

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 955962 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 955962

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A23K 1/16
A23L 1/035
A61K 7/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 18.04.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 13.12.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 13.12.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 18.04.1995 PCT/EP1995/001461
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

18.04.1994 EP 94201067

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Gist-Brocades B.V., Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 Ma Delft, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Edens, Luppo, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Meijer, Dirk, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Van Paridon, Petrus Andreas, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Stabiilit vesi-öljyemulsiot

Stabila vatten-olja-emulsioner

STABIILIT VESI-ÖLJYEMULSIOT

Keksintö kuvaa stabiileja vesi-öljyemulsioita. Emulsioita käytetään labiilien yhdisteiden lisäämiseen rehu-, elin-
5 tarvike- tai kosmeettisiin koostumuksiin.

Useita elintarvikkeiden, rehujen ja kosmeettisten aineiden
lisäaineita, kuten esimerkiksi väriaineita, vitamiineja,
10 rokotteita tai entsyymejä, pidetään labiileina.

Lisäaineet voivat olla kemiallisesti tai entsyymaattisesti
yhteensopimattomia muiden koostumuksessa olevien yhdis-
teiden kanssa. Lisäaineet voivat olla myös lämpölabiileja,
minkä vuoksi ne pyrkivät inaktivoitumaan korkeassa lämpö-
15 tilassa tapahtuvissa prosessointivaiheissa. Esimerkiksi
rehu tai elintarvike valmistetaan usein käyttämällä suula-
kepuristusprosessia. Nämä suulakepuristusprosessit ovat
välttämättömiä, jotta elintarvike- tai rehupartikkeli saa-
daan tarvittavaan muotoon. Lisäksi perusrehuun tai -elin-
20 tarvikkeeseen sisällytetään kasvavassa määrin kaikenlaisia
lisäaineita. Rehu- tai elintarvikekoostumukset tehdään yhä
useammin valmiiksi yhdessä sellaisten lisäaineiden kanssa,
jotka oli aikaisemmin tapana lisätä itsenäisesti.

25 Labiilin yhdisteen hajoamisen välttämiseksi on ehdotettu
useita ratkaisuja. Eräs ratkaisu on haluttujen yhdisteiden
lisääminen korkeassa lämpötilassa tapahtuvan käsittelyvai-
heen jälkeen, esimerkiksi suulakepuristusprosessin jäl-
keen. Onkin julkaistu erilaisia selontekoja, jotka koske-
30 vat labiilien yhdisteiden formulaatioita ja/tai menetelmiä
sellaisten yhdisteiden lisäämiseksi rehu- tai elintarvike-
partikkeleihin.

DE 2602260 kuvaa entsyymisuspension käyttöä nestemäisessä
35 tai sulassa ravintorasvassa. Seoksen jäähdyttämisen jäl-
keen materiaali on pilkottava. Karkean hajotuksen jälkeen
partikkeleja käsitellään edelleen esimerkiksi jauhamalla.
Tämän prosessin epäkohtana on se, että jauheiden jauhami-

nen on pienen partikkelikoon takaamiseksi hyvin työlästä ja johtaa ei-toivottujen pölyjen muodostumiseen.

5 WO-patenttihakemus 93/14645 ratkaisee ongelman lisäämällä lämpölabiileja yhdisteitä sisältävän öljysuspension suulakepuristusprosessin jälkeen. Suspension lisääminen pelletteihin suoritetaan alennetussa paineessa.

10 WO-patenttihakemus 92/06599 kuvaa vesi-öljyemulsion käyttöä rokotteiden suojaamiseen. Siinä ei ole mainintaa (proteiinin) stabilointiaineen (s.o. veden aktiivisuutta alentava aine) käytöstä emulsion osana. Labiilien yhdisteiden, kuten entsyymien, formulointi sellaiseen emulsioon aiheuttaisi nopean entsyymiaktiivisuuden häviämisen. Tämä hävik-
15 ki voi nousta 50 %:iin kuukaudessa kuumassa ilmastossa, mitä ei voida hyväksyä kaupallisille tuotteille. Samainen patenttihakemus kuvaa myös lesitiinipohjaisen emulgaattorin edullisen sovellutuksen.

20 WO-patenttihakemus 93/16175 kuvaa stabiloidun entsyymin vesiliuoksen, joka sisältää stabilointiaineena ureaa ja/tai polyolia. Urea ja polyolit tunnetaan aineina, jotka stabiloivat entsyymiä vesiympäristössä.

