

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges  
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum  
14. August 2014 (14.08.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2014/122087 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

A23K 1/16 (2006.01) C12N 1/06 (2006.01)  
A23K 1/18 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)  
C11B 1/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/052020

(22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Februar 2014 (03.02.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
13153971.0 5. Februar 2013 (05.02.2013) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVONIK INDUSTRIES AG** [DE/DE]; Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder (nur für US): **RUDINGER, Nicolas** [DE/DE]; Remscheider Str. 8, 40215 Düsseldorf (DE). **RABE, Christian** [DE/DE]; Vogelsbergstr. 14, 63762 Großostheim (DE). **BORCHERS, Georg** [DE/DE]; Kurstraße 2, 61231 Bad Nauheim (DE). **FISCHER, Frank** [DE/DE]; Bienerstr. 39, 65719 Hofheim (DE). **BAUER, Klaus-Peter** [DE/DE]; Elsa-Brändström-Str. 5B, 63452 Hanau (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: IMPROVING THE BIOAVAILABILITY OF USEFUL MATERIALS FROM MICROORGANISMS BY MEANS OF A ROTOR-STATOR SYSTEM FOR CELL DISRUPTION

(54) Bezeichnung : VERBESSERUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT VON WERTSTOFFEN AUS MIKROORGANISMEN DURCH VERWENDUNG EINES ROTOR-STATOR SYSTEMS FÜR DEN ZELLAUFSCHLUSS

(57) Abstract: According to the invention, a rotor-stator system allows cells containing useful materials to be disrupted in a very gentle manner.

(57) Zusammenfassung: Erfindungsgemäß wurde gefunden, dass unter Verwendung eines Rotor-Stator-Systems ein sehr schonender Aufschluss Wertstoff-haltiger Zellen möglich ist.



WO 2014/122087 A1

**VERBESSERUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT VON WERTSTOFFEN AUS  
MIKROORGANISMEN DURCH VERWENDUNG EINES ROTOR-STATOR  
SYSTEMS FÜR DEN ZELLAUFSCHLUSS**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum schonenden Aufschluss von Wertstoffe  
enthaltenden Zellen, Nahrungsmittel und Futtermittel, die solche durch schonenden  
5 Aufschluss erhaltene Wertstoffe enthalten, sowie Tiere, die durch Fütterung mit solchen  
Futtermitteln erhalten wurden.

Die Bedeutung von mikrobiellen Zellen zur Herstellung von Wertstoffen ist dem Fachmann  
bekannt. Ein Beispiel für solche Wertstoffe stellen Nahrungsmittelkomponenten dar,  
insbesondere Lipide wie etwa polyungesättigte Fettsäuren. Für die Herstellung von solchen  
10 Wertstoffen spielen neben Bakterien und Hefen insbesondere auch weitere Pilze sowie  
Algen eine besondere Rolle.

Bestimmte Wertstoffe, insbesondere polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs), stellen eine  
wichtige Komponente für die Ernährung von Mensch und Tier dar. Als Quelle für omega-3-  
Fettsäuren wurde anfangs vor allem Fisch verwendet. Später wurde entdeckt, dass  
15 bestimmte Mikroben heterotroph omega-3-Fettsäuren in großen Mengen produzieren, wobei  
die Fettsäureproduktion durch Wahl spezifischer Reaktionsparameter vorteilhaft beeinflusst  
werden kann. Die omega-3-Fettsäuren können anschließend aus den Zellen gewonnen  
werden oder aber die Zellen in Form von Biomasse direkt in Futter- oder Nahrungsmitteln  
eingesetzt werden.

20 Ein Problem bei der Verwendung und Verarbeitung von zahlreichen Wertstoffen,  
insbesondere von polyungesättigten Fettsäuren, stellt ihre Instabilität gegenüber oxidativen  
Abbau dar: Sobald der Wertstoff aus den Zellen isoliert wird, ist die Gefahr des oxidativen  
Abbaus stark erhöht, da der Schutz durch die umgebende Zellmembran nicht mehr gegeben  
ist. Wenn der Wertstoff jedoch nicht aus den Zellen isoliert wird, ist die Bioverfügbarkeit  
25 reduziert, d.h. der Wertstoff kann von dem konsumierenden Tier nicht verwertet werden, da  
die Zellwand nicht oder nicht in ausreichender Menge gespalten werden kann. Ein  
Kompromiss besteht entsprechend darin, den Wertstoff erst unmittelbar vor seinem Einsatz  
bzw. erst bei Herstellung des Futter- oder Nahrungsmittels aus den Zellen freizusetzen. Auf  
diese Weise wird sichergestellt, dass der Wertstoff auf bestmögliche Weise stabilisiert wird,  
30 bevor er seiner Anwendung zugeführt wird. In diesem Sinne wird in US 2012/0183668 A1  
beschrieben, dass zur Herstellung von Futtermitteln PUFAs enthaltende Zellen mit anderen

Futtermittelinhaltsstoffen vermischt werden und das so erhaltene Gemisch zwecks Herstellung eines Futtermittels anschließend einem Extrusionsverfahren unterworfen wird.

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass bei Einsatz der PUFAs enthaltenden Zellen der Zellaufschluss in der Regel nur unzureichend erfolgt bzw. dass zur Erzielung eines  
5 zufriedenstellenden Zellaufschlusses sehr harsche Zellaufschlussbedingungen in Form eines hohen mechanischen Energieeintrags gewählt werden müssen, wobei selbst dann nicht sichergestellt ist, dass der Zellaufschluss tatsächlich zufriedenstellend verläuft. Bei dem anzuwendenden hohen Energieeintrag kann es im Übrigen zur Schädigung der PUFAs oder anderer Bestandteile der Futtermittelmischung kommen.

10 Die Aufgabe der vorliegenden Aufgabe bestand daher darin, ein schonenderes Verfahren zur Herstellung von Futtermitteln, die Wertstoffe, vorzugsweise Lipide, insbesondere polyungesättigte Fettsäuren, enthalten, zur Verfügung zu stellen, wobei eine Schädigung der Wertstoffe bestmöglich vermieden werden sollte.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, dass der mechanische  
15 Energieeintrag deutlich reduziert werden kann, wenn zur Durchführung des Zellaufschlusses ein Rotor-Stator-System eingesetzt wird.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zum Aufschluss von Zellen, die Wertstoffe, vorzugsweise Lipide, insbesondere polyungesättigte Fettsäuren, enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass zum Zellaufschluss ein Rotor-Stator-System  
20 eingesetzt wird.

Zur Durchführung des Zellaufschlusses wird eine Zellsuspension eingesetzt. Die Zellsuspension weist vorzugsweise einen Feststoffgehalt von mindestens 10 Gew.-%, insbesondere von 10 bis 70 Gew.-%, vorzugsweise 30 bis 70 Gew.-% oder 45 bis 65 Gew.-%, besonders bevorzugt von 50 bis 65 Gew.-%, auf.

25 Die Zellsuspension wird vorzugsweise ausgehend von einer Zellmasse mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 15 Gew.-%, insbesondere 1 – 14 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 10 Gew.-%, insbesondere 1 – 9 Gew.-%, vor allem weniger als 5 Gew.-%, insbesondere 1 – 4,5 Gew.-%, erhalten.

