиск (ТМТ), що генерує потік пермеату.

В переважному варіанті даного винаходу вказану мікрофільтрацію можна здійснити при певному потоці (кг пермеату на квадратний метр поверхні мікрофільтраційної мембрани на годину) в діапазоні від 0,2 кг/(м²/год.) до 70 кг/(м²/год.), більш переважно в діапазоні від 0,4 кг/(м²/год.) до 50 кг/(м²/год.).

В переважному варіанті даного винаходу вказану мікрофільтрацію можна здійснити при температурі в діапазоні від 20 °С до 40 °С, переважно в діапазоні від 25 °С до 35 °С, більш переважно при температурі ферментації.

В переважному варіанті даного винаходу вказану мікрофільтрацію можна здійснювати через листові або порожнисто-волоконні полімерні мембрани, занурені або у тангенціальній конфігурації ("перехресний потік"), або через керамічні мембрани, занурені або у тангенціальній конфігурації ("перехресний потік") або в обертальній конфігурації ("динамічний перехресний потік").

Приклади мембран, які можна застосовувати для цілей даного винаходу і які наявні на ринку, включають "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" від Sartorius, Ceram inside® від Tami, Schumasiv™ або Membralox® від Pall, або Microza від Asahi Kasei Corporation.

В межах даного опису і формули винаходу термін "перший ретентат" означає водну суспензію, що містить концентровану ліпідну клітинну біомасу, що одержана мікрофільтрацією принаймні частини другого ферментаційного бульйону.

В межах даного опису і формули винаходу термін термін "перший пермеат" означає водний потік, що містить цукри і інші органічні і неорганічні речовини (наприклад, нітрати, фосфати), одержаний мікрофільтрацією принаймні частини другого ферментаційного бульйону.

В переважному варіанті даного винаходу вказане очищення здійснюють за допомогою зворотного осмосу або випаровування.

В переважному варіанті даного винаходу вказаний зворотний осмос проводять за наявності принаймні однієї полімерної мембрани, яку обирають серед полімерних мембран, які звичайно використовують для знесолення (зазвичай відомі як "мембрани для морської води" або "мембрани для солоної води"), таких як, наприклад: мембрани із вмістом поліамідів, поліімідів, полісульфонів, поліетерсульфонів. Переважно вказану полімерну мембрану обирають серед полімерних мембран із вмістом поліамідів.

В переважному варіанті даного винаходу вказана полімерна мембрана може мати максимальну робочу температуру в діапазоні від 15 °С до 90 °С, переважно в діапазоні від 20 °С до 80 °С, навіть більш переважно в діапазоні від 20 °С до температури ферментації.

В переважному варіанті даного винаходу вказана полімерна мембрана може мати максимальний робочий тиск в діапазоні від 5 бар до 80 бар, переважно в діапазоні від 10 бар до 70 бар.

В переважному варіанті даного винаходу вказана полімерна мембрана може мати відсікання по молекулярній масі (MWCO) в діапазоні від 30 дальтонів до 200 дальтонів, переважно в діапазоні від 40 дальтонів до 100 дальтонів.

В переважному варіанті даного винаходу вказану полімерну мембрану можливо обрати серед тих, що мають робочий рівень рН, сумісний з рН першого пермеата, переважно в діапазоні від 1 до 13, більш переважно в діапазоні від 2 до 11, навіть більш переважно в діапазоні від 3,5 до 7,5.

Приклади полімерних мембран, які можна застосовувати для цілей даного винаходу і які наявні на ринку, це: продукти Dow™ Filmtec™ серії SW30, серії BW30, або серії BW30LE, від Dow Chemical, або продукти Desal™ серії AG від General Electric, або продукти TFC®-HR від Koch Membrane Systems.

Вищевказані полімерні мембрани можуть мати форму плоских дисків, трубчастих мембран, спіралевидних модульних мембран, мембран з тонкої композитної плівки (TFC) або інші.

В переважному варіанті даного винаходу вказаний зворотний осмос можна здійснити шляхом застосування тиску на стороні подачі (сторона ретентату) в діапазоні від 5 бар до 80

бар, більш переважно в діапазоні від 10 бар до 40 бар.

В переважному варіанті даного винаходу вказаний зворотний осмос можна здійснити шляхом обробки при певному потоці (кг пермеату на квадратний метр поверхні мембрани зворотного осмосу на годину) в діапазоні від 5 кг/(м²/год.) до 80 кг/(м²/год.), більш переважно в діапазоні від 10 кг/(м²/год.) до 40 кг/(м²/год.).

В межах даного винаходу і доданої формули винаходу термін "другий ретентат" означає водний потік із концентратом цукрів та інших органічних і неорганічних речовин, (наприклад, нітратів, фосфатів), одержаних з вказаного першого пермеату. Такий водний потік із концентратом цукрів переважно включає кількість цукрів в діапазоні від 20 г/л до 110 г/л, більш переважно в діапазоні від 30 г/л до 100 г/л.

Для цілей даного винаходу і доданої формули термін "Другий пермеат" означає водний потік, що одержаний із вказаного першого пермеату.

В переважному варіанті даного винаходу вказане випаровування можна здійснити при температурі в діапазоні від 30 °C до 100 °C і при тиску, що змінюється в залежності від температури і дорівнює тиску (тиску пари), при якому водна фаза випаровується при зазначеній температурі, переважно при тиску в діапазоні від 0,04 бар до 1 бар.

Слід відзначити, що якщо очищення виконують шляхом випаровування очищеної фази (випаровуваної фази), одержують еквівалент зазначеного другого пермеату і концентрат, еквівалентний зазначеному другому ретентату.

Наприкінці ферментації для деактивації ліполітичних ферментів (наприклад, ліпази), вказаний другий ферментаційний бульйон можна піддати тепловій обробці. Вказану теплову обробку можна здійснити при температурі в діапазоні від 70 °C до 120 °C, переважно в діапазоні від 75 °C до 110 °C, протягом періоду в діапазоні від 5 хвилин до 3 годин, переважно в діапазоні від 30 хвилин до 2 годин.

Наприкінці ферментації здійснюють сепарацію, якій піддають другий ферментаційний бульйон для відновлення вказаної водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що містить ліпіди (така водна суспензія ліпідної клітинної біомаси має концентрацію ліпідної клітинної біомаси більше, ніж концентрація ліпідної клітинної біомаси у другому ферментаційному бульйоні) і вказаної другої водної фази (вказана друга водна фаза необов'язково містить суспендовані тверді речовини, наприклад, клітини олеогенних мікроорганізмів, що застосовувались при ферментації, або частинки, одержані внаслідок дії обладнання, застосовуваного в способі, або внаслідок преципітації солей), її можна виконати способами, відомими з рівня техніки, такими як, наприклад, фільтрація, фільтрувальне пресування, мікрофільтрація або ультрафільтрація, центрифугування.