25 Myös kosmetiikka-alalla on kasvava suuntaus sisällyttää labiileja yhdisteitä lopputuotteet sisältävään öljyyn. Erityisesti ihon suojaamiseen, puhdistamiseen ja nuorentamiseen tarkoitettut yhdisteet ovat ilmeisen kiinnostavia. Entsyymit, kuten esimerkiksi proteaasit, kuuluvat labiileihin yhdisteisiin, joilla väitetään olevan tässä suhteessa hyödyllisiä vaikutuksia.
30

Jotta entsyymiaktiivisuus kosmeettisissa formulaatioissa taataan pidentyneinä varastointiaikoina, entsyymiformu-
35 lointiaineina käytetään yleisesti pääasiallisesti vedettömiä, hydrofobisia yhdisteitä, kuten vahoja, kasvi- tai mineraaliöljyjä. Vaikka tämä lähestymistapa merkitsee ent-

syymin korkeaa varastointistabiilisuutta kosmeettisessa formulaatiossa, vakavana epäkohtana on se, että entsyymi voidaan aktivoida vain saattamalla formulaatiot alttiiksi verrattain suurille vesimäärille (minkä aikana alunperin vedetön entsyymi liuotetaan). Tähän sisältyy se ongelma, että entsyymin aktivoituminen on verrattain hidasta ja paljon alkuperäisestä entsyymiaktiivisuudesta menee hukkaan. Tämä lähestymistapa ei ole kovin miellyttävä useissa kosmeettisissa sovellutuksissa.

10

Vaihtoehtoisessa lähestymistavassa, kuten J03004791:ssä kuvataan, kosmeettisissa aineissa käytettävät proteiinia hajottavat entsyymit stabiloidaan lisäämällä entsyymien vesiliuokseen polysakkarideja. Vaikka tämä lähestymistapa minimoi entsyymin uudelleenaktivointiin tarvittavan veden käytön, lähestymistapa jättää huomioon ottamatta monissa kosmeettisissa formulaatioissa olevan lipofiilisen faasin tarpeen.

20

Tässä keksinnössä esitetään stabiileja vesi-öljyemulsioita. Yksityiskohtaisesti keksintö esittää sellaisen vesi-öljyemulsion, jolle on tunnusomaista se, että se sisältää seuraavat aineosat: vettä, öljyä, haluttua labiilia yhdistettä, stabilointiainetta ja emulgaattoria.

25

Tämän keksinnön mukaiset vesi-öljyemulsiot sisältävät halutun labiilin yhdisteen vesifaasiin liuotettuna ja stabilointiaineen lisäyksellä stabiloituna. Stabilointiaine on edullisesti veden aktiivisuutta alentava aine. Edullisemmin stabilointiaine on polyoli.

30

Polyoli lisätään vesi-öljyemulsion vesifaasiin korkeissa konsentraatioissa, s.o. määrinä, jotka ovat vähintään 10 %, edullisesti 10-70 % ja edullisemmin 30-70 % (w/w).

35

Edullinen koostumus sisältää vesi-öljyemulsion, joka sisältää haluttua labiilia yhdistettä vesifaasissa yhdessä

polyolin kanssa, ja emulsio on siinä stabiloitu käyttämäl-
lä emulgaattoria, joka on aktiivinen polyolin korkeissa
konsentraatioissa. Käytetty emulgaattori on edullisesti
tislattu monoglyseridi tai polyglyseroli polyrisineolaat-
ti.

Edelleen haluttu yhdiste on edullisesti entsyymi, vitamiini,
väriaine tai rokote.

Esitettyjä emulsioita käytetään suojaamaan labiileja yh-
disteitä ennen niiden lisäämistä elintarvike-, rehu-, kos-
meettisiin tai öljymäisiin koostumuksiin.

Keksinnön mukaiset vesi-öljyemulsiot ovat stabiileja pi-
dentyneinä ajanjaksoina. Niitä voidaan käyttää ihmisten
tai eläinten ruokakoostumusten valmistamiseen. Keksinnön
mukaisia vesi-öljyemulsioita esimerkiksi sumutetaan rehu-
tai elintarvikepartikkelien päälle. Edullisesti emulsiot
sumutetaan rehu- tai elintarvikepartikkelien päälle sen
jälkeen, kun emulsio on laimennettu öljyyn tai rasvaan.
Lisäksi keksinnön mukaisia emulsioita voidaan käyttää kos-
meettisten koostumusten valmistamiseen.

Keksintö esittää vesi-öljyemulsion, joka sisältää vesifaa-
sissaan halutun, labiilin yhdisteen yhdessä stabilointiai-
neen kanssa, ja jossa emulsio stabiloidaan käyttämällä so-
pivaa emulgaattoria.

Vesi-öljyemulsio sisältää seuraavat aineosat: vettä, öljyä,
haluttua labiilia yhdistettä, stabilointiainetta ja
emulgaattoria. Labiilit yhdisteet ovat vesifaasissa. Sta-
bilointiainetta lisätään vesifaasiin halutun yhdisteen
stabiloimiseksi.

Labiili yhdiste voi olla mikä tahansa yhdiste, joka on ke-
miallisesti tai entsyymaattisesti yhteen sopimaton muiden
yhdisteiden kanssa. Yhteen sopimaton yhdiste voi olla joko

emulsiossa tai siinä koostumuksessa, johon emulsio lisätään. Lisäksi labiili yhdiste voi olla mikä tahansa yhdiste, joka on lämpölabiili.

- 5 Keksintö esittää stabiilit vesi-öljyemulsiot, jotka sisältävät vesifaasissa useampia kuin yhden labiillin yhdisteen. Keksintö esittää myös stabiilit vesi-öljyemulsiot, jotka sisältävät vesifaasissa labiilia yhdistettä sekä labiillin yhdisteen kanssa yhteen sopimatonta yhdistettä. Keksintö
- 10 mahdollistaa sellaisten emulsioiden valmistamisen, jotka sisältävät keskenään yhteen sopimattomia, vesiliukoisia yhdisteitä. Näiden yhteen sopimattomien yhdisteiden fysikaalinen erottaminen suoritetaan edullisesti panemalla niitä yksittäisiin vesipisaroihin emulsion öljyfaasiin.

