



Производство недорогого протеина одноклеточных с Омега-3

Алексей Аблаев
НаноТайга
Москва, Россия
info@nanotaiga.ru

Эдвард Хэмрик
Hamrick Engineering
Майами, США
info@cellofuel.com

Agenda

- История ферментера с пенообразованием
- Производство дрожжей Torula с Омега-3
- Текущий рынок дрожжей Torula (Lallemand)
- Важность Омега-3
- Почему американцы толстые?
- Полезный и вредный жир
- Мировые источники углеводов
- Что нового в ферментерах компании CelloFuel?
- Контроль контаминации
- Патентный статус
- Статус проекта

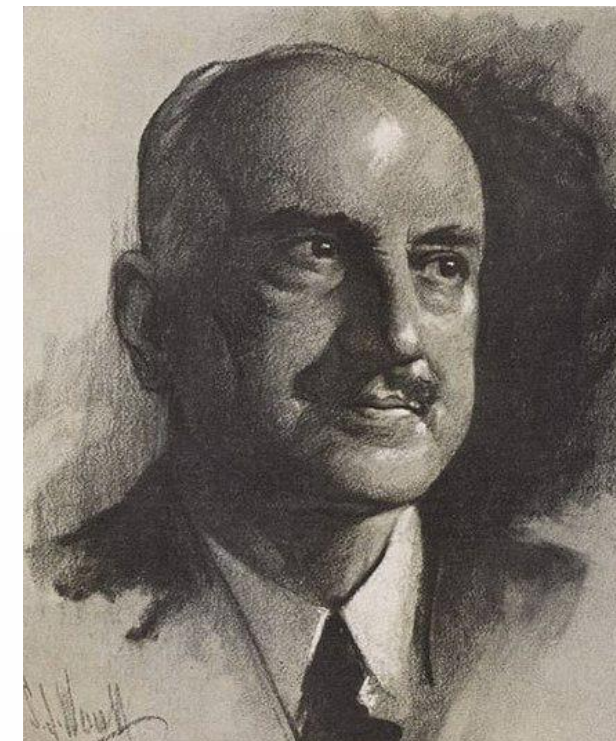
История ферментера с пенообразованием

George Santayana

Those who cannot remember the
past are condemned to repeat it.

Джордж Сантаяна

Те, кто не помнит прошлого,
обречены повторять его.



Как «Зева» связана с самым важным изобретением в производстве одноклеточного белка в 20 веке?



Zellstoffabrik Waldhof

Вальдхофский
целлюлозный завод

Pulp mill Waldhof



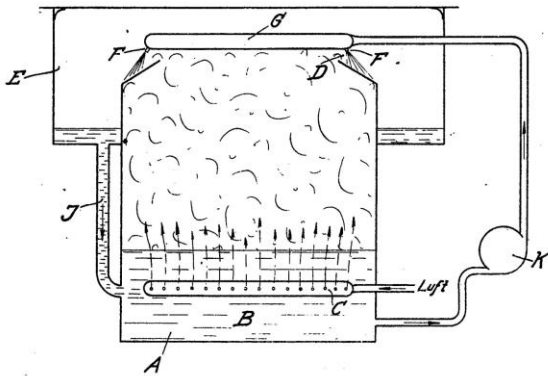
Germany, 1937-1945

- Во время Второй мировой войны Германия испытывала нехватку топлива, белков и жиров.
- На немецких бумажных фабриках было много избыточного сахара как побочного продукта сульфитного процесса.
- При производстве бумаги из древесины хвойных пород (ели) содержался избыток сахаров С6 (глюкоза/манноза), а в результате анаэробной ферментации этанол использовался в качестве топлива.
- Изготовление бумаги из лиственных пород (березы) содержало избыток сахара С5 (ксилозы), который не поддавался ферментации, поэтому его использовали для производства белка из *Candida utilis*.
- Ферментеры производили слишком много пены, а в Германии было мало жира для пеногашения, поэтому в 1939 году на Zellstofffabrik Waldhof был изобретен ферментер с пенообразованием, производивший десятки тысяч тонн белка, в конечном итоге во многих местах Германии.
- В 1950-х годах Вальдхоф перешел на сжигание излишков отработанного сульфитного щелока, белок больше не был нужен и не приносил прибыль.
- Ферментеры Waldhof больше никогда не использовались в Германии, но сегодня вы можете купить их в Китае на [Alibaba.com](https://www.alibaba.com).

Предыдущие решения – ферментеры с пенообразованием

1937 – Stob Fermenter

Zu der Patentschrift 681 847
Kl. 6a Gr. 14



1940 – Waldhof Fermenter

Zu der Patentschrift 759 121
Kl. 6a Gr. 15 0a

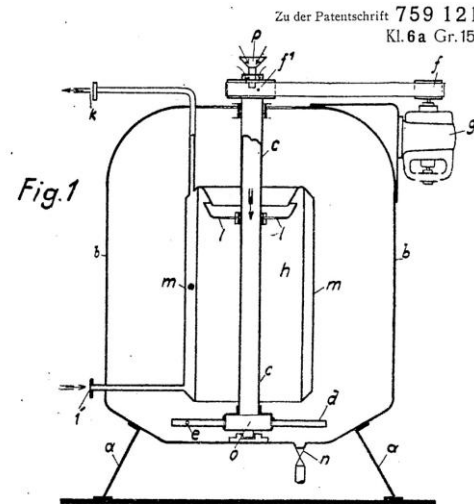


Fig. 2

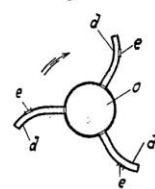


Fig. 3

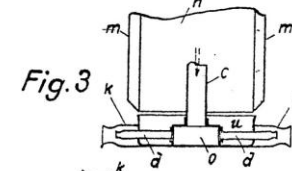
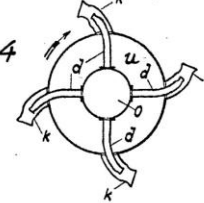