Verfahren zur Bestimmung des Feststoffgehalts bzw. Feuchtigkeitsgehalts sind dem  
30 Fachmann bekannt. Die Bestimmung des Feststoffgehalts kann beispielsweise unter Verwendung einer Infrarotlampe erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung des

Feststoffgehalts erfindungsgemäß gravimetrisch durch Ermittlung des Wasserverlustes während der thermischen Trocknung, die beispielsweise in einem Trockenschrank durchgeführt werden kann. Feststoffgehalt und Feuchtigkeitsgehalt sind einander komplementär.

- 5 Das Rotor-Stator-System basiert auf einem stationären Teil, der Stator genannt wird, und einem rotierenden Teil, dem Rotor. Der Rotor besitzt typischerweise eine Umfangsgeschwindigkeit von mindestens 5 m/s, beispielsweise 10 bis 30 m/s, die Spaltbreite zwischen Rotor und Stator kann beispielsweise 0,1 – 0,5 mm betragen. Zur Durchführung des Zellaufschlusses wird die Zell-Suspension in den Zwischenraum zwischen  
10 Stator und Rotor zugegeben. In diesem Spalt erfahren die Zellen eine Scherbeanspruchung und zusätzlich entstehen Turbulenzen. Diese beiden Faktoren bewirken den Zellaufschluss.

- Der Energieeintrag mittels des Rotor-Stator-Systems auf die Zellen beträgt erfindungsgemäß vorzugsweise maximal 50 kWh pro Tonne Suspension, insbesondere maximal 40, 35 oder 30 kWh pro Tonne Suspension, besonders bevorzugt maximal 25, 20 oder 15 kWh pro  
15 Tonne Suspension. Bevorzugte Bereiche stellen hierbei Energieeinträge von 0,1 – 50 kWh pro Tonne Suspension, insbesondere 0,3 - 45 kWh, besonders bevorzugt 0,5 – 40 kWh, insbesondere 0,8 – 35 kWh, vor allem 1 – 30 kWh, insbesondere 1,5 – 25 kWh, 2 – 20 kWh oder 3 – 15 kWh, jeweils pro Tonne Suspension, dar.

- Die „Zellaufschlussrate“ des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt vorzugsweise  
20 mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 60, 70 oder 80 %, vor allem mindestens 85, 90 oder 95 %. Unter der „Zellaufschlussrate“ ist die Anzahl der aufgeschlossenen Zellen nach Beendigung des Zellaufschlussverfahrens im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen zu verstehen. Die Zellaufschlussrate kann beispielsweise visuell unter Verwendung eines Mikroskops bestimmt werden als das Verhältnis der Anzahl aufgeschlossener Zellen in  
25 Bezug zur Gesamtzahl der Zellen.

- Um die Wertstoffe, insbesondere Lipide, gegen oxidativen Abbau zu stabilisieren, können in der Zellsuspension, die für den Zellaufschluss verwendet wird, zusätzlich Antioxidantien enthalten sein. Bevorzugte Antioxidantien stellen hierbei BHT, BHA, TBHA, Ethoxychin, beta-Carotin, Vitamin E und Vitamin C dar. Das Antioxidans ist, sofern eingesetzt,  
30 vorzugsweise in einer Menge von 0,01 bis 2 Gew.-% enthalten.

Um den Zellaufschluss zu erleichtern können gegebenenfalls auch geringe Enzymmengen enthalten sein, die zum Verdau der Zellwand beitragen und dadurch die Freisetzung der

Lipide erleichtern. Das Zellwand spaltende Enzym ist, sofern eingesetzt, vorzugsweise in einer Menge von 0,01 bis 0,5 Gew.-% in der Zellsuspension enthalten.

In einer erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform wird der Zellaufschluss jedoch in Abwesenheit von Enzymen, insbesondere in Abwesenheit von Enzymen, die zum Verdau  
5 der Zellwand beitragen, durchgeführt. Denn das Enzym müsste nach seinem Einsatz wieder inaktiviert werden. Außerdem wäre eine größere Wassermenge als erfindungsgemäß bevorzugt erforderlich, um das Enzym effektiv einzusetzen.

Bei den erfindungsgemäß im Zellaufschlussverfahren einzusetzenden Zellen kann es sich um Zellen handeln, die bereits natürlicherweise Wertstoffe, vorzugsweise Lipide,  
10 insbesondere PUFAs, produzieren, es kann sich jedoch auch um Zellen handeln, die durch entsprechende gentechnische Verfahren dazu in die Lage versetzt wurden, Lipide, insbesondere PUFAs, zu produzieren. Die Produktion kann hierbei autotroph, mixotroph oder heterotroph erfolgen.

Bevorzugt werden erfindungsgemäß Zellen eingesetzt, die Lipide, insbesondere PUFAs,  
15 heterotroph produzieren. Es handelt sich bei den Zellen erfindungsgemäß vorzugsweise um Algen, Pilze, insbesondere Hefen, oder Protisten, es kommen jedoch etwa auch Zellen von öl-produzierenden Pflanzen in Betracht. Besonders bevorzugt handelt es sich um Zellen mikrobieller Algen oder Pilze.

Als Zellen von öl-produzierenden Pflanzen kommen insbesondere die Samen von Soja,  
20 Flachs, Raps, Mais, Baumwolle, Distel und Sonnenblume in Betracht.

Als Zellen von öl-produzierenden Hefen kommen insbesondere Stämme von *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Lipomyces* in Betracht.

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise Zellen des Taxons *Labyrinthulomycetes*  
25 (*Labyrinthulea*, Netzschleimpilze, Schleimnetze) eingesetzt, insbesondere solche der Familie der *Thraustochytriaceae*. Zu der Familie der *Thraustochytriaceae* gehören die Gattungen *Althomia*, *Aplanochytrium*, *Elnia*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* und *Ulkenia*. Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß Zellen der Gattungen *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* und *Ulkenia* eingesetzt, vor allem solche der Gattung  
30 *Thraustochytrium* oder *Schizochytrium*. Ein besonders bevorzugt eingesetzter Stamm stellt der Stamm *Schizochytrium limacinum* SR21 (IFO 32693) dar.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Zellen werden vorzugsweise in Form von sogenannter „Biomasse“ eingesetzt. Bei der Biomasse handelt es sich vorzugsweise um das Produkt eines fermentativen Kultivierungsverfahrens. Die Biomasse kann entsprechend neben den aufzuschließenden Zellen auch noch Bestandteile des Fermentationsmediums enthalten. Bei diesen Bestandteilen kann es sich insbesondere um Salze, Antischaummittel und nicht umgesetzte Kohlenstoffquelle und/oder Stickstoffquelle handeln. Der Zellgehalt in dieser Biomasse beträgt vorzugsweise mindestens 70 Gew.-%, vorzugsweise mindestens 75 Gew.-%. Der Zellgehalt in der Biomasse kann gegebenenfalls vor Durchführung des Zellaufschlussverfahrens durch entsprechende Waschschr

5  
10

Die erfindungsgemäß im Zellaufschlussverfahren einzusetzenden Zellen zeichnen sich vorzugsweise dadurch aus, dass sie einen Wertstoff-Gehalt, vorzugsweise Lipid-Gehalt, besonders bevorzugt PUFA-Gehalt, von mindestens 20 Gew.-%, vorzugsweise mindestens 30 Gew.-%, insbesondere mindestens 40 Gew.-%, jeweils bezogen auf die Zelltrockenmasse, aufweisen.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform liegt ein Großteil der Lipide in Form von Triglyceriden vor, wobei vorzugsweise mindestens 50 Gew.-%, insbesondere mindestens 75 Gew.-% und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mindestens 90 Gew.-% der in der Zelle enthaltenen Lipide in Form von Triglyceriden vorliegen.

