



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101106913 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200680002978. 5 *A61K 8/97*(2006. 01)
A23K 1/00(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 01. 26

(30) 优先权数据
1020055003624. 4 2005. 01. 26 DE

(85) PCT申请进入国家阶段日
2007. 07. 24

(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2006/000676 2006. 01. 26

(87) PCT申请的公布数据
W02006/079533 DE 2006. 08. 03

(73) 专利权人 努特诺瓦营养产品及食品成分有限公司
地址 德国法兰克福

(72) 发明人 德克·法布里蒂乌斯 多琳·诺伊曼

(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 樊卫民

(56) 对比文件
WO 00/54575 A2, 2000. 09. 21, 实施例 1.
WO 00/54575 A2, 2000. 09. 21, 实施例 1.
CN 1217029 A, 1997. 03. 21, 权利要求 1-10, 33-36.

审查员 李晶晶

(51) Int. Cl.
A23L 1/30(2006. 01)
A23K 1/16(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页

(54) 发明名称
无色涡鞭毛藻抗氧化提取物的生产和用途

(57) 摘要

本发明涉及无色涡鞭毛藻 (*Crypthecodinium* sp) 的抗氧化提取物。本发明还涉及含有一种或多种多不饱和脂肪酸和 / 或一种或多种多不饱和脂肪酸酯和根据本发明的至少一种提取物和不同于无色涡鞭毛藻生物量的组分的脂肪酸组合物, 和涉及生产该脂肪酸组合物的方法和其用途。

1. 来自无色涡鞭毛藻 (*Crypthecodinium* sp) 的具有抗氧化活性的提取物用于抗氧化稳定不同于无色涡鞭毛藻的生物量的脂肪酸组合物的用途, 其中提取物抗氧化能力大于 250006-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸等价物, 其中脂肪酸组合物基于脂肪酸组合物的总重量包含 0.1-50.0% 重量的来自无色涡鞭毛藻的抗氧化提取物, 和 50.0-99.9% 重量的不同于无色涡鞭毛藻的生物量组分。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于提取物通过以下步骤获得:

i) 皂化无色涡鞭毛藻的生物量, 和

ii) 用在 25°C 时水溶解度小于 0.1g 溶剂 / 克水的溶剂提取被皂化的生物量。

3. 如权利要求所述 2 的用途, 其特征在于提取物通过用己烷、戊烷、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷、二甲乙酮和 / 或超临界二氧化碳, 提取来自无色涡鞭毛藻的皂化生物量而获得。

4. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于提取物通过用具有 1-12 个碳原子的醇和 / 或 3-6 个碳原子的酮提取无色涡鞭毛藻的生物量而获得。

5. 如权利要求 4 所述的用途, 其特征在于提取物通过用甲醇、异丙醇、丙酮和 / 或乙醇提取无色涡鞭毛藻的生物量而获得。

6. 如权利要求 4 或 5 所述的用途, 其特征在于提取物通过用具有 1-12 个碳原子的醇提取后用酮提取无色涡鞭毛藻的生物量而获得。

7. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于提取物是隐甲藻 (*Crypthecodinium cohnii*) 的提取物。

8. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于提取物通过将无色涡鞭毛藻的生物量进行酯交换的方法而获得。

9. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于提取物通过机械方法提取无色涡鞭毛藻的生物量而获得。

10. 包含至少一种不饱和脂肪酸的抗氧化稳定的脂肪酸组合物, 其特征在于脂肪酸组合物基于脂肪酸组合物的总重量包含 0.1-50.0% 重量的至少一种来自无色涡鞭毛藻的具有抗氧化活性的提取物和 50.0-99.9% 重量的不同于无色涡鞭毛藻的生物量组分, 其中提取物抗氧化能力大于 250006-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸等价物, 其中所述脂肪酸组合物不含有任何其它抗氧化剂。

11. 如权利要求 10 所述的抗氧化稳定的脂肪酸组合物, 其特征在于包含破囊壶菌 (*Thraustochytriales*) 的生物量组分。

12. 如权利要求 11 所述的抗氧化稳定的脂肪酸组合物, 其特征在于包含 *Ulkenia* sp 的生物量组分。

13. 如权利要求 10-12 至少之一所述的抗氧化稳定的脂肪酸组合物, 其特征在于通过将不同于无色涡鞭毛藻的生物量进行酯交换的方法, 获得不同于无色涡鞭毛藻的生物量的组分。

14. 如权利要求 10-12 至少之一所述的抗氧化稳定的脂肪酸组合物, 其特征在于基于总重量, 包含至少 25.0% 重量的二十二碳六烯酸和 / 或二十二碳六烯酸烷基酯。