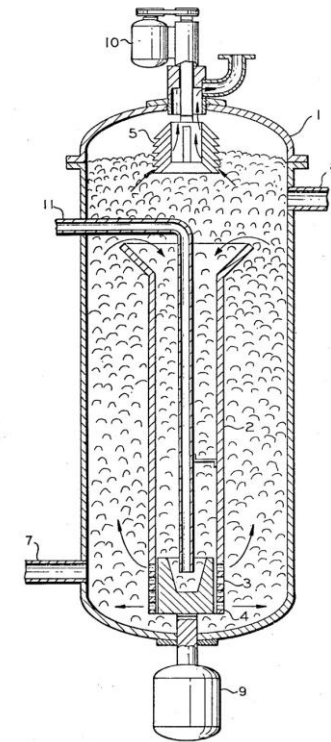
Fig. 4



1976 – Phillips Petroleum

U.S. Patent Sept. 28, 1976

3,982,998



США, 1945-1965, ферментеры с пенообразованием

- Вальдхоф находится недалеко от Мангейма, который после войны находился в американском секторе, и американские инженеры опросили инженеров Вальдхофа и сделали копии всех чертежей этого ферментера.
- Ферментеры Waldhof были построены на сульфитных заводах в районе Великих озер (Райнлендер, Висконсин), большая часть древесины была твердой древесины.
- Было не очень прибыльно, но очищали воду с сульфитных производств целлюлозы.
- В конце концов большинство сульфитных заводов закрылись, доминирующими стали заводы по производству крафт-целлюлозы, остался только один ферментер Waldhof (Rhineland).
- В 1947 году Э. Шмидт, бывший директор Вальдхофа, опубликовал полное техническое описание событий в Вальдхофе, сомневаясь, что кто-нибудь в США когда-либо его читал.
- Шмидт, Э. «Eiweiß-und Fettgewinnung über Hefe aus Sulfitablauge». *Angewandte Chemie* 59.1 (1947): 16–20. Шмидт Э. «Производство белков и жира дрожжами из сульфитной жидкости». *Прикладная химия* 59.1 (1947): 16-20.
- «сумма жиров и белков в Торуле около 50%, т. е. если у вас 10% жира, то есть и 40% белка, но у вас 25% жира, значит, только 25% белка и т. д.»

Производство дрожжей Торула с Омега-3

- Растущий *Candida utilis* в условиях высоких концентраций глюкозы накапливает жирные кислоты.
- Около 5% глюкозы накапливает около 7% жирных кислот.
- Ферментер Waldhof может производить 150 г/л сухой дрожжевой массы.
- Вероятно, именно так Шмидт произвел 25% липидов в *Candida utilis*.
- Бабий Т., Ф. Дж. Мосс и Б. Дж. Ральф. «Влияние уровня кислорода и глюкозы на липидный состав дрожжей *Candida utilis*, выращенных в непрерывной культуре». Биотехнология и биоинженерия 11.4 (1969): 593-603.

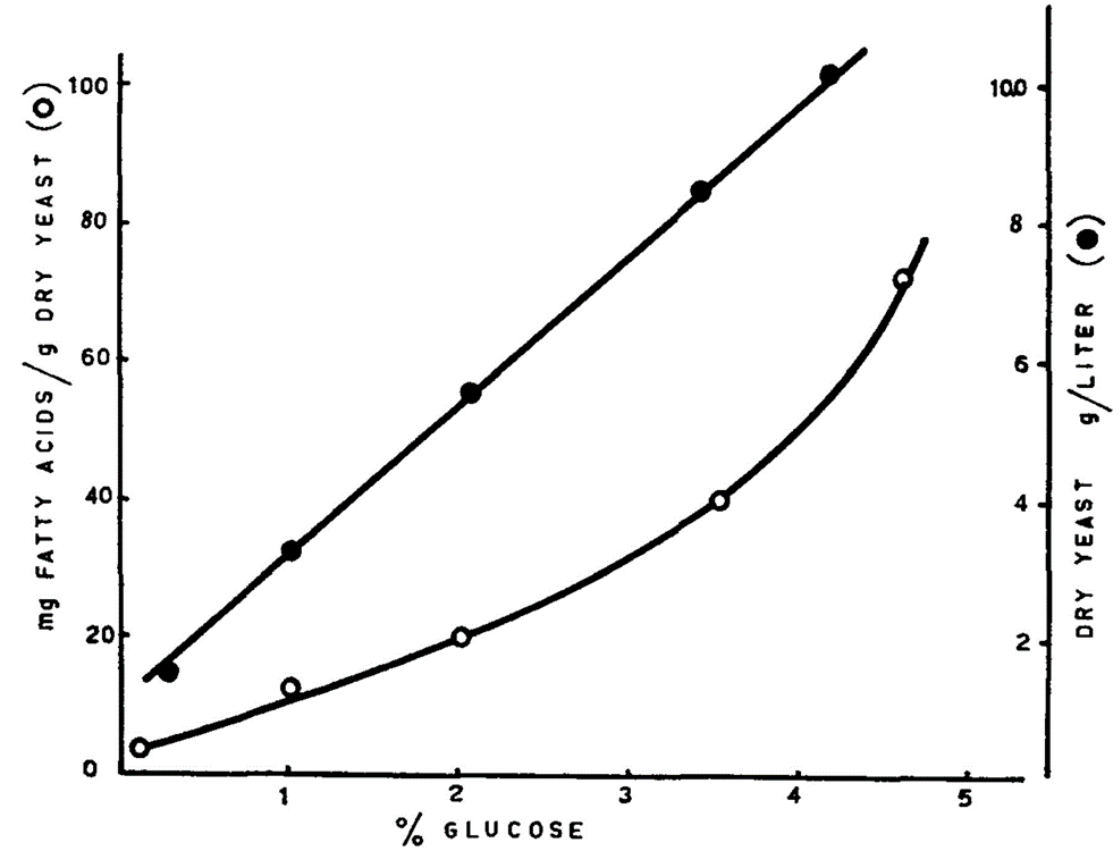


Fig. 3. Changes in lipid content of yeast cells with increasing glucose concentration.

Производство дрожжей Торула с Омега-3

- Более высокая концентрация кислорода приводит к более высокой концентрации линоненовой кислоты (C18:3, Омега-3).
- Может производить концентрацию кислорода до 240 мкм в пенном ферментере.
- Это показывает, что пенный ферментер с *Candida utilis* может производить липиды с 35% омега-6 и 30% омега-3. Результаты Бабиджа подтверждены у Джонсона Б., Шейлы Дж. Нельсон и К.М. Брауна. «Влияние концентрации глюкозы на физиологию и липидный состав некоторых дрожжей». Антони ван Левенгук 38 (1972): 129–136.

