



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104508113 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201380034740. 0

(22) 申请日 2013. 06. 28

(30) 优先权数据

61/666, 096 2012. 06. 29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/048532 2013. 06. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/004999 EN 2014. 01. 03

(83) 生物保藏信息

PTA-12513 2012. 02. 09

PTA-12517 2012. 02. 09

PTA-12516 2012. 02. 09

PTA-12515 2012. 02. 09

PTA-12514 2012. 02. 09

PTA-12512 2012. 02. 09

PTA-12511 2012. 02. 09

PTA-12510 2012. 02. 09

PTA-12509 2012. 02. 09

PTA-12508 2012. 02. 09

PTA-12506 2012. 02. 09

PTA-12507 2012. 02. 09

(71) 申请人 BP 生物燃料英国有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

(72) 发明人 马丁·约翰·塞勒斯 大卫·杰弗斯

简-查尔斯·杜梅尼 维德娅·帕伊

雅各布·博登

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51) Int. Cl.

C12N 1/06(2006. 01)

C12P 7/64(2006. 01)

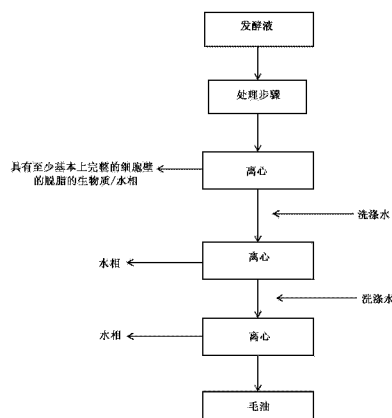
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

从微生物中分离可再生物质的方法

(57) 摘要

从微生物例如产油酵母分离可再生物质例如脂质的方法,可包括调理微生物的细胞壁以形成、打开或放大孔,并且经孔移除至少部分的可再生物质。这些方法可产生具有基本上完整的细胞壁且具有中孔的脱脂微生物。这些脱脂微生物可用于生产生物燃料。



1. 一种从微生物分离可再生物质的方法,所述方法包括:
调理含可再生物质的微生物的细胞壁以形成、打开或放大孔;以及
通过所述孔移除至少部分的可再生物质。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞壁保持至少基本上完整。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述微生物包括产油酵母。
4. 权利要求 1 ~ 3 任一项的方法,其中所述产油酵母属于如下属:红酵母属 (*Rhodotorula*)、*Pseudozyma*、或锁掷酵母属 (*Sporidiobolus*)。
5. 权利要求 1 ~ 4 任一项的方法,其中所述调理包括在约 120 摄氏度持续约 4 小时的热处理。
6. 权利要求 1 ~ 5 任一项的方法,其中所述移除包括与溶剂接触或使用机械破坏装置,所述机械破坏装置包括均化器、珠磨机、高剪切混合器、或其任意组合。
7. 权利要求 1 ~ 6 任一项的方法,其中:
基于重量,所述微生物包含至少约 20% 的所述可再生物质;并且
基于重量%,至少约 50% 的所述可再生物质在移除步骤期间穿过所述孔。
8. 权利要求 1 ~ 7 任一项的方法,其中基于数量,在调理后全部孔的至少 50% 包含中孔。
9. 一种脱脂微生物,其通过权利要求 1 ~ 8 任一项的方法制造。
10. 权利要求 9 的脱脂微生物,其中基于数量,至少约 50% 的细胞壁保持至少基本上完整。
11. 一种从产油酵母提取脂质的方法,所述方法包括:
通过热处理调理产油酵母以增加细胞壁孔隙率;以及
在细胞壁基本上完整的情况下,从所述产油酵母移除脂质。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述产油酵母在提取前包含至少约 50 重量%的脂质。
13. 权利要求 11 或 12 的方法,其中所述移除包括从所述产油酵母移除至少约 50 重量%的脂质。
14. 权利要求 11 ~ 13 任一项的方法,其中基于数量,所形成的全部孔的至少约 50% 是中孔。
15. 权利要求 11 ~ 14 任一项的方法,其中所述热处理包括高于约 80 摄氏度的温度、持续至少约 10 分钟的时间、和约 2 至约 14 的 pH 范围。
16. 一种生产生物燃料的方法,所述方法包括:
在糖上培养酵母以在所述酵母的细胞壁内积聚脂质;
调理所述酵母以形成或放大在细胞壁中的孔;
通过在细胞壁中的所述孔移除脂质;
将所述脂质与所述酵母分开;以及
将所述脂质转化为生物燃料。

从微生物中分离可再生物质的方法

[0001] 参加共同研究协议的组织的名称

[0002] 出于 35U.S.C. § 103(c) (2) 的目的, BP Biofuels UK Limited 和 Martek Biosciences Corporation 于 2008 年 12 月 18 日在可再生物质领域制定了共同研究协议。同样出于 35U.S.C. § 103(c) (2) 的目的, BP Biofuels UK Limited 和 Martek Biosciences Corporation 于 2009 年 8 月 7 日在可再生物质领域制定了共同研究协议。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于可再生物质和生物燃料生产的方法和系统。本发明的方面涉及从产油微生物提取可再生物质。

背景技术

[0004] 温室气体水平和气候变化的问题已经导致寻求利用固定碳和自由二氧化碳之间的自然循环的技术的开发。随着这些技术的进步, 已经开发了将原料转化为生物燃料的各种技术。然而, 即使有了上面的技术进步, 仍然存在需要和愿望来提高可再生碳源到燃料的转化的经济可行性。

[0005] 相对于传统石化柴油(化石柴油), 植物油来源的生物柴油燃料可具有好处例如可再生、可生物降解、无毒、且不含硫或芳香族化合物。但是, 植物油来源的生物柴油的一个潜在缺点是成本高, 大多成本是因为植物油原料的成本。因此, 生物柴油燃料生产的经济因素已经至少某种程度上被植物油原材料的成本所限制。