15

Edullisesti labiili yhdiste sisältää eläviä mikro-organismeja, joita voidaan käyttää esimerkiksi probioottisina. Edullisemmin labiili yhdiste on entsyymi, vitamiini, väriaine tai rokote. Sopivia entsyymejä ovat proteaasit, fytaasit, karbohydraasit, lipaasit, fosfolipaasit ja oksidoreduktaasit. Sopivia vitamiineja ovat vesiliukoiset vitamiinit, esim. C-vitamiini.

20

- Keksinnön mukaiset emulsiot ovat erityisen käyttökelpoisia keskenään yhteen sopimattomien yhdisteiden, esim. entsyymiseosten, joista yksi entsyymeistä on proteolyyttinen entsyymi, formulointiin.

25

- Lisäksi keksinnön mukaiset emulsiot mahdollistavat labiilien yhdisteiden täsmällisen annostuksen. Ensiksikin sen vuoksi, että labiilien yhdisteiden stabiilisuus taataan, ja lisäksi sen vuoksi, että nestemäisen emulsion, erityisesti öljyyn laimennetun emulsion, annostus on täsmällisempää kuin jauheen annostus. Esimerkiksi rehun prosessoinnin aikaisten tekijöiden, kuten lämmön, paineen, kosteuden, hapetus-pelkistysreaktioiden ja hankauksen tiedetään voivan vaikuttaa ratkaisevasti vitamiinien stabiili-

30

35

suuteen. Erityisesti E-, K- ja C- (askorbiinihappo) -vitamiinit tunnetaan pysymättömyydestään (katso esimerkiksi M.B. Coelho, Feed International, joulukuu 1991, sivut 39-45). Askorbiinihappo on vesiliukoinen, ja sen tiedetään olevan erittäin herkkä hivenaineille, esim. raudalle, joi-
 5 ta lisätään yleisesti rehuun. Askorbiinihapon paneminen keksinnön mukaisen vesi-öljyemulsioon vesifaasiin on miellyttävä vaihtoehto minimoimaan vitamiinin kallista yliannostusta.

10

Keksinnön mukaiset vesi-öljyemulsiot sisältävät vesifaasin, joka sisältää haluttua yhdistettä erittäin väkevöidyssä muodossa. Haluttua yhdistettä voidaan lisätä vesifaasiin määränä 0,01-30 % (w/w) aktiivisen yhdisteen kuivapainon perusteella.

15

Labiilit yhdisteet stabiloidaan lisäämällä vesifaasiin stabilointiainetta. Edullisesti stabilointiaineena käytetään veden aktiivisuutta alentavaa ainetta. Veden aktiivisuutta alentava aine on edullisesti suola, edullisemmin polyoli. Erityisen käyttökelpoisia polyoleja ovat glyseroli, sorbitoli, sakkaroosi, polypropeeniglykoli, trehaloosi, maltodekstriinit, laktoosi ja glukoosi.

20

Lisäksi veden aktiivisuutta alentava aine ehkäisee mikrobikasvua emulsioon vesifaasissa. Tarvittaessa vesifaasin mikrobistabiilisuutta voidaan edelleen parantaa panemalla yleisesti hyväksyttäviä (elintarvikkeiksi soveltuvia) antimikrobisia aineita, kuten sorbaatteja tai bentsoaatteja.

25

30

Vesifaasiin lisättävän veden aktiivisuutta alentavan aineen määrä riippuu aineen siitä määrästä, joka tarvitaan halutun stabiilisuusvaikutuksen tai halutun antimikrobisen vaikutuksen saamiseksi. Polyoleja lisätään vesifaasiin määrinä, jotka ovat vähintään 10 %, edullisesti 10-70 %, edullisemmin 30-70 % (w/w).

35

Stabiilien emulsioiden saamiseen käytetään emulgaattoria. Emulgaattorit ovat pinta-aktiivisia aineita, jotka mahdollistavat yhden nestefaasin dispergoitumisen toiseen nestefaasiin. Emulgaattoreissa on sekä hydrofiilisiä että lipofiilisiä ryhmiä, näiden ryhmien suhde tunnetaan HLB-arvona.

Tavallisesti rasvaliukoisten, hydrofobisten emulgaattoreiden HLB-arvot ovat alueella 0-9, kun taas vesiliukoisten aineiden HLB-arvot ovat välillä 11 - 20. Vesi-öljyemulsioiden stabilointiin sopivien emulgaattoreiden tai emulgaattoriseosten HLB-arvojen väitetään olevan alemmalla alueella.

Yllättäen sellaiset hyvin tunnetut emulgaattorit kuin SpanTM 80 (HLB = 4,3), TweenTM 80 (HLB = 15) ja näiden seokset eivät aikaansaa stabiileja vesi-öljyemulsioita verrattain korkeiden polyolimäärien läsnä ollessa. Samoin sellaisten lesitiinipohjaisten emulgaattoreiden kuin Emulbes-toTM 2000, EmulfluidTM E (käytön) seurauksena on nopea faasisien erottuminen.