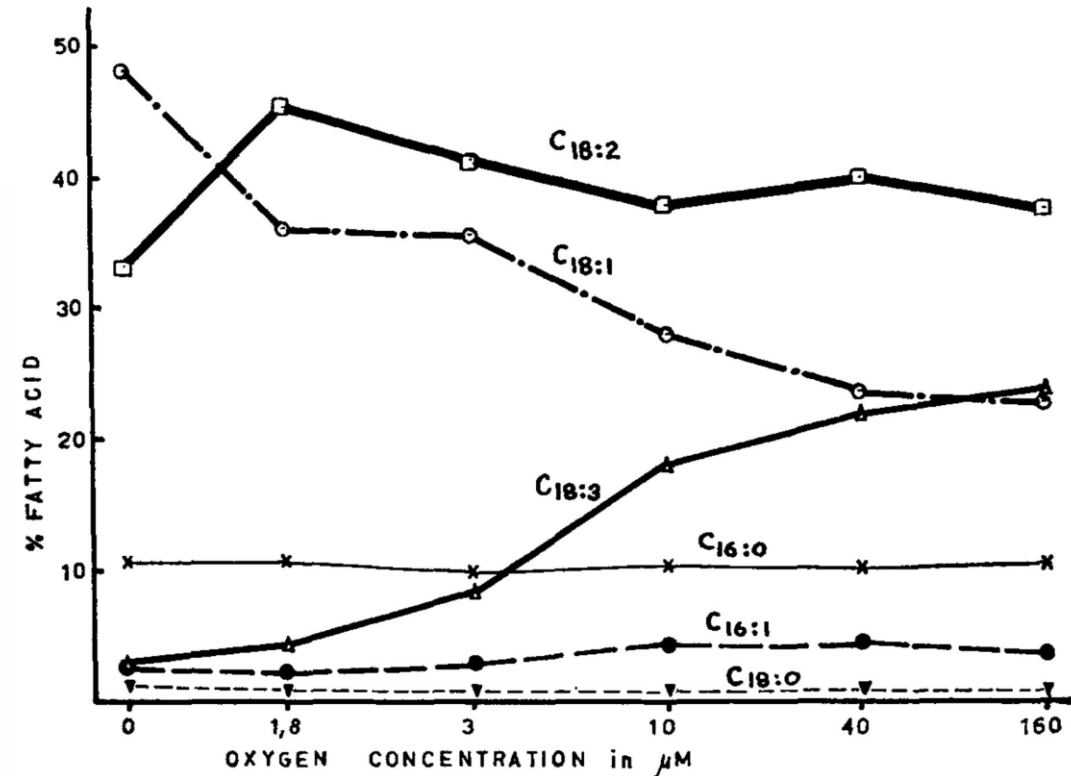


Fig. 2. Effects of oxygen tensions on fatty acid composition expressed as % of total fatty acids at high glucose concentration.

Key: C_{16:0} Palmitic; C_{16:1} Palmitoleic; C_{18:0} Stearic; C_{18:1} Oleic; C_{18:2} Linoleic; C_{18:3} Linolenic.

Современный рынок дрожжей Торула (Lallemand)

- В настоящее время Lallemand является мировым лидером в производстве *Candida utilis* (Torula) для пищевой промышленности в Райнлендере, штат Висконсин.
- Приобретен ферментер Waldhof и активы Provesta (ферментер Phillips Petroleum).
- Завод по производству сульфитной целлюлозы закрыт, Lallemand использует глюкозу и патоку, стандартный асептический аэробный ферментер периодического действия, ферментер Waldhof больше не используется.
- Lallemand Torula не содержит липидов Омега-3.
- Есть что-то волшебное в ферментере Waldhof, который производит дрожжи Торула с липидами Омега-3.



LAKE STATES®

Primary grown, dried whole cell torula inactive yeast. It is a specialty product range with the unique ability of delivering superb flavor carrier properties in different food applications, with distinctive savory notes and superior texture enhancement.



DESCRIPTION

Lake States® production begun in 1948 in Rhinelander, Wisconsin. For over 50 years the site has been a leader in the development and commercialization of inactive dried torula yeast for the food industry, pharmaceuticals, industrial fermentations, animal feed, and pet food markets. Thanks to Lallemand investments, it is today the largest torula inactive yeast production site in the world.

The Lake States® products can be used to help to reduce the use of additives such as MSG and HVP. They are designed to impart savory notes, enhance texture and nutritional characteristics in foods. They are ideal for a broad range of processing temperatures and preparation techniques, including microwave.

If you are interested in receiving "Lake-States®" leaflet, or to learn more about our inactive yeast range, please [contact us](#) or send an e-mail to info@bio-lallemand.com.

We will be happy to support you in the choice of the most suitable product!

PRODUCT HIGHLIGHTS

RECIPES

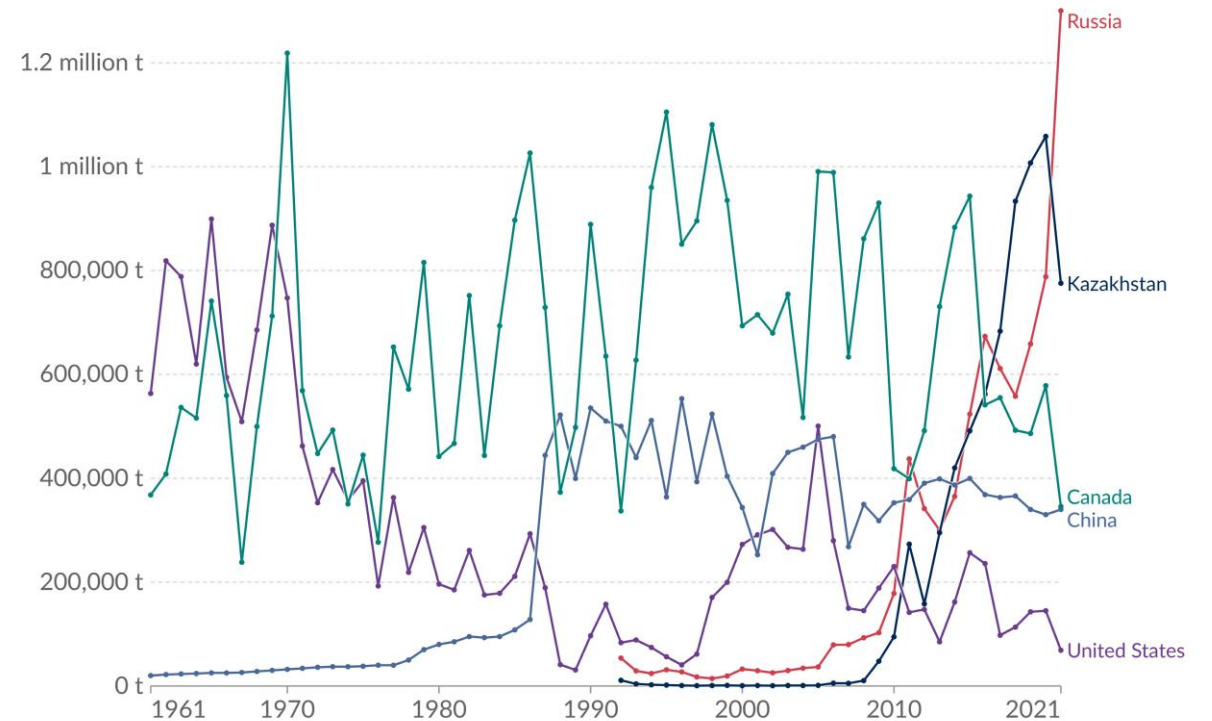
Почему компании
продают яйца,
содержащие
«Омега-3»?



Почему Россия и Казахстан крупнейшие производители льняного семени?