[0006] 用于营养产品的脂类可以在藻类中生产。在藻类中生产脂类可包括生长藻类、将其干燥、并且从中提取胞内脂质。从藻类内部提取物质很困难。

[0007] 存在对于从产油微生物中提取可再生物质的方法和系统的需要和愿望, 所述方法和系统能产生提取物质的高产率和细胞壁结构的最小破裂。

发明内容

[0008] 本发明涉及用于从产油微生物中提取可再生物质的方法和系统, 以及产生于这种方法的脱脂微生物。

[0009] 根据某些实施方式, 用于从含有可再生物质的微生物中分离可再生物质的方法可包括调理微生物的细胞壁以形成、打开或放大孔, 以及通过所述孔移除至少一部分的可再生物质。为了形成、打开、或放大细胞壁的孔, 该方法可包括使细胞壁结构和/或细胞壁成分变性。细胞壁结构和/或细胞壁成分可包含转运蛋白、整合膜蛋白、受体蛋白、凝血蛋白、抗原蛋白、隔膜、芽痕(bud scar)、装饰性(decorating)糖类、非结构性糖类、结构性糖类、葡聚糖、甘露聚糖、甘露糖蛋白、乙酰氨基葡萄糖、甲壳素、陷孔、孔帽(pore cap)、蛋白交联物、糖交联物、蛋白-糖交联物、包埋的脂质、磷脂、甘油酯、甾体、甾醇脂或其任意组合。

[0010] 根据某些实施方式, 细胞壁或细胞壁结构保持为至少基本上完整。

[0011] 可再生物质可包括生物燃料或生物燃料前体。例如, 生物燃料或生物燃料可包括

脂质、有机酸、氨基酸、乙醇、酯、烷烃、烯烃、链烯、石蜡、蜡或其组合。根据某些实施方式,生物燃料或生物燃料前体可基本上包括极性物质,而在其他实施方式中生物燃料或生物燃料前体可基本上包括非极性物质。根据某些实施方式,分配、相或层可将极性可再生物质从非极性可再生物质分开。根据某些实施方式,可再生物质包括脂质和 / 或甘油三酯。

[0012] 根据某些实施方式,可再生物质可制成食物产品、药物组合物、化妆产品、和 / 或工业组合物。可再生物质可制成的食物产品的实例包括:人类食品、动物食品、医用食品、食品添加剂、饮品、治疗性饮料、营养饮料、功能饮料、补充剂、营养食品、婴儿配方、怀孕或哺乳女人用食品、和老年食品。

[0013] 在本文中使用的微生物可包括藻类、真菌、和 / 或细菌。特别地,真菌可包括产油酵母。根据某些实施方式,产油酵母可属于红酵母属 (*Rhodotorula*)、*Pseudozyma*、或锁掷酵母属 (*Sporidiobolus*)。特别地,酵母可以是近玫色锁掷酵母 (*Sporidiobolus pararoseus*) 或牧草红酵母 (*Rhodotorula ingeniosa*)。例如,微生物可对应于如下的一种或多种: ATCC 保藏编号 PTA-12508(菌株 MK29404(Dry1-13J))、ATCC 保藏编号 PTA-12509(菌株 MK29404(Dry1-182J))、ATCC 保藏编号 PTA-12510(菌株 MK29404(Dry1-173N))、ATCC 保藏编号 PTA-12511(菌株 MK29404(Dry55))、ATCC 保藏编号 PTA-12512(菌株 MK29404(Dry41))、ATCC 保藏编号 PTA-12513(菌株 MK29404(Dry1))、ATCC 保藏编号 PTA-12515(菌株 MK29404(Dry1-147D))、或 ATCC 保藏编号 PTA-12516(菌株 MK29404(Dry1-72D))。作为另一个实例,微生物可对应于如下的一种或多种: ATCC 保藏编号 PTA-12506(菌株 MK29794(KDry16-1))、ATCC 保藏编号 PTA-12507(菌株 MK29794(KDry7))、ATCC 保藏编号 PTA-12514(菌株 MK29794(K200Dry1))、或 ATCC 保藏编号 PTA-12517(菌株 MK29794(33Dry1))。

[0014] 调理微生物的细胞壁的各种技术可包括热处理、化学处理、酶处理、和 / 或机械处理。

[0015] 处理过程可以持续任何合适的期间或时间,例如至少约 10 分钟、至少约 20 分钟、至少约 60 分钟、至少约 120 分钟、约 10 分钟至约 240 分钟、约 10 分钟至约 15 分钟、约 20 分钟至约 40 分钟、或约 30 分钟至约 180 分钟。

[0016] 处理过程可以在任何合适的温度,例如至少约 50 摄氏度、至少约 80 摄氏度、至少约 100 摄氏度、至少约 120 摄氏度、约 40 摄氏度至约 140 摄氏度、约 80 摄氏度至约 120 摄氏度、约 80 摄氏度、或约 100 摄氏度。

[0017] 处理过程可以在任何合适的压力,例如大气压、全真空、部分真空、约 0.1 巴至约 1000 巴、约 1 巴至约 100 巴、约 10 巴至约 50 巴、或约 0.1 巴至约 0.5 巴,其各自基于绝对压力。

[0018] 处理过程可以在任何合适的 pH,例如约 1 至约 14、约 2 至约 14、约 2 至约 5、小于约 7、小于约 3、约 2、大于约 9、或约 12。

[0019] 根据某些实施方式,调理可包括至少约 80 摄氏度的热处理温度。根据某些实施方式,调理可包括至少约 10 分钟的期间。根据某些实施方式,调理可包括在约 120 摄氏度、持续约 4 小时的热处理。

[0020] 通过孔移除至少部分的可再生物质可使用如下技术实现:水剂提取技术、溶剂提取技术、机械提取技术、或这些技术的任意组合。机械提取技术可包括挤、压、和 / 或榨等。

根据某些实施方式,机械提取可使用机械破坏装置进行。机械破坏装置可包括均化器、珠磨机、高剪切混和器或其任意组合。根据某些实施方式,机械破坏装置可包括珠磨机。

[0021] 根据某些实施方式,溶剂提取技术可排除机械破坏装置的使用。

[0022] 根据某些实施方式,基于处理和移除前的重量微生物可包含至少约 50%的可再生物质,并且在从微生物移除可再生物质时,基于重量百分比至少约 50%的可再生物质可以穿过孔。可再生物质从微生物的移除或分离可以为至少约 50%、至少约 60%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 50%至约 99%、约 80%至约 95%、或约 90%至约 99%。