20

Weiterhin umfassen die in der Zelle enthaltenen Lipide vorzugsweise polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs), wobei vorzugsweise mindestens 10 Gew.-%, insbesondere mindestens 20 Gew.-%, besonders bevorzugt 20 bis 60 Gew.-%, insbesondere 20 bis 40 Gew.-%, der in der Zelle enthaltenen Fettsäuren PUFAs darstellen.

Unter polyungesättigten Fettsäuren (PUFAs) werden erfindungsgemäß Fettsäuren verstanden, die mindestens zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen. Unter den PUFAs sind erfindungsgemäß hochungesättigte Fettsäuren (HUFAs) bevorzugt. Unter HUFAs werden erfindungsgemäß Fettsäuren verstanden, die mindestens vier C-C-Doppelbindungen aufweisen.

25

Die PUFAs können in der Zelle in freier Form oder in gebundener Form vorliegen. Beispiele für das Vorliegen in gebundener Form sind Phospholipide und Ester der PUFAs, insbesondere Monoacyl-, Diacyl- und Triacylglyceride. In einer bevorzugten

30

## 6

Ausführungsform liegt ein Großteil der PUFAs in Form von Triglyceriden vor, wobei vorzugsweise mindestens 50 Gew.-%, insbesondere mindestens 75 Gew.-% und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mindestens 90 Gew.-% der in der Zelle enthaltenen PUFAs in Form von Triglyceriden vorliegen.

- 5 Bevorzugte PUFAs stellen omega-3-Fettsäuren und omega-6-Fettsäuren dar, wobei omega-3-Fettsäuren besonders bevorzugt sind. Bevorzugte omega-3-Fettsäuren stellen hierbei die Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 $\omega$ -3), insbesondere die (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eicosa-5,8,11,14,17-pentaensäure, und die Docosahexaensäure (DHA, 22:6 $\omega$ -3), insbesondere die (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaensäure, dar, wobei die
- 10 Docosahexaensäure besonders bevorzugt ist.

- Verfahren zur Herstellung der Lipide, insbesondere PUFAs, enthaltenden Zellen insbesondere der Ordnung Thraustochytriales sind im Stand der Technik ausführlich beschrieben (siehe z.B. WO91/07498, WO94/08467, WO97/37032, WO97/36996, WO01/54510). Die Herstellung erfolgt in der Regel dadurch, dass Zellen in Anwesenheit
- 15 einer Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle in einem Fermenter kultiviert werden. Es können hierbei Biomasse-Dichten von mehr als 100 Gramm pro Liter und Produktionsraten von mehr als 0,5 Gramm Lipid pro Liter pro Stunde erreicht werden. Das Verfahren wird vorzugsweise als sogenanntes Fed-Batch-Verfahren durchgeführt, d.h. dass die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen inkrementell während der Fermentation zugeführt werden. Die Lipid-
- 20 Produktion kann nach Erreichen der gewünschten Biomasse durch unterschiedliche Maßnahmen induziert werden, beispielsweise durch Limitierung der Stickstoffquelle, der Kohlenstoffquelle oder des Sauerstoffgehalts oder Kombinationen davon.

- Die Fermentation der Zellen erfolgt vorzugsweise in einem Medium mit niedriger Salinität, insbesondere um Korrosion zu verhindern. Dies kann dadurch erreicht werden, dass anstelle
- 25 von Natriumchlorid chlor-freie Natriumsalze, wie beispielsweise Natriumsulfat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat oder Sodaasche, als Natriumquelle verwendet werden. Vorzugsweise wird Chlorid in Mengen von weniger als 3 g/l, insbesondere weniger als 500 mg/l, besonders bevorzugt weniger als 100 mg/l, bei der Fermentation eingesetzt.

- Als Kohlenstoffquelle kommen sowohl alkoholische als auch nicht-alkoholische
- 30 Kohlenstoffquellen in Betracht. Beispiele für alkoholische Kohlenstoffquellen sind Methanol, Ethanol und Isopropanol. Beispiele für nicht-alkoholische Kohlenstoffquellen sind Fructose, Glucose, Saccharose, Molassen, Stärke und Maissirup.

Als Stickstoffquelle kommen sowohl anorganische als auch organische Stickstoffquellen in Betracht. Beispiele für anorganische Stickstoffquellen sind Nitrate und Ammoniumsalze, insbesondere Ammoniumsulfat und Ammoniumhydroxid. Beispiele für organische Stickstoffquellen sind Aminosäuren, insbesondere Glutamat, und Harnstoff.

- 5 Zusätzlich können auch anorganische oder organische Phosphorverbindungen und/oder bekannte wachstumsstimulierende Stoffe, wie etwa Hefeextrakt oder Maisquellwasser, hinzugegeben werden, um die Fermentation positiv zu beeinflussen.

- Die Fermentation der Zellen erfolgt vorzugsweise bei einem pH-Wert von 4 bis 11, insbesondere 6 bis 10, sowie vorzugsweise bei einer Temperatur von mindestens 20°C, 10 insbesondere 20 bis 40°C, besonders bevorzugt mindestens 30 °C. Ein typisches Fermentationsverfahren dauert bis zu etwa 100 Stunden.

- Nach Beendigung der Fermentation erfolgt die Ernte der Zellen. Durch Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder Lösungsmittelverdampfung kann ein Großteil des Fermentationsmediums von der Biomasse abgetrennt werden. Die 15 Lösungsmittelverdampfung erfolgt vorzugsweise unter Einsatz eines Trommeltrockners, eines Tunnelrockners, durch Sprühtrocknung oder Vakuumverdampfung. Die Lösungsmittelverdampfung kann insbesondere auch unter Einsatz eines Rotationsverdampfers, eines Dünnschichtverdampfers oder eines Fallfilmverdampfers erfolgen. Alternativ zur Lösungsmittelverdampfung kommt beispielsweise auch die 20 Umkehrosmose zur Einengung der Fermentationsbrühe in Betracht. Anschließend wird die erhaltene Biomasse gegebenenfalls weiter getrocknet, vorzugsweise durch Fließbettgranulation. Vorzugsweise wird durch das Trocknen der Feuchtigkeitsgehalt auf unter 15 Gew.-%, insbesondere auf unter 10 Gew.-%, besonders bevorzugt auf unter 5 Gew.-% reduziert.

- 25 Vorzugsweise erfolgt nach der Ernte der Zellen oder gegebenenfalls auch schon kurz vor der Ernte der Zellen eine Pasteurisierung der Zellen, um die Zellen abzutöten und Enzyme, die den Abbau der Lipide befördern könnten, zu inaktivieren.

