



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110462014 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201780087448.3

(22)申请日 2017.12.20

(30)优先权数据

17158286.9 2017.02.28 EP

62/439,354 2016.12.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/083712 2017.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/122057 EN 2018.07.05

(71)申请人 赢创德固赛有限公司

地址 德国埃森

申请人 DSM知识产权资产有限公司

(72)发明人 M·迪尔 X·D·董 A·哈特曼

M·海宁 M·B·约翰逊

J·莱贝特 N·F·莱宁格尔

K·L·老马修斯

M·E·内贾科二世

H·普法伊费尔 C·拉贝

S·E·E·里索 G·M·尚克

V·塔尔韦德 D·A·廷斯利

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 于辉

(51)Int.Cl.

C11B 1/10(2006.01)

C11B 1/12(2006.01)

A23D 9/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

(54)发明名称

从含有脂质的生物质中分离脂质的方法

(57)摘要

本发明涉及从含脂质的生物质中分离含有
多不饱和脂肪酸的脂质的方法。

1. 从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括以下步骤:

- a) 提供含有细胞的生物质悬浮液, 所述细胞包含含有PUFAs的脂质;
- b) 任选地裂解所述生物质的细胞;
- c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至TDM含量为20-60wt%;
- d) 调节所述悬浮液中的温度为20-100°C, 优选25°C、30°C、40°C、50°C或60°C至100°C, 更优选65-95°C, 特别是70-90°C;
- e) 将温度保持在(d)所示的范围内至少1小时, 优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时或8小时, 更优选1-36小时, 特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时, 更优选10-24小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20摩尔, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔的碱当量加入至包含在所述悬浮液中的10kg总干物质中。

2. 权利要求1所述的从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括以下步骤:

- a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液, 所述细胞包含含有PUFAs的脂质;
- b) 任选地裂解所述生物质的细胞;
- c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至TDM含量为20-60wt%;
- d) 调节所述悬浮液中的温度为20°C至低于80°C, 优选25°C至低于60°C, 更优选25-58°C, 特别是30-55°C, 尤其是30-50°C;
- e) 将温度保持在(d)所示的范围内至少1小时, 优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时, 更优选1-36小时, 特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时, 更优选10-24小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20摩尔, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔的碱当量加入至包含在所述悬浮液中的10kg总干物质中。

3. 权利要求1所述的从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括以下步骤:

- a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液, 所述细胞包含含有PUFAs的脂质;
- b) 任选地裂解所述生物质的细胞;
- c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至TDM含量为20-60wt%;
- d) 调节所述悬浮液中的温度为20-100°C, 优选25°C、30°C、40°C或50°C至100°C, 更优选60-95°C, 特别是70-90°C;
- e) 将温度保持在(d)所示的范围内低于10小时, 特别是1小时至低于10小时, 优选不超过8小时, 特别是1小时或2小时至8小时, 更优选不超过6小时, 特别是1小时、2小时、或3小时至6小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20摩尔, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔的碱当量加入至包含在所述悬浮液中的10kg总干物质中。

4. 前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在步骤(e)中保持pH低于11.5, 优选低于11, 更优选低于10.5, 特别是7.5至11.5, 优选8-11, 更优选8-10.5, 特别是8.0-10.0。

5. 权利要求1所述的从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括

以下步骤:

- a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液,所述细胞包含含有PUFAs的脂质;
 - b) 任选地裂解所述生物质的细胞;
 - c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质(TDM)含量,则将所述悬浮液浓缩至TDM含量为20-60wt%,优选25-60wt%,特别是30-60wt%;
 - d) 调节所述悬浮液中的温度为25-100°C,优选30°C、40°C或50°C至100°C,更优选60-95°C,特别是70-90°C;
 - e) 将温度保持在(d)所示的范围内至少1小时,优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时,更优选1-36小时,特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时,更优选10-24小时,同时将总共7.5-25摩尔,优选8.5-18.5摩尔,特别是10-17摩尔,更优选11-16摩尔,尤其是12-15摩尔的碱当量加入至包含在所述悬浮液中的10kg总干物质中,同时将所述组合物的pH始终保持在9.0以下,优选8.5以下,特别是8.0-8.9,更优选8.0-8.5。
6. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述碱选自氢氧化物,特别是氢氧化钠,氢氧化锂,氢氧化钾和/或氢氧化钙,和/或碳酸盐,特别是碳酸钠,碳酸钾,和/或碳酸镁,和/或碳酸氢盐,特别是碳酸氢锂,碳酸氢钠和/或碳酸氢钾,其中优选氢氧化钠。
7. 权利要求1至3或5中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的悬浮液的浓缩通过在不高于100°C,优选70°C至100°C,更优选80°C至90°C的温度下蒸发水来进行。
8. 权利要求1至6中任一项所述的方法,其中步骤(a)中提供的悬浮液已经具有20-60wt%,优选25-60wt%,更优选30-55wt%的总干物质含量。
9. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中为了裂解所述细胞,不使用或仅使用少量盐,其中“少量”优选是指盐的加入量小于0.1g/L发酵液。
10. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中为了裂解细胞,不使用或仅使用少量有机溶剂,其中“少量”优选是指有机溶剂的加入量小于0.1g/L发酵液。
11. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过酶促法、机械法、化学和/或物理方法实施所述生物质细胞的裂解。
12. 权利要求1至8中任一项所述的方法,其中步骤(d)和(e)在不预先裂解所述生物质细胞的情况下进行。
13. 前述权利要求中任一项所述的方法,包括收获含有PUFAs的油的另一步骤,其中收获所述含有PUFAs的油优选包括中和破乳的悬浮液并随后分离由此获得的含有油的轻相和含有水、盐、残油和细胞碎片的重相。
14. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述悬浮液以生物质密度优选为至少80g/L、100g/L、120g/L或140g/L的发酵液的形式提供。
15. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中包含含有PUFAs的脂质的细胞选自藻类、真菌、原生生物、细菌、微藻、植物细胞及其混合物,其中所述微藻优选选自原生藻类(*phylus Stramanopiles*),特别是破囊壶菌(*Thraustochytrids*)科,优选裂殖壶菌(*Schizochytrium*)属。

从含有脂质的生物质中分离脂质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从含有脂质的生物质中分离含有多不饱和脂肪酸的脂质的方法。

背景技术

[0002] 含有PUFAs(多不饱和脂肪酸)的脂质在饲料、食品和制药工业中具有高度的重要性。由于过度捕捞,对除鱼油之外的含有PUFAs的脂质的替代来源的需求很高。结果表明,除了某些酵母和藻类菌株之外,特别是破囊壶菌目(Thraustochytriales)那样的微藻细胞是含有PUFAs的脂质的非常好的来源。

[0003] 但是对于微生物有机体,特别是产生含有PUFAs的脂质的破囊壶菌目细胞,从所述细胞中分离出所述油是一个特别问题。分离所述油的最有效方法是使用有机溶剂如己烷。但是使用有机溶剂会导致危险的操作条件,需要使用昂贵的防爆设备,并且需要实施昂贵的溶剂回收工艺以避免污染环境。