- Турин Е.Н. и др. «*Linum usitatissimum* L. — важнейшая культура в России для производства высококачественного масла с низкой себестоимостью». Серия конференций ИОР: Науки о Земле и окружающей среде. Том. 640. № 4. Издательство ИОП, 2021.

Linseed production, 1961 to 2021

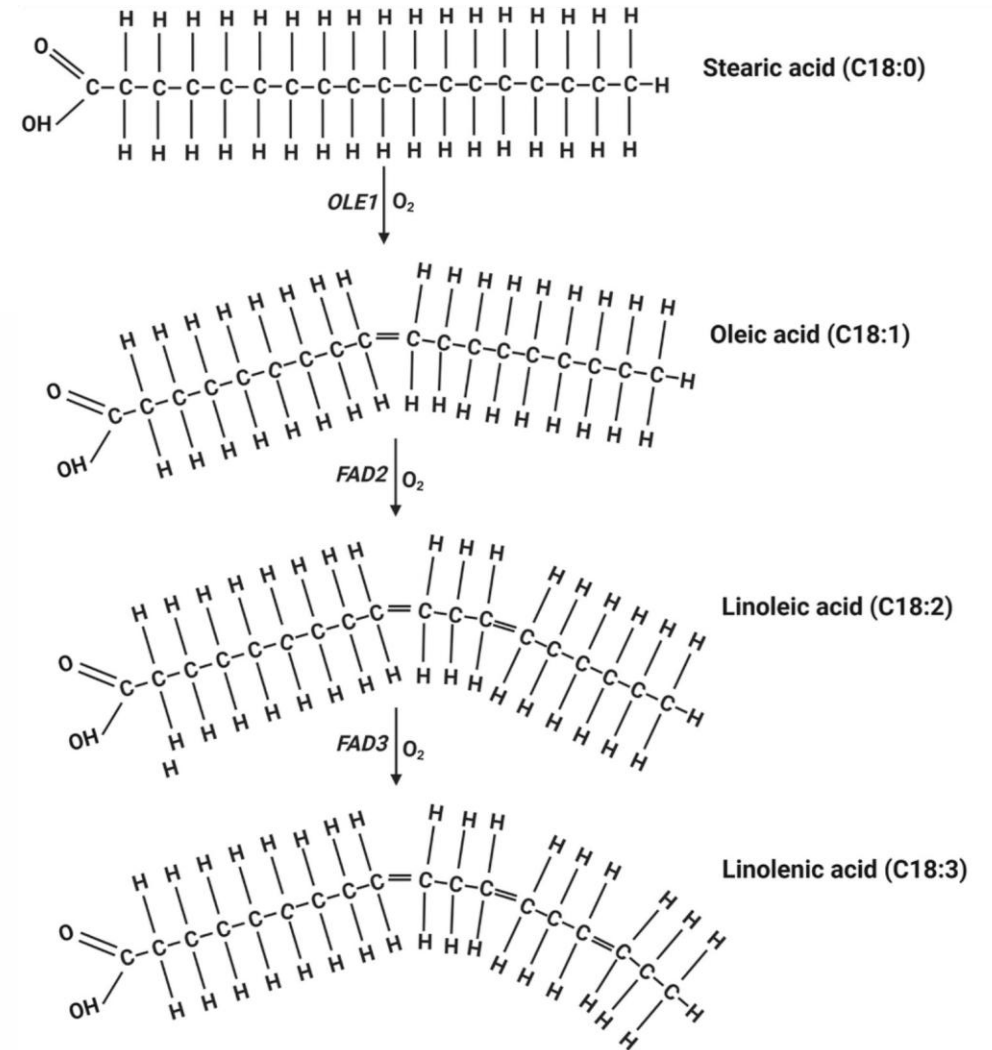


Data source: UN Food and Agriculture Organization (FAO)

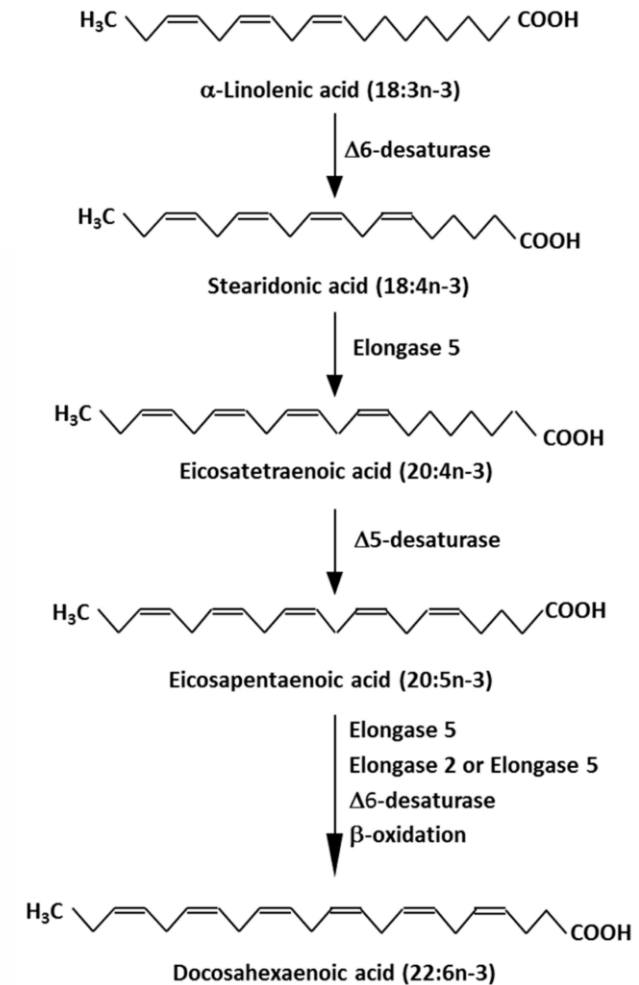
CC BY

Важность Омега-3

- Жирные кислоты Омега-3 и Омега-6 необходимы для жизни человека.
- В организме человека нет ферментов FAD2 и FAD3, поэтому нам необходимы линолевая кислота (Омега-6) и линоленовая кислота (Омега-3) в нашем рационе.
- Для оптимального здоровья соотношение омега-6 и омега-3 должно быть от 2:1 до 1:2.
- Больше кислорода = больше Омега-3
- Ферментер Waldhof имеет более высокий уровень растворенного кислорода при высоких концентрациях клеток, чем любой другой тип ферментера.