Tämä keksintö kuvaa ensimmäisen kerran emulgaattorit, jotka ovat aktiivisia verrattain korkeiden polyolimäärien läsnä ollessa. On löydetty emulgaattoreita, jotka toimivat niinkin korkeiden polyolimäärien kuin 50 % läsnä ollessa.

Käyttökelpoisia emulgaattoreita ovat monoglyseridit (kuten HymonoTM 1163 ja HymonoTM 7804) ja polyglyseroli polyrisinoleaatti (AdmulTM WOL 1403). Koska valikoidut emulgaattorit ovat tehokkaita verrattain korkeiden polyolimäärien läsnä ollessa, öljyfaasissa olevien yksittäisten vesipisaroiden yhtyminen on vähäistä. Näin keksinnön mukainen emulsio estää riittävällä tavalla ei-öljyliukoisten yhdisteiden kulkeutumisen yksittäisten vesipisaroiden välillä emulsiossa.

Polyglyseroli polyrisinoleaatin (Admul™ WOL 1403) havaittiin olevan erityisen käyttökelpoinen yhdessä fytaasin kanssa.

- 5 Polyglyseroli polyrisinoleaatti on neste huoneenlämmössä eikä vaadi kuumentamista ennen sekoittamista öljyn kanssa tai sen aikana. Emulsion viskositeetti säilyy alhaisena polyglyseroli polyrisinoleaattia käytettäessä, eikä pisaroiden yhteen keräytymistä esiinny juuri lainkaan. Lisäksi
10 polyglyseroli polyrisinoleaatin käyttö mahdollistaa vesifaasin korkean konsentraation emulsiossa.

- Keksinnön mukaisissa emulsioissa käytetyt öljyt ovat elintarvike-, rehu- tai kosmeettisissa valmisteissa tavallisesti käytettyjä öljyjä. Niihin kuuluu kalaöljy, soijaöljy, rapsiöljy, oliiviöljy, ruiskukkaöljy, palmuöljy, avokadoöljy ja eri mineraaliöljyt.

- Keksintö koskee edelleen menetelmää mainittujen vesi-öljy-emulsioiden valmistamiseksi.

- Emulsiot voidaan valmistaa syöttämällä suuri määrä energiaa, esimerkiksi voimakkaalla sekoittamisella tai ottamalla käyttöön suuret hiertovoimat. Näin saadaan stabiileja
25 emulsioita, joita voidaan stabiilisti varastoida tässä muodossa.

- Keksintö koskee emulsioita, jotka ovat stabiileja pitkän varastoinnin aikana. Emulsiot ovat stabiileja yhden kuukauden ajan, edullisemmin kuuden kuukauden ajan, edullisimmin yli vuoden ajan.

- Keksinnön mukaisia vesi-öljyemulsioita voidaan käyttää elintarvikkeiden, rehujen tai kosmeettisten aineiden lisäaineina.

Keksinnön mukaisten emulsioiden käyttö antaa elintarvike-, rehu- ja kosmetiikkavalmistajille mahdollisuuden käyttää labiileja yhdisteitä prosessivaiheissa, jotka johtaisivat muutoin mainittujen labiilien yhdisteiden inaktivoitumiseen. Lisäksi keksinnön mukaisten emulsioiden käyttö estää riittävässä määrin ei-öljyliukoisten yhdisteiden kulkeutumisen rehu-, elintarvike- tai kosmetiikkakoostumuksesta emulsion vesifaasiin. Näin emulsion vesifaasissa oleva haluttu labiili yhdiste tai yhdisteet suojataan riittävästi kemiallisilta tai entsymaattisilta yhteensopimattomuuksilta, joita siinä koostumuksessa on, johon emulsio lisätään.

Keksinnön mukaisia emulsioita käytetään ihmisten tai eläinten elintarvike- tai rehupartikkeleiden, erityisesti kalanrehun tai siipikarjan rehun, valmistamisessa. Edullisesti emulsiot lisätään sumuttamalla elintarvike- tai rehupartikkelien päälle. Lisäys voidaan tehdä myös alennetussa paineessa, kuten WO-patenttihakemuksessa 93/14645 kuvataan.

Emulsioita voidaan lisätä sellaisenaan elintarvike- tai rehupartikkeleihin. Edullisesti emulsiot laimennetaan öljyyn tai rasvaan ennen elintarvike- tai rehupartikkeleihin lisäämistä. Tämän prosessin etuna on se, että konsentroitua labiili yhdiste voidaan helposti, mikä tarkoittaa alhaista energiansyöttöä, homogeenisesti sekoittaa öljyfaasin kanssa. Näin taataan aktiivisen yhdisteen tasainen jakautuminen öljyyn. Öljy, joka sisältää sitten laimennettua haluttua yhdistettä, voidaan myöhemmin sumuttaa elintarvike- tai rehupartikkelin päälle. Kun valmistetaan lopullinen, partikkelien päälle sumutettava seos, tähän prosessiin tarvitaan minimaalinen investointi.