Вказаний другий пермеат можна піддати подальшій обробці з метою видалення або відновлення і застосування як технологічної води в способі згідно даного винаходу (наприклад, як води для промивання або розведення).

З метою подальшої концентрації водної суспензії ліпідної клітинної біомаси, що містить ліпіди, одержаної після сепарації, вказану водну суспензію ліпідної клітинної біомаси до піддання відновленню ліпідів (тобто, клітинному лізису, екстракції розчинником і випаровуванню розчинником) можна піддати центрифугуванню. Вказане центрифугування можна здійснити протягом періоду в діапазоні від 5 хвилин до 30 хвилин, переважно в діапазоні від 15 хвилин до 25 хвилин, при швидкості обертання в діапазоні від 3000 об./хв. до 9000 об./хв., переважно в діапазоні від 4000 об./хв. до 8000 об./хв.

З метою відновлення ліпідів таку водну суспензію ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, можна піддати клітинному лізису, який можна здійснювати різними способами. Необмежувальними прикладами таких способів є:

- теплова обробка, яку можна здійснити із застосуванням автоклавів під тиском (наприклад, автоклав Brignole модель AU-2, або реактор із змішувачем Parr модель PA 4575), при тиску в діапазоні від 2 бар до 6,5 бар, переважно в діапазоні від 3 бар до 5,5 бар, при температурі в діапазоні від 100 °C до 160 °C, переважно в діапазоні від 110 °C до 150 °C, протягом періоду в діапазоні від 1 години до 8 годин, переважно в діапазоні від 1,5 годин до 4 годин, при перемішуванні в діапазоні від 100 об./хв. до 800 об./хв., переважно в діапазоні від 400 об./хв. до 600 об./хв., як описано, наприклад, у вищевказаній міжнародній заявці на видачу патенту;

- механічна обробка, яку можна здійснити із застосуванням гомогенізаторів високого тиску (наприклад, гомогенізатор Gea NiroSoavi, модель NS3006L), при тиску в діапазоні від 800 бар до 2000 бар, переважно в діапазоні від 1000 бар до 1600 бар, при температурі в діапазоні від 10 °C до 100 °C, переважно в діапазоні від 20 °C до 80 °C, при швидкості потоку водної суспензії ліпідної клітинної біомаси в діапазоні від 5 л/год. до 50 л/год., переважно в діапазоні від 7 л/год. до 40 л/год.;

- мікрохвильова обробка, яку можна здійснити із застосуванням мікрохвильових пристроїв (наприклад, мікрохвильовий пристрій Milestone модель MicroSYNTH), при температурі в діапазоні від 45 °C до 150 °C, переважно в діапазоні від 50 °C до 100 °C, протягом періоду в діапазоні від 10 хвилин до 2 годин, переважно в діапазоні від 15 хвилин до 1 години.

5 Наприкінці клітинного лізису клітин клітини можна відновити з одержаної водної суспензії відпрацьованої клітинної біомаси, що включає ліпіди, шляхом екстракції із застосуванням, наприклад, рефлюкс-екстрактора.

Зазначену екстракцію можна здійснити в присутності принаймні одного органічного розчинника, який можливо обрати серед: неполярних органічних розчинників, таких як, наприклад, ізо-октан, n-октан, або їх суміші; суміші вуглеводнів, таких як, наприклад, фракції нафти та дизелю, які необов'язково також можуть бути одержані в ході виробництва зеленого палива; полярні органічні розчинники, такі як, наприклад, метанол, етанол, iso-пропанол, ацетон, етил-ацетат, гексан, метил-трет-бутил кетон, етил-трет-бутиловий ефір, або їх суміші;

15 Зазначену екстракцію можна здійснити при температурі в діапазоні від 20 °C до 200 °C, переважно при точці кипіння застосовуваного розчинника.

Зазначену екстракцію можна здійснити в присутності кількості розчинника, що становить в діапазоні від 1 до 6 , переважно в діапазоні від 1,5 до 5, об'ємів водної фази водної суспензії відпрацьованої ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, які одержані лізисом клітин.

20 Водну суспензію відпрацьованої ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди і яка одержана після зазначеного лізису клітин, можна піддати екстракції один або більше разів. Переважно, таку водну суспензію відпрацьованої ліпідної клітинної біомаси, що містить ліпіди, можна піддати екстракції від 1 до 5 разів, переважніше від 1 до 3 разів.

Наприкінці вищезазначеної екстракції одержують наступні дві фази:

- 25 (i) органічну фазу, що містить ліпіди, розчинені в розчиннику;
(ii) водну фазу, що включає клітинні залишки та сліди невідокремлених ліпідів.

З метою відновлення ліпідів зазначену органічну фазу (i) піддають випаровуванню для отримання в якості залишку олії із високою температурою кипіння (ia), що містить ліпіди та рідку фазу, що містить розчинник, який може бути перероблений вищезгаданою екстракцією.

30 Спосіб згідно з цим винаходу дає можливість відновити ліпіди при виході екстракції від 40 % до 99,9 %, при діапазоні від 45 % до 99 %, при цьому вихід екстракції обчислюється, виходячи із загальної кількості ліпідів, присутніх у (сухий) ліпідній клітинній біомасі, отриманій після ферментації.

35 Переважно, ліпіди, що містяться у зазначеній органічній фазі (i), являють собою тригліцериди, більш переважно складні ефіри гліцерину з жирними кислотами, що містять від 14 до 24 атомів вуглецю, такі як пальмітинова кислота, стеаринова кислота, олеїнова кислота, α-лінолева кислота, у кількостях, які більше або дорівнюють 80 мас.%, переважно більше або дорівнюють 90 мас.%, виходячи із загальної маси ліпідів. Іншими ліпідами, які можуть бути присутніми у зазначеній органічній фазі (i), є: фосфоліпіди, моногліцериди, дигліцериди, вільні жирні кислоти або їх суміші.