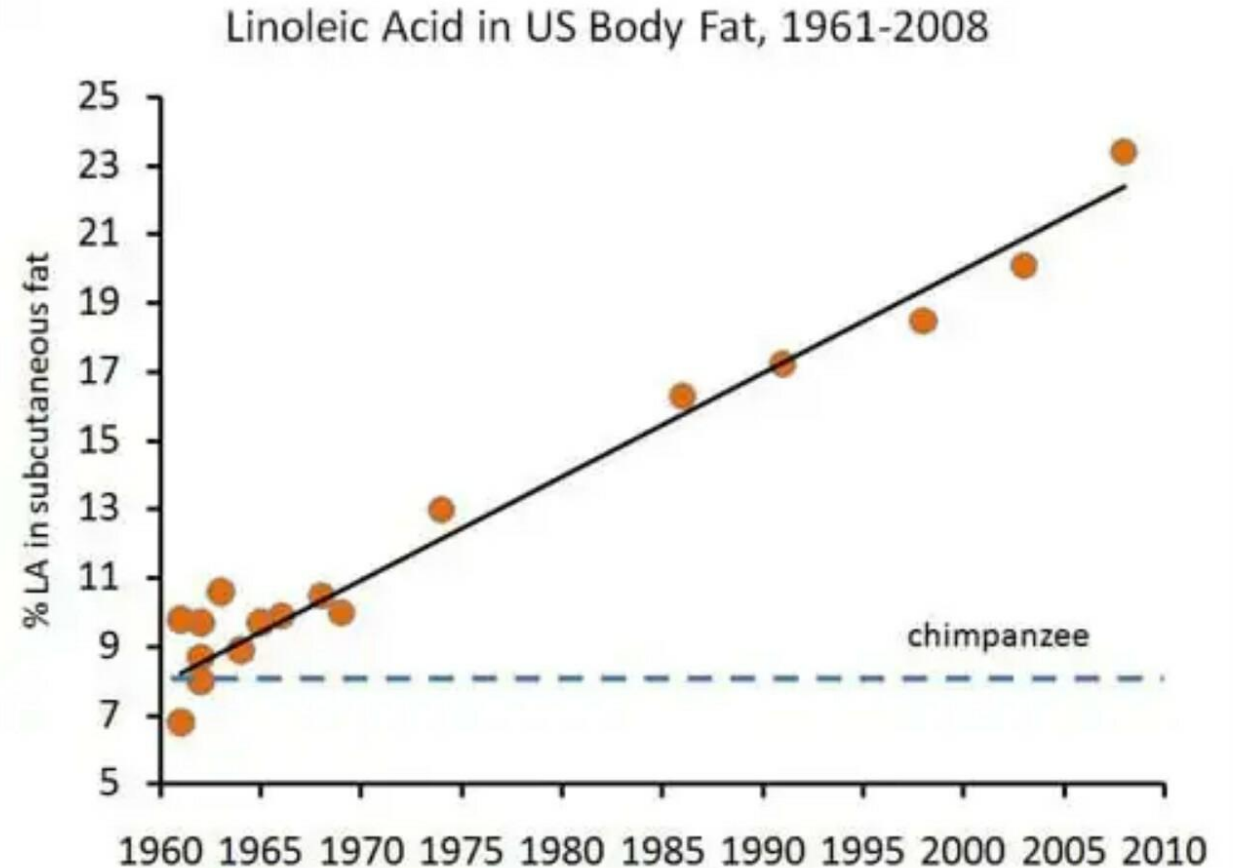


- Омега-3 являются предшественниками ЭПК (Эйкозапентаеновая кислота) и ДГК (Докозагексаеновая кислота), основной жирной кислотой в мозге является ДГК.
- Организм человека может вырабатывать ЭПК и ДГК, но чем больше Омега-6, тем меньше ЭПК и ДГК (конкуренция за одни и те же ферменты).
- Куры и лосось (и большинство животных) могут производить ЭПК и ДГК из омега-3.
- Эпидемиологические исследования показывают, что потребление ДГК связано со снижением заболеваемости болезнью Альцгеймера. Исследования на животных показывают, что пероральный прием ДГК уменьшает патологию мозга, подобную болезни Альцгеймера.



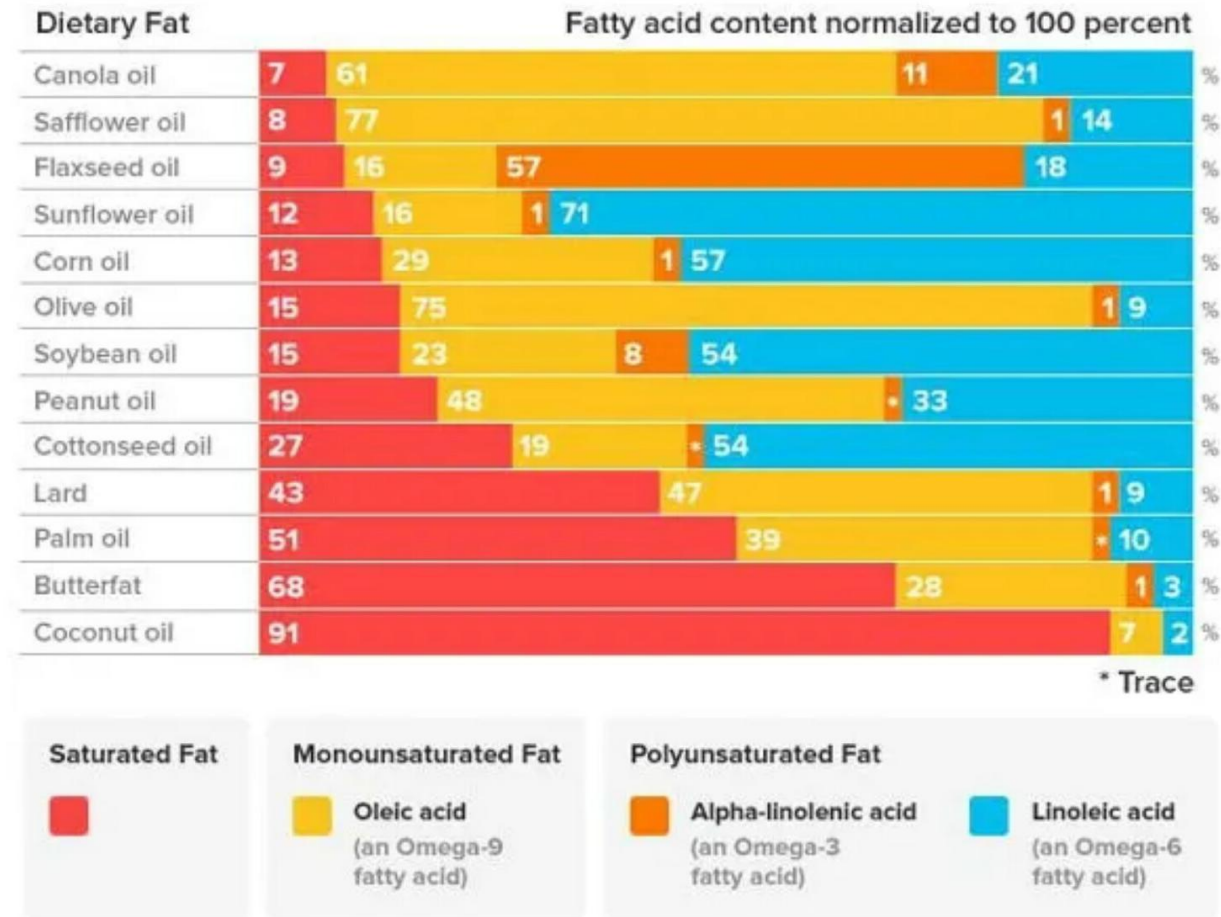
Почему американцы жирные?