15. 生产如权利要求 10-14 任一项所述的脂肪酸组合物的方法, 其特征在于无色涡鞭毛藻的至少一种具有抗氧化活性的提取物与不同于无色涡鞭毛藻的生物量的组分互相混合, 其中所述脂肪酸组合物不含有任何其它抗氧化剂。

16. 如权利要求 10-14 中至少之一所述的脂肪酸组合物的用途,用作药物组合物中的活性成分或组分。

17. 如权利要求 10-14 中至少之一所述的脂肪酸组合物的用途,用作化妆品制剂组分。

18. 如权利要求 10-14 中至少之一所述的脂肪酸组合物的用途,用作食品添加剂和 / 或食品成分。

19. 如权利要求 10-14 中至少之一所述的脂肪酸组合物的用途,用作动物饲料成分。

无色渦鞭毛藻抗氧化提取物的生产和用途

[0001] 本发明涉及无色渦鞭毛藻 (*Crypthecodinium* sp) 的提取物,其生产方法和用途,特别是针对含有一或多种长链多不饱和脂肪酸和 / 或一或多种长链多不饱和脂肪酸酯的脂肪酸组合物的抗氧化稳定性。

[0002] 长链多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 是人体新陈代谢的必需脂肪酸。PUFAs 可以细分为两大家族,除了其起始于亚油酸的 ω -6PUFAs 家族,还有其起源于 α -亚麻酸的 ω -3PUFAs 家族。

[0003] PUFAs 是细胞膜、视网膜、脑膜的重要组成元件和诸如前列腺素、血栓素和白细胞三烯这些重要激素的前体。

[0004] 除了作为组成元件的功能外,近年来不断发现 PUFAs 直接对人体器官和疾病具有多重有益效果。

[0005] 大量的临床研究发现 PUFAs 对治愈和减缓病情作出了重要贡献,例如癌症、类风湿性关节炎、高血压、神经性皮炎和许多其他疾病。在这些情况下二十二碳六烯酸 (DHA; 全-顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸) 及其衍生物,特别是 DHA 酯,就常常特别具有优势,因为这种酯(特别是乙酯和甘油三酯)倾向于具有宜人的口感,容易被消化系统吸收。这些发现原先造成了国际机构和权威推荐控制每日需摄入 PUFAs 的事实。

[0006] PUFAs 不能由人体从头合成,因为缺少将双键在 $>C9$ 位置导入碳链中的酶系统(缺少 Δ 12-去饱和酶)。人们只能通过饮食中的脂肪酸前体(如 α -亚麻酸)的供应合成多不饱和脂肪酸。然而,这个量是否能够满足多不饱和脂肪酸的需求有待讨论。

[0007] 绝大多数的必需脂肪酸通过饮食摄取。特别是植物油富含 ω -6 脂肪酸(例如月见草油含有 γ -亚油酸 (GLA)) 但链长只达到 C18,鱼油和微生物来源的油含 ω -3 脂肪酸(例如鲑鱼油含有二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA; 全-顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸))。大体上,鱼油和微生物来源的油是多不饱和脂肪酸的唯一商业来源。然而通常所需的 PUFAs 的含量过低,并且存在于混合物中,这样也可能存在显示拮抗作用的 PUFAs。为了摄取每日推荐剂量的 PUFAs,因此必须要摄入大量的油。特别地,这适用于必须消耗高剂量 PUFAs 的病人(例如囊性纤维化病)。为了尽可能以靶向方式达到单独 PUFAs 的效果,必须使用富集的或高纯度的 PUFAs。因此在现有技术中迫切需要高纯度 PUFAs。

[0008] 很多方法被单独或组合起来使用以从大量天然存在的来源中分离(或至少浓缩)和回收脂肪酸及其衍生物。这些方法包括低温分步结晶、分子蒸馏、尿素加合物结晶、金属盐溶液提取、反相柱分离超临界流体分部和 HPLC 方法。

[0009] 考虑到 PUFAs 对氧化作用的敏感,通常必须加入合适的抗氧化剂来稳定。为了这个目的,商业上特别使用天然生育酚,又特别是提取自大豆油的 α -、 β -、 γ -和 δ -生育酚和 / 或生育三烯酚类的混合物。此外已知一些化合物,例如棕榈酸抗坏血酸酯,能协同作用。因此除了生育酚,它们也能被使用。