[0004] 为了避免使用有机溶剂,已经发现可以对油使用大量氯化钠的盐析作为分离所述油的有效替代方法。但是使用大量氯化钠会导致脱脂的生物质副产物,其由于高盐含量不能用作饲料成分,因此该方法不是很可持续的。此外,高盐浓度导致所使用的钢设备的快速腐蚀。

发明内容

[0005] 因此,本发明的目的是提供一种从含有脂质的细胞、特别是破囊壶菌目中分离脂质,特别是含有PUFAs的脂质,同时不仅避免需要有机溶剂,而且还避免需要用于实现从细胞中有效分离油的大量盐的有效方法。

[0006] 本发明的另一个目的是提供一种从含有脂质的细胞,特别是破囊壶菌目中分离脂质,特别是含有PUFAs的脂质的方法,并同时提供可用于商业用途优选是在农业领域的脱脂的生物质。

[0007] 结果表明,如果所述生物质,特别是裂解(lysing)后的生物质用特定量的碱当量,优选在低碱性pH和不高于100°C的温度下孵育,则可以实现从所述生物质中有效地分离脂质。通过将温度保持在100°C以下,可以至少基本上禁止脂肪酸酯的皂化。

[0008] 根据本发明令人非常惊讶地发现,当将特定的、明确限定量的碱当量加入到所述量的包含在悬浮液中的生物质中时,所述量必须既不能太低也不能太高,则所述pH值和温度甚至暴露时间似乎都对实现有效的破乳没有重要作用。这意味着可以在对于所包含的PUFAs非常温和的条件下以及在非常经济的情况下将油与残余生物质分离,因为低温和低暴露时间意味着低能量输入和另外的时间节省。

[0009] 因此,本发明的第一个主题是从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸(PUFAs)的脂质的方法,包括以下步骤:

[0010] a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液,所述细胞包含含有PUFAs的脂质;

[0011] b) 任选地裂解所述生物质的所述细胞;

[0012] c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至总干物质 (TDM) 含量为20-60wt%, 优选25-60wt%, 更优选30-55wt%;

[0013] d) 调节所述悬浮液中的温度为20-100°C, 优选25°C、30°C、40°C、50°C或60°C至100°C, 更优选65-95°C, 特别是70-90°C;

[0014] e) 将温度保持在 (d) 所示的范围内至少1小时, 优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时或8小时, 更优选1-36小时, 特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时或8小时至36小时, 更优选10-24小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔, 特别是12-15摩尔的碱当量加入至包含在所述任选裂解的生物质的悬浮液中的10kg总干物质中。

[0015] 在这种情况下令人非常惊讶的是, 即使在低于80°C的温度下, 特别是在低于60°C的温度下, 也可以有效地进行破乳。

[0016] 因此, 本发明的一个特定主题是从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括以下步骤:

[0017] a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液, 所述细胞包含含有PUFAs的脂质;

[0018] b) 任选地裂解所述生物质的所述细胞;

[0019] c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至总干物质 (TDM) 含量为20-60wt%, 优选25-60wt%, 更优选30-55wt%;

[0020] d) 调节所述悬浮液中的温度为20°C至低于80°C, 优选25°C至低于60°C, 更优选25-58°C, 特别是30-55°C, 尤其是30-50°C;

[0021] e) 将温度保持在 (d) 所示的范围内至少1小时, 优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时, 更优选1-36小时, 特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时, 更优选10-24小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20摩尔, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔, 特别是12-15摩尔的碱当量加入至包含在所述任选裂解的生物质的悬浮液中的10kg总干物质中。

[0022] 在这种情况下也令人非常惊讶的是, 所述破乳可以在低于9.0的pH下有效地进行。

[0023] 因此, 本发明的另一个特定主题是从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的脂质的方法, 包括以下步骤:

[0024] a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液, 所述细胞包含含有PUFAs的脂质;

[0025] b) 任选地裂解所述生物质的所述细胞;

[0026] c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质 (TDM) 含量, 则将所述悬浮液浓缩至总干物质 (TDM) 含量为20-60wt%, 优选25-60wt%, 更优选30-55wt%;

[0027] d) 调节所述悬浮液中的温度为20-100°C, 优选25°C、30°C、40°C、50°C或60°C至100°C, 更优选65-95°C, 特别是70-90°C;

[0028] e) 将温度保持在 (d) 所示的范围内至少1小时, 优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时, 更优选1-36小时, 特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时, 更优选10-24小时, 同时将总共7.5-25摩尔, 优选8.5-22摩尔, 特别是10-20摩尔, 更优选11-18摩尔, 尤其是12-17摩尔, 特别是12-15摩尔的碱当量加入至包含在所述任选裂解的生物质的悬浮液中的10kg总干物质中, 同时将所述组合物的pH始终保持在9.0以下, 优选始终保持在8.5以下, 特别是保持在8.0-8.9的范围内, 特别是在8.0-8.4的范围内。

[0029] 在这方面还令人惊讶的是,所述破乳可以在低于10小时的暴露时间下有效地进行。

[0030] 因此,本发明的另一主题是从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸(PUFAs)的脂质的方法,包括以下步骤:

[0031] a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液,所述细胞包含含有PUFAs的脂质;

[0032] b) 任选地裂解所述生物质的所述细胞;

[0033] c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质(TDM)含量,则将所述悬浮液浓缩至总干物质(TDM)含量为20-60wt%,优选25-60wt%,更优选30-55wt%;

[0034] d) 加热所述悬浮液至20-100°C,优选25°C、30°C、40°C、50°C或60°C至100°C,更优选65-95°C,特别是70-90°C的温度;

[0035] e) 将温度保持在(c)所示的范围内不超过10小时,特别是1至小于10小时,优选不超过8小时,特别是1小时或2小时至8小时,更优选不是超过6小时,特别是1小时、2小时或3小时至6小时,同时将总共7.5-25摩尔,优选8.5-22摩尔,特别是10-20摩尔,更优选11-18摩尔,尤其是12-17摩尔,特别是12-15摩尔的碱当量加入至包含在所述任选裂解的生物质的悬浮液中的10kg总干物质中。

[0036] 根据本发明还令人惊讶的是,所述破乳可以在不事先裂解所述生物质细胞的情况下进行。

[0037] 因此,本发明的另一主题是从生物质中分离含有多不饱和脂肪酸(PUFAs)的脂质的方法,包括以下步骤:

[0038] a) 提供含有细胞的生物质的悬浮液,所述细胞包含含有PUFAs的脂质;

[0039] c) 如果所述悬浮液具有较低的总干物质(TDM)含量,则将所述悬浮液浓缩至总干物质(TDM)含量为20-60wt%,优选25-60wt%,更优选30-55wt%;

[0040] d) 加热所述悬浮液至20-100°C,优选25°C、30°C、40°C、50°C或60°C至100°C,更优选65-95°C,特别是70-90°C的温度;

[0041] e) 将温度保持在(d)所示的范围内至少1小时,优选至少2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时,更优选1-36小时,特别是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7或8小时至36小时,更优选10-24小时,同时将总共7.5-25摩尔,优选8.5-22摩尔,特别是10-20摩尔,更优选11-18摩尔,尤其是12-17摩尔,特别是12-15摩尔的碱当量加入至包含在悬浮液中的10kg总干物质中。