- Die auf diese Weise erhaltene – vorzugsweise getrocknete – Biomasse kann nun eingesetzt werden, um die Zellsuspension für den Zellaufschluss durch das Rotor-Stator-System 30 herzustellen. Zur Herstellung der Suspension wird Wasser oder eine wässrige Lösung eingesetzt. Die Suspension kann direkt im Rotor-Stator-System hergestellt werden, so dass Herstellung der Suspension und Zellaufschluss in einem Schritt erfolgen. Alternativ wird

zunächst in einem Rührsystem die Zellsuspension hergestellt und diese anschließend zwecks Zellaufschluss in dem Rotor-Stator-System eingesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Herstellung der Suspension im Rotor-Stator-System unter Verwendung eines feststoffmischenden Aufsatzes. Unter einem  
5 feststoffmischenden Aufsatz ist hierbei eine Vorrichtung zu verstehen, die das separate Einbringen von einerseits Feststoff und andererseits Wasser bzw. wässriger Lösung in das Rotor-Stator-System erlaubt. Die Suspension wird somit erst während des Zellaufschlusses bzw. unmittelbar vor dem Zellaufschluss durch Vermischung in dem feststoffmischenden Aufsatz hergestellt. Erfindungsgemäß wurde gefunden, dass unter Verwendung eines  
10 solchen feststoffmischenden Aufsatzes Suspensionen mit sehr hohen Feststoffgehalten dem Zellaufschluss unterzogen werden können, was mit Hinblick auf die nachfolgende Verarbeitung besonders vorteilhaft ist. Suspensionen, die unter Verwendung eines feststoffmischenden Aufsatzes in dem Rotor-Stator-System eingesetzt werden, weisen vorzugsweise einen Feststoffgehalt von 40-70 Gew.-%, besonders bevorzugt von 50-65  
15 Gew.-%, auf.

Falls zur Herstellung der Zellsuspension eine wässrige Lösung eingesetzt wird, dann kann diese insbesondere weitere Nahrungsmittelkomponenten – wie etwa Vitamine oder Salze – enthalten.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung  
20 eines Wertstoffs, bei welchem nach Durchführung des erfindungsgemäßen Zellaufschlusses unter Verwendung des Rotor-Stator-Systems anschließend eine teilweise oder vollständige Abtrennung der Zelltrümmer erfolgt, um einen teilweise oder vollständig gereinigten Wertstoff zu erhalten. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist entsprechend auch der Wertstoff, der durch ein solches erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

25 Bei dem Wertstoff handelt es sich entsprechend vorzugsweise um ein Lipid, vorzugsweise ein Öl, besonders bevorzugt um ein Öl, das polyungesättigte Fettsäuren enthält, wobei vorzugsweise mindestens 10 Gew.-%, insbesondere mindestens 20 Gew.-%, besonders bevorzugt 20 – 60 Gew.-%, vor allem 20 – 40 Gew.-%, der in der Zelle enthaltenden Lipide polyungesättigte Fettsäuren darstellen. Vorzugsweise werden hierbei mindestens 20, 30  
30 oder 40 Gew.-%, insbesondere mindestens 50, 60 oder 70 Gew.-%, besonders bevorzugt mindestens 80, 90 oder 95 Gew.-% der Zelltrümmer abgetrennt.

Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgt erfindungsgemäß vorzugsweise mechanisch, beispielsweise durch Dekantieren, Filtration oder Zentrifugation.

Zur Abtrennung des Wertstoffs von den Zelltrümmern kann gegebenenfalls auch ein Lösungsmittel verwendet werden, in welchem sich der Wertstoff löst. Das Lösungsmittel  
5 kann nach der Abtrennung des Wertstoffs entsprechend wieder entfernt werden, beispielsweise durch Anlegen eines reduzierten Drucks. Alternativ kann die Abtrennung des Wertstoffs beispielsweise durch superkritische Flüssigextraktion erfolgen.

So kann die Abtrennung eines Öls beispielsweise dadurch erfolgen, dass die dem Fachmann bekannten Lösungsmittel, beispielsweise Chloroform, Ether, Hexan,  
10 Methylenechlorid oder Methanol, eingesetzt werden. Die Abtrennung des Öls kann beispielsweise auch dadurch erfolgen, dass ein anderes Öl zur Extraktion des erfindungsgemäßen Öls verwendet wird. Alternativ kann die Abtrennung des Öls natürlich auch ohne Verwendung eines Lösungsmittels auf rein mechanischem Wege erfolgen.

Das Öl kann anschließend einer chemischen oder physikalischen Raffinierung unterzogen  
15 werden. Die Raffinierung kann das Degummieren, das Bleichen, das Filtern, das Desodorieren und/oder das Polieren des Rohöls umfassen.

Die Isolierung gewünschter Öl-Bestandteile, insbesondere der omega-3-Fettsäuren, kann durch Hydrolyse der enthaltenen Lipide und anschließende fraktionierte Kristallisation, fraktionierte Destillation, Säulenchromatographie oder superkritische Flüssigfraktionierung  
20 erfolgen. Die Hydrolyse der Lipide kann hierbei durch basische, saure oder enzymatische Spaltung erfolgen. Nach der Spaltung der Lipide können die nicht-verseifbaren Komponenten durch Lösungsmittelextraktion – beispielsweise unter Verwendung von Ether, Hexan oder Chloroform – abgetrennt werden. Die verbliebene Lösung wird anschließend acidifiziert, so dass die freien Fettsäuren ebenfalls in ein Lösungsmittel aufgenommen  
25 werden können. Durch Kühlung können dann die nicht-polyungesättigten Fettsäuren aus dem Lösungsmittel ausgefällt und durch Filtration, Zentrifugation oder Dekantieren abgetrennt werden, während die polyungesättigten Fettsäuren in Lösung verbleiben.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels, bei welchem die Zellen nach Durchführung des  
30 Zellaufschlusses mit anderen Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen vermischt werden und anschließend zu dem Nahrungs- oder Futtermittel verarbeitet werden.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels, bei welchem der teilweise oder vollständig gereinigte Wertstoff, insbesondere ein erfindungsgemäß isoliertes Lipid oder erfindungsgemäß isolierte omega-3-Fettsäuren, mit anderen Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen vermischt wird und anschließend zu dem Nahrungs- oder Futtermittel verarbeitet wird.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Nahrungs- oder Futtermittel, das durch erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Die Verarbeitung des Gemisches aus aufgeschlossenen Zellen und weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform durch ein Extrusionsverfahren, um verkaufsfertige Portionen des Nahrungs- oder Futtermittels zu erhalten. Alternativ kann beispielsweise auch ein Pelletierverfahren eingesetzt werden.

Im Extrusionsverfahren wird vorzugsweise ein Schnecken- oder Doppelschneckenextruder eingesetzt. Das Extrusionsverfahren wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 80 – 220° C, insbesondere 100 – 190 °C, einem Druck von 10 – 40 Bar, und einer Wellenumlaufgeschwindigkeit von 100 – 1000 rpm, insbesondere 300 – 700 rpm, durchgeführt. Die Verweilzeit des eingebrachten Gemisches beträgt vorzugsweise 5 – 30 Sekunden, insbesondere 10 – 20 Sekunden.

Bei einer erfindungsgemäß bevorzugten Art des Extrusionsverfahrens umfasst das Verfahren einen Kompaktierungs- und einen Kompressionsschritt.

Vor der Durchführung des Extrusionsverfahrens werden die Komponenten vorzugsweise innig miteinander vermischt. Dies geschieht vorzugsweise in einer Trommel, die mit Schaufeln ausgestattet ist. Bei diesem Mischungsschritt erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform eine Wasserdampf-injektion, insbesondere um die Quellung der vorzugsweise enthaltenen Stärke zu bewirken.

Die weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffe werden vor dem Vermischen mit den aufgeschlossenen Zellen – soweit erforderlich - vorzugsweise zerkleinert, um sicherzustellen, dass bei dem Mischungsschritt ein homogenes Gemisch erhalten wird. Das Zerkleinern der weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffe kann beispielsweise unter Verwendung einer Hammer-Mühle erfolgen.

