

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения PUFA, необязательно в масле из микробных клеток, включающему культивирование микроорганизма двухстадийным способом и затем извлечение масла из клеток микроорганизмов. Также изобретение относится к новому (например, из микробных клеток) маслу, полученному данным способом. В масле 50% или более липидов (или PUFA, например, в масле) составляет арахидоновая кислота (ARA). Масло может иметь низкое значение перекисного числа (POV) ниже 2,5 или 2,0, и/или низкое значение анизидинового числа (AnV) ниже 1,0. Также настоящее изобретение относится к продуктам питания или пищевым добавкам, содержащим или полученным с использованием масла из микробных клеток по изобретению.

Уровень техники

Полиненасыщенные жирные кислоты, или PUFA, распространены в природе. Самые разнообразные PUFA продуцируются различными одноклеточными микроорганизмами (водорослями, грибами и т.д.). Одной особенно важной PUFA является арахидоновая кислота (ARA), которая представляет одну из ряда полиненасыщенных кислот с длинной цепью (LC-PUFA). В химическом отношении арахидоновая кислота представляет собой цис-5,8,11,14-эйкозатетраеновую кислоту (20:4) и относится к семейству (n-6) LC-PUFA.

Арахидоновая кислота является одним из основных предшественников самых разнообразных биологически активных веществ, известных под общим названием эйкозаноиды, группы, включающей простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Также арахидоновая кислота является одним из компонентов липидной фракции женского молока, и полагают, что она является необходимой для оптимального развития нервной системы младенцев. Арахидоновая кислота имеет широкий ряд различных применений, включая применение в детских молочных смесях, продуктах питания и кормах для животных.

Арахидоновую кислоту можно получать при использовании микроорганизмов и, в частности, при использовании нитчатого гриба *Mortierella*. Однако процентное содержание арахидоновой кислоты в масле из микробных клеток, как правило, является очень низким. Предпринимались попытки увеличить выход арахидоновой кислоты из *Mortierella*, но они завершались с различным успехом. Для осуществления многих попыток повысить содержание арахидоновой кислоты требуются стадии, которые с трудом можно применить в промышленном масштабе.

Например, Eroschin et al., *Process Biochemistry*: (35) 2000, pp. 1171-1175 выдерживают культуру в течение примерно недели после окончания ферментации. Количество ARA оценивалось по отношению к биомассе (а не по отношению к маслу, экстрагированному из нее), поскольку в данном документе не описывается экстракция какого-либо масла. Totani et al., *Industrial Applications of single cell oils*, American Oil Chemists' Society Campaign, 1992, Chapter 4, pp. 52-60 и *Lipids*, vol. 22, № 12 (1987), pages 1060-1062 предлагают применять необычно низкую температуру ферментации, что означает значительное замедление ферментации. В данном случае содержание ARA основано на экстракции смесью растворителей хлороформ/метанол. Другим документом в области получения ARA является заявка WO 96/21037.

В заявке на Европейский патент A-1035211 (Suntory) описывается способ получения ARA и липидов DHGLA из *M. alpina*. Однако оценка содержания ARA проводится либо по отношению к биомассе (а не по отношению к экстрагированному из нее маслу), либо на основе результатов аналитического метода, где полиненасыщенные кислоты вначале этерифицируют, и затем экстрагируют с использованием растворителя (а не проводят вначале экстракцию с получением масла с последующим определением содержания ARA по отношению к данному маслу).

В одном сообщении приводятся данные о более высоком выходе ARA, где ее концентрация в собранном мицелии составляет примерно 70% при использовании штамма *M. alpina* 1S-4 (Shimizu S., *Oils-Fats-Lipids* 1995, Proc. World Congr. Int. Soc. Fat Res., 21st (1996), Meeting Date 1995, Volume 1, pages 103-109 и *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 150 (1), 1988, p. 335-441). Однако данное процентное содержание выражено по отношению к клеткам, и не является таким же, как процент ARA в масле из микробных клеток. Фактически в полученном масле содержание ARA составляет только 39,0% (табл. 27.2, с. 105). (Необходимо отметить, что в данной области используются самые различные методы определения содержания ARA, результаты которых необязательно выражаются в тех же единицах, или основаны на том же аналитическом методе, что цифры, приведенные в данном описании ниже). Кроме того, ее получают при выдерживании клеток *M. alpina* при комнатной температуре в течение еще 6 суток после ферментации, что явно не является жизнеспособным выбором для производства в промышленном масштабе.

Следовательно, имеется потребность в изыскании способов повышения относительного содержания (и таким образом выхода) арахидоновой кислоты в маслах из микробных клеток и, в частности, способом, который можно было бы использовать в промышленном масштабе.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новые способы получения масла (из микробных клеток) с повышенным относительным содержанием арахидоновой кислоты. Это означает, что арахидоновую кислоту можно получать при низких затратах и с повышенной скоростью. Кроме того, поскольку настоящее изобретение не основывается на генетической модификации используемых микроорганизмов для повы-

шения продукции арахидоновой кислоты, изобретение отвечает возрастающему спросу на естественные, генетически не модифицированные пищевые ингредиенты. Дополнительно, масло обладает низкой способностью к окислению и таким образом пригодно для включения в состав продуктов питания для человека, для которых токсичность имеет особое значение, например, таких как детские молочные смеси.

Масло из микробных клеток, согласно изобретению содержит по меньшей мере 50% арахидоновой кислоты (ARA) и обладает по крайней мере одним из следующих свойств:

- а) имеет содержание триглицеридов по меньшей мере 90%;
- б) имеет значение перекисного числа (POV) не более 3,0;
- в) имеет значение анизидинового числа (AnV) не более 1,0;
- г) имеет содержание фосфолипидов ниже 5%.