[0023] 根据某些实施方式,调理过的微生物的提取率可提高超过未调理的微生物,例如超过未调理的微生物至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、约 20%至约 40%、约 40%至约 50%。

[0024] 根据某些实施方式,在调理和移除后,调理过的微生物的提取率可以为至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 50%至约 99%、约 80%至约 95%。

[0025] 根据某些实施方式,各自基于重量,油可提取性指数可比未调理过的微生物增加至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、约 20%至约 40%、约 40%至约 50%。

[0026] 根据某些实施方式,在调理和移除后,油可提取性指数可以为至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 50%至约 99%、约 80%至约 95%。

[0027] 根据某些实施方式,各自基于重量,油回收指数可比未调理过的微生物增加至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、约 20%至约 40%、约 40%至约 50%。

[0028] 根据某些实施方式,在调理和移除后,油回收指数可以为至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 50%至约 99%、约 80%至约 95%。

[0029] 根据某些实施方式,各自基于重量,油提取率指数可比未调理过的微生物增加至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、约 20%至约 40%、约 40%至约 50%。

[0030] 根据某些实施方式,在调理和移除后,油提取率指数可以为至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 50%至约 99%、约 80%至约 95%。

[0031] 根据某些实施方式,调理微生物细胞壁的步骤可形成包括中孔和 / 或微孔的孔。特别地,在调理之后,基于数量,至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、约 50%至约 90%、约 60%至约 80%、或约 85%的全部的孔包含中孔(以沸石表面积测量)。

[0032] 可根据在本文中描述的任一种方法生产调理过的微生物。根据某些实施方式,调理过的微生物可具有大于约 8 的沸石表面积:基质表面积的比率,而未调理的微生物的沸石表面积:基质表面积的比率可为约 2。根据某些实施方式,调理过的微生物具有约 10、约 20、约 100、约 6 至约 100、约 8 至约 20、或约 10 至约 12 的沸石表面积:基质表面积。根据

某些实施方式,未调理的微生物具有约 4、约 3、约 1、约 1 至约 4、约 1.5 至约 3、或约 2 至约 2.5 的沸石表面积:基质表面积。其中使用来自多相催化测量的分析技术测量沸石表面积和基质表面积。

[0033] 可根据在本文中描述的任一种方法生产耗尽的 (depleted) 或脱脂的微生物。根据某些实施方式,在这些方法中,脱脂微生物的细胞壁可保持至少基本上完整。更特别地,基于数量,至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、约 10%至约 99%、约 40%至约 90%、或约 70%至约 90%的细胞壁可保持至少基本上完整。

[0034] 根据某些实施方式,细胞壁孔指在细胞壁中穿过完整细胞壁结构的洞、开口、或缝隙,使得物质可经所述孔被运输穿过细胞壁。

[0035] 根据某些实施方式,基本上完整指的是至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、约 50%至约 80%、约 50%至约 60%、约 60%的细胞壁结构维持结构完整性。

[0036] 可根据在本文中描述的任一种方法生产可再生物质。

[0037] 根据某些实施方式,从产油酵母中提取脂质的方法可包括使用热处理调理产油酵母以增加细胞壁孔隙率,和在细胞壁保持至少基本上完整或可选地完全完整的情况下从产油酵母中移除脂质。

[0038] 可使用多种技术从产油酵母移除脂质,例如溶剂提取或机械处理。

[0039] 根据某些实施方式,在提取前产油酵母可包含至少约 50 重量%脂质。此外,当从产油酵母移除脂质时,可从产油酵母移除至少约 50 重量%的脂质。

[0040] 根据某些实施方式,调理产油酵母可包括形成包括中孔和微孔的孔。例如,基于数量,至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至少约 90%的形成的全部的孔可以为中孔(按沸石表面积测量)。

[0041] 根据某些实施方式,产油酵母可包括在调理前约 2 的沸石表面积:基质表面积比率,和在调理后约 8 的沸石表面积:基质表面面积的比率。

[0042] 用以调理产油酵母的热处理可包括例如高于约 80 摄氏度的温度、大于约 10 分钟的时间、和约 2 至约 14 的 pH。

[0043] 用以从产油酵母移除脂质的机械处理可包括例如使用均化器、珠磨机、高剪切混和器、压力机 (press)、挤压机、压力破坏、湿磨法、低温研磨法、和 / 或干磨法。

[0044] 可使用在本文中描述的任一种方法生产生物燃料。

[0045] 根据某些实施方式,脱脂的酵母可具有基本上完整且其中有中孔的细胞壁。

[0046] 根据某些实施方式,脱脂的酵母可具有少于约 20 重量%的脂质剩余在细胞中。根据某些实施方式,相对于未调理的细胞的全部的脂质含量,脱脂的酵母在移除后可具有约 10 至约 30 重量%的脂质剩余在细胞中。

[0047] 根据某些实施方式,至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95%的细胞壁可以是基本上完整的。根据某些实施方式,脱脂的酵母可以具有约 40 ~ 约 80%的基本上完整的细胞壁。

[0048] 根据某些实施方式,基于数量,脱脂的酵母可具有全部孔的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至

少约 90% 的最终中孔含量。根据某些实施方式,脱脂的酵母可具有全部孔的约 50% 至约 90% 的最终中孔含量。

[0049] 根据某些实施方式,用于生产生物燃料的混合物可包含具有基本上完整的细胞壁的脱脂产油微生物和脂质材料。

[0050] 根据某些实施方式,用于生产生物燃料的生产设施可包括脂质积聚单元、与该脂质积聚单元流体相通的脂质提取单元,其中脂质提取单元包括细胞调理装置和脂质分离装置。细胞调理装置可包括一个或多个传热设备(例如热交换器),脂质分离装置可包括一个或多个提取设备。根据某些实施方式,提取设备可包括机械破坏装置。