[0042] 特征在于,步骤(d)和(e)在没有预先裂解所述生物质细胞的情况下进行。

[0043] 如果没有另外说明,则根据本发明的pH在步骤(e)中优选保持低于11.5,更优选低于11,更优选低于10.5,特别是在8-11.5的范围内,更优选在9-11的范围内,特别是在10-11的范围内。这可以通过在步骤(e)中不一次性地加入碱,而是连续地或逐步地加入来实现,以便可以避免超过指定的pH值。

[0044] 在根据本发明的方法中,步骤(d)和(e)导致包含在所述悬浮液中的乳液破解成含油的轻相和含有水、细胞碎片和盐的重相。在本申请的上下文中,乳液的这种破解也称为“破乳”。

[0045] 优选,在所述方法的步骤(b)至(e)中,使用搅拌器和/或搅拌机连续混合所述悬浮液。在所述方法步骤(d)和/或(e)中,优选使用低剪切搅拌和/或轴流搅拌,特别是如W0

2015/095694中所公开的。适用于步骤(d)和/或(e)之前和期间搅拌的叶轮尤其包括直叶片叶轮、Rushton叶片叶轮、轴流式叶轮、径向流动叶轮、凹形叶片盘叶轮(concave blade disc impeller)、高效叶轮、螺旋桨、桨叶、涡轮机及其组合。

[0046] 术语“碱当量”考虑到这样的事实,即不仅存在单价碱,而且存在双价碱或多价碱,并且可以根据本发明使用。如果使用双价碱代替单价碱或者除单价碱之外额外使用双价碱的情况下,与所需要使用的单价碱的量相比,则只需要使用一半摩尔量的这种双价碱以实现相同的碱当量;在使用三价碱的情况下,则仅需使用三分之一的单价碱的摩尔量;在使用单价碱如氢氧化钠的情况下,所述碱当量的量与碱的量相同。

[0047] 通过所述碱的摩尔重量,可以基于摩尔量容易地计算所述碱的重量。例如,在非常优选的碱氢氧化钠的情况下,摩尔重量等于40g/mol。这意味着1摩尔氢氧化钠对应于40克氢氧化钠。

[0048] 根据本发明优选使用的碱选自氢氧化物,特别是氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、和/或氢氧化钙,碳酸盐,特别是碳酸钠、碳酸钾、和/或碳酸镁,和/或碳酸氢盐,特别是碳酸氢锂、碳酸氢钠、和/或碳酸氢钾。在本发明的一个非常优选的实施方案中,根据本发明使用的碱仅为或几乎仅为氢氧化钠。由于易于处理,所述碱优选以液体形式使用,特别是作为浓缩溶液使用,其中碱在溶液中的浓度优选为10-60wt%,特别是在20-50wt%的范围内。

[0049] 根据本发明,在根据步骤(a)提供所述悬浮液之后,优选进行裂解步骤。如果-例如由于所应用的发酵条件-所述细胞或其大部分已经被裂解或在该方法的后续步骤之一中易于破碎而不需要任何明确的裂解步骤,则可以省略所述裂解步骤。

[0050] 根据步骤(b)的所述生物质细胞的裂解可以通过本领域技术人员已知的方法进行,特别是酶促法、机械法、物理法、或化学法、或通过应用它们的组合进行。

[0051] 取决于暴露时间和/或施加的力的程度,可以获得仅包含裂解细胞的组合物或包含细胞碎片和完整细胞的混合物的组合物。术语“含有裂解脂质的生物质”在此范围内涉及含有水、细胞碎片和由所述生物质细胞释放的油的悬浮液,但除此之外还可包含其它组分,特别是盐、完整细胞、裂解细胞的其它内容物,以及发酵培养基组分,特别是营养素。在本发明的一个优选实施方案中,在所述裂解细胞的步骤之后,仅有少量的完整细胞,特别是小于20%,优选小于10%,更优选小于5%(基于生物质细胞裂解之前存在的完整细胞的总数)存在于裂解的生物质中。

[0052] 所述细胞的裂解可以例如通过下述设备实现:弗氏压碎器、超声波仪、均化器、微流化器、球磨机、棒磨机、卵石磨、珠磨机、高压研磨辊、立式轴冲击器、工业混合器、高剪切混合器、桨式混合器和/或polytron均化器。

[0053] 在本发明的一个优选实施方案中,所述细胞的裂解包括通过施用细胞壁降解酶对所述细胞进行酶处理。

[0054] 根据本发明,所述细胞壁降解酶优选选自蛋白酶,纤维素酶(如Cellustar CL(Dyadic)、Fibrezyme G2000(Dyadic)、Celluclast(Novozymes)、Fungamyl(Novozymes)、Viscozyme L(Novozymes)),半纤维素酶,几丁质酶,果胶酶(如Pectinex(Novozymes)),蔗糖酶,麦芽糖酶,乳糖酶, α -葡萄糖苷酶, β -葡萄糖苷酶,淀粉酶(如Alphastar Plus(Dyadic); Termamyl(Novozymes)),溶菌酶,神经氨酸酶,半乳糖苷酶, α -甘露糖苷酶,葡糖醛酸酶,透明质酸酶,支链淀粉酶,葡糖脑苷脂酶,半乳糖基神经酰胺酶(galactosylceramidases),乙

酰半乳糖胺酶,岩藻糖苷酶,己糖胺酶(hexosaminidases),艾杜糖苷酶,麦芽糖酶-葡糖淀粉酶,木聚糖酶(如Xylanase Plus (Dyadic)、Pentopan (Novozymes)), β -葡聚糖酶(如Vinoflow Max (Novozymes)、Brewzyme LP (Dyadic)),甘露聚糖酶,及其组合。所述蛋白酶可选自丝氨酸蛋白酶,苏氨酸蛋白酶,半胱氨酸蛋白酶,天冬氨酸蛋白酶,金属蛋白酶,谷氨酸蛋白酶,碱性蛋白酶(alcalases)(枯草杆菌蛋白酶),及其组合。所述几丁质酶可以是壳三糖苷酶。所述果胶酶(pectinase)可选自果胶酶(pectolyases),果胶酶(pectozymes),多聚半乳糖醛酸酶,及其组合。

[0055] 利用所述酶的适当pH取决于所述酶的最佳pH值。

[0056] 在本发明的一个优选实施方案中,使用了pH最佳值为7.0-8.0,特别是约7.5的酶,使得在该步骤中施加的pH为7.0-8.0,优选7.3-7.7。可在该pH范围内使用的优选酶是碱性蛋白酶。

[0057] 所述酶优选作为浓缩酶溶液加入,优选添加量为0.01-1.5wt%,更优选0.03-1.0wt%,尤其是0.05-0.5wt%,所添加的浓缩酶溶液的量相对于加入所述浓缩酶溶液后悬浮液的总量。

[0058] 在本发明的一个非常优选的实施方案中,所述细胞的裂解如下进行:

[0059] i) 将(a)的悬浮液加热至50-70°C间的温度,优选加热至55-65°C间的温度,并向该悬浮液中加入细胞壁降解酶,特别是发酵液,并根据需要调节适当的pH值,使所述酶正常工作;

[0060] ii) 将所述温度和pH保持在(ii)中所述的范围内至少1小时,优选至少2小时,更优选2-4小时。

[0061] 在步骤(i)中,可以在加热所述悬浮液之前或之后和/或在调节所述pH之前或之后加入所述酶。可以在调节所述pH之前或之后以同样的方式对所述悬浮液进行加热。但是,在一个优选的实施方案中,在加热所述悬浮液之后和调节所述pH之后(如果需要调节pH)加入所述酶。在一个非常优选的实施方案中,所有的方法都或多或少地同时进行。

[0062] 优选,在步骤(i)和(ii)中,通过使用搅拌器和/或搅拌机连续混合所述悬浮液。

[0063] 根据本发明,实施所述破乳的悬浮液的干物质含量为20-60wt%,优选25-60wt%,特别是30-55wt%或30-45wt%。这可以通过在步骤(a)中提供具有适当高生物质量的悬浮液或者浓缩悬浮液特别是在裂解生物物质的细胞之后来实现。因此,在本发明的一个优选实施方案中,在任性地裂解所述生物物质细胞之后并在破乳步骤之前,将所述悬浮液浓缩至总干物质含量为20-60wt%,更优选25-60wt%,特别是30-55wt%,尤其是30-50wt%或30-45wt%。

[0064] 所述悬浮液的浓缩优选通过在不高于100°C,优选70-100°C,更优选80-90°C的温度下蒸发水来进行,直至总干物质含量达到20-60wt%,更优选25-60wt%,特别是30-55wt%或30-45wt%。

[0065] 所述悬浮液的浓缩优选在强制循环蒸发器(例如可从德国GEA获得)中进行,以允许快速去除水。作为另外一种选择或除此之外,也可通过降膜蒸发、薄膜蒸发和/或旋转蒸发进行浓缩。

[0066] 通常,根据本发明,可以通过使用本领域技术人员已知的碱或酸来调节所述pH值。所述pH的降低可以特别通过使用有机酸或无机酸如硫酸、硝酸、磷酸、硼酸、盐酸、氢溴酸、

高氯酸、次氯酸、亚氯酸、氟代硫酸、六氟磷酸、乙酸、柠檬酸、甲酸或其组合进行。由于希望避免高含量的氯化物,在本发明的一个优选实施方案中,在本发明的方法中不使用或仅使用少量的盐酸。根据本发明,硫酸是降低pH值的优选物质。提高所述pH值可特别使用有机或无机碱如氢氧化物,特别是氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾和/或氢氧化钙,碳酸盐,特别是碳酸钠、碳酸钾或碳酸镁,和/或碳酸氢盐,特别是碳酸氢锂、碳酸氢钠和/或碳酸氢钾。由于易于处理,所述酸和碱优选以液体形式使用,特别是作为浓缩溶液使用,其中酸或碱在溶液中的浓度优选为10-55wt%,特别是20-50wt%。特别是硫酸也优选以浓缩形式使用。

[0067] 根据本发明的方法优选包括从步骤(e)获得的破乳组合中收获含有PUFAs的脂质作为额外的步骤。

[0068] 所述含有PUFAs的脂质的收获优选包括中和所述破乳的悬浮液,并随后将由此获得的含有油的轻相与含有水、盐、细胞碎片和残油的重相分离。

[0069] 所述破乳组合物的中和优选通过加入酸,优选硫酸以调节pH值为5.5-8.5,特别是6.5-8.5,优选6.5-7.5或7.0-8.0来实现。在开始将所述轻相与所述重相分离之前,可以在该中和的pH下将中和的组合物搅拌几分钟至几小时。仅当根据本发明方法的步骤(e)所获得的破乳组合物具有该范围之外的pH值时需要在该实施方案中中和所述破乳组合物。

[0070] 所述含有油的轻相与含有水、盐和细胞碎片的重相的分离优选通过机械方法,优选在60-90°C,更优选70-80°C的温度下,优选在pH值6-9,更优选7-8.5下实现。“机械方法”特别是指本领域技术人员已知的过滤和离心方法。

[0071] 在分离含有油的轻相之后,可以通过应用本领域技术人员已知的方法(特别是精制、漂白、除臭和/或冬化(winterizing))进一步处理从而获得含PUFAs的油。

[0072] 本发明方法的一个特别的优点是其可以在不使用任何有机溶剂,特别是不使用任何极性或非极性的有机溶剂的情况下进行。因此,在本发明的一个优选实施方案中,不使用或仅使用少量有机溶剂,特别是极性或非极性有机溶剂,从所述生物质中分离含有PUFAs的油。典型的有机溶剂是己烷和乙醇。

[0073] 在本发明的一个优选实施方案中,使用少于2wt%的非极性有机溶剂,更优选少于1wt%、0.5wt%或0.1wt%。在本发明的一个特别优选的实施方案中,根本不使用非极性有机溶剂。在本发明的一个非常优选的实施方案中,使用少于2wt%的有机溶剂,通常,特别优选少于1wt%、0.5wt%或0.1wt%。在本发明的一个特别优选的实施方案中,根本不使用有机溶剂。

[0074] 本发明方法的另一个优点是在不添加氯化钠的情况下实现油与剩余生物质的非常有效的分离,氯化钠通常用于将油从生物质中盐析出来。优选,所述方法可以在不添加氯化物盐的情况下进行,尤其是不添加任何用于盐析所述油的盐。但是,由于用于生长所述生物质的发酵培养基,所述悬浮液中可能存在少量氯化物盐,特别是氯化钠。

[0075] 因此,在本发明的一个优选实施方案中,不使用或仅使用少量氯化钠来改善所述油分离。在本发明的一个优选实施方案中,使用小于1wt%的氯化钠,更优选小于0.5wt%或0.2wt%的氯化钠用于从生物质中分离油,尤其是小于0.1wt%或0.05wt%,其中所述wt%基于加入氯化钠后组合物的总重量。

[0076] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,根本不使用或仅使用少量氯化物盐来改善所述油分离。在该实施方案中,优选使用小于1wt%的氯化物盐,更优选小于0.5wt%或

0.2wt%的氯化物盐来从生物质中分离所述油,尤其是小于0.1wt%或0.05wt%,其中所述wt%基于加入氯化物盐后组合物的总重量。

[0077] 在本发明的一个非常优选的实施方案中,通常不使用或仅使用少量盐来改善所述油分离。在该实施方案中,优选使用小于1wt%的盐,更优选小于0.5wt%或0.2wt%的盐来从生物质中分离所述油,尤其是小于0.1wt%或0.05wt%,其中所述wt%基于加入盐后组合物的总重量。

[0078] 本发明的方法允许非常有效地将生物质中所包含的油与包含在所述悬浮液(特别是发酵液)中的细胞碎片和其它物质分离。通过使用本发明的方法,生物质中所包含的优选大于80wt%,特别是大于90wt%的油可以从生物质中分离出来,并通过应用非常经济和可持续的条件来分离。