- Наиболее широко потребляемая в Америке растительное масло вызывает генетические изменения в мозге. Новое исследование Калифорнийского университета в Риверсайде показывает, что соевое масло не только приводит к ожирению и диабету, но также может влиять на неврологические заболевания, такие как аутизм, болезнь Альцгеймера, тревогу и депрессию. Источник: Калифорнийский университет, Риверсайд, 17 января 2020 г.
- В соевом масле соотношение линолевой кислоты Омега-6 к линоленовой кислоте Омега-3 составляет 7:1.
- Соотношение омега-6 и омега-3 более 2:1 приводит к снижению уровня ДНА в организме. ДНА является основной жирной кислотой в мозге.
- Животных обычно кормят зерновыми кормами, содержащими сою и кукурузу. Жиры в мясе в основном состоят из Омега-6, тогда как у животных травяного откорма их соотношение 1:1.



Полезные и вредные жиры

- Вредные жиры имеют соотношение линолевой кислоты к линоленовой кислоте более 2:1. Это приводит к снижению выработки ДГК, которая необходима мозгу.
- Соевое (7:1), кукурузное (57:1), подсолнечное (71:1) и хлопковое масло (54:1) очень вредны для здоровья.
- Масло канолы (рапсовое) (2:1) достаточно полезно для здоровья, сегодня в большинстве маргаринов в мире используется именно это масло.
- Льняное масло (1:3) является самым полезным для здоровья, но легко окисляется, поэтому бесполезно для кулинарного масла и маргарина.
- Можно скормить цыплятам льняное семя без измельчения, это обычно используется для производства яиц с омега-3.



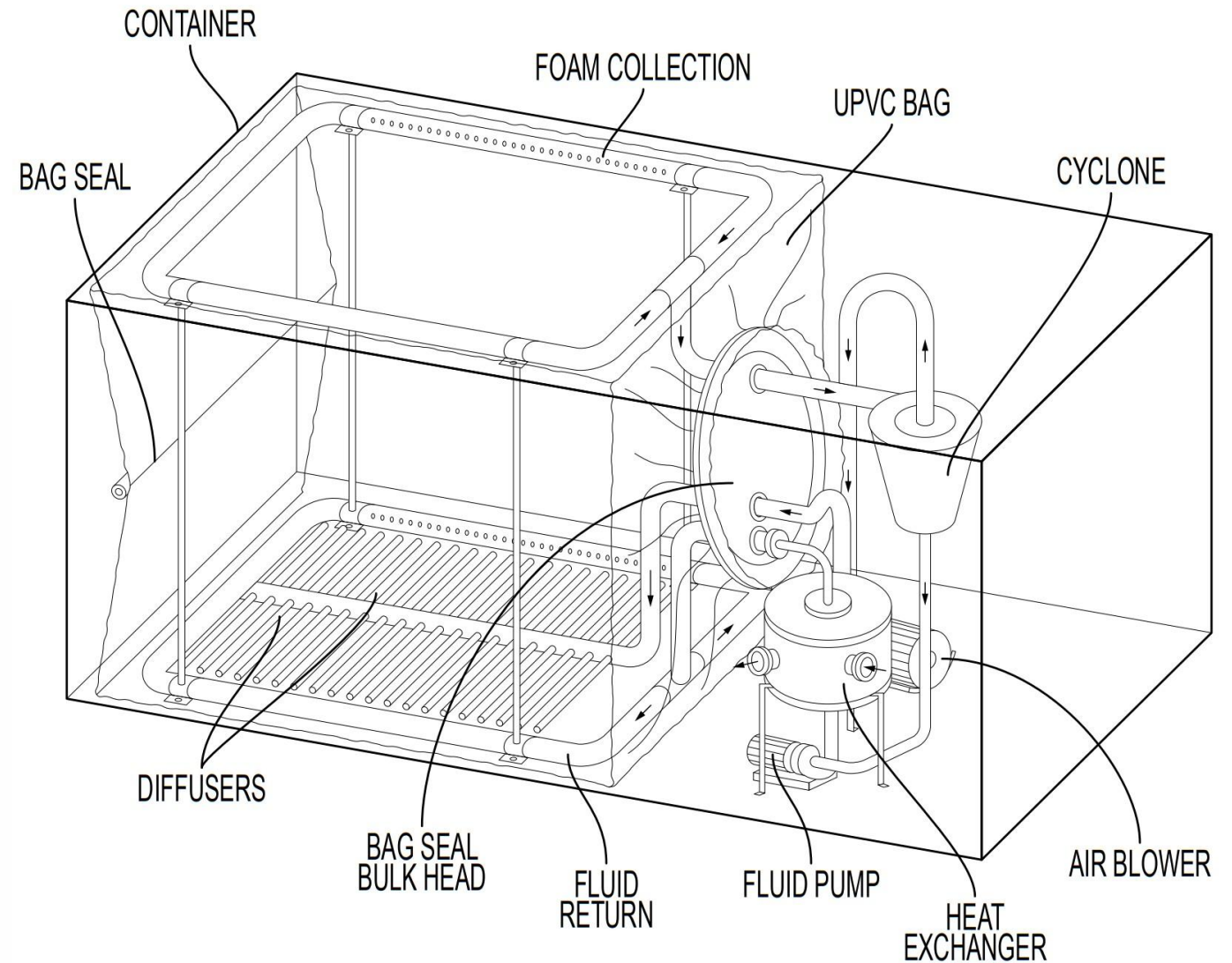
Мировые источники углеводов

- Россия производит более 100 млн тонн зерна, США производит 400 млн тонн кукурузы, 40% топливного этанола, Китай является крупнейшим производителем сельскохозяйственной продукции.
- Бразилия, Индия, Россия, США и ЕС производят много сахара из сахарного тростника и сахарной свеклы.
- Основным углеводом в Африке является маниока, в которой очень мало белка и липидов. Пенный ферментер может производить белки и липиды из маниоки.
- К 2030 году более 90% всех новых автомобилей будут электромобилями, поэтому спрос на биоэтанол значительно упадет к 2030 году, поэтому будет много излишков кукурузы, пшеницы и сахара.
- Для чего можно использовать все эти лишние углеводы?
- Одноклеточный белок для корма для животных? Рыбным кормам не нужны углеводы, поэтому *Candida utilis* с липидами Омега-3 лучше всего заменять рыбную муку и рыбий жир.
- Beyond Meat – белок из гороха, маша, фасоли и коричневого риса не так вкусен, как лосось и курица.
- Люди не хотят есть дрожжи, но любят лосося и курицу. Используйте Омега-3 *Candida utilis* для кормления рыб и кур, получая таким образом рыбу и курицу с ЭПК и ДГК.