[0010] 然而天然抗氧化剂的效果并不能随着浓度的增加而无限增加。例如, α -生育酚早至 100ppm 其活性就逆转,并且发生促氧化作用。这意味着过量可能引起不利后果。

[0011] 可替代地,公布的 W003092628 提出了一种在温和条件下作用逐步加强的油的用途。这种情况下必须以该方式进行制备,即首先将含多不饱和脂肪酸的生物量与酶反应然后分离脂质。尽管该方法获得的油起初氧化程度不高,然而它还是显示出多不饱和脂肪酸氧化性质的敏感性。

[0012] 根据现有技术,因此本发明的目的是显示脂肪酸组合物增强的抗氧化稳定性的可能。在这种情况下要尽可能增加抗氧化活性,但不能加入对健康有害的物质,从而使脂肪酸组合物能无保留地应用在食品领域。

[0013] 本发明的另一个目的是详细说明生产本发明脂肪酸组合物的方法,它使得可以尽可能以简单的方式大规模廉价生产。

[0014] 此外还应指出本发明的脂肪酸组合物应用于特别有优势的领域。尽管没有明确指出,但可以从申请文本中明确推出或不可避免地导出的这些或其他目的能通过无色渦鞭毛藻的提取物达到。

[0015] 权利要求 1 的从属权利要求描述了本发明提取物的有利修饰。权利要求 11-19 要求保护的范围是对抗氧化剂稳定的脂肪酸组合物。方法权利要求保护特别适用于生产本发明脂肪酸组合物的模式,用途权利要求描述了特别适用于本发明脂肪酸组合物应用的优势领域。

[0016] 通过提供无色渦鞭毛藻的抗氧化提取物,以不容易预见的方式成功获得了具有特别高抗氧化活性的提取物,这种提取物特别适用于使脂肪酸组合物抗氧化稳定,特别是含有至少一种不饱和脂肪酸和 / 或至少一种不饱和脂肪酸酯的脂肪酸组合物。这样根据本发明无需添加对健康有害的物质就能增加抗氧化活性,即可以放心将本发明的脂肪酸组合物应用到食品领域。例如隐甲藻 (*Crythecodium cohnii*) 油已用于婴儿食品中,在美国归于 GRAS(通常认为是安全的)一类。

[0017] 本发明的脂肪酸组合物能以简单的方式大规模廉价地生产。

[0018] 本发明的脂肪酸组合物含有至少一种来自于无色渦鞭毛藻,优选隐甲藻的抗氧化提取物。申请文件中“脂肪酸组合物”的表达不仅包括含有游离脂肪酸的组合物,也包括含有脂肪酸衍生物优选脂肪酸酯,特别是脂肪酸甘油三酯的组合物,这样脂肪酸根大体上一致或不同。

[0019] 本发明的脂肪酸表示脂肪酸,它可以是饱和的,或单不饱和,或多不饱和,优选含 6-30 个碳原子。

[0020] 无色渦鞭毛藻中获得的提取物本身已知。根据本发明,不仅可使用无色渦鞭毛藻野生菌株提取物,还可以使用无色渦鞭毛藻菌株的突变体或重组体。

[0021] 申请文件中“无色渦鞭毛藻提取物”的表达包括所有用溶剂从无色渦鞭毛藻生物量,优选为油中提取获得的组合物,溶剂优选有机溶剂和 / 或超临界溶剂,特别是有机溶剂。同样可以使用溶剂混合物。

[0022] 本发明的提取物具有优选比其来源的生物量具有更大的抗氧化活性。因此优选它的过氧化物值小于最初使用的优选为新鲜分离的其来源的生物量的过氧化物值,并且优选为提取物来源的生物量过氧化物值的最多 50.0%,更优选最多 25.0%,有利地最多 10.0%,特别是最多 1.0%。这种情况下,过氧化物值优选用 AOCS(美国油类化学家协会)官方方法 Cd-3d63 的说明测定,有利地在 2 周的敞开贮存之后。

[0023] 本发明提取物的抗氧化能力大于 15000Trolox 等价物,更优选为大于 20000Trolox 等价物,有利地大于 25000Trolox 等价物,特别优选大于 30000Trolox 等价物,又特别大于 35000Trolox 等价物 (ug/ml)。 Trolox®是 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸惯常使用的商品名。