Предпочтительно масло имеет содержание свободных жирных кислот $\leq 0,4\%$. Содержание арахидоновой кислоты (ARA), таким образом, может быть по меньшей мере 50,5, 51 или 52%. Оно может содержать до 55, 57 или 60% ARA. Масло может быть получено нижеописанным способом. Его можно экстрагировать гексаном.

Согласно изобретению способ получения масла из микробных клеток включает культивирование микроорганизма в культуральной среде в ферментере, где ферментация разделена по меньшей мере на две стадии, причем на второй или последней стадии источник углерода добавляют со скоростью $\leq 0,30$ М углерода/кг среды в час; и скорость добавления источника углерода находится ниже скорости потребления источника углерода микроорганизмами.

Предпочтительно, если на второй или последней стадии источник углерода добавляют со скоростью по меньшей мере 0,01 М углерода/кг среды в час.

Предпочтительно, если концентрация источника углерода на указанной второй или последней стадии составляет в среднем ≤ 10 г/кг среды или содержания углерода на этих стадиях составляет $\leq 0,17$ М углерода/кг среды.

Предпочтительно, если источником углерода является глюкоза, причем скорость добавления глюкозы в течение второй или последней стадии составляет менее 1,0 г глюкозы/кг среды в час.

Предпочтительно, если ферментацию проводят при температуре 22-30°C.

Предпочтительно, если микроорганизм представляет собой *Mortierella*, в частности *Mortierella alpina*.

Способ согласно изобретению, как правило, представляет собой процесс глубинной ферментации.

Предпочтительно, если во время более ранней стадии ферментации скорость добавления источника углерода превышает скорость его потребления микроорганизмами.

Способ согласно изобретению также включает извлечение масла из ферментированных микроорганизмов экстракцией растворителем, в частности гексаном.

Как правило, полученное масло подвергают рафинации и очистке.

На основе масла из микробных клеток получают композицию, которая представляет собой продукт питания (такой, как детская молочная смесь), продукт питания для людей, корм или кормовую добавку, фармацевтическую, ветеринарную или косметическую композицию. Предпочтительно композиция представляет собой детскую молочную смесь.

Согласно настоящему изобретению источник углерода является фактором, ограничивающим рост микроорганизмов, или он ограничивает таким образом, что микроорганизмы метаболизируют (свой собственный) жир(ы) и/или липид(ы), источник углерода используется весь, или его концентрация в среде равняется примерно нулю в или перед концом ферментации; добавление источника углерода останавливают, но ферментацию продолжают и/или микроорганизмы подвергаются таким условиям, что клетки, в первую очередь, потребляют иные жиры, чем ARA. В результате относительное содержание ARA в жирах или липидах в клетках возрастает. Таким образом, способ по первому аспекту может приводить к повышенному содержанию ARA в масле по второму аспекту.

Подробное описание изобретения

Микроорганизмы.

Используемые микроорганизмы могут быть бактериями, дрожжами, водорослями или грибами. Предпочтительно используют грибок, в частности нитчатый грибок. Предпочтительными грибами являются относящиеся к отряду Mucorales. Грибок может быть из родов *Mortierella*, *Phycomyces*, *Entomophthora*, *Rhizoglyphus*, *Thraustochytrium*, *Blakeslea*, *Rhizomucor* или *Aspergillus*. Предпочтительными грибами могут быть таковые вида *Mortierella alpina*. Предпочтительными дрожжами являются относящиеся к родам *Pichia* или *Saccharomyces*, например *Pichia cifertii*. Бактерии могут быть представителями рода *Propionibacterium*. Подходящими водорослями являются динофлагеллаты и/или относящиеся к родам *Cryptocodinium*, *Porphyridium* или *Nitzschia*, например вид *Cryptocodinium cohnii*.

Штаммы микроорганизмов, используемых по настоящему изобретению, могут представлять собой распространенные в природе или обычно используемые промышленные штаммы. Штамм может представлять собой не измененный генетически, например, он может быть не трансформирован вектором, или он может не включать гетерологичный ген(ы). С учетом предпочтений в некоторых группах населе-

ния в отношении продуктов питания, которые не содержат генно-инженерных ингредиентов, используемый микроорганизм может представлять собой штамм, который не является модифицированным таким образом.

Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA).

PUFA может представлять собой одну PUFA, две или более различных PUFA.

Каждая PUFA может быть из семейства n-3 или n-6. Предпочтительно это C₁₈, C₂₀ или C₂₂ PUFA. Она может представлять собой PUFA по меньшей мере с 18 атомами углерода и/или по меньшей мере с 3 или 4 двойными связями. PUFA можно выделить в виде свободной жирной кислоты, соли, в виде эфира жирной кислоты (например, метилового или этилового эфира), в виде фосфолипида и/или в виде моно-, ди- или триглицерида.

Подходящие (n-3 и n-6) PUFA включают

докозагексаеновую кислоту (DHA, 22:6 Ω 3), соответственно из водорослей или грибов таких, как (динофлагеллаты) *Syngnathodinium* или (гриба) *Thraustochytrium*;

γ-линоленовую кислоту (GLA, 18:3 Ω 6);

α-линоленовую кислоту (ALA, 18:3 Ω 3);

конъюгированную линоленовую кислоту (октадекадиеновую кислоту, CLA);

дигомо-γ-линоленовую кислоту (DGLA, 20:3 Ω 6);

арахидоновую кислоту (ARA, 20:4 Ω 6) и

эйкозапентаеновую кислоту (ERA, 20:5 Ω 3).