[0051] 根据某些实施方式,生产生物燃料的方法可包括:在糖溶液中培养酵母以在酵母的细胞壁内积聚脂质;调理酵母以形成或放大在细胞壁中的孔;通过在细胞壁中的孔移除脂质;将脂质与酵母分开;以及例如通过氢化处理或酯交换反应将脂质转化为生物燃料。

附图说明

[0052] 并入本说明书并构成本说明书一部分的附图,示出了本发明的实施方式,并且与说明一起,用于解释本发明的特征、优点和原理。在图中:

[0053] 图 1 是示出了从产油微生物提取可再生物质的方法的一个实施方式的方法流程图。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明提供了从产油微生物提取可再生物质的方法和系统,其可以理想地产生提取的物质的低产率和细胞与细胞壁结构的最小破裂。可再生物质可用在生物燃料生产中。从微生物生产生物燃料可比从植物(包括含油种子)生产生物燃料具有很多优点,例如短的生命周期、较少的劳力需求、不依赖于季节和气候、和易于扩大规模。微生物的培养也不需要大面积的农田且与食品生产的竞争较小。

[0056] 在本文中使用时,术语“可再生物质”优选地指至少部分源自能够至少部分被自然生态循环和/或资源替代的来源和/或方法的物质和/或物品。可再生物质可广泛地包括例如化学品、化学中间体、溶剂、粘合剂、润滑剂、单体、低聚体、聚合物、生物燃料、生物燃料中间体、生物汽油、生物汽油掺混储料、生物柴油、绿色柴油、可再生柴油、生物柴油掺混储料、生物馏出物、生物碳、生物焦炭、生物油、和/或可再生建筑材料等。作为更具体的实例,可再生物质可包括但不限于如下的任一种或多种:甲烷、乙醇、正丁醇、异丁醇、2-丁醇、脂肪醇、异丁烯、类异戊二烯、甘油三酯、脂质、脂肪酸、乳酸、乙酸、丙二醇、丁二醇。根据某些实施方式,可再生物质可包括一种或多种生物燃料组分。例如,可再生物质可包括醇类,例如乙醇、丁醇或异丁醇或脂质。在某些实施方式中,可再生物质可以来自活的有机体,例如藻类、细菌、和/或真菌等。根据某些实施方式,可再生物质是脂质,例如具有至少某种程度上与油菜籽油相似的碳链长度属性的脂肪酸。

[0057] 术语“生物燃料”优选地指适合用作至少部分源自可再生资源的燃料和/或燃烧源的组分和/或物流。例如当与化石燃料相比时,生物燃料能够可持续地生产,和/或向大气的净碳排放(总碳生命周期)减少和/或无净碳排放。根据某些实施方式,可再生资源可以排除例如从地下开采或钻探的材料。在某些实施方式中,可再生资源可包括单细胞有机体、多细胞有机体、植物、真菌、细菌、藻类、耕种的农作物、非耕种的农作物、和/或木材等。

[0058] 根据某些实施方式,可再生资源包括微生物。生物燃料可适合用作运输燃料,例如用于地面运输工具、海上运输工具、和 / 或空中运输工具等。更特别地,生物燃料可包括汽油、柴油、喷气燃料、和 / 或煤油等。生物燃料可适合用于能源生成,例如产生蒸汽、与合适的热交换媒介交换能量、生成合成气、生成氢气、和 / 或生产电力等。根据某些实施方式,生物燃料是生物柴油和汽油柴油的掺混物。

[0059] 在本文中使用时,术语“生物柴油”指适合直接使用和 / 或掺混到柴油池中的组分或物流,和 / 或源自可再生资源的十六烷供给。合适的生物柴油分子可包括脂肪酸酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、脂质、脂肪醇、烷烃、石油脑、馏分范围物质、石蜡物质、芳香物质、和 / 或脂肪族化合物(直链的、支链的和 / 或环状的)等。生物柴油可用在压缩点火引擎,例如汽车柴油内燃引擎、和 / 或卡车重型柴油引擎等。可选地,生物柴油还可用在气体涡轮机、加热器、和 / 或热水器等。根据某些实施方式,生物柴油和 / 或生物柴油掺混物达到或遵守工业认可的燃料标准,例如 B5、B7、B10、B15、B20、B40、B60、B80、B99.9、和 / 或 B100 等。

[0060] 根据某些实施方式,可再生柴油(氢化处理的)和 / 或可再生柴油掺混物达到或遵守工业认可的燃料标准,例如 B5、B7、B10、B15、B20、B40、B60、B80、B99.9、和 / 或 B100 等。

[0061] 在本文中使用时,术语“脂质”指油、脂肪、石蜡、油脂、胆固醇、甘油酯、甾体、磷脂、脑苷脂、脂肪酸、脂肪酸相关的化合物、脂肪酸衍生的化合物、和 / 或其他油性物质等。脂质可以在活细胞中制造,并且可具有相对高的碳含量和相对高的氢含量以及相对低的氧含量。例如基于重量,脂质通常包括相对高的能量含量。

[0062] 在本文中使用时,术语“有机体”指相互依赖和附属的要素的至少相对复杂的结构,所述要素的关系和 / 或性质极大地由它们在整体中的功能所决定。有机体可包括设计为与功能上分离但相互依赖的元件一起进行生命活动的个体。有机体可包括例如能够生长、和 / 或繁殖等的生命体。根据某些实施方式,微生物包括单细胞(单细胞的)、细胞团、或多细胞相对复杂的有机体。

[0063] 有机体可包括任何合适的简单(单)细胞体、和 / 或复杂(多)细胞体等。有机体可包括藻类、真菌(包括酵母)、和 / 或细菌等。有机体可包含微生物,例如蓝细菌、细菌或原虫。有机体可包含一种或多种天然存在的有机体、一种或多种基因修饰的有机体、和 / 或天然存在的有机体和基因修饰的有机体的组合等。多种不同有机体的组合的实施方式在本公开的范围内。可以使用任何合适的组合或有机体类型或种类,例如一种或多种有机体(酵母和细菌、不同的属、不同的种类、或不同的变体)、至少约 2 种有机体类型、至少约 5 种有机体类型、和 / 或约 2 种有机体类型至约 20 种有机体类型等。