Ein erfindungsgemäß bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels umfasst daher die folgenden Schritte:

a) Bereitstellung einer Zellsuspension, insbesondere von Zellen aus Thraustochytriales, die vorzugsweise einen Feststoffgehalt von 10 bis 70 Gew.-%, insbesondere 40 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt 50 bis 65 Gew.-%, aufweist;

b) Zellaufschluss mittels eines Rotor-Stator-Systems unter Anwendung eines  
5 Energieeintrags von maximal 50 kWh pro Tonne Suspension, vorzugsweise von 0,1 – 50 kWh, insbesondere 0,3 - 45 kWh, besonders bevorzugt 0,5 – 40 kWh, insbesondere 0,8 – 35 kWh, vor allem 1 – 30 kWh, insbesondere 1,5 – 25 kWh, 2 – 20 kWh oder 3 – 15 kWh, jeweils pro Tonne Suspension;

c) Vermischung der aufgeschlossenen Zellen und/oder daraus isolierter Wertstoffe mit  
10 weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen;

d) Herstellung des finalen Produkts durch ein Kompaktierungs- oder Extrusionsverfahren.

Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels umfasst die folgenden Schritte:

a) Bereitstellung einer Zellsuspension von Zellen der Gattung Thraustochytrium oder  
15 Schizochytrium, die einen Feststoffgehalt von 10 bis 70 Gew.-%, insbesondere 40 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt 50 bis 65 Gew.-%, aufweist;

b) Zellaufschluss mittels eines Rotor-Stator-Systems unter Anwendung eines  
Energieeintrags von maximal 50 kWh pro Tonne Suspension, vorzugsweise von 0,1 – 50 kWh, insbesondere 0,3 - 45 kWh, besonders bevorzugt 0,5 – 40 kWh, insbesondere 0,8 – 35  
20 kWh, vor allem 1 – 30 kWh, insbesondere 1,5 – 25 kWh, 2 – 20 kWh oder 3 – 15 kWh, jeweils pro Tonne Suspension;

c) Vermischung der aufgeschlossenen Zellen und/oder daraus isolierter Wertstoffe mit weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen;

d) Herstellung des finalen Produkts durch ein Kompaktierungs- oder Extrusionsverfahren.

25 Erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels zeichnen sich vorzugsweise dadurch aus, dass in keinem Verfahrensschritt, insbesondere auch nicht während der Extrusion, ein höherer Energieeintrag auf die Zellen bzw. aufgeschlossenen Zellen erfolgt als beim Zellaufschluss. Vorzugsweise ist der Energieeintrag in allen übrigen Verfahrensschritten, denen die Zellen bzw. aufgeschlossenen Zellen bzw. der enthaltene

Wertstoff ausgesetzt sind, deutlich geringer als während des Zellaufschlusses. Der Energieeintrag beträgt hierbei in allen anderen Verfahrensschritten vorzugsweise maximal 80 %, insbesondere maximal 60 %, des Energieeintrags, der beim Zellaufschluss auf die Zellen erfolgt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der enthaltene Wertstoff möglichst wenig geschädigt wird.

Die aufgeschlossenen Zellen machen vorzugsweise 0,5-20 Gew.-%, insbesondere 1-10 Gew.-%, vorzugsweise 2-8 Gew.-% des Nahrungs- oder Futtermittels bzw. der zur Herstellung des Nahrungs- oder Futtermittels eingesetzten Zusammensetzung aus.

Die durch ein zuvor beschriebenes erfindungsgemäßes Verfahren erhältliche Nahrungs- und Futtermittel zeichnen sich vorzugsweise durch eine sehr homogene Verteilung des Wertstoffs in dem erhältlichen Nahrungs- oder Futtermittel aus.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Nahrungs- oder Futtermittel, das einen Wertstoff, insbesondere ein Lipid, vor allem PUFAs, enthält, wobei der Wertstoff sehr homogen in dem Nahrungs- oder Futtermittel verteilt ist. Der Wertstoff macht hierbei vorzugsweise 0,1 – 15 Gew.-%, besonders bevorzugt 0,2 – 8 Gew.-%, des Nahrungs- oder Futtermittels aus.

Die Homogenität der Verteilung kann hierbei auf folgende Weise bestimmt werden: Es werden n Proben mit einer Masse von jeweils x Gramm genommen. Anschließend wird jeweils die in den einzelnen Proben enthaltene Masse des Wertstoffes (y Gramm) bestimmt und der Mittelwert der Masse des in den n Proben enthaltenen Wertstoffes bestimmt ( $y_n$  Gramm).

Erfindungsgemäße Nahrungs- oder Futtermittel zeichnen sich vorzugsweise dadurch aus, dass die Abweichung der enthaltenen Masse des Wertstoffes in den einzelnen Proben in Bezug auf den ermittelten Mittelwert der Masse des Wertstoffes maximal 25 %, vorzugsweise maximal 20 oder 10 %, besonders bevorzugt maximal 5, 3 oder 2 % beträgt.

Dieses Merkmal ist hierbei vorzugsweise für mindestens eine der folgenden Vorgaben, vorzugsweise für alle folgenden Vorgaben, erfüllt: 20 oder 50 Stichproben des Nahrungs- oder Futtermittels mit einer Masse von jeweils 1,00 Gramm, 20 oder 50 Stichproben des Nahrungs- oder Futtermittels mit einer Masse von jeweils 500 Milligramm, 20 oder 50 Stichproben des Nahrungs- oder Futtermittels mit einer Masse von jeweils 100 Milligramm.

Weiterhin und/oder alternativ beträgt die Varianz der Verteilung des Wertstoffs in unterschiedlichen Teilportionen des Nahrungs- oder Futtermittels maximal 10 %, vorzugsweise maximal 5 %, insbesondere maximal 3 %.

Die Varianz wird hierbei vorzugsweise ebenfalls ermittelt für 20 oder 50 Stichproben des Nahrungs- oder Futtermittels mit einer Masse von jeweils 1,00 Gramm, 500 Milligramm oder 100 Milligramm, wobei das Merkmal der Varianz vorzugsweise für mindestens eine der Vorgaben, besonders bevorzugt für alle genannten Vorgaben, erfüllt ist.

Bei dem Nahrungs- oder Futtermittel handelt es sich vorzugsweise um ein Mittel zum Einsatz in der Aquakultur oder um ein Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz in der Geflügelzucht, Schweinezucht oder Rinderzucht. Bei dem Futtermittel kann es sich auch um ein Futtermittel handeln, das eingesetzt wird, um Kleinlebewesen zu züchten, die in der Aquakultur als Futtermittel eingesetzt werden können. Bei den Kleinlebewesen kann es sich beispielsweise um Nematoden, Crustaceen oder Rotiferen handeln. Das Futtermittel liegt vorzugsweise flockenförmig, kugelförmig oder tablettenförmig vor. Ein durch Extrusion erhältliches Futtermittel hat vorzugsweise einen Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 5 Gew.-%, besonders bevorzugt von 0,2 bis 4 Gew.-%.