Toisessa sovelluksessa keksinnön mukaista emulsiota voidaan käyttää parantamaan soija- ja rapsiöljyn hartsinpoistoa (degumming). Tässä tapauksessa emulsio sisältää fosfo-

- lipaasi A2:ta. Hartsinpoistolla (degumming) tarkoitetaan lesitiinin poistamista osoitetuista öljyistä. EP-patentti-hakemuksessa 0 513 709 on kuvattu perusteellisesti fosfolipaasin käyttö hartsinpoistoon. Tämä entsyymi parantaa ei-hydratoituvien fosfolipidien vesiliukoisuutta, mikä helpottaa niiden poistamista öljystä. Keksinnön mukaiset emulsiot helpottavat fosfolipaasin lisäämistä osoitettuihin öljyihin.
- 10 Jäljempänä esitetään muutamia esimerkkejä, joiden tarkoituksena on ainoastaan kuvata keksintöä eikä rajoittaa sen piiriä millään tavalla.

ESIMERKKI 1

- 15 Vesi-öljyemulsioiden fysikaalinen stabiilisuus käyttämällä eri emulgaattoreita ja eri entsyymejä

1a. Entsyymiliuosten koostumus

- 20 Eri vesi-öljyemulsioiden stabiilisuudet osoitettiin käyttämällä elintarvikkeeksi soveltuvaa neutraalia proteaasia ja rehuksi soveltuvaa fytaasia.
- Proteaasin standardiliuos sisälsi 20 g proteaasia Protease B500 (Gist-brocades, Hollanti), joka oli liuotettu 80 g:aan vettä. Täydellisen liukenemisen jälkeen lisättiin joko sorbitolia tai glyserolia ja liuotettiin tarkoitetun konsentraation saamiseksi.
- 25
- 30 Fytaasin standardiliuos sisälsi joko puhdistamatonta fermentaatiokonsentraattia (Natuphos® UF -konsentraatti, joka on saatu ultrasuodattamalla itiöttömän *Aspergillus*-viljelmän suodos) tai standardisoitua fermentaatiotuotetta Natuphos® 5000 (Gist-brocades, Hollanti), joka sisälsi 40 % sorbitolia. Eri kokeissa käytetyt fytaasiliuokset sisälsivät glyserolia tai sorbitolia 35 ja 50 %:n välisenä loppukonsentraationa.
- 35

1b. SpanTM 80 / TweenTM 80 -seoksilla valmistetut emulsiot

Viiteen grammaan kalaöljyä (Norjasta Skrettingistä saatua villakuoreen öljyä) lisättiin 0,5 g joko SpanTM 80 tai
 5 TweenTM 80 -emulgaattoria (molemmat yhtiöltä Brocacef, Alankomaat). Lisäksi valmistettiin emulgaattoriseos, joka sisälsi eri suhteissa edellä valmistettuja SpanTM 80 ja TweenTM 80 -liuoksia. Perusteellisen sekoituksen jälkeen
 10 lisättiin 0,18 g yhtä edellä kuvatuista stabiloiduista entsyymiliuoksista, minkä jälkeen seosta sekoitettiin perusteellisesti vortex-sekoittimella.

Kaikissa emulsioissa, jotka sisälsivät joko proteaasia tai fytaasia yhdessä jonkun eri SpanTM 80 ja/tai TweenTM 80
 15 -emulgaattorin kanssa, näkyi öljy- ja vesikerroksen erottumista huoneenlämpötilassa muutamien tuntien kuluessa.

1c. Lesitiinipohjaisilla emulgaattoreilla valmistetut emulsiot

20

EmulbestoTM 2000, EmulfluidTM E ja VP627 ovat kaikki lesitiinipohjaisia emulgaattoreita ja saatiin Lucas Meyeriltä, Saksasta. Emulsiot valmistettiin seuraten kohdassa (1b) pääpiirteittäin esitettyä lähestymistapaa käyttämällä 0,5
 25 g kutakin edellä mainituista lesitiinipohjaisista emulgaattoreista. Muutamien tuntien sisällä kaikissa näillä emulgaattorituotteilla valmistetuissa emulsioissa näkyi öljy- ja vesikerroksen erottumista.

30 1d. Monoglyseridiemulgaattoreilla valmistetut emulsiot

HymonoTM 1163 ja HymonoTM 7804 saatiin Questilta, Hollannista.

35 24 g HymonoTM -valmistetta (monoglyseridi; E471) liuotetaan varovasti sekoittaen 700 g:aan kalanöljyä 70 °C:n lämpötilassa (HymonoTM 1163) tai 50 °C:n lämpötilassa (HymonoTM

7804). Sen jälkeen liuos jäähdytetään, kunnes se on ainakin 50 °C:ista. Käyttämällä suurinopeuksista homogenaattoria (Ultra Turrax), 200 g entsyymiliuosta dispergoidaan emulgaattoria sisältävään öljyfaasiin, ja emulsio jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Muutamien päivien kuluttua vesifaasissa näkyi ainoastaan hyvin niukkaa sedimentoitumista. Tämä sedimentoituminen voitaisiin minimoida lisäämällä palmitiinihappoa.