40 Загальна кількість ліпідів, присутніх у водній суспензії ліпідної клітинної біомаси, отриманої після ферментації на вказаному другому ферментаційному пристрої, а також загальна кількість ліпідів, що містяться у згаданій олії із високою температурою кипіння (ia), може визначатися методами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, колориметрією на основі реакції ліпідів з фосфорною кислотою та фосфованіліном, використовуючи, наприклад, набір "загальний ліпід сульфо-фосфо-ванілін", що реалізується Spinreact SA/SAU, Ctra Santa Coloma, 7 - E-17176 Сант-Есте́ве-де-Бас (GI), Іспанія. Більш детальну інформацію щодо зазначеного методу можна знайти, наприклад, у наступній статті: "Хімічна основа реакції сульфо-фосфо-ваніліну для оцінки загальних ліпідів у сироватці крові", "Chemical Basis of the Sulpho-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids", J. A. Knight et al., опубліковано у "Clinical Chemistry" (1972), Vol. 18, No. 3, pp. 199-202.

45 Зазначену водну фазу (ii), що містить клітинні залишки, зокрема білки та полісахариди, що містяться в клітинній мембрані застосовуваного олеогенного мікроорганізму, можливо зневодити та використати як паливо, необов'язково разом з лігніном, отриманим при гідролізі біомасу.

50 Альтернативно, зазначену водну фазу (ii) можна піддавати анаеробному розщепленню для отримання біогазу, який може бути використаний для виробництва електричної енергії, який також може бути використаний для задоволення енергетичних потреб процесу згідно з цим винаходу.

60 Альтернативно, зазначену водну фазу (ii) можна піддавати зрідженню для отримання

біоолії, як описано, наприклад, у міжнародних патентних заявках WO 2010/069583 або WO 2010/069516.

Ліпіди, отримані способом згідно з цим винаходу, можуть бути піддані етерифікації в присутності принаймні одного спирту, що має від 1 до 4 атомів вуглецю, переважно метанолу, етанолу та принаймні одного кислотного або лужного каталізатора, щоб отримати гліцеринові та алкільні складні ефіри, зокрема метилові ефіри або етилові ефіри (біодизель).

Альтернативно, зазначені ліпіди можуть бути піддані гідруванню/дезоксигенації у присутності принаймні одного каталізатора з метою отримання зеленого дизельного палива. Процеси гідрування/оксигенації відомі в даній області техніки і описані, наприклад, в європейській заявці на патент EP 1,728,844.

Даний винахід тепер буде проілюстровано більш детально за допомогою варіанта втілення з посиланням на вищезгадану фіг. 1.

Фіг. 1 зображує варіант здійснення способу згідно з цим винаходом. З цією метою біомасу, що включає щонайменше один полісахарид (наприклад, лігноцелюлозну клітинну біомасу), піддають гідролізу (працює відповідно до одного з вищезгаданих способів, відомих у цій галузі) для отримання суміші, що включає першу водну фазу та першу тверду фазу, включаючи лігнін.

Згадану суміш піддають фільтрації або центрифугуванню (не показано на фіг. 1) для отримання першої твердої фази та першої водної фази.

Тим часом інокулянт готують у першому ферментаційному пристрої з використанням олеогенного мікроорганізму (наприклад, *Rhodospiridium azoricum*) для отримання першого ферментаційного бульйону: слід зазначити, що, як було сказано вище, водний розчин, що містить кількість цукрів, більше або 40 г/л, що знаходиться в діапазоні від 45 г/л до 60 г/л, може бути аліквотою першої водної фази, отриманої в результаті гідролізу біомаси, включаючи принаймні один полісахарид, необов'язково розведений так, мати бажану кількість цукрів (зазначено пунктирною лінією на фіг. 1).

Вказану першу водну фазу та згаданий перший ферментаційний бульйон подають до другого ферментаційного пристрою у присутності олеогенного мікроорганізму (який, *Rhodospiridium azoricum*) для отримання другого ферментаційного бульйону.

Принаймні частину зазначеного другого ферментаційного бульйону під час ферментації безперервно піддають мікрофільтрації для отримання водного потоку, що містить цукри та інші органічні та неорганічні речовини (наприклад, нітрати, фосфати) (перший пермеат - P1), який піддають очищенню (наприклад, шляхом зворотного осмосу або випаровування), і водну суспензію, що містить концентровану ліпідну клітинну біомасу (перший ретентат - R1), яку направляють на згаданий другий ферментаційний пристрій.

Після очищення отримують додатковий водний потік (другий пермеат - P2), який направляють на утилізацію (стічні води), і ще один водний потік, концентрований за рівнем цукру та інших органічних та неорганічних речовин (наприклад, нітрати, фосфати) (інші ретентат - R2), який направляється на згаданий другий ферментаційний пристрій.

Зазначену мікрофільтрацію та зазначену очистку здійснюють безперервно під час ферментації.

Наприкінці ферментації зазначений другий ферментаційний бульйон піддають сепарації (наприклад, центрифугуванням) для отримання водної суспензії ліпідної клітинної біомаси та другої водної фази.

Вказану водну суспензію ліпідної клітинної біомаси піддають лізису клітин (згідно з одним із способів, описаних вище), екстрагуванню в присутності розчинника з подальшим випаровуванням розчинника з отриманням ліпідів, при цьому вказану другу водну фазу направляють на утилізацію (стічні води).

Для кращого розуміння цього винаходу та для його втілення нижче наведені деякі ілюстративні, необмежувальні приклади.

ПРИКЛАД 1

Композиція лігноцелюлозного гідролізату

Лігноцелюлозний гідролізат (тобто, "перша водна фаза"), яку застосовують у наступних прикладах, має таку композицію: глюкоза (126 г/л), ксилоза (87,1 г/л), арабіноза (7,5 г/л), манноза (2,9 г/л), галактоза (6,5 г/л), оцтова кислота (4,9 г/л), фурфурал (F) (1 г/л), 5-гідроксиметилфурфурал (HMF) (3 г/л), із загальним вмістом цукрів 230 г/л.

Вміст фурфуралу (F) і 5-гідроксиметилфурфуралу (HMF) був визначений високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) із застосуванням пристрою LichroCART Purospher RP-18 з ендкепіруванням (240 мм × 4 мм; 5 мкм) від Merck, спорядженого фотодіодним ультрафіолетовим сенсором, із потоком 0,8 мл/хв., температура 40 °С, мобільна фаза фосфорної кислоти при 0,05 % у воді (елюент А) і ацетонітрил + фосфорна кислота при 0,05 %

у воді, при співвідношенні 90/10 об./об. (елюент В), із застосуванням градієнта елюювання, як показано в Таблиці 1.