Die anderen Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffe sind vorzugsweise ausgewählt aus proteinhaltigen, kohlenhydrathaltigen, nukleinsäurehaltigen und lipidlöslichen Komponenten sowie gegebenenfalls weiteren fetthaltigen Komponenten und weiterhin aus anderen Zusatzstoffen wie Mineralien, Vitaminen, Pigmente und Aminosäuren. Daneben können neben Nährsubstanzen auch strukturgebende Substanzen enthalten sein, um etwa die Textur oder das Erscheinungsbild des Futtermittels zu verbessern. Weiterhin können beispielsweise auch Bindemittel eingesetzt werden, um die Konsistenz des Futtermittels zu beeinflussen. Eine bevorzugt eingesetzte Komponente, die sowohl eine Nährsubstanz als auch eine strukturgebende Substanz darstellt, ist Stärke.

Als proteinhaltige Komponente, die zusätzlich Fette enthält, können beispielsweise eingesetzt werden Fischmehl, Krillmehl, Muschelmehl, Kalmarmehl oder Schrimpschalen. Als fetthaltige Komponente kann alternativ auch Fischöl eingesetzt werden. Als fetthaltige Komponente kann auch ein Pflanzenöl eingesetzt werden, insbesondere Öl aus Sojabohnen, Rapssamen, Sonnenblumenkernen und Flachssamen. Als kohlenhydrathaltige Komponente kann beispielsweise Weizenmehl, Sonnenblumenmehl, Sojablumenmehl oder Getreidegluten eingesetzt werden.

Der Gesamtgehalt an Öl in dem Futtermittel – inklusive des Öls aus den öl-haltigen Zellen – beträgt vorzugsweise 15 bis 40 Gew.-%, insbesondere 15 bis 30 Gew.-%.

Das Futtermittel zum Einsatz in der Aquakultur wird vorzugsweise verwendet um Flossenfische und Crustaceen zu züchten, die vorzugsweise der Ernährung von Menschen dienen. Hierzu zählen insbesondere Karpfen, Tilapia, Welse, Thunfisch, Lachs, Forellen, Baramundi, Brassen, Barsche, Kabeljau, Schrimps, Hummer, Krabben, Garnelen und Krebse. Besonders bevorzugt handelt es sich um ein Futtermittel für die Lachs-Zucht. Bevorzugte Lachsarten stellen hierbei der Atlantische Lachs, der Rotlachs, der Masu-Lachs, der Königslachs, der Ketalachs, der Silberlachs, der Donaulachs, der Pazifische Lachs und der Buckellachs dar.

Alternativ kann es sich auch um ein Futtermittel handeln, das zur Anzucht von Fischen dient, die anschließend zu Fischmehl oder Fischöl verarbeitet werden. Bei den Fischen handelt es sich hierbei vorzugsweise um Hering, Pollack, Menhaden, Anchovis, Kapelan oder Kabeljau. Das so erhaltene Fischmehl oder Fischöl kann wiederum in der Aquakultur zur Zucht von Speisefischen bzw. Crustaceen eingesetzt werden.

Die Aquakultur kann in Teichen, Tanks, Becken oder auch in abgegrenzten Arealen im Meer oder in Seen, hierbei insbesondere in Käfigen oder Netzpferchen, erfolgen. Die Aquakultur kann dazu dienen, den fertigen Speisefisch heranzuzüchten, jedoch auch eingesetzt werden, um Jungfische heranzuzüchten, die anschließend freigesetzt werden, um den Wildfischbestand aufzustocken.

Bei der Lachszucht erfolgt vorzugsweise zunächst die Heranzucht bis zum Junglachs in Süßwasser-Tanks oder künstlichen Wasserströmen und anschließend die weitere Zucht im Meer in schwimmenden Käfigen bzw. Netzpferchen, die vorzugsweise in Buchten oder Fjorden verankert sind.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist entsprechend auch ein Verfahren zum Züchten von Tieren, insbesondere Flossenfischen oder Crustaceen, vorzugsweise Lachs, bei welchem ein erfindungsgemäßes Futtermittel eingesetzt wird. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Tier, insbesondere Flossenfisch oder Schalentier, das durch ein derartiges erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Herstellung einer DHA-enthaltenden Biomasse

Zur Produktion von DHA wurde der Stamm Schizochytrium limacinum SR21 eingesetzt. Dieser ist hinterlegt beim NIBH unter FERM BP-5034 sowie beim IFO unter IFO 32693. Der Stamm S. limacinum SR21 wurde ursprünglich aus Meerwasser isoliert (Nakahara et al. 1996, JAOCS, 73(10); Honda Mycol. Res. 1998).

- 5 Die Fermentation des Stammes erfolgte in einem Medium, das 50 % künstliches Meerwasser (Sigma Aldrich) enthielt und des Weiteren folgende Komponenten enthielt: 60 g/l Glucose, 0,7 g/l Maisquellwasser (Sigma Aldrich), 2 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 3 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Die Fermentation erfolgte bei 28°C, einem pH-Wert von 4,0, einer Belüftungsrate von 0,5 vvm und einer Rührung von 200 rpm für 60 Stunden. Nach Beendigung der Fermentation  
10 wurde der Fermentationsbrühe ein Antioxidans zugegeben und die Fermentationsbrühe danach mindestens 20 Minuten auf 60°C erhitzt.

Anschließend erfolgte eine zweistufige Trocknung der Biomasse: Zunächst wurde die Fermentationsbrühe durch Verdampfung auf eine Trockenmasse von etwa 20 Gew.-%  
15 eingeengt. Anschließend erfolgte Sprühtrocknung der eingeengten Fermentationsbrühe unter Verwendung eines Production Minor<sup>TM</sup> Spray Dryer (GEA NIRO) bei einer Einlasstemperatur der Trocknungsluft von 340°C. Durch Sprühtrocknung wurde so ein Puder mit einer Trockenmasse von mehr als 95 Gew.-% erhalten.

Beispiel 2: Aufschluss der getrockneten Biomasse

Der Zellaufschluss der getrockneten Biomasse erfolgte unter Verwendung eines Rotor-  
20 Stator-Systems vom Typ MHD 2000 (IKA, Deutschland). Aufgrund eines feststoffmischenden Aufsatzes erlaubt dieses Rotor-Stator-System, die Zellsuspension erst unmittelbar vor dem Zellaufschluss bereitzustellen. D.h. die Vermischung aus Zelltrockenmasse und Wasser erfolgt kurz vor bzw. während der Homogenisierung in situ.

Hierzu wurde das Zellpulver aus Beispiel 1 von oben in den feststoffmischenden Aufsatz  
25 hineingegeben und Wasser seitlich in den feststoffmischenden Aufsatz hinzudosiert, um hierdurch eine Suspension mit einem Trockenmassegehalt von 55 Gew.-% bzw. 60 Gew.-% bereitzustellen.

Die so in situ hergestellte Zellsuspension wird sofort durch den Rotor-Stator homogenisiert. Mit der homogenisierten Zellsuspension wurde anschließend eine Hexan-Extraktion  
30 durchgeführt, um den Gehalt an frei verfügbarer und somit extrazellulärer polyungesättigter Fettsäure DHA zu ermitteln. Zum Vergleich wurde eine Hexan-Extraktion mit der nicht

aufgeschlossenen Biomasse durchgeführt. Weiterhin wurde der durchgeführte Zellaufschluss auch optisch mittels Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Als Referenz wurde der Gesamtgehalt an DHA in den Zellen durch einen

Flammenionisationsdetektor (FID) ermittelt. Hierzu wurden die Zellen einer Probe

- 5 aufgeschlossen, mit Kaliumhydroxid verseift und anschließend mittels Salzsäure sauer gestellt. Anschließend wurden die freien Fettsäuren mittels  $\text{BF}_3$  (Bortrifluorid 30% in Methanol) methyliert und über Verteilungschromatographie mit einem Temperaturgradienten getrennt. Anschließend erfolgte zur Bestimmung des Gesamtgehalts an DHA die Detektion mit dem Flammenionisationsdetektor.