10 1e. Polyglyseroli polyrisinoleaattilla valmistetut emulsiot

Admul™ WOL 1403 (polyglyseroli polyrisinoleaatti) saatiin Questilta, Hollannista. Tällä emulgaattorilla on yhdessä labiilien yhdisteiden kanssa useita etuja, muun muassa se, että Admul™ WOL 1403 on huoneenlämmössä neste, mikä mahdollistaa helpon liuottamisen öljyfaasiin. Tällä vältetään öljyn kuumentamisen tarve, joten käsittely on helpompaa ja labiilit yhdisteet voidaan lisätä öljy/emulgaattoriseokseen huoneenlämpötilassa, jolloin minimoidaan lämpökuormitus.

Emulsion valmistamiseksi Admul™ WOL 1403 -valmisteella, sekoitettiin 3 g Admul™ WOL 1403 -valmistetta 87,5 g:n kanssa kalaöljyä, mitä seurasi 25 g:n lisäys Natuphos® 5000:a (stabiloitu 50 %:lla sorbitolia). Emulsion viskositeetti pysyi alhaisena, vesifaasin pisarakoko oli noin 2 µm, eikä pisaroiden yhteenliittymistä esiintynyt. Tämä osoittaa Admul™ WOL 1403:n erinomaisen emulgointiominaisuuden tässä systeemissä. Alhainen viskositeetti mahdollistaa paljon korkeamman entsyymiä sisältävän vesifaasin konsentraation lopullisessa emulsiossa.

Lisäämällä Admul™:n määrää 3 g:sta 9 g:aan, näytti olevan mahdollista emulgoida 75 g:n seos Natuphos® 5000 Liquididiä 87,5 g:aan kalaöljyä. Tämä emulsio on fysikaalisesti stabiili vähintään kuuden kuukauden ajan. Fytaaasientsyymien kohdalla Admul™-emulsio on flokkuloitumiskäyttämisen

suhteen ylivoimaisesti parempi kuin Hymono™-emulsiot ja fysikaalisesti Hymono™-emulsioita stabiilimpi (katso taulukko 1).

- 5 **Taulukko 1. Hymono™ 1163 ja Admul™ WOL 1403 -emulsioiden fysikaalisten parametrien ja ominaisuuksien vertailu.**

FYSIKAALISET PARAMETRIT JA OMINAISUUDET			
		HYMONO 1163	ADMUL WOL
10	Lämpötila, jossa emulgaattori liukenee	70 °C	huoneen- lämpö
15	lämpötila entsyymin lisäyksen aikana	50 °C	huoneen- lämpö
	emulsion valmistamiseen tarvittava energia	suuri	vähäinen
20	emulsion viskositeetti	keskisuuri	alhainen
	pisaroiden kasautuminen	keskisuuri	vähäinen
25	pisarakoko	2-10 µm	2 µm
	vesifaasin maksimaalinen konsentraatio emulsiossa	noin 22 % (w/w)	noin 44 % (w/w)

30

35

ESIMERKKI 2Entsyymiaktiivisuus neutraalissa proteaasi-vesi-öljyemulsiossa

5 A-liuos:

Liuotetaan varovasti sekoittaen 5 g sumutuskuivattua Protease B500 -valmistetta 20 g:aan "demi"-vettä. Proteaasi-liuos laimennetaan glyserolilla lopullisen 50 %:n glyserolikonsentraation saamiseksi.

10

B-liuos:

Liuotetaan varovasti sekoittaen 6 g Hymono™ 1163 -valmistetta 175 g:aan kalaöljyä 70 °C:n lämpötilassa. Sen jälkeen liuos jäähdytetään 50 °C:seen.

15

A-liuos dispergoidaan B-liuokseen käyttämällä suurinopeuksista homogenaattoria. Emulsio jäähdytetään huoneenlämpötilaan.

20 Proteaasi-vesi-öljyemulsion proteaasiaktiivisuus on noin 17 000 U/g emulsiota. Proteaasin talteenotto sekä A-liuoksesta että vesi-öljyemulsiosta oli noin 90 %, mikä osoittaa sen, että emulgoinnilla ei ollut merkittäviä haitallisia vaikutuksia proteolyyttiseen aktiivisuuteen. Emulsion, jota säilytettiin joko 25 °C:n tai 35 °C:n lämpötilassa, varastointistabiilisuudet esitetään taulukossa 2.

30

35

Taulukko 2. Proteaasiemulsiovalmisteen varastointistabiilisuus

5	AIKA (viikko)	PROTEOLYYTTINEN AKTIIVISUUS				PISARAN LÄPIMITTA	
		25 °C		35 °C		µm	
		U*/g emulsiota	%	U*/g emulsiota	%	25 °C	35 °C
10	0	16,926	100	16,926	100	2-10	2-10
	1	12,078	71	14,719	87	2-10	2-10
	2	19,957	118	17,446	103	---	---
	3	17,056	101	14,892	88	---	---
	4	15,281	90	14,113	83	---	---
15	5	14,848	88	12,468	74	---	---
	6	15,844	94	7,143	42	2-10	2-10
	7	13,420	79	10,736	63	---	---
	5 (kk)	---	--	---	--	2-15	---

* Proteaasiaktiivisuuden yksikkö on se entsyymiaktiivisuuden määrä, joka tuottaa kaseiinista (Hammersten, Merck) sellaisen hydrolysaattimäärän pH-arvossa 7,0 ja 37 °C:ssa, jolla on sama optinen tiheys 275 nm:ssä kuin 1,5 µg/ml:n tyrosiiniliuoksella.