Таблиця 1

Час (хв.)	Розчинник А (%)	Розчинник В (%)
0	100	0
4	94	6
30	85	15

- 5 Вміст цукрів був визначений іонно-обмінною хроматографією (аніонно-обмінна хроматографія високого рН із імпульсним амперметричним визначенням), із застосуванням хроматографу Dionex, обладнаного колоною Carborac PA100, із градієнтом натрію гідроксид і натрію ацетат в якості проти іону. Кількісне визначення органічних кислот, наприклад, оцтової
- 10 кислоти, було проведено із застосуванням іонного хроматографу DIONEX BIOLC 4000, з'єднаного із сенсором провідності (ІЕД - "імпульсний електрохімічний детектор"), хроматографічної колони Ice-AS1 (діаметр: 9 мм; довжина: 250 мм), пригнічувача AMMS-ICE (Аніонний мікромембранний пригнічувач), об'єм впорскування 50 мкл, ізократичне розчинення із застосуванням гептафтормасляної кислоти 0,4 мМ.

ПРИКЛАД 2

- 15 Приготування інокулята із застосуванням гідролізату (*Rhodospiridium azoricum*)
Інокулят (тобто, перший ферментаційний бульйон) приготували із застосуванням частини лігноцелюлозного гідролізату (тобто, першої водної фази), як описано в прикладі 1.

- 3 цією метою 22 мл вказаного лігноцелюлозного гідролізату (тобто, першої водної фази), належним чином розведеного у воді (78 мл) для одержання остаточної концентрації цукрів 50
- 20 г/л, помістили у ємність 500 мл із магнітним перемішувачем, до якої послідовно були додані наступні речовини: 2 г/л екстракту дріжджів, 1 г/л KH_2PO_4 , 0,05 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г/л NaCl і 0,01 г/л NaCl : рН одержаної суміші довели до 6 шляхом додавання декількох краплин калію гідроксид (KOH) 2,5 М. Одержану суміш стерилізували в автоклаві при 80 °С протягом 45 хвилин.

- 25 Наприкінці стерилізації одержану суміш довели до кімнатної температури (25 °С) та інокулювали із клітинами *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3, які залишити зростати протягом 24 годин при 30 °С, при перемішуванні (200 об./хв.) для одержання першого ферментаційного бульйону із концентрацією ліпідної клітинної біомаси 23 г/л (в сухій речовині).

ПРИКЛАД 3

- 30 Ферментація *Rhodospiridium azoricum* (мікрофільтрацію і зворотний осмос проводять безперервно)

Тест на ферментацію із застосуванням клітин *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3 провели у 20-літровому ферментаторі в таких умовах:

- 35 - 0,78 літрів лігноцелюлозного гідролізату (тобто, першої водної фази), як описано в прикладі 1, належним чином розведено у воді для одержання первісної концентрації цукрів 30 г/л;

- 2,0 г/л екстракту дріжджів;
- 5 г/л кукурудзяного екстракту в сухій речовині;
- 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 40 - 6 г/л KH_2PO_4 ;
- 0,03 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 0,06 г/л NaCl ;
- 0,06 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- подача повітря: потік, еквівалентний 1 л/хв.;
- 45 - температура: 30 °С;
- робочий рН, що еквівалентний 6, який підтримують шляхом додавання при необхідності декількох крапель розчину калію гідроксиду (KOH) 5 М і сірчаної кислоти (H_2SO_4) 10% (об./об.);
- перемішування при 600 об./хв.-900 об./хв., яке регулюють потоком повітря для додержання концентрації розчиненого кисню (DO_2) вище показника насичення 30%;

- 50 - первісний об'єм: 6 літрів;
- інокулят *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3 (тобто, першого ферментаційного бульйону), одержаний, як описано в прикладі 2, розвели до 10 % (об./об.) із культуральним середовищем, що застосовувалось для ферментації, для початку ферментації із концентрацією ліпідної

клітинної біомаси, еквівалентної 2,3 г/л (в сухій речовині).

Ферментацію здійснюють перервним способом ("попартійно") протягом перших 6 годин і надалі перфузією. У зв'язку з цим, тангенціальний мікрофільтраційний пристрій, що має мікрофільтраційну мембрану "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" від Sartorius, з'єднують із ферментатором через поршневий насос, така мембрана має поверхню, що дорівнює 0,1 м² і середній діаметр пор, що дорівнює 0,45 мкм, для видалення частини культурального середовища (пермеат - P1) і концентрованої другої ліпідної клітинної біомаси (ретентат - R1), одержаної у другому культуральному середовищі. З цієї метою такий поршневий насос приводять в дію безперервно, під час ферментації, для рециркуляції ліпідної клітинної біомаси і культурального середовища у апараті мікрофільтрації на швидкості потоку, що дорівнює 144 л/год., при роботі при тому ж рН і температурі, що надані вище для ферментації. Вказана друга ліпідна клітинна біомаса таким чином було концентрована для одержання ретентату (R1), який подається безперервно у ферментатор (рециркуляція) і пермеату (P1) який подають безперервно зворотному осмосу. Швидкість потоку пермеату (P1) контролюють в діапазоні від 61 мл/год. до 75 мл/год. із застосуванням перистальтичного насосу, розташованого нижче випускного отвору пермеату (P1) апарату мікрофільтрації.

У зв'язку із зазначеним, тест на зворотний осмос був проведений із застосуванням тестувального апарату із плоскими мембранами, що складається з циліндричного сталевого контейнеру, на корпусі якого полімерна мембрана встановлена на фільтрувальній пористій перегородці, що утворює опору для мембрани. Контейнер при перемішуванні може бути підданий тиску у 35 бар. Пермеат (P2) фільтрують через мембрану і збирають у контейнер, що розташований нижче, поки ретентат (R2), який залишився нижче мембрани, направляють, через клапан контролю потоку, розташований нижче зазначеного апарату, на ферментаційний пристрій, при швидкості потоку в діапазоні від 20 мл/год. до 25 мл/год.

Для зворотного осмосу застосовували мембрану BW30 від Dow Chemical, що є тонкою композитною мембраною на поліамідній основі, яка має такі характеристики:

- відсікання по молекулярній масі (MWCO) = 50 дальтонів;
- робочий рН = 2-11;
- максимальна робоча температура = 70 °C;
- максимальний робочий тиск = 68 бар.

Пермеат (P1) подають до вищевказаного пристрою зворотного осмосу при перемішуванні при 500 об./хв., під тиском, що дорівнює 35 бар.

Від зворотного осмосу одержують другий ретентат (R2), що містить цукри, концентровані із застосуванням фактора концентрації, що дорівнює 3: починаючи з первісного вмісту цукру, що дорівнює 28 г/л (перший пермеат - P1) до рівня цукру, що дорівнює 84 г/л (другий ретентат - R2).