Предпочтительные PUFA включают арахидоновую кислоту (ARA), докозагексаеновую кислоту (DHA), эйкозапентаеновую кислоту (EPA) и/или γ-линоленовую кислоту (GLA). В частности, ARA является предпочтительной.

Ферментация.

Ферментацию/культивирование, как правило, проводят в подходящем ферментере (или сосуде для ферментации), содержащем (жидкую, обычно водную) культуральную среду. В основной ферментер в асептических условиях вносят посевной материал из небольшого питательного ферментера. Как правило, используют глубинную и/или аэробную ферментацию. Ее можно проводить в глубоком ферментер-танке. Ферментер может быть снабжен устройством для мониторинга и/или изменения pH и температуры. Резервуар может быть дополнительно адаптирован для проведения, или возможности проведения, аэрации и/или смешивания клеток и жидкости, например, в виде перемешивания раствора. Это может быть перемешиванием, например, с помощью механических устройств.

Преимущественно емкость ферментера составляет по меньшей мере 10, 20, 40 или даже 60 м³. Можно использовать ферментеры емкостью 100 или даже 150 м³.

Как правило, ферментацию проводят в течение 10 суток или менее, предпочтительно 9 или менее суток, более предпочтительно 8 или менее суток. Продолжительность ферментации может составить 4, 5, 6 или 7 суток.

Необязательно ферментацию можно проводить в течение периода времени от 150 до 120 ч, например от 160 до 190 ч, например от 170 до 180 ч. Окончанием ферментации обычно является точка, когда прекращают перемешивание и/или аэрацию. Это может быть моментом, когда ферментер и/или вспомогательное оборудование отключают (исключают их функции). Затем микроорганизмы можно удалить из ферментера.

Ферментацию можно проводить при температуре в пределах от 20 до 40°C.

Источники углерода и азота.

При ферментации можно использовать любую подходящую среду, например среду, подходящую для используемого микроорганизма. Источник углерода может включать (как комплексные источники) мальтодекстрин, овсяную муку, овсяную муку грубого помола, мелассу, растительное (например, соевое) масло, солодовый экстракт, крахмал, этанол или соевое масло. Предпочтительные (некомплексные) источники углерода включают углеводы и сахара, такие как фруктоза, мальтоза, сахароза, ксилоза, маннит, глюкоза или лактоза либо глицерин (например, из растительного источника), цитрат, ацетат, глицерин, этанол или аскорбат (например, натрия). В предпочтительном воплощении изобретения источник углерода представляет или включает глюкозу и, в частности, глюкозный сироп.

Подходящие источники азота включают дрожжевой экстракт, мочевину и пептон. В среде может отсутствовать агар.

Предпочтительные источники азота и/или углерода являются водорастворимыми или смешивающимися с водой.

Отдельные (все) компоненты среды (такие как источники азота и/или углерода) могут присутствовать либо в начале ферментации, либо их постепенно добавляют во время ферментации, либо добавляют порциями или партиями. В частности, количество источника углерода, находящегося в среде, как правило, будет контролироваться, как описано ниже, предпочтительно при контроле скорости добавления источника углерода.

Источники азота и/или углерода можно вносить (или добавлять) по отдельности или вносить одно-

временно, или вносить в виде комбинированного препарата. Таким образом, они могут находиться в одной композиции (если полагается, что это необходимо), которая предпочтительно представляет собой жидкость. Источники азота и/или углерода можно добавлять (в ферментер) либо до внесения клеток грибов (в резервуар), другими словами до внесения посевного материала, либо во время ферментации, альтернативно их можно вносить до ферментации и во время нее.

Культуральная среда.

Предпочтительно культуральная среда представляет собой водную жидкость. Она может дополнительно включать другие соединения, которые способствуют ферментации, например, хелатообразователи (например, лимонную кислоту), противовспенивающее вещество (например, соевое масло), витамин (например, тиамин и/или рибофлавин), любые необходимые каталитические металлы (например, щелочно-земельные металлы, такие как магний или кальций, или цинк или железо, и/или другие металлы такие, как кобальт и медь), фосфор (например, фосфат) и/или серу (например, сульфат). Среда может, если необходимо, содержать дополнительное масло такое, как оливковое или соевое масло, однако среда предпочтительно не должна содержать подобного масла.

Температура (оптимальная) культивирования (или ферментации) может варьировать в зависимости от используемого микроорганизма. Однако ее значение предпочтительно находится в пределах от 20 до 40°C и более предпочтительно от 22 до 30°C или 32°C. В частности, температура, при которой проводят ферментацию, составляет ≥ 22 или ≤ 25 °C, например от 22 до 30°C, например в пределах 23-28°C. Значение pH водной жидкости во время ферментации может быть от 4 до 10, например от 5 до 8, оптимально от 6 до 7.

Как правило, среду смешивают или перемешивают во время ферментации для облегчения аэрации. Водную жидкость и клетки соответственно смешивают или перемешивают. Этого можно достичь, если аэрации обеспечивается пропусканием газа, например, воздуха в водную жидкость. Это может служить для дополнительной цели обеспечения кислородом клеток грибов: поскольку предпочтительно ферментация является аэробной. Другие способы перемешивания или смешивания включают перемешивание, например, с использованием мешалки. Она может быть типа гидрокрыльевой с осевым потоком или такого типа, в котором водная среда принудительно направляется от мешалки (например, турбина). Если даже перемешивание не проводится, то предпочтительно, что микробные клетки были обеспечены во время ферментации кислородом и, таким образом, аэрация (например, пропусканием воздуха, кислорода или другого содержащего кислород газа) является преимущественной. Аэрация может находиться в пределах от 0,1 до 2,0, например от 0,5 до 1,0 об/об/мин.