[0024] 根据本发明“生物体的生物量”的表达不仅包括生物体的全部细胞,还包括生物体的个体细胞组分。

[0025] 无色涡鞭毛藻提取物通过培养微生物、从培养物收获生物量、分解生物量和分离提取物有利地获得。

[0026] 为了分离提取物,优选使用有机溶剂提取的方法,特别是用己烷或超临界液体。本发明特别优选用有机溶剂提取的方法。有利地,用己烷浸透干的生物量从而提取生物量中的提取物。这种用有机溶剂提取在 W09737032、W09743362 和 EP 515460 和其他内容一起得到描述。还可以在 Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 “Biotechnological Processes for the Production of PUFAs” 中发现特别广泛的描述。

[0027] 可替代地,也可以不使用溶剂进行提取。申请文件中一个特别有利的方法在 EP-A-1178118 中记载。该方法通过生产生物量的水相悬浮液,利用离心将油相与水相分离而避免使用溶剂。

[0028] 根据本发明特别优选的变型,通过纯机械挤压来自无色涡鞭毛藻的生物量,接着用至少一种有机溶剂或至少一种超临界溶剂,优选有机溶剂,特别是己烷提取,从而获得提取物。

[0029] 根据本发明的另一种特别优选的变型,通过蒸馏获得提取物。

[0030] 在本发明的文本中,也证明能特别有优势的是优选具有 1-12 个碳原子的脂肪醇,优选为具有 1-6 个碳原子,特别是具有 1-4 个碳原子将生物量进行酯交换。这样能够特别证明甲醇和乙醇,特别是乙醇的用途。酯交换优选在酸催化下进行,特别是用硫酸和 / 或盐酸。根据另一种特别优选的变型,酯交换通过酶而实现。

[0031] 酯交换后的生物量随后优选至少一种有机溶剂或至少一种超临界溶剂提取,优选有机溶剂,特别是己烷。溶剂的总体积与反应量(包括所加的水)的比例也能在一个大范围内变化,特别优选是 1:3 到 4:3。根据特别优选的实施方式,混合物是通过最终组合在一起的多种溶剂提取的。

[0032] 在这个实施方式的上下文中,优选使用无色涡鞭毛藻生物量的己烷提取物作为被酯交换的生物量,其然后如上所述被酯交换。这个过程用作抗氧化提取物的浓缩和纯化。有利地,基于总重量,用该方式浓缩和纯化的提取物的具有 6-30 个碳原子的脂肪酸的含量,和包含具有 6-30 个碳原子的脂肪酸烷基根的脂肪酸酯的含量,小于 20.0% 重量,优选小于 10.0% 重量,特别是小于 5.0% 重量。

[0033] 提取物的组成可以在宽范围内变化。在本发明第一个特别优选的实施方式中,来自无色涡鞭毛藻的提取物通过以下步骤获得:

[0034] i) 皂化无色涡鞭毛藻生物量,和

[0035] ii) 用溶剂提取被皂化的生物量,该溶剂在 25°C 时的水溶解度小于 0.1g 溶剂 / 克水。

[0036] 优选地,在这种情况下,遵循 DGF 方法 F-III(75) 的步骤。

[0037] 生物量能被本身已知的方法皂化。在这种情况下特别证明了在醇溶液中,优选为甲醇和 / 或乙醇溶液中,生物量与至少一种碱金属氢氧化物,优选 NaOH 和 / 或 KOH,特别是 KOH 的反应。皂化作用特别合适的反应温度范围为 25-100℃。

[0038] 皂化产物混合物的提取可以在宽的范围变化。根据一个优选的变型,在混合物中加水,用 25℃ 时水溶解度小于 0.1g 溶剂 / 克水的溶剂进行提取。溶剂的总体积与反应量(包括加入的水)体积的比例在宽的范围变化,特别优选从 1:3 到 4:3。根据一个特别优选的实施方式,混合物是通过最终组合在一起的多种溶剂提取的。本发明特别适合的溶剂包括有机溶剂二氯甲烷、乙醚、甲乙酮、乙酸乙酯、石油醚、戊烷和己烷,也包括超临界溶剂丙烷、丁烷和二氧化碳,有机溶剂中特别是乙醚和己烷,最优选乙醚。

[0039] 剩余的水可以从提取溶剂层除去,例如通过盐水洗涤(即是说饱和盐溶液)该层,通过分子筛干燥和 / 或无水盐干燥(例如硫酸钠或硫酸镁)。

[0040] 提取以后,优选浓缩提取物,有利地通过部分或完全蒸发溶剂。

[0041] 在本发明的另一个特别优选的实施方式中,用具有 1-12 个,优选具有 1-6 个,特别是 1-4 个碳原子的醇,和 / 或具有 3-6 个,优选 3-4 个碳原子的酮,提取无色涡鞭毛藻生物量,获得无色涡鞭毛藻提取物。这种情况下,用醇提取要优选于用酮提取。每种情况下,特别适合该目的单独的或是在混合物中的醇是甲醇和乙醇。