[0064] 在一个实施方式中,有机体可以为真菌界的单细胞成员,例如酵母。可以使用的产油酵母的实例包括但不限于以下产油酵母:假丝酵母(*Candida apicola*)、假丝酵母属物种(*Candida sp.*)、弯曲隐球菌(*Cryptococcus curvatus*)、陆生隐球菌(*Cryptococcus terricolus*)、*Debaromyces hansenii*、*Endomycopsis vernalis*、*Geotrichum carabidarum*、*Geotrichum cucujoidarum*、*Geotrichum histendarum*、林生地霉(*Geotrichum silvicola*)、*Geotrichum vulgare*、*Hyphopichia burtonii*、产油油脂酵母(*Lipomyces lipofer*)、*Lipomyces orentalis*、斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi*)、*Lipomyces*

tetrasporous、西哥毕赤酵母 (*Pichia mexicana*)、*Rodosporidium sphaerocarpum*、圆红冬孢酵母 (*Rhodosporidium toruloides*)、*Rhodotorula aurantiaca*、*Rhodotorula dairenensis*、*Rhodotorula diffluens*、胶红红酵母 (*Rhodotorula glutinus*)、黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、*Rhodotorula gracilis*、禾本红酵母 (*Rhodotorula graminis*)、小红酵母 (*Rhodotorula minuta*)、粘质红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)、粘质红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)、*Rhodotorula terpenoidalis*、*Rhodotorula toruloides*、*Sporobolomyces alborubescens*、*Starmerella bombicola*、*Torulaspora delbruekii*、*Torulaspora pretoriensis*、毛孢子菌 (*Trichosporon behrend*)、固定化酵母 (*Trichosporon brassicae*)、*Trichosporon domesticum*、*Trichosporon laibachii*、*Trichosporon loubieri*、*Trichosporon loubieri*、丝孢酵母 (*Trichosporon montevidense*)、茁芽丝孢酵母 (*Trichosporon pullulans*)、*Trichosporon sp.*、*Wickerhamomyces canadensis*、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和 *Zygoascus meyeriae*。

[0065] 有机体能够在任何合适的条件例如厌氧、好氧、光合、和 / 或异养等条件下操作、作用和 / 或生存。根据某些实施方式,酵母可以在空气存在下非自养地培养。

[0066] 在本文中使用时,术语“产油”指载油、含油和 / 或生产油、脂质、脂肪和 / 或其他油状物质。产油可包括有机体,其制造有机体总重量的至少约 20 重量%的油、至少约 30 重量%的油、至少约 40 重量%的油、至少约 50 重量%的油、至少约 60 重量%的油、至少约 70 重量%的油、至少约 80 重量%的油等。产油可指在培养、脂质积聚期间、和 / 或在收获条件下等的微生物。

[0067] 通过改变微生物的细胞壁结构,可以从产油微生物中提取或分离可再生物质。微生物细胞壁可含有在结构内的小孔,例如用于细胞物质的扩散。使用根据某些实施方式的调理,可以使用下面详细描述的各种技术将这些孔增加数目、尺寸和 / 或渗透性。在微生物细胞壁内的孔的数目、尺寸和 / 或渗透性的增加使得可以从微生物内部结构内提取或移除可再生物质。与从微生物提取可再生物质的其他方法相比,在本文中描述的方法可产生提取的物质的较高的产率和 / 或细胞和 / 或细胞壁结构的最小破裂。

[0068] 一般来讲,通过调理微生物的细胞壁以形成、打开和 / 或放大孔,可从微生物分离可再生物质。一旦孔达到足够的状态(例如足够大以允许可再生物质或脂质穿过),至少一部分的可再生物质可经孔从微生物移除且无需破裂细胞壁结构。根据某些实施方式,细胞壁破裂包括具有至少约 50% 的细胞直径的长度或直径的洞、撕裂或开口。根据某些实施方式,至少基本上完整的细胞壁排除了裂解的细胞。

[0069] 调理微生物的细胞壁以形成、打开或放大孔可包括使细胞壁结构和 / 或组分变性。细胞壁结构和 / 或组分可包括但不限于,转运蛋白、整合膜蛋白、受体蛋白、凝集蛋白、抗原蛋白、隔膜、芽痕、装饰性糖类、非结构性糖类、结构性糖类、葡聚糖、甘露聚糖、甘露糖蛋白、乙酰氨基葡萄糖、甲壳素、陷孔、孔帽、蛋白交联物、糖交联物、蛋白-糖交联物、包埋的脂质、磷脂、甘油酯、甾体、甾醇酯和其任意组合。

[0070] 用于调理细胞壁的处理步骤可包括热处理、化学处理、酶处理、和 / 或机械处理。这些处理步骤可包括温度的合适调节、蒸汽爆破、酸处理、碱处理、溶剂选择、和各种其他技术。例如,热处理可以在至少约 80 摄氏度的温度进行。任何的这些调理处理可以进行至少

约 10 分钟的持续时间。另外,任何的这些调理处理可以在约 2 至约 14 的 pH 范围内进行。

[0071] 作为实例,热处理可以在约 120 摄氏度的温度下进行约 4 小时。通过调理细胞壁以增加孔尺寸、孔数、和 / 或细胞壁渗透性,在微生物中的物质能够扩散穿过改性的细胞壁以允许可再生物质的回收。此外,因为仅仅改性且非毁坏细胞壁,细胞本身可保持至少基本完整。

[0072] 在调理后,形成的或放大的孔可包括大孔、中孔和 / 或微孔。根据某些实施方式,如沸石表面积测量,中孔具有约 2 纳米~约 50 纳米的直径,而微孔具有小于约 2 纳米的直径。

[0073] 根据某些实施方式,调理过的微生物包含孔,其具有的平均孔径为至少约 4 纳米、至少约 10 纳米、至少约 20 纳米、至少约 40 纳米、至少约 50 纳米、至少约 80 纳米、约 4 纳米、约 10 纳米、约 20 纳米、约 40 纳米、约 4 纳米至约 40 纳米、约 6 纳米至约 20 纳米、或约 2 纳米至约 10 纳米。