Предпочтительно емкость ферментера составляет по меньшей мере 2 или 5 л, предпочтительно по меньшей мере 10 л. Однако для ферментеров, используемых в промышленности или в промышленном масштабе, емкость резервуара предпочтительно составляет по меньшей мере 50, 100, 500 или 1000 л.

Последняя (или вторая) стадия ферментации.

Процесс ферментации можно разделить по меньшей мере на две стадии. Вторую или последнюю стадию, которая может непосредственно предшествовать окончанию ферментации, можно охарактеризовать снижением количества источника углерода, доступного для микроорганизма, или любым из признаков, представленных для первого аспекта. Как правило, данная стадия может начинаться за от 15 до 2 ч до окончания ферментации, предпочтительно менее чем за 10 ч до окончания ферментации, более предпочтительно за 3-5 ч до окончания ферментации. Предпочтительно данная стадия начинается, как правило, менее чем через 10 суток после начала ферментации, более предпочтительно она будет начинаться менее чем через 9 суток после, еще более предпочтительно менее чем через 8 суток после начала ферментации.

Во время первой или более ранней стадии ферментации источник углерода может находиться в избытке. Таким образом, количество доступного источника углерода может быть не ограничивающим фактором в отношении роста микроорганизмов. Скорость добавления источника углерода может превышать скорость его потребления микроорганизмами. На второй или последней стадии ферментации количество добавляемого источника углерода можно снизить, или совсем прекратить его внесение. Это означает, что количество источника углерода, доступного для микроорганизмов, будет снижаться во время второй или последней стадии ферментации. Как правило, на второй, конечной или последней стадии или к концу ферментации источник углерода может

потребляться микроорганизмами со скоростью выше, чем его вносят в среду (например, скорость внесения меньше, чем скорость потребления);

вноситься со скоростью $\leq 0,30$ М углерода/кг среды в час, например $\leq 0,25$ или $\leq 0,20$, и по меньшей мере составляет 0,01, 0,02 или 0,05 М углерода/кг среды/ч (единицы в данном случае выражаются в молях или молярном количестве углерода в источнике углерода, а не в массе или молях самого источника углерода);

быть фактором, ограничивающим рост и/или продукцию (PUFA) микроорганизмами.

Как правило, концентрация источника углерода во время второй стадии составляет ≤ 10 г источника углерода/кг среды, предпочтительно находится в пределах от 0,01 или 0,1 до 8 или 10 г/кг, более пред-

почтительно от 0,5 до 5 г/кг и еще более предпочтительно от 1 или 2 до 4 или 5 г/кг. Это означает, что в среднем во время проведения последней стадии ферментации будет находиться $\leq 0,30$ М углерода на кг среды, предпочтительно от 0,03 до 0,3 М углерода на кг. Преимущественно это составляет от 0,015 до 0,17 М на кг и еще более предпочтительно от 0,03 до 0,17 М углерода на кг среды.

Когда источник углерода включает глюкозу, то, как правило, концентрация глюкозы (на последней стадии) будет в среднем составлять ≤ 10 г/кг среды, предпочтительно от 0,01 или 0,1 до 8 или 10 г/кг. Преимущественно она находится на уровне от 0,5 до 5 г/кг и еще более предпочтительно от 1 или 2 до 4 или 5 г/кг среды. В данном смысле среда включает клетки и водную культуральную среду, т.е. это и есть «бульон» (клетки и окружающая жидкость).

Скорость добавления источника углерода на последней стадии предпочтительно составляет не более 0,03 М углерода на кг, предпочтительно не более 0,025 или 0,02 М углерода/кг (среды). Предпочтительно скорость добавления равняется примерно 0,015 М углерода/кг. Если источником углерода является глюкоза, то предпочтительно скорость добавления глюкозы находится на уровне менее 1,0, например, менее 0,8, например, менее 0,5 г глюкозы/кг среды в час.

Предпочтительно скорость добавления источника углерода на последней стадии составляет примерно половину от скорости потребления источника углерода микроорганизмами. Однако соотношение скорости добавления: скорости потребления может варьировать от 1:1-3, например 1:1,5 до 2,5, оптимально от 1:1,8 до 2,2. Альтернативно скорость добавления может составлять от 30-70%, например от 40 до 60%, оптимально от 45 до 55% от скорости потребления.

Подходящую концентрацию источника углерода во время проведения второй стадии ферментации можно получить при тщательном контроле скорости добавления источника углерода. Как правило, она будет соответствующим образом снижаться во время или в начале последней стадии. Можно периодически проводить отбор проб и анализ культуры для определения концентрации источника углерода и при необходимости корректировать скорость внесения источника углерода. Это можно осуществлять автоматически при использовании компьютерной системы.

Способ пастеризации.

Как правило, пастеризацию проводят после окончания ферментации. В предпочтительном воплощении пастеризация будет завершать ферментацию, поскольку тепло во время пастеризации будет приводить к гибели клеток. Следовательно, пастеризовать можно ферментационный бульон (или клетки в жидкой (водной) среде), хотя, можно пастеризовать микробную биомассу, полученную из бульона. В последнем случае пастеризация может иметь место, пока еще микробные клетки находятся в ферментере. Предпочтительно пастеризация имеет место перед любой последующей обработкой микробных клеток, например, грануляционным измельчением (например, экструзией) или замешиванием.