[0079] 根据本发明的“氯化物”是指可检测的氯的量。氯的含量可以通过例如根据DIN EN ISO 11885的元素分析来确定。氯以盐的形式存在,其被称为“氯化物”。根据本发明提及的氯化物含量-也称为“氯离子”-仅指可检测氯的量,而不是指完全的氯化物盐(其除氯离子外还包含阳离子抗衡离子)的量。

[0080] 所述总干物质含量(TDM)优选通过重量分析确定。为此,在冷冻干燥之前和之后称量具有特定体积的均匀悬浮液样品。干燥样品的剩余重量对应于该特定体积悬浮液中所含的总干物质。

[0081] 释放出来的油的产率优选通过脂肪酸甲酯分析(FAME)测定。为此,首先用KOH皂化样品中的脂质。之后,将游离脂肪酸用MeOH甲基化。然后通过使用内标物的气相色谱法测定和定量甲基化的脂肪酸。

[0082] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,通过将所述生物质干燥至总干物质含量大于90wt%而将在如前所述的收获油的步骤中作为副产物获得的含有水、盐、残油和细胞碎片的水相转化为干燥的生物质。

[0083] 通过将所述生物质干燥至总干物质含量大于90wt%而将在所述收获油的步骤中作为副产物获得的含有水、盐、剩余油和细胞碎片的重相转化为干燥的生物质的转化可以以不同的方式进行。

[0084] 在非常优选的方式中,通过将所述重相浓缩至干物质含量为30-50wt%,优选35-45wt%,并随后通过流化床造粒来喷雾造粒,从而进行所述转化。这样,以非常有效的方式,可以获得具有有利特征的生物质。在EP13176661.0中更详细地公开了通过流化床造粒的喷雾造粒。

[0085] 将所述重相浓缩至干物质含量为30-50wt%优选通过溶剂蒸发,特别是真空蒸发,和/或通过使用旋转蒸发器,薄膜蒸发器或降膜蒸发器进行。溶剂蒸发的有用替代方法是反渗透法。

[0086] 作为喷雾造粒的替代方案,所述浓缩的重相的其它干燥方法,特别是其它对流干燥方法(如通道干燥或喷雾干燥,特别是喷嘴喷雾干燥),或接触干燥方法(如滚筒干燥),或辐射干燥方法(如红外干燥)都是适用的替代方法,其中,通过使用这些方法,通常会获得具有更小或更大直径的颗粒。

[0087] 根据本发明,在干燥过程中,可任选地将抗结块剂,特别是二氧化硅,优选疏水或亲水二氧化硅添加到所述生物质中以防止结块。为此,优选将包含所述生物质以及二氧化

硅的悬浮液,特别是发酵液,喷雾到特定的干燥区中。可替代地或额外地,可在所述干燥过程之后将所述生物质与所述抗结块剂混合。关于使用二氧化硅作为抗结块剂可特别参考专利申请EP13187631.0。

[0088] 通过造粒工艺可以将细粒粉末转化为粗粒无尘产品。常规的有机或无机助剂或载体如淀粉、明胶、纤维素衍生物或类似物质(其通常作为粘合剂、胶凝剂或增稠剂用于食品加工或饲料加工中)可任选地用于该后续的造粒过程中。WO 2016/050560公开了根据本发明优选使用的其它助剂,其中羧甲基纤维素是特别优选的粘合剂。

[0089] 在干燥和任选造粒和/或筛分所述生物质之后,优选储存或包装所述干燥的生物质。

[0090] 本发明的颗粒状生物质以及本发明的含水悬浮液可以以不同方式使用。例如,它们可用于生产食品或饲料。或者,它们可以直接用作食品或饲料。

[0091] 因此,本发明的另一主题类似地是一种生产饲料或食品的方法,其中使用本发明的颗粒状生物质和/或含水悬浮液,并且其优选与其它饲料或食品成分混合。

[0092] 所述含有PUFAs的生物质细胞优选是微生物细胞或植物细胞。优选,由于聚酮合成酶系统(polyketide synthase system),所述细胞能够产生PUFAs。所述聚酮化合物合酶系统可以是内源性的,或者由于基因工程,可以是外源性的。

[0093] 所述植物细胞可以特别选自十字花科(Brassicaceae)、胡颓子科(Elaeagnaceae)和豆科(Fabaceae)的细胞。所述十字花科的细胞可选自芸苔属(genus Brassica),特别是油菜、芜菁油菜和印度芥菜;所述胡颓子科的细胞可以选自胡颓子属(genus Elaeagnus),特别是油橄榄(Olea europaea)类;所述豆科植物的细胞可选自甘氨酸属,特别是大豆类(species Glycine max)。

[0094] 所述含有含PUFAs的脂质的微生物在现有技术中有广泛的描述。在这里,所用的细胞可特别是已经天然产生PUFAs(多不饱和脂肪酸)的细胞;然而,它们也可以是由于适当的基因工程方法或由于随机诱变的结果而显示出改善的PUFAs的产生或者已经能够产生PUFAs的细胞。PUFAs的产生可以是营养缺陷型、混合营养型或异养型。

[0095] 所述生物质优选包含可异养产生PUFAs的细胞。根据本发明的细胞优选选自藻类,真菌,特别是酵母,细菌或原生生物。所述细胞更优选为微生物藻类或真菌。

[0096] 合适的产油酵母细胞特别是耶氏酵母属(Yarrowia),假丝酵母属(Candida),红酵母属(Rhodotorula),红冬孢酵母属(Rhodospiridium),隐球菌属(Cryptococcus),毛孢子菌属(Trichosporon)和油脂酵母属(Lipomyces)的菌株。

[0097] 合适的产油微藻和藻类微生物细胞特别是选自原生藻(Stramenopiles)(也称为不等鞭毛类(也称为Heterokonta))的微生物。所述不等鞭毛类(phylum Stramenopiles)的微生物可尤其选自以下微生物群:Hamatores,Proteromonads,Opalines,Developayella,两孔壳虫属(Diplophrys),Labrinthulids,破囊壶菌科(Thraustochytrids),Bioseids,卵菌纲(Oomycetes),Hypochoytridiomycetes,Commation,膨胀巴夫藻(Reticulosphaera),Pelagomonas,Pelagococcus,Ollicola,金球藻(Aureococcus),Parmales,硅藻(Diatoms),黄藻(Xanthophytes),褐藻(Phaeophytes),黄绿藻(Eustigmatophytes),赤潮异弯藻(Raphidophytes),Synurids,Axodines(包括Rhizochromulinales,金须藻属(Pedinellales),硅鞭藻目(Dictyochales)),Chrysoheridales,Sarcinochrysidales,

Hydrurales, Hibberdiales 和 Chromulinales。其它优选的微藻类组包括绿藻和甲藻, 包括寇氏隐甲藻 (*Crypthecodiurn*) 属。