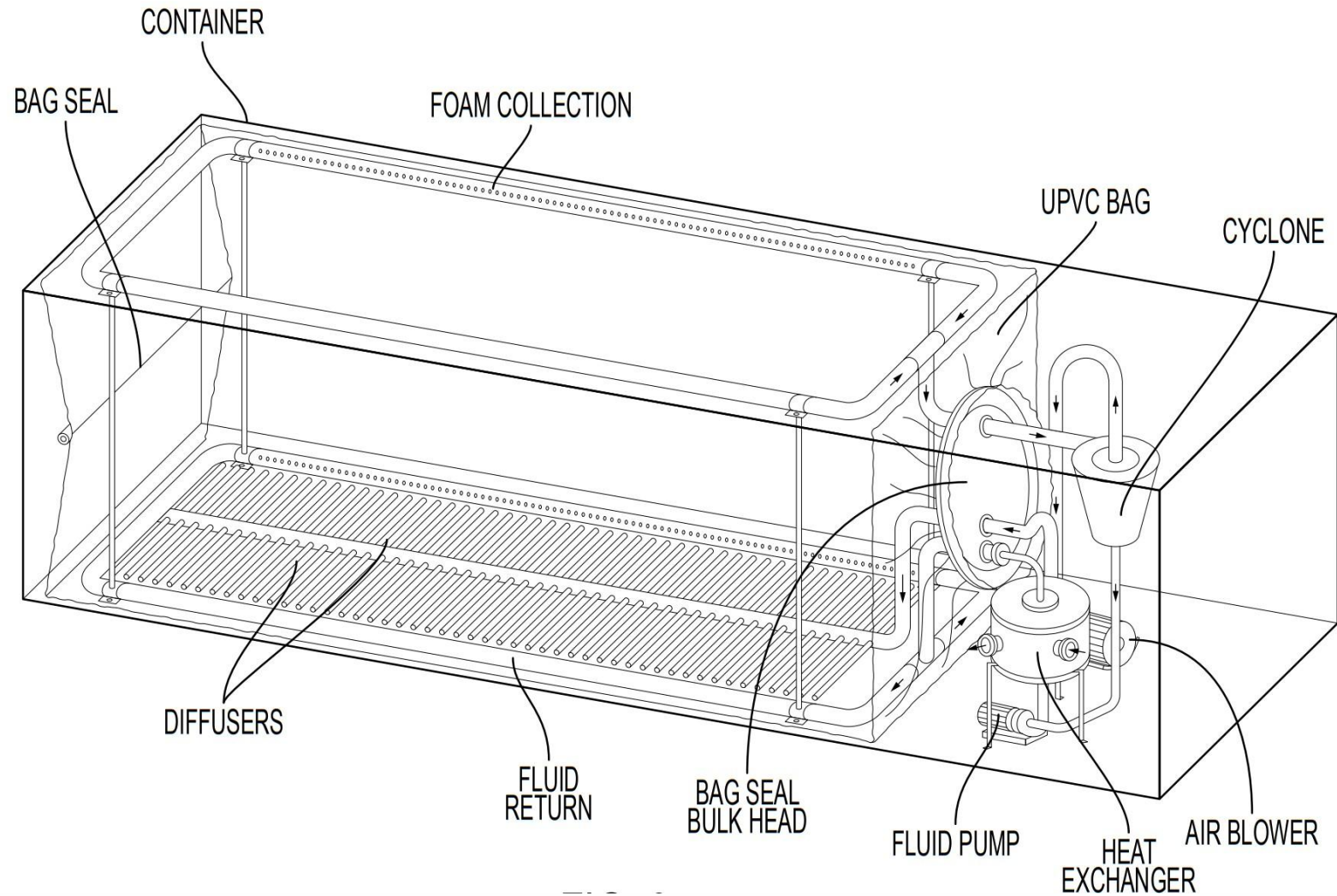
Что нового в ферментерах CelloFuel?

- Ферментер Waldhof имеет вращающийся диск диаметром 1,5 м для получения 10% эмульсии, ферментер Cellofuel использует барботерные трубки диаметром 75 мм для получения пены с 10% жидкости, используя гораздо меньше энергии и не имея движущихся частей.
- Ферментер Waldhof отводит тепло, охлаждая эмульсию с помощью теплообменника, но эмульсия является изолятором и ее нелегко охладить. Ферментер Cellofuel охлаждает ферментативную жидкость после разрушения пены циклоном.
- В ферментере Waldhof используется вращающийся диск, который разрушает пену и повторно нагнетает воздух. Ферментер CelloFuel использует циклон для разрушения пены и обратной подачи воздуха, что требует гораздо меньше энергии и не имеет движущихся частей.
- В ферментере Waldhof используется ферментер из нержавеющей стали, в ферментере Cellofuel используется ферментер из ПВХ в транспортном контейнере, что снижает затраты.
- В ферментере Waldhof используется теплообменник из нержавеющей стали, в ферментере Cellofuel используется теплообменник из титана или 316L для уменьшения выщелачивания никеля, который работает с контролем загрязнения (обсуждается позже).

20 футовый контейнер CelloFuel



40 футовый контейнер CelloFuel



Смоделировано 4 варианта:

1. **Candida utilis, размер ¼, биомасса 10 %**
2. **Candida utilis, полный размер, 10% биомассы**
3. **Methylococcus capsulatus, полноразмерный, биомасса 10 %.**
4. **Methylococcus capsulatus, полный размер, 5% биомассы**