Предпочтительно протокол пастеризации является достаточным для ингибирования или инактивации одного или более ферментов, которые могут оказывать отрицательное влияние или разрушать PUFA или масло из микробных клеток, например, липазы.

По окончании ферментации ферментационный бульон можно профильтровать или обработать иначе для удаления воды или водной жидкости. После удаления воды можно получить «плотный осадок» из биомассы. Если пастеризация не имела место, то затем обезвоженные клетки (или «плотный осадок» биомассы) можно подвергнуть пастеризации.

Экстракция масла.

Если желательно и, например, после окончания ферментации, микроорганизмы можно убить или пастеризовать. Это может представлять собой инактивацию любых нежелательных ферментов, например, ферментов, которые могут приводить к разрушению масла или снижению выхода PUFA.

После окончания культивирования или ферментации ферментационный бульон (клетки и водную жидкость) можно удалить из ферментера и, если необходимо, можно удалить из него жидкость (обычно воду). Можно использовать любой подходящий метод разделения твердой и жидкой фаз. Это (обезвоживание) может представлять собой центрифугирование и/или фильтрование. Клетки можно промыть, например, при использовании водного раствора (такого как вода), например, для удаления любых внеклеточных растворимых в воде или диспергируемых в воде соединений. Затем из микробных клеток можно извлечь масло, например, с использованием растворителя, так, чтобы масло представляло собой экстрагированное растворителем масло, предпочтительно экстрагированное гексаном.

Масло не содержит (или в нем в основном отсутствуют) GLA и/или DGLA.

Способ экстракции PUFA.

Затем можно экстрагировать PUFA (или масло, как правило, содержащее PUFA) из (например, высушенных) гранул (например, экструдатов), содержащих клетки. Экстракцию можно проводить с использованием растворителя. Предпочтительно используют неполярный растворитель, например C_{1-8} , предпочтительно C_{2-6} алкан, например гексан. Можно применять двуокись углерода (в жидкой форме, например, в сверхкритическом состоянии).

Таким образом, клетки можно подвергнуть экстракции, например, органическим растворителем, предпочтительно в атмосфере азота. Другие подходящие органические растворители включают эфир,

метанол, этанол, хлороформ, дихлорметан и/или петролейный эфир. Также можно использовать экстракцию метанолом и петролейным эфиром и/или экстракцию однофазовой системой растворителей, состоящей из хлороформа, метанола и воды. При выпаривании органического растворителя(ей) из экстракта при пониженном давлении можно получить масло из микробных клеток, содержащее арахидоновую кислоту в высокой концентрации.

Растворителю предпочтительно дают просочиться через высушенные гранулы. Подходящие методы грануляции и экструзии микроорганизмов и последующая экстракция масла из микробных клеток, содержащего PUFA, описана в заявке WO-A-97/37032.

Неочищенное масло, содержащее PUFA, извлекают растворителем. Данное масло можно использовать в таком состоянии без дополнительной обработки, или его можно подвергнуть одной или более стадиям рафинирования. Подходящие методы рафинирования описаны в заявке на международный патент № PCT/EP01/08902 (содержание данного документа и всех других, представленных здесь, включено здесь в виде ссылки). Например, масло можно подвергнуть обработке кислотой или удалению высокомолекулярных соединений, обработке щелочью или удалению свободных жирных кислот, отбеливанию или удалению пигментов, фильтрации, фракционированию охлаждением (или охлаждению, например, для удаления насыщенных триглицеридов), дезодорации (или удалению свободных жирных кислот) и/или осветлению фильтрованием (или удалению нерастворимых в масле веществ).

Полученное масло особенно подходит для пищевых целей, и его можно добавлять к продуктам питания (для человека) или кормам (для животных). Примеры включают молоко, детские молочные смеси, лечебные напитки, хлеб и корм для животных.

Очистка/рафинирование.

Масло из микробных клеток можно рафинировать или очистить. Это может включать удаление одного или более из следующих компонентов: фосфолипида, следов металлов, пигмента, углевода, белка, свободной жирной кислоты (FFA), нерастворимого в масле соединения, нерастворимого в воде соединения, мыла или омыляемого вещества, продукта окисления, серы, моно- или диглицерида, продукта разложения пигмента, растворителя и/или стерина. Очистка может приводить к уменьшению или удалению «привкуса» и/или повышению стабильности масла.

Проведение данного способа (например, очистки) может включать удаление высокомолекулярных соединений (или обработку кислотой), нейтрализацию (или обработку щелочью), промывание водой, отбеливание, фильтрование, дезодорирование, осветление фильтрованием и/или охлаждение (или фракционирование охлаждением). Предпочтительно очистка включает обработку кислотой и/или обработку щелочью (удаление высокомолекулярных соединений и нейтрализация). Альтернативно способы очистки могут включать отбеливание и/или дезодорацию. Предпочтительно, однако, если очистка будет включать отбеливание и/или дезодорацию и оптимально дополнительно кислотную и/или щелочную обработку.

Масла.

Второй аспект настоящего изобретения обеспечивает масло из микробных клеток, которое содержит 35 или 40% по меньшей мере одной PUFA, такой как ARA. Масло может содержать по меньшей мере 50, 55 или 60% или более данной PUFA, такой как ARA. Содержание триглицеридов в нем может находиться на уровне по меньшей мере 90%. Предпочтительно масло из микробных клеток содержит 50, 55 или 60-90% арахидоновой кислоты, более предпочтительно 60-80% и еще более предпочтительно от 60 до 70% арахидоновой кислоты.