- 10 Tabelle 1: Parameter für den Zellaufschluss im Rotor-Stator

Versuchsreihe	1	2	3	4
Beabsichtigte Feststoffkonzentration am Ausgang [Gew.-%]	50	50	60	60
Ermittelte Feststoffkonzentration am Ausgang [Gew.-%]	49,7	51,2	59,3	59,6
Eingestellter Massenstrom an Wasser [kg/h]	25	25	20	20
Eingestellter Massenstrom an Biomasse [kg/h]	25	25	30	30
Umdrehungszahl Rotor-Stator [rpm]	9985	9985	9985	9985
Temperatur Eingang [°C]	20	20	20	20
Temperatur Ausgang [°C]	72	73	78	71
Überdruck Ausgang [bar]	1,4	1,4	1,5	1,3
Energieeintrag in kWh pro kg Feststoff	0,05	0,05	0,06	0,06
Energieeintrag in kWh pro Tonne Suspension	50	50	36	36

Zur Durchführung der Hexan-Extraktion wurden jeweils 250 mg Probe in 10 ml-Pyrexröhrchen (Pyrex) eingewogen und mit 1ml internem Standard - in Hexan angesetzt - versetzt. Danach wurden 5 ml Hexan hinzugegeben und die Probe wird über Nacht

geschüttelt. Anschließend wurden 1 ml der so erhaltenen Probe in ein 10 ml-Pyrexröhrchen pipettiert und bei 50°C unter Stickstoff-Begasung im Thermoblock verdampft. Zu dem so erhaltenen Trocknungsrückstand wurden 2 ml 0,5 N KOH zugegeben, das Röhrchen fest verschlossen und die erhaltene Mischung für 15 min bei 100°C im Thermoblock inkubiert und  
 5 zwischendurch auf einem Vortexmischer gemischt, bis die Glaskugeln sich mindestens eine Umdrehung frei im 10 ml-Pyrexglas drehen. Danach wurde die Probe im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde 2 ml 0,7 N HCl und 1 ml BF<sub>3</sub> zugegeben, das Röhrchen wieder fest verschlossen und 15 min bei 100°C im Thermoblock inkubiert und  
 10 zwischendurch auf dem Vortexmischer gemischt, bis die Glaskugeln sich wieder mindestens eine Umdrehung frei im 10 ml-Pyrexglas drehen. Danach wurde die Probe wieder im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 3 ml Wasser und danach 2 ml Hexan zugeben, die Röhrchen wieder fest verschlossen und durch Schütteln durchmischt. Abschließend wurden die Proben für 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert und jeweils 1 ml der oberen Phase in GC-Vials zwecks Analyse überführt. Zum Kalibrieren des  
 15 GC wurde der Standard GLC 617 der Firma NU-CHEK verwendet.

Tabelle 2: Ergebnisse der Hexanextraktion

Versuchsreihe	Ermitteltes DHA vor dem Zellaufschluss*	Ermitteltes DHA nach dem Zellaufschluss*
1	25,3 %	97,8 %
2	25,3 %	99,0 %
3	25,3 %	99,2 %
4	25,3 %	101,6 %

\*in Bezug zur FID-Referenz

Die Ergebnisse zur Hexanextraktion belegen, dass die Zellen durch die Behandlung mit dem Rotor-Stator, also dem Aufquellen mit Wasser im feststoffmischenden Aufsatz und  
 20 anschließender Homogenisierung, trotz niedrigem Energieeintrag vollständig aufgeschlossen werden konnten. Dies wurde auch durch die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bestätigt, auf welcher keine intakten Zellen mehr zu erkennen waren.

Das Rotor-Stator-System stellt somit ein effektives Mittel zum Aufschluss der Zellen bei niedrigem Energieeintrag dar. Durch den hohen Feststoffanteil bei der Homogenisierung wird zugleich sichergestellt, dass das erhaltene Homogenisat ohne weitere Aufkonzentrierung zu einem Futtermittel weiterverarbeitet werden kann.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Aufschluss von Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass zum Zellaufschluss ein Rotor-Stator-System eingesetzt wird.
- 5 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei Durchführung des Zellaufschlusses ein Energieeintrag auf die Zellsuspension von maximal 50 kWh/t, vorzugsweise 0,1 - 50 kWh/t, besonders bevorzugt 0,5 – 40 kWh/t, insbesondere 1 – 30 kWh/t, vor allem 3 – 15 kWh/t, erfolgt.
- 10 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen einen Wertstoff, insbesondere Lipide, vorzugsweise PUFAs, enthalten, wobei der Wertstoff vorzugsweise mindestens 20 Gew.-% der Zelltrockenmasse ausmacht.
- 15 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellen um mikrobielle Zellen, insbesondere um Labyrinthulomyceten, vorzugsweise der Familie der Thraustochytriaceae, insbesondere der Gattung Thraustochytrium oder Schizochytrium, handelt.
- 20 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in Form einer Suspension dem Zellaufschlussverfahren unterworfen werden, wobei die Suspension vorzugsweise 10 bis 70 Gew.-%, insbesondere 30 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt 45 bis 70 Gew.-%, Feststoffgehalt aufweist.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellsuspension ausgehend von einer Zellmasse mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 15 Gew.-%, vorzugsweise weniger als 10 Gew.-%, insbesondere weniger als 5 Gew.-%, erhalten wurde.
- 30 7. Verfahren zur Herstellung eines Wertstoffs, insbesondere eines Lipids, das vorzugsweise PUFAs enthält, umfassend ein Zellaufschlussverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass nach Durchführung des Zellaufschlusses eine teilweise oder vollständige Abtrennung der Zelltrümmer erfolgt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen nach Durchführung des Zellaufschlusses - oder der (teilweise) isolierte Wertstoff - mit anderen Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen vermischt werden und anschließend, vorzugsweise in einem Extrusionsverfahren, zu einem Nahrungs- oder Futtermittel verarbeitet werden.
9. Verfahren nach vorherigem Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die aufgeschlossenen Zellen 0,5-20 Gew.-%, insbesondere 1-10 Gew.-%, vorzugsweise 2-8 Gew.-%, der im Extrusionsverfahren eingesetzten Zusammensetzung ausmachen und die anderen Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffe ausgewählt sind aus kohlenhydrathaltigen, proteinhaltigen, nukleinsäurehaltigen, lipidlöslichen und gegebenenfalls weiteren fetthaltigen Komponenten.
10. Verfahren zur Herstellung eines Nahrungs- oder Futtermittels umfassend die folgenden Schritte:
- a) Bereitstellung einer Zellsuspension von Zellen der Ordnung Thraustochytriales, die vorzugsweise einen Feststoffgehalt von 10 bis 70 Gew.-%, insbesondere 30 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt 45 bis 70 Gew.-%, aufweist;
  - b) Zellaufschluss mittels eines Rotor-Stator-Systems unter Anwendung eines Energieeintrags von maximal 50 kWh pro Tonne Suspension, vorzugsweise von 0,1 – 50 kWh, insbesondere 0,8 – 35 kWh, vor allem 1 – 30 kWh, insbesondere 2 – 20 kWh oder 3 – 15 kWh, jeweils pro Tonne Suspension;
  - c) Vermischung der aufgeschlossenen Zellen und/oder daraus isolierter Wertstoffe mit weiteren Nahrungs- oder Futtermittelinhaltsstoffen;
  - d) Herstellung des finalen Produkts durch ein Kompaktierungs- oder Extrusionsverfahren.
11. Wertstoff, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 7.
12. Nahrungs- oder Futtermittel, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 8, 9 oder 10.