[0074] 根据某些实施方式,平均孔径相对调理过的微生物的平均细胞直径的比率为至少约 0.01、至少约 0.05、至少约 0.1、约 0.2、约 0.01 至约 0.1、约 0.05 至约 0.1、或约 0.1。

[0075] 根据某些实施方式,基于孔的总数量,至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至少约 90%、约 50%至约 90%、约 70%至约 90%、或约 80%至约 90%的细胞壁中的全部的孔在调理后为中孔。

[0076] 根据某些实施方式,调理过的微生物可具有大于约 8 的沸石表面积:基质表面积的比率,而未调理的微生物的沸石表面积:基质表面积的比率为约 2。例如,产油酵母在调理前可具有约 2 的沸石表面积:基质表面积比率,在调理后具有约 8 的沸石表面积:基质表面积比率。

[0077] 其上可实施本文中方法的微生物包括但不限于藻类、真菌和细菌。例如合适的真菌可包括产油酵母,例如属于红酵母属、*Pseudozyma*、或锁掷酵母属的那些。

[0078] 根据某些实施方式,酵母属于近玫色锁掷酵母 (*Sporidiobolus pararoseus*) 属。在具体实施方式中,公开的微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12508(菌株 MK29404(Dry1-13J)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12509(菌株 MK29404(Dry1-182J)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12510(菌株 MK29404(Dry1-173N)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12511(菌株 MK29404(Dry55)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12512(菌株 MK29404(Dry41)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12513(菌株 MK29404(Dry1)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12515(菌株 MK29404(Dry1-147D)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12516(菌株 MK29404(Dry1-72D)) 的微生物。

[0079] 在其他实施方式中,酵母属于牧草红酵母 (*Rhodotorula ingeniosa*) 属。在具体实施方式中,公开的微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12506(菌株 MK29794(KDry16-1)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,公开的微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12507(菌株 MK29794(KDry7)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,公开的微生物是对应于 ATCC 保藏编号 PTA-12514(菌株 MK29794(K200Dry1)) 的微生物。在另一个具体实施方式中,公开

的微生物是对应于至 ATCC 保藏编号 PTA-12517 (菌株 MK29794 (33Dry1)) 的微生物。

[0080] 可使用包括但不限于如下的多种处理的任何一种或多种从微生物经孔移除可再生物质：水剂提取技术（例如 pH 调节）、溶剂提取技术（例如极性或非极性）和机械提取技术。在图 1 中示出提取方法的一个实例，其产生增加的孔或渗透性。机械提取技术或机械处理的实例包括挤、压、和 / 或榨等。机械破坏装置，例如均化器、珠磨机、高剪切混和器、压力机、挤压机、压力破坏器、湿磨机、干磨机等，也可用于辅助从微生物移除可再生物质和产生具有基本上完整的细胞壁的细胞碎片。根据某些实施方式，溶剂提取技术可排除机械破坏装置的使用。

[0081] 如在本文中描述的，通过调理微生物，调理过的微生物的提取率对未调理的微生物可显著地调高。根据某些实施方式，由于移除处理，包含基于重量至少约 50% 的可再生生物质的微生物可具有至少约 50 重量%的可再生物质穿过孔。例如，在提取前包含至少约 50 重量%脂质的产油酵母可具有至少约 50 重量%的脂质穿过孔。根据某些实施方式，相对于未调理的细胞，脱脂的酵母可具有少于约 20 重量%的脂质剩余在细胞内。

[0082] 存在可用于测量微生物的孔隙率和渗透性的多种技术，包括：荧光染料和流式细胞术（例如荧光素二乙酸酯和溴化乙锭）；使用外部探测分子（例如二醇和聚二醇）测量微生物筛分性质；冻干微生物的氮取代和氮吸附；聚阳离子试验（例如测量 DEAE-Dextran 在 260nm 的吸收）；以及 HP 凝胶过滤。

[0083] 用于表征描述的微生物的性能的一个度量是脂肪酸可提取性，或 FAE。根据本公开的任何微生物的 FAE 可以根据下式计算：

[0084]

$$\frac{\ell}{b \times C_{\text{生物质}}} = 1 - \left(\frac{c_{\text{生物粗料}} \times (100 - C_{\text{生物质}})}{C_{\text{生物质}} \times (100 - c_{\text{生物粗料}})} \right)$$

[0085] 其中 b 是在调理和移除步骤后的总生物质，通常以克计量；

[0086] $C_{\text{生物质}}$ 是在调理和移除步骤前的 FAME 百分比，其中 $C_{\text{生物质}}$ 计算为 FAME 总克数除以生物质总克数；在此使用的术语“FAME”指脂肪酸甲酯；

[0087] $c_{\text{生物粗料}}$ 是在调理和移除步骤后的 FAME 百分比，其中 $c_{\text{生物粗料}}$ 计算为 FAME 总克数除以生物粗料 (biomeal) 总克数；以及

[0088] 1 是在调理和移除步骤后但在油回收步骤之前的油的总质量，通常以克计量。

[0089] 根据某些实施方式，在本文中描述的方法可导致微生物的油或脂肪酸可提取性指数的增加。例如，所述方法可导致微生物的 FAE 指数增加至少约 10%。根据某些实施方式，FAE 指数的增加可以为至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、或至少约 40 重量%。

[0090] 根据某些实施方式，在用己烷回收油后，测量油的质量 (L)。同样测量用己烷回收油后的 FAME。在某些实施方式中，如在本领域已知，在 FAME 处理之前对样品进行真空蒸发。

[0091] 根据本公开的任何微生物的油提取率可根据下式计算：

[0092]

$$100 \times \frac{L \times C_{\text{油}}}{B \times C_{\text{生物质}}}$$

[0093] 其中 B 是调理和移除步骤之前的总生物质，通常以克计量；

[0094] $C_{\text{生物质}}$ 是调理和移除步骤之前的 FAME 百分比, 其中 $C_{\text{生物质}}$ 计算为 FAME 总克数除以生物质总克数;

[0095] $C_{\text{油}}$ 是调理和移除以及油回收步骤之后的 FAME 百分比, 其中 $C_{\text{油}}$ 按 FAME 总克数除以油总克数计算; 以及