[0042] 特别适合的酮包括丙酮和 / 或甲乙酮,特别是丙酮。

[0043] 在该实施方式中,优选使用无色涡鞭毛藻的生物量的己烷提取物作为而后用醇和 / 或酮反提取的生物量。这个过程用作抗氧化提取物的浓缩和纯化。有利地,基于总重量,用该方式浓缩和纯化的提取物的具有 6-30 个碳原子的脂肪酸含量,含具有 6-30 个碳原子的脂肪酸烷基根的脂肪酸酯的含量,小于 20.0% 重量,优选小于 10.0% 重量,特别是小于 5.0% 重量。

[0044] 这种情况下醇或酮的总体积与生物量的体积的比例变化范围广,特别优选是 3:1 到 3:4。根据特别优选的实施方式,混合物是通过最终组合在一起的多种醇或酮提取的。

[0045] 提取以后,优选浓缩提取物,有利地通过部分或完全蒸发溶剂。

[0046] 这种方法获得的提取物再次优选具有 3-6 个碳原子的酮提取,更优选用丙酮和 / 或甲乙酮,特别是丙酮提取。这种情况下酮的总体积与第一次提取物的体积的比例变化范围广,特别优选是 3:1 到 3:4。根据特别优选的实施方式,第一次的提取物是通过最终组合在一起的多种酮提取的。

[0047] 提取以后,优选浓缩得到的第二次提取物,有利地通过部分或完全蒸发溶剂。

[0048] 本发明中,脂肪酸组合物另外包含与无色涡鞭毛藻不同的生物量组分,优选破囊壶菌(*Thraustochytriales*)的生物量,特别是 *Ulkenia* sp. 的生物量。与无色涡鞭毛藻不同的生物量同样本身已知。根据本发明,不仅能够使用野生型菌株的生物量,也能使用高效产 DHA(全-顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)和 / 或 DPA(全-顺-4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸)的突变或重组菌株的生物量。这种突变或重组菌株包括与使用相同基质的原始野生型菌株的百分比相比,脂肪中含有更高百分比 DHA 和 / 或 DPA 的微生物,和 / 或与使用相同基质的原始野生型菌株生产的量相比,含有更高的脂质总量。

[0049] 根据本发明特别优选的实施方式,本发明的脂肪酸组合物包含不同于无色涡鞭毛

藻的生物量的提取物。这种情况下的提取物通过培养被讨论的微生物、从培养物收获生物量、分解生物量和分离提取物有利地获得。本文中非常有利的技术在 W003/033631A1 中描述,其公开内容在此清楚地引入作为参考。

[0050] 为了分离提取物,优选使用有机溶剂提取的方法,特别是己烷,或用超临界液体提取。有利地,用己烷浸透干的生物量从而提取生物量中的提取物。这种用有机溶剂提取在 W09737032、W09743362 和 EP515460 和其他内容一起得到描述。还可以在 Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 “Biotechnological Processes for the Production of PUFAs” 中发现特别广泛的描述。

[0051] 可替代地,也可以不使用溶剂进行提取。申请文件中一个特别有利的方法在 EP-A-1178118 中记载。该方法通过生产生物量的水相悬浮液,利用离心将油相与水相分离而避免使用溶剂。

[0052] 根据本发明特别优选的变型,通过纯机械挤压不同于无色涡鞭毛藻的生物量,接着用至少一种有机溶剂或超临界溶剂,优选至少一种有机溶剂,特别是己烷提取,从而获得提取物。

[0053] 在本发明的文本中,也证明能特别有优势地优选具有 1-12 个碳原子,优选为 1-6 个碳原子,特别是 1-4 个碳原子的脂肪醇使生物量进行酯交换。这样能够特别证明甲醇和乙醇,特别是乙醇的用途。酯交换优选在酸催化下进行,特别是利用硫酸和 / 或盐酸。酯交换后的生物量随后优选一种有机溶剂,特别是己烷提取。溶剂的总体积与反应量(包括所加的水)体积的比例也能在一个大范围内变化,特别优选是 1 : 3 到 4 : 3。根据特别优选的实施方式,混合物是通过最终组合在一起的多种溶剂提取的。