В масле из микробных клеток предпочтительно содержание триглицеридов составляет от 90 до 100%, например по меньшей мере 90 или 96%, предпочтительно по меньшей мере 98, более предпочтительно 99% и оптимально выше 99,5%. Как правило, масло из микробных клеток будет иметь содержание эйкозапентаеновой кислоты (EPA) ниже 5%, предпочтительно ниже 1% и наиболее предпочтительно ниже 0,5%. Масло может содержать менее 5, менее 2, менее 1% каждой из CO₂₀, CO_{20:3}, CO_{22:0} и/или CO_{24:0} полинасыщенных жирных кислот (PUFA). Содержание свободных жирных кислот (FFA) может составлять ≤0,4, 0,2 и 0,1%.

Из триглицеридов предпочтительно, чтобы по меньшей мере 40%, например, 50% и более предпочтительно по меньшей мере 60% присутствующих PUFA находилось в α-положении глицерина (находящегося в скелете триглицерида), также известном как 1- или 3-положение. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40% PUFA находилось в β(2)-положении.

Максимальное содержание фосфолипидов в масле соответственно составляет 5, 3 или 2%, и/или минимальное - 0,1, 0,5 или 1,0%.

Как правило, масло из микробных клеток будет представлять таковое, получаемое способом по первому аспекту изобретения. Предпочтительно масло выделяют из гриба, более предпочтительно масло выделяют из *Mortierella* и, в частности, из *M. alpina*. Масло преимущественно экстрагируют гексаном.

Содержание ARA.

Для получения ясности будет пояснен расчет процентного содержания ARA, особенно с учетом то-

го, что в литературе в некоторых случаях расчет количества АРА проводится на различной основе. Процентное содержание АРА рассчитывают по отношению к маслу (которое экстрагировано из биомассы), а не по отношению к самой биомассе. Оно выражено отношением массы к массе. Оно рассчитывается по отношению к маслу, экстрагированному гексаном и, следовательно, по отношению к экстрагируемым гексаном липидам (HEL). Расчет проводят по отношению к общему количеству масла, а не к общему количеству жирных кислот (что в некоторых случаях может дать ошибочные, завышенные значения). Содержание АРА определяют хорошо известным аналитическим методом FAME (с использованием метиловых эфиров жирных кислот), он подробно описан в AOCS Ce1b89. Различные растворители будут экстрагировать различные липиды. Необходимо отметить, что в данном случае масло вначале экстрагируют гексаном и затем определяют содержание АРА методом анализа FAME. Это будет давать другие результаты по сравнению с методом, который включает вначале этерификацию арахидоновой кислоты (например, находящейся еще в клетках) и затем экстракцию полученных метиловых эфиров для дальнейшего анализа.

Перекисное число (POV).

Предпочтительно значение POV масла из микробных клеток составляет не более чем 3,0, 2,5 или 2,0. Однако можно получить значительно более низкие значения POV при использовании способа по изобретению, и данные значения могут быть ниже 1,5 или ниже 1,0. Можно получить значения ниже 0,8 и даже ниже 0,4.

Анизидиновое число (AnV).

Предпочтительно анизидиновое число масла из микробных клеток составляет не более 1,0, например, не более 0,6, 0,3 и даже не более 0,1.

Применения и продукты.

Третий аспект изобретения относится к композиции, содержащей масло по второму аспекту, и где является целесообразным, одно или более других (дополнительных) веществ. Композиция может представлять собой продукт питания и/или пищевую добавку для животных или людей. В воплощениях изобретения, которые предназначены для потребления человеком, масла могут быть подвергнуты обработке подходящей для потребления человеком, как правило, рафинированием или очисткой масла, полученного из микробных клеток.

Композиция может представлять собой детскую молочную смесь или продукт питания (для человека). В данном случае состав молочной смеси можно скорректировать таким образом, что она будет включать аналогичные количества липидов или PUFA, которые имеются в обычном женском молоке. Это может включать смешивание масла из микробных клеток по изобретению с другими маслами для получения соответствующей композиции.

Композиция может представлять собой корм или добавку для животных и рыб. Подобные корма и добавки можно скармливать любым сельскохозяйственным животным, в частности овцам, крупному рогатому скоту и птице. Кроме того, корма или добавки можно скармливать водным организмам, предназначенным для разведения, например рыбам и панцирным водным животным. Композиция может содержать одно или более кормовых веществ или ингредиентов для подобных животных.

Масло по изобретению можно непосредственно продавать в виде масла и оно может находиться в соответствующей упаковке, как правило, в разовых алюминиевых бутылках, покрытых изнутри эпокси-фенольным лаком, и продутых азотом. Масло может содержать один или более антиоксидантов (например, токоферол, витамин Е, пальмитат), каждый, например, в концентрации от 50 до 800 млн⁻¹, например от 100 до 700 млн⁻¹.

Подходящие композиции могут включать фармацевтическую или ветеринарную композиции, например, для перорального введения, или косметические композиции. Масло можно принимать как такое или можно инкапсулировать, например, в оболочку и, таким образом, оно может быть в виде капсул. Оболочка или капсулы могут содержать желатин и/или глицерин. Композиция может включать другие ингредиенты, например, флаворанты (например, флаворанты с запахом и вкусом лимона и лайма) или фармацевтически приемлемый или приемлемый для ветеринарии носитель или наполнитель.

Предпочтительные признаки и характеристики одного аспекта изобретения в равной степени применимы к другому аспекту с соответствующими необходимыми изменениями.

Последующие примеры представлены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Сравнительные примеры 1 и 2 и примеры 3 и 4.

Получение арахидоновой кислоты (ARA).