25 ESIMERKKI 3

Entsyymiaktiivisuus stabiilissa fytaasi-vesi-öljyemulsiossa

A-liuos:

30 Liuotetaan 100 g sorbitolia varovasti sekoittaen 100 g:aan Natuphos® UF-konsentraattia.

B-liuos:

35 Liuotetaan 24 g Hymono™ 1163:a varovasti sekoittaen 700 g:aan kalaöljyä 70 °C:n lämpötilassa. Sen jälkeen liuos jäähdytetään 50 °C:seen.

A-liuos dispergoidaan B-liuokseen käyttämällä suurinopeuksista homogenaattoria. Emulsio jäähdytetään huoneenlämpöön.

- 5 Fytaaasiaktiivisuuden talteenotto sekä A-liuoksesta että fytaaasi-vesi-öljyemulsiosta oli noin 90 %. Tämä osoittaa sen, että emulgoinnilla ei ollut haitallisia vaikutuksia entsyymin fytiinihapon (phytic acid) hajotusaktiivisuuteen. Fytaaasiaktiivisuus määritettiin, kuten on kuvattu EP
10 0 420 358:ssa.

Emulsion, jota säilytettiin joko 25 °C:n tai 35 °C:n lämpötilassa, varastointistabiilisuudet esitetään taulukossa 3.

15

Taulukko 3. Fytaaasiemulsiovalmisteen varastointistabiilisuus

	AIKA (viikko)	FYTAAASIAKTIIVISUUS				PISARAN LÄPIMITTA	
		25 °C		35 °C		µm	
		U*/g emulsiota	%	U*/g emulsiota	%	25 °C	35 °C
20	0	531	100	531	100	2-10	2-10
	1	623	117	569	107	2-10	2-10
	3	494	93	654	123	---	---
	4	616	116	528	99	---	---
	5	523	98	337	63	---	---
25	6	513	97	451	85	2-10	2-15
	7	295	56	380	71	---	---
	5 (kk)	---	--	---	--	2-15	---
30							

* Fytaaasiaktiivisuuden yksikkö määritetään entsyymin sinä määränä, joka vapauttaa epäorgaanista fosforia 1,5 mM natriumfytaatista nopeudella 1 µmol/min 37 °C:ssa ja pH-arvossa 5,50.

35

ESIMERKKI 4

Stabiilien fytaasi- ja proteaasi-vesi-öljyemulsioiden valmistus käyttämällä polyglyseroli polyrisinoleaattia

5 4a. Fytaasi/Öljyemulsio

Joko 3,0 g tai 9,0 g Admul™ W 1403 -valmistetta liuotettiin 87,5 g:aan kalaöljyä, minkä jälkeen emulsio valmistettiin 75 g:n avulla Natuphos® 5000:a, joka sisälsi 50 % sorbitolia, käyttämällä Ultra Turraxia 2 * 30 sekuntia täydellä nopeudella. Natuphos®, joka oli stabiloitu 40 %:lla sorbitolia, on saatettu 50 %:iin käyttämällä lisä-sorbitolia. Sen seurauksena laskennallinen aktiivisuus tulee olemaan 4100 U/g 5000 U/g:n sijasta.

15

Emulsion rikkominen:

Emulsiota pakastetaan hitaasti, kunnes se on -20 °C:ista, ja pidetään tässä lämpötilassa 20 tunnin ajan. Sen jälkeen se saatetaan huoneenlämpötilaan ja sentrifugoidaan nopeudella 20 000 rpm Sorvall-sentrifugissa (SM 24 -roottori) 30 minuutin ajan. Tämän käsittelyn aikana lämpötila on 20-25 °C.

Emulsio, joka sisältää 3,0 g emulgaattoria, erotetaan nyt kolmeen kerrokseen, s.o. kirkkaaseen öljykerrokseen, ohueen välikerrokseen ja kirkkaaseen vesikerrokseen. Tässä vesikerroksessa fytaasiaktiivisuuden on määritetty olevan 3750 U/g, mikä osoittaa sen, että fytaasiaktiivisuuden talteenotto on vähintään 90 %.

30

Emulsiota, joka sisälsi 9,0 g emulgaattoria, ei voitu erottaa sentrifugoinnilla. Huoneenlämmössä pidettynä jälkimmäinen emulsio pysyi fysikaalisesti stabiilina ainakin 6 kuukauden ajan. Tämä havainto on yhdenmukainen esimerkiksi 1 kuvatun fytaasiemulsion ylivoimaisen stabiilisuuden kanssa.