Вміст цукру був визначений шляхом обробки, як описано в прикладі 1.

Зазначений другий ретентат (R2) додатково містив концентровані солі. Фактично, перший пермеат (P1) мав вміст Натрію (Na), калію (K), магнію (Mg), кальцію (Ca), хлору (Cl) і фосфору (P), еквівалентний 825 часток на мільйон, 3186 часток на мільйон, 273 часток на мільйон, 184 часток на мільйон, 320 часток на мільйон і 1880 часток на мільйон відповідно; в той же час, другий пермеат (P2) мав вміст Натрію (Na), калію (K), магнію (Mg), кальцію (Ca), хлору (Cl) і фосфору (P) 8 часток на мільйон, 50 часток на мільйон, менше 2 часток на мільйон, менше 2 часток на мільйон, 25, 4 часток на мільйон, а другий ретентат (R2) мав вміст Натрію (Na), калію (K), магнію (Mg), кальцію (Ca), хлору (Cl) і фосфору (P), еквівалентний 2440 часток на мільйон, 9550 часток на мільйон, 820 часток на мільйон, 552 часток на мільйон, 960 часток на мільйон і 5640 часток на мільйон відповідно.

Вміст солі був визначений мас-спектрометрією із індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS). Для цієї мети застосовують спектрометр ICP-MS ELAN DRCe від Perkin Elmer. Розведення, що застосовувалось для аналізу за допомогою ICP-MS, змінювалось в залежності від релевантного аналіта; зразок для аналізу був окислений із застосуванням азотної кислоти (HNO₃) при 2 об.%. Стандартні розчини, що застосовувались для калібрування, готували шляхом розведення і окислення перевірених 1000 часток на мільйон водних стандартних розчинів.

Швидкість потоку подачі до ферментатора, інакше кажучи, другий ретентат (R2) плюс свіжий гідролізат, контролювали автоматично протягом ферментації із застосуванням датчика рівня, так що об'єм пермеату на випуску з мікрофільтрації (P1) компенсували, а об'єм ферментаційного бульйону залишився постійним у ферментаторі. Така подача здійснювалась при концентрації цукру 295 г/л і складалася, як зазначено вище, з ретентату (R2) і свіжого гідролізату, який було одержано як описано в прикладі 1 і розведено як описано вище, у співвідношенні 1:2.

Зазначену швидкість потоку контролювали в діапазоні від 61 мл/год. до 76 мл/год. для одержання впускної кількості цукрів в діапазоні від 22 г/год. до 18 г/год. для задоволення вимог олеогенних дріжджів і для підтримання концентрації 30 г/л у ферментаторі.

Наприкінці ферментації, через 100 годин, одержаний другий ферментаційний бульйон із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 68 г/л (в сухій речовині) і загальним вмістом ліпідів, що дорівнює 55 мас.% (37,4 г/л) в сухій речовині зазначеної ліпідної клітинної біомаси, об'єм у ферментаторі (6 л) підтримували постійним протягом тесту.

Загальний вміст ліпідів визначили із застосуванням набору "загальна кількість ліпідів сульфо-фосфо-ванілін" шляхом роботи, як описано вище. Вміст цукрів був визначений, як описано в прикладі 1.

Зазначений другий ферментаційний бульйон піддали сепарації центрифугуванням при 7000 об./хв. протягом 20 хвилин для одержання 1,2 кг ліпідної клітинної біомаси [408 г (в сухій речовині) - концентрація, що дорівнює 35 мас.% від загальної кількості одержаної ліпідної клітинної біомаси.

Було досягнуто виходу ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 0,36 г/г, виходячи із спожитого субстрату ($Y_{X/S}$ = г одержаної біомаси на г спожитого субстрату) і вихід ліпідів, що дорівнює 0,17 г/г, виходячи із спожитого субстрату ($Y_{L/S}$ = г одержаних ліпідів на г спожитого субстрату).

ПРИКЛАД 4

Ферментація *Rhodospiridium azoricum* (мікрофільтрацію і випаровування здійснюють безперервно)

Провели тест на ферментацію із застосуванням клітин *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3 у 20-літровому ферментаторі, працюючи в наступних умовах:

- 0,78 л лігноцелюлозного гідролізату (тобто, першої водної фази), як описано в прикладі 1, належним чином розведеного водою для одержання первісної концентрації цукрів, що дорівнює 30 г/л;

- 2,0 г/л екстракту дріжджів;

- 5 г/л кукурудзяного екстракту в сухій речовині;

- 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

- 6 г/л KH_2PO_4 ;

- 0,03 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

- 0,06 г/л NaCl ;

- 0,06 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

- подане повітря: потік, що дорівнює 1 л/хв.;

- робочий pH, що дорівнює 6, який підтримують шляхом додавання, при необхідності, декількох крапель розчину калію гідроксид (KOH) 5 M і сірчана кислота (H_2SO_4) 10 % (об./об.);

- температура: 30 °C;

- перемішування при 600 об./хв. - 900 об./хв., що змінюється потоком повітря таким чином, щоб підтримувати концентрацію розчиненого кисню (DO_2) вище показника насичення 30%;

- первісний об'єм: 6 літрів;

- інокулят *Rhodospiridium azoricum* RGRDP3 (тобто, перший ферментаційний бульйон), одержаний, як описано в прикладі 2, розведений до 10 % (об./об.) із культуральним середовищем, яке застосовують для ферментації для початку ферментації при концентрації ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 2,3 г/л (в сухій речовині).

Ферментацію здійснюють перервним способом ("попартійно") протягом перших 6 годин, а потім - способом перфузії. При цьому тангенціальний пристрій мікрофільтрації, що має мембрану мікрофільтрації "Hydrosart® Microfiltration Cassettes" від Sartorius, був приєднаний до ферментатора через поршневий насос, така мембрана має поверхню мембрани, що дорівнює 0,1 м² і середній діаметр пор, що дорівнює 0,45 мкм, з метою видалення частини культурального середовища (пермеат - P1) і концентрування другої ліпідної клітинної маси (ретентат - R1), одержаної у зазначеному другому культуральному середовищі. З цією метою вказаний поршневий насос безперервно проводять в дію під час ферментації для рециркуляції ліпідної клітинної маси і культурального середовища у вказаному апараті мікрофільтрації при швидкості потоку 144 л/год., що працює при тих ж умовах pH і температури, що наведені вище щодо ферментації. Така друга ліпідна клітинна біомаса таким чином була концентрована для одержання ретентату (R1), що подається безперервно до ферментації (рециркуляція) і пермеату (P1), що подається безперервно для випаровування. Швидкість потоку пермеату (P1) контролювали в діапазоні від 58 мл/год. до 70 мл/год. із застосуванням перистальтичного насоса, що розташований нижче впускного отвору для пермеату (P1) апарату мікрофільтрації.