1 ампулу емкостью 1 мл с суспензией штамма *Mortierella alpina* CBS 168.95 (депонирован в DSM N.V., 2600 MA Delft, Нидерланды (депонированный биологический материал был предоставлен заявителю) в Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Нидерланды, 20 февраля 1995 г. под инвентарным номером DS 30340) хранили при -80°C и вскрывали в асептических условиях. Содержимое использовали для посева в емкости на 500 мл с 100 мл среды, содержащей (г/л):

глюкозу, 29%

дрожжевой экстракт (паста Gistex® сухой остаток, 80%, белок (N×6,25), 46%, NaCl, 16%, pH (2% раствор) 5,6, зола, 22%, общее количество на чашке, Enterobacteriaceae <10/г, E. coli <1/г, дрожжи и грибы <100/г, производства DSM N.V., Savory Ingredients PO Box 1,2600 MA Delft), 12,5;

противовспенивающее вещество (Базилдон 8 6/013K кремний содержащее/не содержащее кремний противовспенивающее вещество, использованное согласно рекомендациям изготовителя, Basildon Chemical Company, Kimber Road, Abingdon, Oxford, Англия OX14 IRZ), 0,2.

pH среды доводили до 7,0 перед автоклавированием.

Культуру выращивали при 25°C в течение 48 ч при встряхивании на 250 об/мин, и ее использовали для посева в четыре емкости на 2000 мл с 500 мл среды, содержащей (г/л):

глюкозу, 20;

дрожжевой экстракт (паста Gistex®) 25;

противовспенивающее вещество (Basildon 86/013K), 0,2.

Значение pH перед стерилизацией равнялось 7,0.

Данные культуры выращивали при 25°C в течение 24 ч и использовали для посева в инокуляционный ферментер емкостью 5 м³, содержащий 2400 л среды того же состава, что использовали для матрасов емкостью 2000 мл (pH перед стерилизацией равнялось 6,0).

Температуру ферментации устанавливали на 25°C, перемешивание - на 150 об/мин, давление в резервуаре составляло 0,5 бар и скорость аэрации - 0,5 об/об/мин.

Культуру из инокуляционного ферментера переносили в основной ферментер примерно через 36 ч (скорость поглощения кислорода равнялась >3 ммоль/кг/ч).

В основном ферментере находилось (г/л):

глюкоза, 35;

дрожжевой экстракт (порошок Expressa 2200®, пивные дрожжи с низким содержанием натрия, пептон (экстракт), сухое вещество > 96%, общий N>10%, аминный N 6-7%, NaCl<1%, pH (2% раствор) 5,3-6,3), зола <12,5%, гомогенный порошок производства DSM N.V., Savory Ingredients), 5,0;

NaH₂PO₄·2H₂O, 1,0;

KH₂PO₄, 2,0;

MgSO₄·7H₂O, 0,5;

Базилдон 86/013K, 0,3;

лимонная кислота·1H₂O, 0,6;

ZnCl₂, 0,010;

Fe₂(SO₄) 20% H₂O, 0,025;

MnSO₄·1H₂O, 0,010;

(pH до стерилизации 5,0).

Глюкозу стерилизовали отдельно и добавляли в основной ферментер после стерилизации.

Ферментацию проводили в течение 175 ч. Значение pH среды поддерживалось примерно на 6 (±0,1) при аэрации (поток воздуха) 0,5 об/об/мин, давление воздуха составляло 0,8 бар и перемешивание - 70 об/мин. Концентрация кислорода поддерживалась на D.O.≥30% при последовательном повышении скорости перемешивания до 100 об/мин и потока воздуха до 0,9 об/об/мин.

В ферментер подавали стерильный раствор глюкозы примерно 50% (мас./мас.) для поддержания концентрации глюкозы выше 10 г/л, и примерно через 30-78 ч в ферментер подавали 625 кг 25% раствора дрожжевого экстракта со скоростью подачи, контролируемой таким образом, что концентрация аммиака составляла <30 мг/л.

Опыт повторяли четыре раза (примеры 1-4), и контролировали в течение времени концентрацию глюкозы в культуральной среде. График зависимости концентрации глюкозы в г/кг от продолжительности ферментации в часах представлен на фиг. 1. Он показывает, что последнее значение в примере 4 составляло 2,2 г/кг на время 172 ч. Это время соответствовало 3 ч до окончания ферментации (ЕоF). Концентрация глюкозы была на 0 примерно за 1 ч перед ЕоF.

В сравнительных примерах 1 и 2 концентрация источника углерода (глюкозы) была существенно выше 5 г/кг к концу ферментации. Фактически за 10 ч до ЕоF концентрация глюкозы составляла примерно 20 г/кг. Таким образом, в примерах 1 и 2 концентрация глюкозы была таковой, что она не являлась фактором, ограничивающим рост микроорганизмов или продукцию АРА.

В примерах 3 и 4 концентрация глюкозы на последней стадии ферментации, непосредственно перед ЕоF, контролировалась таким образом, что примерно за 10 ч до ЕоF уровень глюкозы составлял примерно 5 г/кг. Во время данной последней стадии, в течение 10 ч, глюкозу вносили со скоростью внесения 0,5 г/кг/ч. Концентрация глюкозы была практически нулевой при ЕоF. В данный период скорость потребления глюкозы была примерно в 2 раза выше по сравнению со скоростью внесения, а именно составляла 1 г/кг/ч.

Концентрация глюкозы (г/кг) в культуральной среде в течение времени во время ферментации представлена в табл. 1-4 (которые соответствуют примерам 1-4).