1	Microorganism and nitrogen source	Candida utilis + urea	Candida utilis + urea	Methylococcus capsulatus + KNO3	Methylococcus capsulatus + N2
2					
3	Doubling time (min)	105	105	120	140
4	Heat (MJ/mol_O2)	0.40	0.40	0.47	0.47
5	Fermentation temperature (C)	30	30	45	45
6					
7	Substrate (sub)	CH2O	CH2O	CH4	CH4
8	Molar mass of substrate (g/mol_sub)	30	30	16	16
9	Cell composition (cell)	CSH10O2.5N	CSH10O2.5N	CSH9O2N	CSH9O2N
10	Molar mass of cells (g/mol_cell)	124	124	115	115
11	Molar yield from substrate (mol_cell/mol_sub)	0.13	0.13	0.13	0.13
12	Mass yield from substrate (g_cell/g_sub)	0.55	0.55	0.92	0.92
13	Cell yield from O2 (mol_cell/mol_O2)	0.40	0.40	0.11	0.11
14	Ratio of substrate to O2 (mol_sub/mol_O2)	3.03	3.03	0.83	0.83
15					
16	Cell yield from O2 (g_cell/mol_O2)	50.09	50.09	12.27	12.27
17	Oxygen concentration (mol_O2/mol_gas)	0.21	0.21	0.21	0.08
18					
19	Fermenter width (m)	0.60	2.40	2.40	2.40
20	Fermenter height (m)	0.60	2.40	2.40	2.40
21	Fermenter length (m)	4.00	4.00	4.00	4.00
22	Liquid height (m)	0.15	0.15	0.15	0.15
23	Fermenter foam volume (m3)	1.08	21.60	21.60	21.60
24	Plastic tube roll-flat width (m)	1.20	4.80	4.80	4.80
25	Plastic tube diameter (m)	0.76	3.06	3.06	3.06
26					
27	Cell density in liquid (g_cell/g_liquid)	0.18	0.10	0.10	0.05
28	Liquid fraction (fraction)	0.10	0.10	0.10	0.10
29	Fermenter liquid (kg)	108.00	2,160.00	2,160.00	2,160.00
30	Fermenter gas (L)	972.00	19,440.00	19,440.00	19,440.00
31	Fermenter cells (kg_cell)	10.80	216.00	216.00	108.00
32	Fermenter gas (mol_gas)	39.07	781.46	744.62	744.62
33	Fermenter O2 (mol_O2)	8.18	163.68	155.97	59.57
34					
35	Cell mass grown if all O2 used (kg)	0.41	8.20	1.91	0.73
36	Time to use all O2 (min)	5.64	5.64	1.53	1.36
37	Fan airflow to use all O2 (m3/h)	10.33	206.68	784.01	856.42
38					
39	Diameter of cyclone inlet (m)	0.05	0.10	0.10	0.10
40	Number of cyclones	1.00	3.00	4.00	4.00
41	Min inlet velocity (m/s)	7.00	7.00	7.00	7.00
42	Fan airflow to achieve min inlet velocity (m3/h)	49.48	593.76	791.68	791.68
43	Fan airflow (m3/h)	49.48	593.76	791.68	856.42
44					
45	Foam cycle time (min)	1.18	1.96	1.47	1.36
46	Cell mass grown per cycle (kg)	0.08	2.82	1.85	0.73
47	O2 consumed per cycle (mol_O2)	1.68	56.29	150.49	59.57
48	Heat generated per cycle (kJ)	673.69	22,514.75	70,280.53	27,818.88
49	Temperature rise per cycle (C)	1.49	2.49	7.78	3.08
50					
51	Number of 750 mm diffusers needed	6.60	79.17	79.17	85.64
52	Number of 1 m diffusers needed		59.38	79.17	85.64
53	Spacing of diffusers (m)		0.10	0.10	0.10
54	Number of diffusers that will fit		78.00	78.00	78.00
55					
56	Fan power needed (kW)	0.41	4.95	6.60	7.14
57					
58	Cooling needed (kW)	9.53	191.02	795.04	340.43
59	Cooling water temperature (C)	15.00	15.00	15.00	15.00
60	Cooling water mass flow (kg/s)	0.15	3.04	6.33	2.71
61	Cooling water volume flow (m3/hr)	0.55	10.95	22.79	9.76
62	Cooling water volume flow (L/min)	9.10	182.53	379.85	162.65
63	Heat exchanger area (m2)	0.24	4.72	9.82	4.20
64					
65	Recirculation slurry flow (m3/h)	5.50	22.96	84.89	95.16
66	Recirculation slurry flow (liters per minute)	91.63	382.75	1,414.84	1,585.95
67	Harvest of cells (kg/h)	4.29	87.17	75.19	32.19
68	Harvest slurry flow (m3/h)	0.04	0.87	0.75	0.64
69	Harvest slurry flow (liters per minute)	0.72	14.53	12.53	10.73
70	Nutrient feed (m3/h)	0.04	0.87	0.75	0.64
71	Nutrient feed (liters per minute)	0.72	14.53	12.53	10.73
72					
73	Yearly substrate (ton_sub/year)	68.28	1,385.89	715.95	306.52
74	Yearly productivity (ton_cell/year)	37.62	763.59	658.67	282.00
75	Hourly productivity (kg/hr)	4.29	87.17	75.19	32.19
76					
77	Cost of substrate (\$/ton_sub)	500.00	500.00	110.00	110.00
78	Cost of nitrogen (\$/ton_cell)	46.28	46.28	28.02	-
79	Cost of electricity (\$/ton_cell)	184.25	14.28	18.75	45.47
80	Salvage of cells (\$/ton_cell)	1,500.00	1,500.00	1,500.00	1,500.00
81					
82	Profit/year (\$)	14,000.00	406,000.00	878,000.00	378,000.00
83	CAPEX (\$)	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00

Контроль контаминации

- Ферментер Waldhof работал месяцами с открытым верхом и без бактериального загрязнения. Анализ показывает, что это произошло из-за остаточного сульфита.
- Бактериям необходим никель для роста на мочеvine (необходим для фермента уреазы). Контейнер CelloFuel предназначен для предотвращения выщелачивания никеля в жидкость.
- Дрожжам необходим биотин для роста на мочеvine без никеля (необходим для фермента мочевиноамидолиазы), и во время ферментации биотин не добавляется. *Candida utilis* является прототрофным биотином (вырабатывает собственный биотин), а другие контаминирующие дрожжи, такие как *Dekkera bruxellensis*, нуждаются в добавлении биотина.
- Ферментер CelloFuel выращивает *Candida utilis* с мочевиной в качестве единственного источника азота, без добавления биотина и без выщелачивания никеля.
- Самый быстрый рост *Candida utilis* происходит при выращивании с использованием мочевины в качестве источника азота.
- Испытание этого метода контроля загрязнения было успешно завершено, и вскоре будет подана окончательная заявка на патент.

Патентный статус

Патенты находятся на рассмотрении в Патентном ведомстве

США:

“AEROBIC FERMENTATION USING PNEUMATIC FOAM”

application number 63/530,954, priority date of 5 August 2023

“CONTAMINATION CONTROL WHEN GROWING YEASTS”

Application number 63/534,123, priority date of 23 August 2023

**Планируется подача РСТ в Россию, США, Китай,
Индию, Бразилию, ЕС, Катар**



Масштабная модель (1/4 высоты/ширины), 600 x 600 x 4000 мм.





Спасибо за внимание!

Задавайте вопросы!

Алексей Аблаев
НаноТайга
Москва, Россия
info@nanotaiga.ru

Эдвард Хэмрик
Hamrick Engineering
Майами, США
info@cellofuel.com