У зв'язку із вищезазначеним проводять тест на випаровування із застосуванням ротаційного

випаровувача. Пермеат (P1) таким чином направляють у ротаційний випаровувач і проводять випаровування при 38 °C і при тиску, що дорівнює 147 мбар.

Очищену фазу (P2) (випаровувана фаза - еквівалент другому пермеату) конденсували із застосуванням схеми, що включає охолоджувальну воду 15 °C, в той час як концентрат (R2) (еквівалент другого ретентату) направляють у пристрій ферментації за допомогою поршневого насоса при швидкості потоку від 16 мл/год. до 20 мл/год.

Після випаровування одержують концентрат (R2), що містить цукри, концентровані із фактором концентрації 3,5: виходячи з первісного вмісту цукрів, що дорівнює 28 г/л (перший пермеат - P1), до вмісту цукрів, що дорівнює 98 г/л (концентрат - R2).

Вміст цукрів було визначено, як описано в прикладі 1.

Зазначений другий концентрат (R2) додатково містить всі солі: для підтвердження, провідність зазначеної очищеної фази (P2) була виміряна після конденсації із застосуванням вимірювача провідності MM40+ від Crison, було встановлено її рівень менше 0,2 мС/см.

Швидкість потоку при подачі до ферментатора, інакше кажучи, другого концентрату (R2) і свіжого гідролізату, контролювали автоматично протягом тривалості ферментації із застосуванням датчика рівня, так що об'єм пермеату на виході з мікрофільтрації (P1) компенсували, а об'єм ферментаційного бульйону у ферментаторі залишився постійним: при такому поданні наявна концентрація цукрів, що дорівнює 313 г/л і потік, що складається, як вказано вище, з ретентату (R2) і свіжого гідролізату, який був одержаний, як описано в прикладі 1, і розведений, як описано вище, у співвідношенні 2:5.

Зазначену швидкість потоку контролювали в діапазоні від 58 мл/год. до 70 мл/год. для одержання впускної кількості цукрів в діапазоні від 22 г/год. до 18 г/год. для задоволення потреб олеогенних дріжджів і для підтримання концентрації 30 г/л у ферментаторі.

Наприкінці ферментації, через 100 годин, одержаний другий ферментаційний бульйон із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 67 г/л (в сухій речовині) і загальним вмістом ліпідів, що дорівнює 56 мас.% (37,5 г/л) в сухій речовині зазначеної ліпідної клітинної біомаси, об'єм у ферментаторі (6 л) підтримувати постійним протягом тесту.

Загальний вміст ліпідів визначили із застосуванням "набору для визначення загальної кількості ліпідів сульфо-фосфо-ванілін" вищеописаним способом. Вміст цукрів був визначений, як описано в прикладі 1.

Зазначений другий ферментаційний бульйон піддали сепарації центрифугуванням при 7000 об./хв. протягом 20 хвилин для одержання 1,1 кг ліпідної клітинної біомаси [402 г (в сухій речовині) - концентрація, що дорівнює 36 мас.% від загальної кількості одержаної ліпідної клітинної біомаси.

Було досягнуто вихід ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 0,35 г/г від спожитого субстрату ($Y_{X/S}$ = г одержаної біомаси на г спожитого субстрату) і вихід ліпідів, що дорівнює 0,17 г/г, виходячи із спожитого субстрату ($Y_{L/S}$ = г ліпідів на г спожитого субстрату).

ПРИКЛАД 5

Відновлення ліпідів клітинним лізисом (теплова обробка)

З цією метою наприкінці ферментації 1180 мл другого ферментаційного бульйону, одержаного як описано в прикладі 3, із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 68 г/л (в сухій речовині), були піддані центрифугуванню при 7000 об./хв., протягом 20 хвилин, для одержання 200 мл водної суспензії ліпідної клітинної біомаси із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 350 г/л (в сухій речовині) і 980 мл відпрацьованої ферментаційної рідини (тобто, другої водної фази).

200 мл зазначеної водної суспензії помістили у автоклав 0,5 л (реактор змішування Парра модель РА 4575 А) і довели до температури 140 °C, при автогенному тиску 4,9 бар, із перемішуванням при 450 об./хв., і витримували в даних умовах протягом 2 годин. Після цього відпрацьовану ліпідну клітинну біомасу вивантажують і починають процес екстрації (ПРИКЛАД 8).

ПРИКЛАД 6

Відновлення ліпідів клітинним лізисом (механічна обробка)

З цією метою наприкінці ферментації 6 л другого ферментаційного бульйону, одержаного як описано в прикладі 3, із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 68 г/л (в сухій речовині), були піддані центрифугуванню при 7000 об./хв., протягом 20 хвилин, для одержання 200 мл водної суспензії ліпідної клітинної біомаси із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 352 г/л (в сухій речовині) і 5,8 л відпрацьованої ферментаційної рідини (тобто, другої водної фази).

5,8 л зазначеної водної суспензії були подані насосом у гомогенізатор (Gea NiroSoavi модель NS3006L) при тиску гомогенізації 1500 бар, при кімнатній температурі і при швидкості

поток приблизно 15 л/год.

Наприкінці обробки відпрацьовану ліпідну клітинну біомасу вивантажують і починають процес екстракції (ПРИКЛАД 8).

ПРИКЛАД 7

5 Відновлення ліпідів клітинним лізисом (мікрохвильова обробка)

3 цією метою наприкінці ферментації 1180 мл другого ферментаційного бульйону, одержаного як описано в прикладі 3, із концентрацією ліпідної клітинної біомаси, що дорівнює 68 г/л (в сухій речовині), були піддані центрифугуванню при 7000 об./хв., протягом 20 хвилин, для одержання 200 мл водної суспензії ліпідної клітинної біомаси із концентрацією ліпідної

10 клітинної біомаси, що дорівнює 350 г/л (в сухій речовині) і 980 мл відпрацьованої ферментаційної рідини (тобто, другої водної фази).

200 мл зазначеної водної суспензії помістили у скляну колбу ємністю 300 мл із охолоджувачем, магнітним змішувачем, і довели до температури 100 °C із застосуванням мікрохвильового пристрою (Milestone модель "MicroSYNTH"). Температуру підтримували

15 постійною протягом 20 хвилин при атмосферному тиску.