Таблица 1

Время (час)	Концентрация глюкозы г/кг
0	48,7
24	57,6
28	47,8
54	46,4
78	62,0
102	62,5
126	48,2
150	42,5
167	20

Таблица 2

Время (ч)	Концентрация глюкозы г/кг
0	47,8
28	32,5
54	32,2
78	41,3
102	49,5
126	46,8
150	29,9
165	17,1

Таблица 3

Время (ч)	Концентрация глюкозы г/кг
0	49,2
28	60,1
54	40,8
78	34,0
102	37,3
126	23,2
150	16,7
172	7

Таблица 4

Время (ч)	Концентрация глюкозы г/кг
0	45
28	34,1
54	34,7
78	29,2
102	38,1
126	45
150	23,5
172	2,2

В конце ферментации микроорганизмы и окружающую водную жидкость (ферментационный бульон) удаляли из ферментера. Бульон подвергали разделению на твердую и жидкую фазы для удаления воды. Затем оставшиеся клетки экстрадировали и подвергали экстракции гексаном. Таким образом, получали содержащее АРА масло (экстрагируемые гексаном липиды) из микробных клеток, прошедших каждую из четырех различных режимов ферментации.

Затем определяли процентное содержание АРА в масле (по массе по отношению к массе) с использованием хорошо известного аналитического метода FAME (подробно описан в AOCS Celb89). В примере 3 концентрация АРА в масле из микробных клеток составляла 508 г/кг (50,8%). Аналогичное значение в примере 4 составляло 545 г/кг (54,5% АРА). При сравнении данные показатели в масле, экстрагированном из микробных клеток в сравнительных примерах 1 и 2, были значительно ниже соответственно 36,8% и 36,7%.

Справка о депонировании микроорганизма

DSM N.Y.

Postbus 1

2600 MA DELFT

Нидерланды

Утрехт, 12 мая 2003 г.

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Утрехт, Нидерланды настоящим подтверждает, что следующий микроорганизм:

CBS 168.95 *Mortierella alpina* DS30340

депонирован в Centraalbureau voor Schimmelcultures 20 февраля 1995 г. и будет храниться конфиденциально как безопасный депозит в коллекции CBS в условиях, необходимых для поддержания его жизнеспособности и чистоты в течение 1 года после последней оплаты ежегодного взноса.

В течение времени, пока он будет храниться в виде безопасного депозита, указанный микроорганизм будет выдаваться только депозитору или лицам, уполномоченным депозитором.

Как только депозитор проинформирует CBS о том, что депонированный штамм больше не нужно сохранять, CBS - по требованию депозитора - уничтожит штамм. Данное требование CBS должна получить до конца текущего года.

Администрация CBS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Масло из микробных клеток, которое содержит по меньшей мере 50% арахионовой кислоты (ARA) и обладает по крайней мере одним из следующих свойств:

- а) имеет содержание триглицеридов по меньшей мере 90%;
- б) имеет значение перекисного числа (POV) не более 3,0;
- в) имеет значение анизидинового числа (AnV) не более 1,0;
- г) имеет содержание фосфолипидов ниже 5%.

2. Масло по п.1, которое получено при экстракции гексаном.

3. Масло по п.1 или 2, в котором содержание триглицеридов составляет по меньшей мере 90%.

4. Масло по любому из пп.1-3, которое имеет значение перекисного числа (POV) не более 3,0.

5. Масло по п.4, которое имеет значение перекисного числа (POV) не более 1,0.

6. Масло по любому из пп.1-5, которое имеет значение анизидинового числа (AnV) не более 1,0.

7. Масло по любому из пп.1-6, где содержание свободных жирных кислот составляет $\leq 0,4\%$.

8. Композиция, содержащая масло из микробных клеток по любому из пп.1-7.

9. Композиция по п.8, которая представляет собой продукт питания (такой, как детская молочная смесь), продукт питания для людей, корм или кормовую добавку, фармацевтическую, ветеринарную или косметическую композицию.

10. Композиция по п.8, которая представляет собой детскую молочную смесь.

11. Способ получения масла из микробных клеток по любому из пп.1-7, включающий культивирование микроорганизма в культуральной среде в ферментере, где ферментация разделена по меньшей мере на две стадии, причем на второй или последней стадии источник углерода добавляют со скоростью $\leq 0,30$ М углерода/кг среды в час; и скорость добавления источника углерода находится ниже скорости потребления источника углерода микроорганизмами.

12. Способ по п.11, где на указанной второй или последней стадии источник углерода добавляют со скоростью по меньшей мере 0,01 М углерода/кг среды в час.

13. Способ по п.11 или 12, где концентрация источника углерода на указанной второй или последней стадии составляет в среднем ≤ 10 г/кг среды или содержание углерода на этих стадиях составляет $\leq 0,17$ М углерода/кг среды.

14. Способ по п.11, где источником углерода является глюкоза, причем скорость добавления глюкозы в течение второй или последней стадии составляет менее 1,0 г глюкозы/кг среды в час.

15. Способ по любому из пп.11-14, где ферментацию проводят при температуре 22-30°C.

16. Способ по любому из пп.11-15, где микроорганизм представляет собой *Mortierella*.
17. Способ по п.16, где микроорганизм представляет собой *Mortierella alpina*.
18. Способ по любому из пп.11-17, который представляет собой процесс глубинной ферментации.
19. Способ по любому из пп.11-18, где во время более ранней стадии ферментации скорость добавления источника углерода превышает скорость его потребления микроорганизмами.
20. Способ по любому из пп.11-19, который включает извлечение масла из ферментированных микроорганизмов экстракцией растворителем.
21. Способ по п.20, где растворителем является гексан.
22. Способ по любому из пп.11-21, где масло подвергают рафинации и очистке.