[0054] 生物量的组成可以在宽范围内变化。优选地,不同于无色涡鞭毛藻的生物量包括至少一种多不饱和脂肪酸和 / 或至少一种脂肪酸酯,有利地是一种脂肪酸烷基酯,优选甘油酯,特别是甘油三酯,它含有至少一个多不饱和脂肪酸根,优选有 6-30 个碳原子。根据特别优选的实施方式,生物量中至少 10%, 特别优选至少 25%, 特别是至少 30% 的脂肪酸和 / 或脂肪酸根是 DHA 或 DHA 根。

[0055] 此处用的表达“甘油酯”是甘油和至少一种脂肪酸的酯,其中甘油的 1-3 个羟基基团被一个或多个脂肪酸根酯化。当存在多个脂肪酸根时,这些脂肪酸根可以是相同的或是不同的。

[0056] 在很多适合的起始材料中,绝大多数甘油酯是甘油三酯,即是说三个脂肪酸根和甘油的酯。这种情况下每一个脂肪酸根可以是饱和的(即是说碳原子之间的所有键是单键)或不饱和的(即是说至少有一个碳碳双键或三键)。此处不饱和脂肪酸根的类型有时指定 ω 。这个数字给出了第一个双键的位置,从脂肪酸或脂肪酸根末端的甲基基团开始计数。

[0057] 本发明的脂肪酸组合物单独组分的相对分数大体上可以自由选择,与各自用途相对应。然而本发明发现非常特别有利的是,当每种情况下基于脂肪酸组合物的总重量包含 0.1-50.0% 重量,优选 0.01-25.0% 重量,有利地 0.2-10.0% 重量,特别是 0.5-5.0% 重量的来自无色涡鞭毛藻的抗氧化提取物,以及 50.0-99.9% 重量,优选 75.0-99.9% 重量,有利地 90.0-99.8% 重量,特别是 95.0-99.5% 重量的不同于无色涡鞭毛藻生物量的组分,与上述相对分数合起来优选为 100% 重量。

[0058] 本发明的脂肪酸组合物具有相对高分数的多不饱和脂肪酸,每一种情况下基于其总重量优选包含至少 10.0%重量,有利地为至少 25.0%重量,更优选为至少 50.0%重量,特别是至少 70.0%重量的二十二碳六烯酸(全-顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)和/或二十二碳六烯酸烷基酯(全-顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸烷基酯),优选二十二碳六烯酸、二十二碳六烯酸甲酯和/或二十二碳六烯酸乙酯。

[0059] 与常规稳定的脂肪酸组合物相比,本发明的脂肪酸组合物对氧化作用具有更高的稳定性而与众不同。因此不必添加已知的抗氧化剂,例如 α -、 β -、 γ -和/或 δ -生育酚。因此,本发明的脂肪酸组合物根据第一个优选实施方式不含有另外的抗氧化剂。

[0060] 然而,既然本发明的脂肪酸组合物的抗氧化稳定性常常能通过其他抗氧化剂的加入而增强,本发明的一个特别优选实施方式中的脂肪酸组合物包含至少一种抗氧化剂,优选能协同作用的抗氧化剂,优选至少一种生育三烯酚, α -、 β -、 γ -和/或 δ -生育酚和棕榈酸抗坏血酸酯,每一种情况下基于脂肪酸组合物的总重量该组分的相对分数优选为 0.01-5.0%重量,特别是 0.05-0.5%重量。

[0061] 本发明的脂肪酸用已知的方法生产,优选通过相应组分的混合。这种情况下已经证明特别有利的是溶解来自无色渦鞭毛藻的抗氧化提取物和在溶剂中将不同于无色渦鞭毛藻的生物量的组分彼此分离,溶剂优选石油醚、己烷、戊烷、乙醇、甲醇、乙腈、二氯甲烷、甲乙酮、乙醚和/或乙酸乙酯,有利地为己烷和/或乙醚,特别是乙醚,然后将溶液相互混合,随即除去溶剂,优选通过蒸发除去。

[0062] 根据本发明的另一个优选实施方式,组分混合时不用添加溶剂,这样使用的合适的升高的温度优选的范围为 25°C -80°C,特别是 25°C -60°C。

[0063] 本发明的脂肪酸组合物可能的应用领域对于本领域技术人员而言是显而易见的。它们特别适用于 PUFAs 和 PUFA 酯所显示的应用。在这些情况下本发明的脂肪酸组合物常常被直接使用。然而,对于一些应用来说,需要提前皂化脂肪酸酯或在液相中提前皂化脂肪酸酯。例如可以通过在乙醇中与 KOH 反应,随后用无机或有机酸酸化来达到。

[0064] 本发明的脂肪酸组合物特别用作药物组合物中的活性成分或组分、化妆品制剂中的组分、食品添加剂、食物成分、功能食品组分以及用于生产高浓缩的 PUFA 的二级产品,如酯和酸。