- 5 13. Nahrungs- oder Futtermittel, das einen Wertstoff, vorzugsweise Lipide, insbesondere PUFAs enthält, dadurch gekennzeichnet, dass der Wertstoff homogen in dem Nahrungs- oder Futtermittel verteilt ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Varianz der Verteilung des Wertstoffs in unterschiedlichen Teilportionen des Nahrungs- oder Futtermittels maximal 10 %, vorzugsweise maximal 5 %, insbesondere maximal 3 %, beträgt.
- 10 14. Verfahren zum Züchten von Tieren, insbesondere Flossenfischen oder Crustaceen, vorzugsweise Lachs, dadurch gekennzeichnet, dass ein Nahrungs- oder Futtermittel gemäß Anspruch 12 oder 13 eingesetzt wird.
- 15 15. Tier, insbesondere Flossenfisch oder Schalentier, erhältlich durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2014/052020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A23K1/16 A23K1/18 C11B1/00 C12N1/06 C12M1/00  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A23K C11B C12M C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/183668 A1 (ODOM J MARTIN) 19 July 2012 (2012-07-19) cited in the application paragraphs [0080], [0116], [0132], [0199], [0200] examples 4,5; tables 4-11 -----	1-12,14, 15
X	EP 1 178 118 A1 (DSM NV) 6 February 2002 (2002-02-06) paragraphs [0008], [0016], [0017] -----	1,4,7,11
X	US 2003/138477 A1 (BARCLAY WILLIAM R) 24 July 2003 (2003-07-24) paragraphs [0010], [0014], [0016] paragraph [0043] ----- -/--	11,12, 14,15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search <b>14 March 2014</b>	Date of mailing of the international search report <b>24/03/2014</b>
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <b>Mandl, Birgit</b>
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/052020

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 102 58 898 A1 (INST ENERGETIK UND UMWELT GGMB) 1 July 2004 (2004-07-01) paragraph [0025] - paragraph [0026] -----	1
X	EP 2 384 647 A1 (ADEXGO LTD [HU]) 9 November 2011 (2011-11-09) claim 1 -----	13
X	WO 2010/090506 A1 (ECHEVARRIA PARRES ANTONIO JOSE DE JESUS DE SAN JUA [MX]) 12 August 2010 (2010-08-12) abstract; figures 1-3 -----	1,3,4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2014/052020
---

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012183668	A1	19-07-2012	NONE	
-----				
EP 1178118	A1	06-02-2002	AT 470719 T	15-06-2010
			AU 9371101 A	13-02-2002
			AU 2001293711 B2	24-08-2006
			BR 0112942 A	08-07-2003
			CA 2417571 A1	07-02-2002
			CA 2742152 A1	07-02-2002
			CN 1447860 A	08-10-2003
			DK 1305440 T3	13-09-2010
			EP 1178118 A1	06-02-2002
			EP 1305440 A2	02-05-2003
			ES 2357614 T3	28-04-2011
			JP 2004504849 A	19-02-2004
			JP 2012019794 A	02-02-2012
			KR 20030059086 A	07-07-2003
			KR 20100019579 A	18-02-2010
			KR 20110030661 A	23-03-2011
			KR 20120135322 A	12-12-2012
			KR 20130109249 A	07-10-2013
			MX PA03000878 A	06-06-2003
			NO 20030510 A	31-03-2003
			NZ 523884 A	24-09-2004
			US 2004067574 A1	08-04-2004
			WO 0210423 A2	07-02-2002
			ZA 200300787 A	19-02-2004
-----				
US 2003138477	A1	24-07-2003	NONE	
-----				
DE 10258898	A1	01-07-2004	NONE	
-----				
EP 2384647	A1	09-11-2011	EP 2384647 A1	09-11-2011
			WO 2011138763 A1	10-11-2011
-----				
WO 2010090506	A1	12-08-2010	NONE	
-----				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A23K1/16 A23K1/18 C11B1/00 C12N1/06 C12M1/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) A23K C11B C12M C12N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2012/183668 A1 (ODOM J MARTIN) 19. Juli 2012 (2012-07-19) in der Anmeldung erwähnt Absätze [0080], [0116], [0132], [0199], [0200] Beispiele 4,5; Tabellen 4-11 -----	1-12,14, 15
X	EP 1 178 118 A1 (DSM NV) 6. Februar 2002 (2002-02-06) Absätze [0008], [0016], [0017] -----	1,4,7,11
X	US 2003/138477 A1 (BARCLAY WILLIAM R) 24. Juli 2003 (2003-07-24) Absätze [0010], [0014], [0016] Absatz [0043] ----- -/-	11,12, 14,15
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
14. März 2014	24/03/2014	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Mandl, Birgit	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 102 58 898 A1 (INST ENERGETIK UND UMWELT GGMB) 1. Juli 2004 (2004-07-01) Absatz [0025] - Absatz [0026] -----	1
X	EP 2 384 647 A1 (ADEXGO LTD [HU]) 9. November 2011 (2011-11-09) Anspruch 1 -----	13
X	WO 2010/090506 A1 (ECHEVARRIA PARRES ANTONIO JOSE DE JESUS DE SAN JUA [MX]) 12. August 2010 (2010-08-12) Zusammenfassung; Abbildungen 1-3 -----	1,3,4

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/052020

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2012183668	A1	19-07-2012	KEINE
EP 1178118	A1	06-02-2002	AT 470719 T 15-06-2010
		AU 9371101 A 13-02-2002	
		AU 2001293711 B2 24-08-2006	
		BR 0112942 A 08-07-2003	
		CA 2417571 A1 07-02-2002	
		CA 2742152 A1 07-02-2002	
		CN 1447860 A 08-10-2003	
		DK 1305440 T3 13-09-2010	
		EP 1178118 A1 06-02-2002	
		EP 1305440 A2 02-05-2003	
		ES 2357614 T3 28-04-2011	
		JP 2004504849 A 19-02-2004	
		JP 2012019794 A 02-02-2012	
		KR 20030059086 A 07-07-2003	
		KR 20100019579 A 18-02-2010	
		KR 20110030661 A 23-03-2011	
		KR 20120135322 A 12-12-2012	
		KR 20130109249 A 07-10-2013	
		MX PA03000878 A 06-06-2003	
		NO 20030510 A 31-03-2003	
		NZ 523884 A 24-09-2004	
		US 2004067574 A1 08-04-2004	
		WO 0210423 A2 07-02-2002	
		ZA 200300787 A 19-02-2004	
US 2003138477	A1	24-07-2003	KEINE
DE 10258898	A1	01-07-2004	KEINE
EP 2384647	A1	09-11-2011	EP 2384647 A1 09-11-2011
		WO 2011138763 A1 10-11-2011	
WO 2010090506	A1	12-08-2010	KEINE