Наприкінці обробки відпрацьовану ліпідну клітинну біомасу вивантажують і починають процес екстракції (ПРИКЛАД 8).

ПРИКЛАД 8

Екстракція розчинником

20 Для відновлення ліпідів, що містяться в ліпідній клітинній біомасі, одержаній після обробок, як описано в прикладах 5, 6 і 7, виконали різні тести на екстракцію із застосуванням різних типів розчинників або їх суміші.

3 цією метою 200 мл водної суспензії відпрацьованої ліпідної клітинної біомаси, одержаної як описано в прикладі 5, 6 або 7, протестували за допомогою різних тестів.

25 Таку водну суспензію піддали двом циклами екстракції, кожен протягом 2 годин, при температурі кипіння розчинника або суміші застосовуваних розчинників, у рефлюкс-екстракторі, в присутності кількості розчинника або суміші розчинників, що вдвічі більше кількості водної суспензії.

30 Були одержані ліпіди після сепарації органічної фази, що містила розчинник, ліпіди з зазначеної водної суспензії, що містила відпрацьовану ліпідну клітинну біомасу, і після піддання вказаної органічної фази дистиляції розчинника, який переробили до екстракції.

Застосовувані розчинники і їх суміші, обробки, яким була піддана ліпідна клітинна біомаса (приклади 6-8-клітинний лізис), температури екстракції і вихід екстракції показані у таблиці 2.

Таблиця 2

Обробка	Умови обробки	Розчинник екстракції	Температура екстракції	Вихід з екстракції* (%)
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	гексан/ізо-пропанол (3:2; об./об.)	60 °C	98 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	етил-ацетат	72 °C	95 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	ізо-октан	82 °C	74 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	ксилен	93 °C	87 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	етил трет-бутиловий ефір	68 °C	83 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	метил ізо-бутиловий кетон	90 °C	97 %
Теплова	Автоклав, 140 °C, 2 години	ізо-октано + 10 % етанол	70 °C	82 %

35

Продовження таблиці 2

Механічна	Гомогенізатор, 1500 бар, 15 л/год.	етил-ацетат	72 °C	71 %
Мікрохвильова	Мікрохвильовий реактор, 100 °C, 20 хв.	етил-ацетат	72 °C	80 %

*: вихід екстракції (%) ліпідів, одержаних від екстракції, надають, виходячи із загальної маси ліпідів, наявних у сухій ліпідній клітинній біомасі, одержаній після ферментації, що визначається із застосуванням "набору для визначення загальної кількості ліпідів сульфо-фосфо-ванілін" вищеописаним способом.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб одержання ліпідів з біомаси, що включає принаймні один полісахарид, за яким:
 - піддають зазначену біомасу, що включає принаймні один полісахарид, гідролізу для одержання суміші, що включає першу тверду фазу і першу водну фазу;
 - відокремлюють першу водну фазу від зазначеної суміші;
 - готують інокулят, що включає принаймні один олеогенний мікроорганізм, у першому ферментаційному пристрої і проводять ферментацію для одержання першого ферментаційного бульйону;
 - подають зазначену першу водну фазу та зазначений перший ферментаційний бульйон до другого ферментаційного пристрою і проводять ферментацію у зазначеному другому ферментаційному пристрої для одержання другого ферментаційного бульйону;
 - піддають принаймні частини зазначеного другого ферментаційного бульйону мікрофільтрації для одержання першого ретентату і першого пермеату;
 - подають зазначений перший ретентат до зазначеного другого ферментаційного пристрою;
 - піддають зазначений перший пермеат очищенню для одержання другого пермеату і другого ретентату;
 - подають зазначений другий ретентат до зазначеного другого ферментаційного пристрою;
 - наприкінці зазначеної ферментації, яку проводять у зазначеному другому ферментаційному пристрої, піддають вказаний другий ферментаційний бульйон сепарації для одержання водного розчину ліпідної клітинної біомаси, що включає ліпіди, і другої водної фази;
 - який **відрізняється** тим, що вказану мікрофільтрацію і очищення проводять безперервно протягом зазначеної ферментації, що проводиться у зазначеному другому ферментаційному пристрої.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вказаний полісахарид вибирають серед целюлози, геміцелюлози або їх сумішей, переважно з целюлози або сумішей целюлози і геміцелюлози.
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що вказана біомаса, яка включає принаймні один полісахарид - це лігноцелюлозна біомаса, переважно вибрана серед:
 - продуктів, одержаних при вирощуванні рослин спеціально на енергетичні потреби, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або відходи, залишки і побічні відходи від переробки зазначених продуктів;
 - продуктів сільськогосподарського призначення, відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або відходи, залишки і побічні відходи від переробки зазначених продуктів;
 - продуктів лісівництва або лісового господарства, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених продуктів або відходи, залишки і побічні відходи від переробки зазначених продуктів;
 - залишків харчових і сільськогосподарських продуктів, призначених для споживання людиною або для зоотехніки;
 - не підданих хімічній обробці залишків паперової промисловості;
 - відходів роздільного збирання комунальних твердих відходів;
 - водоростей, таких як макроводорості або мікроводорості, особливо макроводорості,

переважно, серед осоту, гвайюли, включаючи відходи, залишки і побічні відходи від зазначених осоту або гвайюли або відходи, залишки і побічні відходи від переробки зазначених осоту або гвайюли.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що вказану біомасу, яка включає принаймні один полісахарид, піддають попередній процедурі помелу до піддання вказаному гідролізу для одержання часток з діаметром в діапазоні 0,1 мм до 10 мм.

5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що в зазначеному першому ферментаційному пристрої ферментацію проводять:

- при температурі в діапазоні від 20 °С до 40 °С, переважно в діапазоні від 25 °С до 35 °С; і
- протягом періоду в діапазоні від 10 годин до 36 годин, переважно в діапазоні від 12 годин до 26 годин; і

при рН в діапазоні від 4,5 до 7, переважно в діапазоні від 5 до 6,7.

6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що в зазначеному другому ферментаційному пристрої, ферментацію проводять:

- при температурі в діапазоні від 20 °С до 40 °С, переважно в діапазоні від 25 °С до 35 °С; і
- протягом періоду в діапазоні від 2 днів до 10 днів, переважно в діапазоні від 3 днів до 8 днів; і
- при рН в діапазоні від 4,5 до 7, переважно в діапазоні від 5 до 6,7.