[0065] 本发明将在稍后的实施例中得到更加详细的描述,而不将发明概念限制于此。

[0066] 确定下列脂肪酸组合物的诱导时间、过氧化物值和/或抗氧化能力:

[0067] 对照 1

[0068] 使用如 Yokochi 等人, *Appl. Microb. Biotechnol.*, (1998), 49, pp. 72-76 中描述生产的“含 DHA 的油”。它进行了常规已知方法步骤的完全精炼,下文指定这种油简称作“含 DHA 的油”。

[0069] 对照 2-17

[0070] 表 1 详细列出“含 DHA 的油”+ 棕榈酸抗坏血酸酯和/或生育酚混合物(加入 0.14% Coviox T70 , 天然生育酚混合物)的量。

[0071] 实施例 1

[0072] 根据 DGF 法 F-III(75) 得到提取物。

[0073] 称重 5.02g 隐甲藻原油(己烷提取物)放入 250ml 圆底烧瓶,再与 20mg 连苯三

酚、40ml 甲醇、10ml60%强度的氢氧化钾溶液 (g/v) 和 3 块沸石混合。80℃热水水浴中,样品在回流和温和的氮流中皂化 20 分钟。冷却后,皂液用 40ml 双蒸水冲洗三次,50ml 乙醚冲洗两次,放入 500ml 分液漏斗。

[0074] 用乙醚小心回荡进行第一次提取。水相放入 600ml 玻璃烧杯。乙醚相用 40ml 双蒸水重新冲洗,水被导入水相。乙醚相被导入 1000ml 圆底烧瓶。如此描述(加入乙醚,提取等)再次处理水相四次直到变为无色。合并的乙醚相用旋转式蒸发器浓缩,使用油泵干燥,称重。产生了 921mg 提取物。

[0075] 其与 4g “含 DHA 的油”(对照 5;含 0.1%的生育酚)混合,再加入 10ml 乙醚而充分混合。移去乙醚后,获得橙色的油。

[0076] 实施例 2

[0077] 称重 41.9g 隐甲藻原油放入 500ml 圆底烧瓶,与 120ml 甲醇和磁力搅拌棒混合。该批量在磁力搅拌器上剧烈搅拌 3 小时。上层的甲醇相慢慢倒入 250ml 圆底烧瓶。该批次的油再次与 100ml 甲醇混合,再次冲洗一小时。将油-甲醇混合物置于 100ml 分液漏斗,甲醇相转移到前面的甲醇相中。用旋转式蒸发器浓缩,通过油泵干燥。产生 760mg 提取物。“含 DHA 的油”(对照 5;含 0.1%的生育酚)与 2%重量的提取物充分混合。

[0078] 实施例 3

[0079] 与实施例 2 的脂肪酸组合物的方法类似,除了使用的“含 DHA 的油”(对照 1)与 4%重量的提取物充分混合。

[0080] 实施例 4

[0081] 隐甲藻的干生物量用甲醇直接提取,这样也一同提取了大分数的磷脂,从而得到粘稠的产物。

[0082] “含 DHA 的油”(对照 1)与 4%重量的提取物充分混合。

[0083] 实施例 5

[0084] 隐甲藻的干生物量用甲醇直接提取,这样也一同提取大分数的磷脂,从而得到非常粘稠的产物。为了除去这些化合物,提取物再次用丙酮洗涤,溶于丙酮的组分形成了隐甲藻丙酮提取物。

[0085] “含 DHA 的油”(对照 1)与 4%重量的丙酮提取物充分混合。

[0086] 实施例 6

[0087] 与实施例 2 的脂肪酸组合物的方法类似,除了使用的“含 DHA 的油”(对照 1)与 4%重量的提取物充分混合。

[0088] 确定氧化稳定性测定仪 (Rancimat dertermination)

[0089] 仪器:743Rancimat

[0090] 生产商:Metrohm

[0091] 仪器设置:

[0092] 方法:(与 AOCs 法 Cd12b-92 类似)

[0093] 温度:80℃

[0094] 气体流速:20L/h

[0095] 停止标准:终点法

[0096] 步骤和测量原理

[0097] 称取测量用的油 (3g) 放入反应容器,置于加热块上,暴露于确定的温度和气流中。形成易挥发的氧化产物,如甲酸,它们经由气体管道转移至测量容器,在其中用导电电极在蒸馏水中测量导电率。随着时间记录导电率直到终点。从曲线上可以自动形成二级导数,在鞍点具有最大值。到达鞍点的时间叫做诱导时间。