[0096] L 是调理和移除以及油回收步骤之后的油的总质量, 通常以克计量。从微生物或发酵液获取这些测量在本领域普通技术人员的能力之内。

[0097] 根据某些实施方式, 在本文中描述的方法可导致微生物的油提取率的增加。例如, 所述方法可导致微生物的油提取率增加至少约 10 重量%。根据某些实施方式, 油提取率的增加可以为至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、或至少约 40 重量%。

[0098] 油回收指数是油提取率相对油可提取性的比例。根据某些实施方式, 在本文中描述的方法可导致至少约 10 重量%的油回收指数增加。根据某些实施方式, 油回收指数的增加可以为至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、或至少约 40 重量%。

[0099] 通过细胞壁的调理和可再生物质经孔的移除, 细胞壁可保持至少基本上完整。根据某些实施方式, 基于数量, 至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95% 的细胞壁保持至少基本上完整。根据某些实施方式, 基于数量, 约 50%~约 80% 的细胞壁保持完整。

[0100] 根据某些实施方式, 在调理和移除之后, 基于数量, 微生物可能最后具有全部孔的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至少约 90% 的最终中孔含量。根据某些实施方式, 微生物具有全部孔的约 50%~约 90% 的最终中孔含量。

[0101] 本文中公开的可再生物质可用于生产食品、补充剂、化妆品、或非人类动物或人用药物组合物。可再生物质可制造为如下的非限制性实例: 食物产品、药物组合物、化妆品、和工业组合物。根据某些实施方式, 可再生物质是生物燃料或生物燃料前体。

[0102] 食物产品是为了动物或人类食用的任何食物, 且包括固体和液体组合物两者。食物产品可以是动物或人类食物的添加剂, 且包括医疗食品。食品包括但不限于: 普通食品; 液体食品, 包括奶、饮品、治疗性饮料、和营养饮料; 功能食品; 补充剂; 营养食品; 婴儿配方, 包括未成熟婴儿的配方; 怀孕或哺乳女人用食品; 成人食品; 老年食品; 和动物食品。在某些实施方式中, 在本文中公开的微生物、可再生物质、或其他生物产品可直接用作添加剂或作为添加剂包括在如下的一种或多种里面: 油、酥油、酱、其他脂肪成分、饮品、调味汁、基于乳品或基于大豆的食品(例如奶、酸奶、奶酪和冰淇淋)、烘烤食品、营养产品例如营养补充剂(以胶囊或片剂形式)、维他命补充剂、饮食补充剂、粉状饮品、加工的或半加工的粉状食物产品、和其组合。

[0103] 如上所述, 可再生物质可以为生物燃料或生物燃料前体。更特别地, 可再生物质可包括脂质、有机酸、氨基酸、醇、酯、烷烃、烯烃、链烯、石蜡、蜡、或其任意组合。根据某些实施方式, 可再生物质可基本上包括极性物质, 或基本上非极性物质。根据某些实施方式, 分配(partition)、相、或层可将极性可再生物质与非极性可再生物质分开。

[0104] 生产生物燃料的方法也包括在本文中。根据某些实施方式, 生产生物燃料的方法包括: 在糖上培养酵母以在酵母的细胞壁内积聚脂质; 调理酵母以形成或放大在细胞壁中的孔; 通过在细胞壁中的孔移除脂质; 将脂质与酵母分开; 以及将脂质转化为生物燃料。例

如,脂质可通过使用氢化处理或酯交换反应转化为生物燃料。生产生物燃料的混合物可包含具有基本上完整的细胞壁的脱脂的产油微生物,以及脂质材料。

[0105] 根据某些实施方式,本发明可涉及生产生物燃料的生产设施。根据某些实施方式,生产设施可包括脂质积聚单元、与该脂质积聚单元流体相通的脂质提取单元。脂质提取单元可包括细胞调理装置和脂质分离装置。细胞调理装置可包括一个或多个传热设备。脂质分离装置可包括一个或多个提取设备。

[0106] 根据某些实施方式,本发明可涉及根据在本文中描述的任何方法制造的脱脂的微生物、可再生物质、和 / 或生物燃料。

[0107] 实施例 1

[0108] 在这个实施例中,微生物 MK 29404 - Dry 1 在蔗糖限定的培养基的发酵液中。在调理步骤期间,将发酵液在 80℃ 加热 3 小时,之后圆筒干燥含有微生物的发酵液。在移除步骤期间,在没有混合的情况下,圆筒干燥的材料随后以介于 1:5 和 1:12 之间的比率(油:己烷)室温下浸泡在己烷中,持续 30 分钟到 1 天。这导致介于 33% 和 43% 之间的油可提取性,通过分析残余生物质和确定溶于溶剂的油的量而确定。这一材料在显微镜下观察并且大于 95% 的细胞看上去是完整的,即没有细胞破坏。

[0109] 实施例 2

[0110] 在这个实施例中,微生物 MK 29404 - Dry 1 在蔗糖限定的培养基的发酵液中。在调理步骤期间,含有微生物的发酵液通过珠磨机在 380ml/ 分钟处理 3 次(通过 3 次)。在移除步骤期间,将材料的样品干燥(使用冻干机)并且分析油可提取性。通过用己烷(30ml)洗涤干燥样品(3g)和确定样品的脂肪含量,确定油可提取性,得出的油可提取性为约 85%。

[0111] 实施例 3

[0112] 在这个实施例中,微生物 MK 29404 - Dry 1 在蔗糖限定的培养基的发酵液中。在调理步骤期间,在另外的温度预处理前,将发酵液在 80℃ 加热 1 小时。发酵液的一部分(80L 发酵液中的 10L)的温度预处理在 121 摄氏度进行 4 小时。在移除步骤期间,将材料的样品干燥(使用冻干机)并且分析油可提取性。通过用己烷(30ml)洗涤干燥样品(3g)和确定样品的脂肪含量,确定的预处理的发酵液的油可提取性为 >76%,这比在实施例 1 中的样品有提高。