[0098] 根据本发明的生物质优选包含细胞, 优选基本上由粘菌分类群 (taxon *Labyrinthulomycetes*) (网粘菌目 (*Labyrinthulea*)), 净粘液真菌 (net slime fungi), slime nets), 特别是破囊壶菌科细胞组成。破囊壶菌科 (破囊壶菌) 包括 *Althomia*, *Aplanochytrium*, *Aurantiochytrium*, 蛙壶菌 (*Botryochytrium*), *Elnia*, *Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, 裂殖壶菌 (*Schizochytrium*), *Sicyoidochytrium*, 囊壶 (*Thraustochytrium*) 和 *Ulkenia*。所述生物质特别优选包含来自 genera *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, 裂殖壶菌或囊壶菌属的细胞, 尤其是来自裂殖壶菌属的细胞。

[0099] 根据本发明, 所述多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 优选为高度不饱和脂肪酸 (HUFA)。

[0100] 存在于所述生物质中的细胞优选通过以下事实来区分: 它们含有至少 20 重量%, 优选至少 30 重量%, 特别是至少 35 重量% 的 PUFAs, 在每种情况下都基于细胞干物质。

[0101] 根据本发明, 术语“脂质”包括磷脂; 游离脂肪酸; 脂肪酸酯; 三酰甘油; 甾醇和甾醇酯; 类胡萝卜素; 叶黄素 (如氧代胡萝卜素); 烃类; 类异戊二烯衍生的化合物和本领域普通技术人员已知的其它脂质。根据本发明, 术语“脂质”和“油”可互换使用。

[0102] 在一个优选的实施方案中, 大多数所述脂质在该种情况下以甘油三酯的形式优选至少 50 重量%, 特别是至少 75 重量% 存在, 并且在一个特别优选的实施方案中, 至少为 90 重量% 的存在于细胞中的脂质以甘油三酯的形式存在。

[0103] 根据本发明, 多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 应理解为是指具有至少两个, 特别是至少三个 C-C 双键的脂肪酸。根据本发明, 在 PUFAs 中优选高度不饱和脂肪酸 (HUFA)。根据本发明, HUFA 应理解为是指具有至少四个 C-C 双键的脂肪酸。

[0104] 所述 PUFAs 可以以游离形式或以结合形式存在于细胞中。结合形式存在的实例是 PUFAs 的磷脂和酯, 特别是单酰基, 二酰基和三酰基甘油酯。在一个优选的实施方案中, 大多数 PUFAs 以甘油三酯的形式优选至少 50 重量%, 特别是至少 75 重量% 存在, 在一个特别优选的实施方案中, 至少 90 重量% 的存在于细胞中的 PUFAs 以甘油三酯的形式存在。

[0105] 优选的 PUFAs 是 ω -3 脂肪酸和 ω -6 脂肪酸, 特别优选 ω -3 脂肪酸。这里优选的 ω -3 脂肪酸是二十碳五烯酸 (EPA, 20:5 ω -3), 特别是 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-二十碳-5, 8, 11, 14, 17-五烯酸, 和二十二碳六烯酸 (DHA, 22:6 ω -3), 特别是 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-二十二碳-4, 7, 10, 13, 16, 19-己烯酸。

[0106] 在本发明的一个非常优选的实施方案中, 使用了特别是裂殖壶菌菌株的细胞, 其了同时产生显著量的 EPA 和 DHA, 其中 DHA 的产量优选为至少 20wt%, 优选为至少 30wt%, 特别是 30-50wt%, EPA 的产量为至少 5wt%, 优选至少 10wt%, 特别是 10-20wt% (分别相对于细胞中所包含的脂质的总量)。产生 DHA 和 EPA 的裂殖壶菌 (*Schizochytrium*) 菌株可以通过连续诱变然后适当选择显示出优异的 EPA 和 DHA 产量和特定 EPA:DHA 比例的突变菌株来获得。任何能够引起酵母细胞基因改变的化学或非化学 (如紫外 (UV) 辐射) 试剂都可用作所述诱变剂。这些试剂可以单独使用或彼此组合使用, 所述化学试剂可以纯净形式使用或与溶剂一起使用。

[0107] 将优选的裂殖壶菌属的微生物种 (如上所述, 其可同时产生大量的 EPA 和 DHA) 以

ATCC保藏号:PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210,或PTA-10211、PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214、PTA-10215保藏。

[0108] 根据本发明的生物质悬浮液的生物质密度优选为至少80g/l或100g/l,特别是80-250g/l,特别是80-200g/l的生物质密度,更优选生物质密度为至少120g/l或140g/l,特别是至少160g/l或180g/l(以干物质含量计算),且所述悬浮液优选为发酵液。因此,可以通过在由微生物产生PUFAs的条件下在发酵培养基中培养和生长合适的细胞来获得所述悬浮液。

[0109] 在现有技术中(参见W091/07498、W094/08467、W097/37032、W097/36996、W001/54510)详细描述了用于生产所述生物质的方法,特别是包含含有脂质(特别是PUFAs)的细胞,特别是破囊壶菌目生物质。通常,通过在碳源和氮源以及允许微生物生长和产生PUFAs的许多其它物质如矿物质的存在下,在发酵罐中培养细胞来进行所述生产。在这种情况下,可以获得超过100克/升的生物质密度和每升每小时超过0.5克脂质的生产速率。该方法优选以所谓的补料分批(fed-batch)方法进行,即在发酵过程中逐渐加入碳源和氮源。当获得所需的生物质时,可以通过各种措施诱导脂质产生,例如通过限制氮源、碳源或氧含量或其组合。

[0110] 在本发明的一个优选实施方案中,使细胞生长直至它们达到至少80g/l或100g/l,更优选至少120g/l或140g/l,特别是至少160g/l或180g/l的生物质密度(以总干物质含量计算)。这些方法在例如US 7,732,170中公开。

[0111] 优选,所述细胞在低盐度的培养基中发酵,特别是为了避免腐蚀。这可以通过使用无氯钠盐代替氯化钠作为钠源来实现,如硫酸钠,碳酸钠,碳酸氢钠或苏打灰等。优选,氯化物在所述发酵中的用量小于3g/l,特别是小于500mg/l,特别优选小于100mg/l。

[0112] 合适的碳源是醇类和非醇类碳源。醇类碳源的实例是甲醇、乙醇和异丙醇。非醇类碳源的实例是果糖、葡萄糖、蔗糖、糖蜜、淀粉和玉米糖浆。

[0113] 合适的氮源是无机和有机氮源。无机氮源的实例是硝酸盐和铵盐,特别是硫酸铵和氢氧化铵。有机氮源的实例是氨基酸,特别是谷氨酸和尿素。

[0114] 此外,还可以加入无机或有机磷化合物和/或已知的生长刺激物质,如酵母提取物或玉米浆,以便对所述发酵产生积极影响。

[0115] 所述细胞优选在3-11,特别是4-10的pH下,优选在至少20°C,特别是20-40°C,特别优选至少30°C的温度下发酵。典型的发酵过程需要大约100小时。

[0116] 在所述发酵结束后,可以对所述细胞进行巴氏灭菌以杀死细胞并使可能会促进脂质降解的酶失活。所述巴氏灭菌优选通过将所述生物质加热至50-121°C,优选50-70°C的温度,进行5-150分钟,特别是20-100分钟的时间来实现。