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що зазначений мікроорганізм вибирають серед олеогенних дріжджів, таких як *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Lypomices starkeyi*, *Lypomices lipofer*, *Trigonopsis variabilis*, *Candida kefir*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis* sp., *Pichia stipitis*, *Trichosporon cacaoliposimilis*, *Trichosporon oleaginosus*, *Trichosporon pullulans*, *Rhodospiridium azoricum*, *Cryptococcus curvatus*.

8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що ферментацію в зазначеному другому ферментаційному пристрої проводять в одну або декілька стадій, в періодичному режимі та в періодичному режимі з підживленням, безперервним способом, перфузією, переважно в періодичному режимі протягом перших 3-10 годин, а потім - перфузією.

9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що до зазначеного другого ферментаційного пристрою додають кукурудзяний екстракт в діапазоні від 2 г/л до 20 г/л, переважно в діапазоні від 4 г/л до 18 г/л.

10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що зазначену мікрофільтрацію проводять під час експоненціальної фази росту ліпідної клітинної біомаси.

11. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що зазначену мікрофільтрацію проводять через мембрани із середнім розміром пор в діапазоні від 0,02 мкм до 2,0 мкм, переважно в діапазоні від 0,1 мкм до 0,8 мкм.

12. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що зазначену мікрофільтрацію проводять:

- із застосуванням трансмембранного тиску в діапазоні від 0,05 бар до 25 бар, переважно в діапазоні від 0,1 бар до 2,2 бар; і

- при швидкості (кг пермеату на м² поверхні мембрани мікрофільтрації на годину) в діапазоні від 0,2 кг/(м²/год.) до 70 кг/(м²/год.), більш переважно в діапазоні від 0,4 кг/(м²/год.) до 50 кг/(м²/год.); і

- при температурі в діапазоні від 20 °С до 40 °С, переважно в діапазоні від 25 °С до 35 °С, переважніше при температурі ферментації.

13. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що зазначену мікрофільтрацію проводять через плоскі або порожнисті волоконні мембрани, які розташовані у конфігурації перехресного потоку; або через керамічні мембрани, які розташовані у конфігурації перехресного потоку або у конфігурації динамічного перехресного потоку.

14. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів формули, який **відрізняється** тим, що очищення здійснюють за допомогою зворотного осмосу.

15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що зазначений зворотний осмос проводять у присутності принаймні однієї полімерної мембрани, яку вибирають серед мембран, що складаються з поліамідів, поліімідів, полісульфонів, переважно серед полімерних мембран, які складаються з поліамідів.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що зазначена полімерна мембрана має:

- максимальний діапазон робочих температур в діапазоні від 15 °С до 90 °С, переважно в діапазоні від 20 °С до 80 °С, ще переважніше в діапазоні від 20 °С до температури ферментації; і

- максимальний робочий тиск в діапазоні від 5 бар до 80 бар, переважно в діапазоні від 10 бар до 70 бар; і

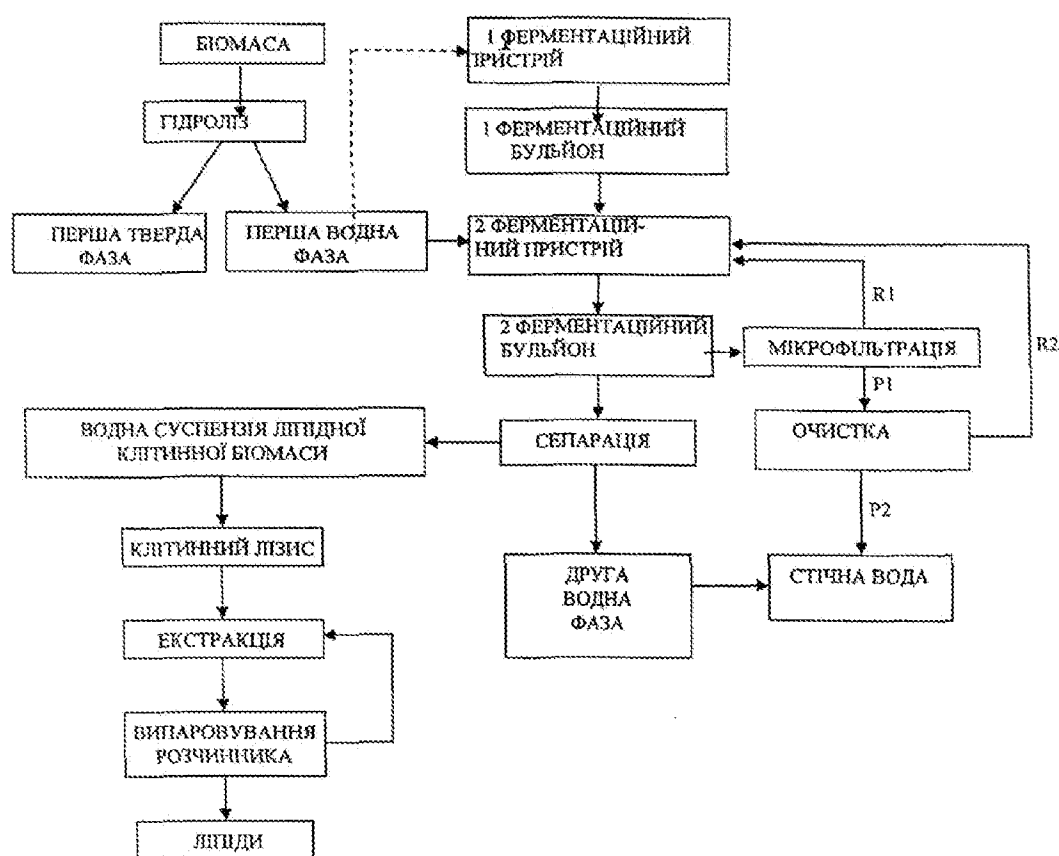
- номінальне відсікання по молекулярній масі в діапазоні від 30 дальтонів до 200 дальтонів, переважно в діапазоні від 40 дальтонів до 100 дальтонів; і

- робочий рН, сумісний з рН першого пермеату, переважно в діапазоні від 1 до 13, більш переважно в діапазоні від 2 до 11, ще більш переважно в діапазоні від 3,5 до 7,5.

5 17. Спосіб за будь-яким з пп. 15-16, який **відрізняється** тим, що зазначений зворотний осмос здійснюють шляхом:

- застосування тиску на стороні подання в діапазоні від 5 бар до 80 бар, більш переважно в діапазоні від 10 бар до 40 бар; і

10 - проведення операцій при швидкості в діапазоні від 5 кг/(м²/год.) до 80 кг/(м²/год.), більш переважно в діапазоні від 10 кг/(м²/год.) до 40 кг/(м²/год.).



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601