[0098] 各样品的稳定性越高,诱导时间就越长。因此,通过比较检测的诱导时间,可得出样品抗氧化状态的结论以及可以有效比较抗氧化剂之间的活性。

[0099] 对于以上列出的材料,测量的诱导时间总结在表 1。

[0100] 表 1 :氧化稳定性测试的诱导时间

[0101]

样品	添加	诱导时间 (h)
对照 1	-	1.1
对照 2	0.01%重量 Toc	1.9
对照 3	0.025%重量 Toc	3.7
对照 4	0.05%重量 Toc	5.5
对照 5	0.1%重量 Toc	5.7
对照 6	0.15%重量 Toc	6.8
对照 7	0.2%重量 Toc	7.7
对照 8	0.5%重量 Toc	7.0
对照 9	1.0%重量 Toc	7.5
对照 10	2.0%重量 Toc	6.6
对照 11	0.025%重量 Toc+0.025%重量 AP	4.3
对照 12	0.1%重量 Toc+0.025%重量 AP	9.0
对照 13	0.1%重量 Toc+0.5%重量 AP	8.5
对照 14	0.1%重量 Toc+0.1%重量 AP	7.4
对照 15	0.2%重量 Toc+0.05%重量 AP	11.6
对照 16	0.2%重量 Toc+0.1%重量 AP	10.6
对照 17	0.2%重量 Toc+0.2%重量 AP	7.0
实施例 1	18.7%重量 UVA+0.1%重量 Toc	17.9
实施例 2	2.0%重量 MeOH-extr+0.1%重量 Toc	14.3
实施例 6	4.0%重量 MeOH-extr+0.1%重量 Toc	17.6
实施例 5	4%重量 Ace-extr	41.5

[0102] AP :棕榈酸抗坏血酸酯

[0103] Toc :生育酚混合物

[0104] UvA :未皂化的级分 (见上文)

[0105] MeOH-extr :MeOH 提取物 (见上文)

[0106] Ace-extr :丙酮提取物 (见上文)

[0107] 过氧化值的确定

[0108] 上述材料室温下暗处在开口的 100ml 锥形烧瓶中贮存预定时间,然后分析它们的过氧化值。按照 AOCS(美国油脂化学家协会)官方方法 Cd-3d63 的详细说明测定过氧化值。获得的结果总结在表 2。它们显示与未添加稳定剂的“含 DHA 的油”(对照 1)或常规方法稳定的“含 DHA 的油”(对照 2)相比,通过使用甲醇提取物(实施例 3)可以显著增加抗氧化稳定性。在这些情况下,另外添加生育酚能使抗氧化稳定性进一步增加。

[0109] 表 2 :开口贮存后的过氧化值

[0110]

储存时间	对照 1	对照 2	实施例 3	实施例 6
0 日	0.5	0.7	0.6	0.6
2 日	3.0	1.2	1.4	1.3
7 日	9.5	3.0	1.9	2.7
14 日	17.8	4.2	2.8	2.1
21 日	74.5	24.9	3.1	4.2

[0111] 抗氧化能力的确定

[0112] 对照 1 和 5 以及实施例 5 的抗氧化活性如下确定：

[0113] 方法：

[0114] 用 Photochem 法测量样品。**Photochem®**根据光化学发光法 (PLC) 操作。使用光敏剂产生超氧化物阴离子根, 可通过它们与化学发光物质 (例如鲁米诺) 的反应来检测或是通过产生的光来探测。样品中出现的自由根捕获剂 (抗氧化剂) 越多, 光化学发光以浓度依赖的方式减弱的强度就越强。结果以等价的 Trolox 浓度单位报道。使用标准试剂盒操作仪器, 从而测量单个抗氧化剂和超氧化物歧化酶的抗氧化能力。

[0115] 为了确定 Trolox 的等价物, 用 n- 己烷稀释样品, 直接用来测量。

[0116] 获得的结果总结在表 3

[0117] 表 3 : 一些样品的抗氧化能力

[0118]

样品	抗氧化能力 Trolox 等价物 ($\mu\text{g/ml}$)
对照 1	20.4
对照 5	328
实施例 5	1143

[0119] 可以看出本发明的实施例具有相对高的抗氧化能力。必须指出本文中加入了提取物的量不等价于混合物中抗氧化活性量。例如, 可以进一步纯化, 产生的提取物具有更大的抗氧化活性。当然, 保护范围覆盖更高度纯的浓缩物直到抗氧化活性化合物。