[0117] 同样,在所述发酵结束后,可以添加抗氧化剂以保护存在于所述生物质中的PUFAs免于氧化降解。在本文中优选的抗氧化剂是BHT、BHA、TBHA、乙氧基喹、 β -胡萝卜素、维生素E,特别是生育酚和维生素C。如果使用,则所述抗氧化剂优选以0.001-0.1wt%的量加入,优选0.002-0.05wt%,基于加入所述抗氧化剂后发酵液的总量。

具体实施方式

[0118] 工作实施例

[0119] 实施例1:制备用于破乳试验的悬浮液

[0120] 将生物质密度超过100g/l的含有微生物细胞(裂殖壶菌属)的未洗涤细胞培养液在搅拌容器中加热至60℃。在加热所述悬浮液后,使用苛性钠(50wt%NaOH溶液)将pH调节至7.5,然后以0.5wt%的量加入液体形式的碱性蛋白酶(Alcalase® 2.4FG (Novozymes))。在60℃下继续搅拌3小时。之后,将裂解的细胞混合物转移到强制循环蒸发器(德国GEA)中并加热至85℃。将所述混合物在强制循环蒸发器中浓缩,直至达到约30wt%的总干物质含量。

[0121] 实施例2:所添加的碱当量的量对油释放的影响

[0122] 为了测试所添加的碱当量的量对由生物质释放油的效率的重要性,测试了向生物质中添加不同量的苛性钠对油释放的影响。表1描述了添加的碱当量与总干物质的比率以及通过添加苛性钠而释放的油量。使用搅拌容器BIOSTAT®B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius),用1升经酶处理并随后浓缩的发酵液进行所有实验。所述样品的总干物质为30wt%。破乳在80℃的温度下进行24小时。将所述悬浮液在300rpm下搅拌。在起始时一次性加入苛性钠。24小时后,将破乳的组合物中和至pH 7.5。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0123] 表1:添加的NaOH的量对释放的油量的影响

[0124]

添加的NaOH量[mol/10kg TDM]	10	12.5	15	22.5
添加的NaOH量[wt%/TDM]	4	5	6	9
产率[wt%]	90.8	91.9	93.4	87.7

[0125] 结果表明,即使加入相当少量的碱当量,也可以在不添加有机溶剂或盐如氯化钠的情况下实现非常好的释放油的产率。此外,显然的是,存在添加的碱当量与总干物质的可以实现最大产率的比率。超过该比例进一步增加碱当量的量不增加产率,甚至会导致比添加较少碱当量更差的结果。每10kg TDM使用12.5摩尔和15摩尔NaOH的量获得了最佳结果。

[0126] 实施例3:所添加的碱当量的量对油释放的影响

[0127] 为了进一步测试添加的碱当量的量对由生物质释放油的效率的重要性,测试了向生物质中添加不同量的苛性钠对油释放的影响。表2描述了添加的碱当量与总干物质的比率以及通过添加苛性钠而释放的油量。使用搅拌容器BIOSTAT®B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius),用1升经酶处理并随后浓缩的发酵液进行所有实验。所述样品的总干物质为30.5wt%。破乳在80℃的温度下进行24小时。将所述悬浮液在300rpm下搅拌。苛性钠分三批逐步加入以保持低的pH。24小时后,将破乳的组合物中和至pH 7.5。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0128] 表2:添加的NaOH量对释放的油量的影响

添加的NaOH量 [mol/10 kg TDM]	12.5	17.5	20	22.5
添加的NaOH量 [wt%/TDM]	5	7	8	9
产率 [wt%]	93.9	92.3	92.6	84.5

[0129]

[0130] 结果表明,即使加入相当少量的碱当量,也可以在不添加有机溶剂或盐如氯化钠的情况下实现非常好的释放油产率。此外,显然的是,存在可以实现最大产率的、添加的碱当量与总干物质的比率。超过该比例进一步增加碱当量的量不增加产率,甚至会导致比添加较少碱当量更差的结果。每10kg TDM使用12.5摩尔-20摩尔NaOH的量获得了最佳结果。

[0131] 实施例4:添加的碱当量的量对油的释放的影响

[0132] 为了测试添加的碱当量的量对由生物质释放油的效率的重要性,测试了向生物质中添加不同量的苛性钠对油释放的影响。表3描述了添加的碱当量与总干物质的比率以及通过添加苛性钠而释放的油量。使用搅拌容器BIOSTAT® B-DCU-Quad 2L (德国 Sartorius),用1升经酶处理并随后浓缩的发酵液进行所有实验。所述样品的总干物质为30wt%。破乳在80℃的温度下进行24小时。将所述悬浮液在300rpm下搅拌。连续添加苛性钠以避免高的pH值。24小时后,将破乳的组合物中和至pH 7.5。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0133] 表3:添加的NaOH量对释放的油量的影响

[0134]

添加的NaOH量 [mol/10 kg TDM]	10	12.5	15	17.5	20
添加的NaOH量 [wt%/TDM]	4	5	6	7	8
产率 [wt%]	92.5	94.0	95.2	95.2	93.8

[0135] 结果表明,即使加入相当少量的碱当量,也可以在不添加有机溶剂或盐如氯化钠的情况下实现非常好的释放油产率。此外,显然的是,存在可以实现最大产率的、添加的碱当量与总干物质的比率。超过该比例进一步增加碱当量的量不增加产率,甚至会导致比添加较少碱当量更差的结果。每10kg TDM使用12.5摩尔-17.5摩尔NaOH的量获得了最佳结果。

[0136] 实施例5:添加的碱当量的量对油的释放的影响

[0137] 为了测试添加的碱当量的量对由生物质释放油的效率的重要性,测试了向生物质中添加不同量的苛性钠对油释放的影响。表4描述了添加的碱当量与总干物质的比率以及通过添加苛性钠而释放的油量。使用搅拌容器BIOSTAT® B-DCU-Quad 2L (德国 Sartorius),用1升经酶处理并随后浓缩的发酵液进行所有实验。所述样品的总干物质为35.5wt%。破乳在80℃的温度下进行24小时。将所述悬浮液在300rpm下搅拌。连续添加苛性钠以避免高的pH值。24小时后,将破乳的组合物中和至pH 7.5。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0138] 表4:添加的NaOH量对释放的油量的影响

[0139]

添加的NaOH量 [mol/10 kg TDM]	10	12.5	15	17.5	20
添加的NaOH量 [wt%/TDM]	4	5	6	7	8
产率 [wt%]	88.5	91.8	91.0	89.0	87.0

[0140] 结果表明,即使加入相当少量的碱当量,也可以在不添加有机溶剂或盐如氯化钠的情况下实现非常好的释放油产率。此外,显然的是,存在可以实现最大产率的、添加的碱当量与总干物质的比率。超过该比例进一步增加碱当量的量不增加产率,甚至会导致比添加较少碱当量更差的结果。每10kg TDM使用12.5摩尔-15摩尔NaOH的量获得了最佳结果。