[0113] 然后,预处理的发酵液以 380ml/ 分钟的速率穿过珠磨机(通过 1 次),所得的样品具有 >93% 的油可提取性。如在实施例 1 中,通过视觉检查,在经珠磨机处理之前,细胞看起来是完整细胞。

[0114] 在这个实施例中的方法也是对实施例 2 的改进,因为样品经受 1 次通过而非 3 次通过,所以在较少机械破坏的情况下实现了较高的油可提取性。

[0115] 实施例 4

[0116] 在这个实施例中,将巴氏消毒的全细胞酵母生物物质的 3 个样品进行调理和比较。在分析前将各个样品抽空许多天,并且各个样品经受 4 次精炼步骤。氩气用于多微孔分析(87.3 凯氏度数)。将数据提供在表 1 中,包括三个样品各自的可提取油(Ex. 油)、总比表面积(TSA): m^2/gm 、基质(中孔)比表面积(MSA): m^2/gm 、沸石(微孔)比表面积(ZSA): m^2/gm 、沸石表面积 / 基质表面积比率(Z/M)、以及沸石表面积 / 总表面积比率(Z/TSA)。

[0117] 表 1 :调理后生物质评价

[0118]

	处理	Ex. 油	TSA	MSA	ZSA	TPV	Z/M	Z/TSA
1	80℃, 3 小时	40%	10. 696	1. 052	9. 644	0. 0067	9. 17	0. 90
2	121℃, 4 小时	54%	9. 11	0. 672	8. 429	0. 0035	12. 54	0. 93
3	121℃, 4 小时	85%	14. 249	0. 72	13. 53	0. 0035	18. 79	0. 95

[0119] 如在表 1 中所示,每种情况下,调理过的样品的沸石表面积 / 基质表面积比率高于 8。

[0120] 对本领域的技术人员将是显而易见的是,在不背离本发明范围或主旨的情况下,在公开的结构和方法中可作出各种修改和变化。特别地,任何一个实施方式的描述可以自由地与其他实施方式的描述相结合,以产生两种或多种要素或限制的组合和 / 或变化。出于在本文中公开的本发明的说明和实践的考虑,本发明的其他实施方式对于本领域的技术人员显而易见。目的是,说明书和实施例仅考虑为例示性的,本发明的真实的范围和主旨指示在权利要求书中。

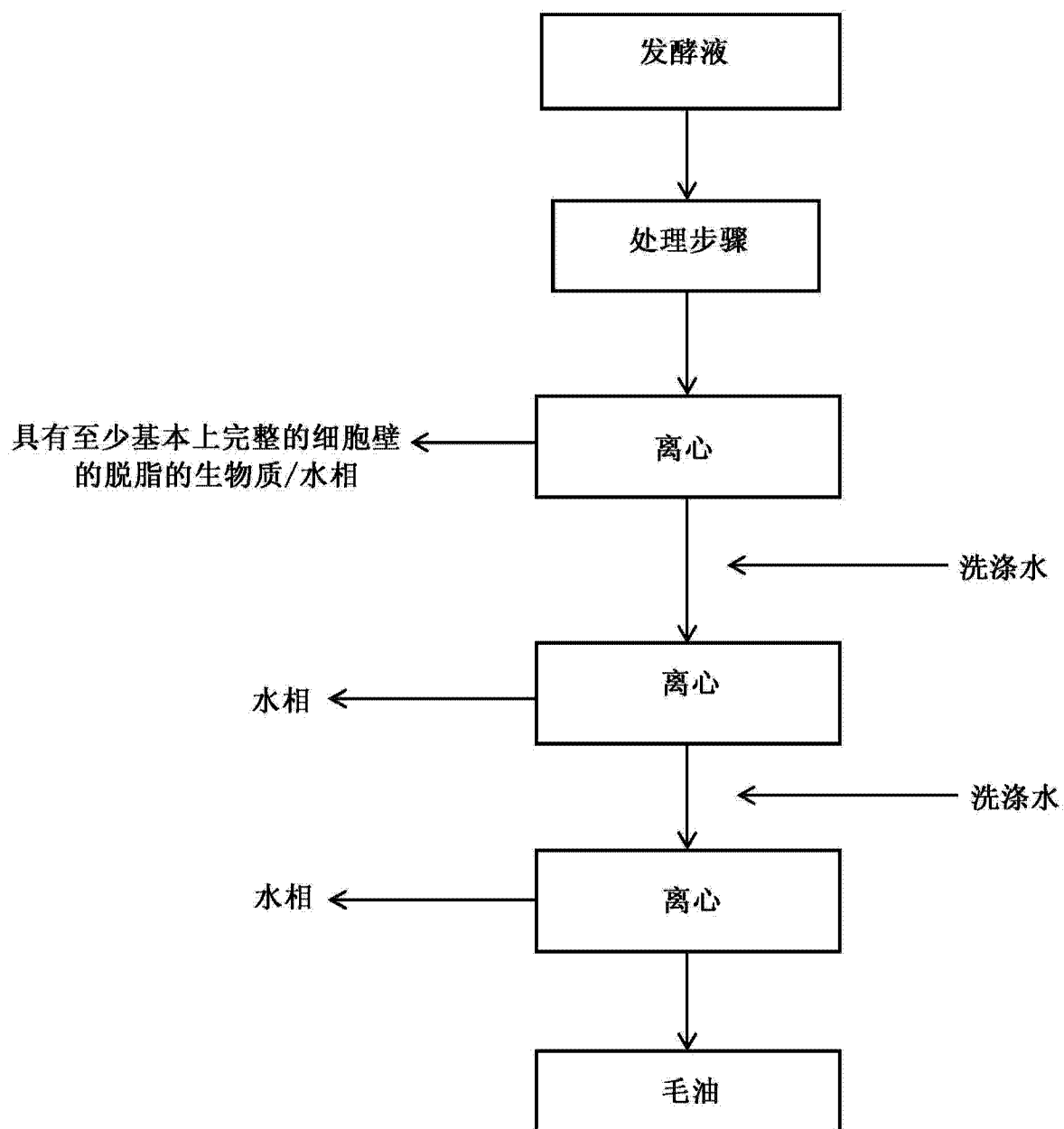


图 1