[0141] 实施例6:温度、总干物质、苛性碱量和搅拌速度对油的释放的影响

[0142] 为了测试温度、总干物质含量(TDM)、碱当量和搅拌速度对油的释放的影响和相互依赖性,用经酶处理的发酵液进行了测试,所述发酵液通过强制循环蒸发浓缩至总干物质含量为25wt%、30wt%或35wt%。测试在搅拌容器BIOSTAT® B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius)中进行。试验中使用的浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是1L。在试验中,碱当量的总加入量为5-7wt%,而破乳在70°C、80°C或90°C下进行。在所述破乳步骤开始时,一次性加入液体形式(20wt%NaOH溶液)的NaOH碱当量。破乳在100rpm、550rpm或1000rpm的搅拌速度下进行24小时。24小时后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0143] 表5:温度、TDM和搅拌速度对油释放产率的影响

[0144]

温度 [°C]	70	70	90	90	70	70	90	90	80	80
TDM [wt%]	25	35	25	35	25	35	25	35	30	30
NaOH的量 [wt% 每TDM]	5	7	7	5	7	5	5	7	6	6
NaOH的量 [mol/10 kg TDM]	12.5	17.5	17.5	12.5	17.5	12.5	12.5	17.5	15	15
搅拌速度 [rpm]	100	100	100	100	1000	1000	1000	1000	550	550
产率[wt%]	90.3	96.2	82.9	95.5	76.6	93.1	93.1	90.0	94.9	93.9

[0145] 可以看出,使用35wt%的TDM,总是可以实现非常好的结果,即油产率至少为90wt%,即使在相当高的碱当量和相当低的温度下也是如此。相反,当TDM仅为25wt%时,当碱当量的量非常高时,特别是当温度非常低时,结果可能变得差很多。

[0146] 实施例7:温度对油的释放的影响

[0147] 为了测试温度对油的释放的影响,用经酶处理的发酵液进行了测试,所述发酵液

通过强制循环蒸发浓缩至总干物质含量为33wt%。测试在搅拌容器BIOSTAT®B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius)中进行。试验中使用的浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是1L。在每次试验中,加入相同的总碱当量(每TDM 6wt%的NaOH,即每10千克TDM 15摩尔NaOH),而破乳在40℃、50℃或90℃下进行。在所述破乳步骤开始时,一次性加入液体形式(20wt% NaOH溶液)的NaOH碱当量。破乳在300rpm的搅拌速度下进行24小时。24小时后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0148] 表6:温度对释放的油产率的影响

[0149]

温度[℃]	40	50	90
产率[wt%]	85.4	87.6	93.0

[0150] 结果表明,即使在40℃或50℃的低温下,当加入适量的碱当量时,可以实现非常有效的油释放。

[0151] 实施例8:在非常低的温度下破乳

[0152] 为了进一步测试温度对油的释放的影响,用经酶处理的发酵液进行了测试,所述发酵液通过强制循环蒸发浓缩至总干物质含量为33.5wt%。测试在搅拌容器BIOSTAT®B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius)中进行。使用的浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是1L。在每次试验中,加入相同的总碱当量(每TDM 6wt%的NaOH,即每10千克TDM 15摩尔NaOH),破乳在30℃或40℃下进行。在所述破乳步骤开始时,一次性加入液体形式(20wt% NaOH溶液)的NaOH碱当量。破乳在300rpm的搅拌速度下进行24小时。24小时后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0153] 表7:温度对释放油产率的影响

[0154]

温度[℃]	30	40
产率[wt%]	85.8	84.6

[0155] 结果表明,即使在低至30℃的温度下,当加入适量的碱当量时,也可以实现有效的油释放。

[0156] 实施例9:破乳时间对油的释放的影响

[0157] 为了测试暴露时间对油的释放的影响,用经酶处理的发酵液进行了测试,所述发酵液通过强制循环蒸发浓缩至总干物质含量为36.2wt%。测试在搅拌容器中进行。使用的浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是300L。在每次试验中,加入相同的总碱当量(每TDM 6wt%的NaOH,即每10千克TDM 15摩尔NaOH),并将温度保持在80℃。在暴露过程中,逐步加入液体形式(20wt% NaOH溶液)的NaOH碱当量,使得悬浮液的pH从未超过pH9.5。暴露时间从4小时到23小时变化。温育后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0158] 表8:破乳时间对释放油产率的影响

[0159]

暴露时间[h]	4	9	13	23
---------	---	---	----	----

产率[wt%]	90.5	92.0	92.0	91.3
---------	------	------	------	------

[0160] 令人惊讶的是,事实证明,在4-23小时的暴露时间内可以分离出几乎相同量的油。这意味着非常短的暴露时间已经导致非常好的产率,因此可以避免更长、耗时和耗能的温育时间。

[0161] 实施例10:在破乳中使用Ca(OH)₂作为碱

[0162] 通过强制循环蒸发将经酶处理的发酵液浓缩至总干物质含量为34wt%。测试在搅拌容器BIOSTAT® B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius)中进行。使用的浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是1L。破乳在80°C的温度和24小时的暴露时间下进行。将悬浮液以300rpm搅拌。向悬浮液中加入10.6摩尔碱当量或14.0摩尔碱当量的Ca(OH)₂/10kg总干物质。在暴露过程中,逐步加入悬浮形式(20wt%Ca(OH)₂水溶液)的Ca(OH)₂,使得悬浮液的pH值不超过9.5。温育后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g离心下分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0163] 表9:Ca(OH)₂的添加量对释放的油量的影响

[0164]

Ca(OH) ₂ 的添加量[mol/10kg TDM]	10.6	14.0
Ca(OH) ₂ 的添加量[wt%/TDM]	3.9	5.2
Ca(OH) ₂ 的添加量[g]	13.3	17.8
产率[wt%]	90.2	90.1

[0165] 可以看出,将Ca(OH)₂的量从每10kg总干物质10.6摩尔增至14.0摩尔对释放的油的产率并没有影响。添加相同量的碱当量导致与NaOH类似的良好结果。

[0166] 实施例11:在没有酶处理细胞的情况下破乳

[0167] 为了测试细胞的酶处理对油的释放的重要性,用发酵液进行了试验,所述发酵液在巴氏灭菌后不进行酶处理,而是通过强制循环蒸发直接浓缩至总干物质含量为32.8wt%。测试在搅拌容器BIOSTAT® B-DCU-Quad 2L(德国Sartorius)中进行。所用浓缩悬浮液的体积对于每个样品都是1L。在每次试验中,加入相同的总碱当量(每TDM 6wt% NaOH,即每10千克TDM 15摩尔NaOH),并在90°C下以300rpm搅拌速度进行破乳24小时。在破乳步骤开始时,一次性加入液体形式(20wt%NaOH溶液)的碱当量。24小时后,通过加入硫酸中和所得组合物。中和后,取50g均化后的悬浮液样品,在13500g下离心分离细胞碎片。随后测定上清液中EPA和DHA的量。

[0168] 结果表明,即使没有预先酶处理细胞,当提供适当的总干物质质量并且在破乳过程中施加适当的碱当量时,也可以实现约80%的非常好的油产率。