35

4b. Proteaasi/öljyemulsio

Seos, jonka koostumus oli 87,5 g kalaöljyä, 3,0 g Admul™ WOL 1403 (liuotettu kalaöljyyn) ja 75 g Protease B500:aa, 50%:isessa sorbitoliliuoksessa homogenoitiin samalla tavalla kuin edellä on kuvattu fytaasi/öljyemulsiolle. Aivan yllättäen tämän proteolyyttisen entsyymin yhdistelmä Admul™ WOL -emulgaattorin kanssa tuotti emulsioita, joilla oli alentunut stabiilisuus verrattuna Protease B500:n stabiilisuuteen yhdistelmässä Hymono™-emulgaattorin kanssa (katso esimerkki 2). Protease B500 -emulsioita valmistettaessa on ilmeisesti suosittava Hymono™-emulgaattoria.

ESIMERKKI 5

15 Fytaasin stabiilisuus proteaaseja sisältävissä emulsioissa

Emulsion yhteen sopimattomia yhdisteitä suojaavan vaikutuksen osoittamiseksi valmistettiin sekä fytaasia että hapanta proteaasia sisältäviä vesi-öljyemulsioita. Tämä esimerkki osoittaa sen, että sellaisten emulsioiden seos, jotka sisältävät vesifaasissa joko fytaasia tai hapanta proteaasia, on stabiilimpi kuin emulsio, joka sisältää kahta entsyymiä yhteen vesifaasiin sekoitettuna.

25 Materiaalit

Natuphos® UF-konsentraatti (stabiloitu 50 %:lla sorbitolia laimentamalla 70%:ista sorbitoliliuosta, joka saatiin Roquette Frèresiltä, Ranskasta).

30 Fromase® 150 TL (nestemäinen hapan proteaasi *Mucor mieheistä*, saatu yhtiöltä Gist-brocades).

Admul™ WOL 1403 (Quest, Hollanti).

35 Kalaöljy (villakuoreen öljyä Skrettingiltä, Norjasta).

5a. Natuphos®/öljyemulsio

- Stabiili emulsio saatiin seuraamalla esimerkissä 4 pää-
 piirteittäin esitettyä menettelyä liuottamalla 6 g Admul™
 5 WOLia 87,5 g:aan kalaöljyä ja sekoittamalla sen jälkeen
 voimakkaasti öljyä 75 g:n kanssa Natuphos® UF-konsentraat-
 tia. Emulsio säilytettiin 20 °C:ssa. Ensimmäinen näyte
 jäädytettiin välittömästi -20 °C:ssa.

10 5b. Fromase®/öljyemulsio

- Kaksi millilitraa Fromase® 150 TL:ää lisättiin 98 ml:aan
 vettä, joka sisälsi 50 % sorbitolia. Standardiemulsio
 valmistettiin sekoittamalla 87,5 g kalanöljyä, 6 g Admul™
 15 WOLia ja 75 g Fromase®-liuosta. Emulsio säilytettiin 20
 °C:ssa.

5c. Sekaemulsio

- 20 Välittömästi emulsioiden (5a) ja (5b) valmistamisen jäl-
 keen valmistettiin sekaemulsio lisäämällä 100 ml Natu-
 phos®/öljyemulsiota 100 ml:aan Fromase®/öljyemulsiota. Pe-
 rusteellisen käsin sekoittamisen jälkeen seos varastoitettiin
 20 °C:ssa. Ensimmäinen näyte jäädytettiin välittömästi -20
 25 °C:ssa.

5d. Natuphos®-Fromase®/öljyemulsio

- 75 g:aan Natuphos® UF-konsentraattia, jossa oli sorbito-
 30 lia, lisättiin 750 µl Fromase® TL:ää ja sekoitettiin sen
 jälkeen. Haluttu emulsio saatiin, kun oli lisätty 87,5 g
 kalaöljyä, joka sisälsi 6 g Admul™ WOLia, ja sekoitettu
 voimakkaasti. Emulsio säilytettiin 20 °C:ssa. Ensimmäinen
 näyte jäädytettiin välittömästi -20 °C:ssa.

35

5e. Fytaasin stabiilisuus eri emulsioissa

20 °C:ssa pidetyistä eri emulsioista otettiin näytteet 5 ja 10 varastointipäivän jälkeen ja jäädytettiin välittömästi -20 °C:ssa. Vähintään yhden yön -20 °C:ssa pitämisen jälkeen eri näytteet sulatettiin ja sentrifugoitiin, kuten esimerkiksi 4 on kuvattu. Fytaasiaktiivisuudet määritettiin vesikerroksesta otetuista näytteistä. Kun oletettiin Natuphos®/öljyemulsiosta (5a) saaduissa eri näytteissä 100 %:n aktiivisuus, rekisteröitiin seuraavat fytaasiaktiivisuudet 5 ja vastaavasti 10 päivän varastoinnin jälkeen.

Sekaemulsiossa (5c): 94 % ja vastaavasti 96 % fytaasin alkuaktiivisuudesta.

Natuphos®-Fromase®-öljyemulsiossa (5d): 80 % ja vastaavasti 78 % fytaasin alkuaktiivisuudesta.

Kun otetaan huomioon se, että Fromase®:n proteolyyttinen aktiivisuus on verrattain alhaista sorbitolin läsnäolon vuoksi, tiedot osoittavat emulsion lisäävän formuloitujen labiilien yhdisteiden stabiilisuutta. Fytaasi suojataan proteolyyttistä vaikutusta vastaan silloin, kun se emulgoidaan proteaasista erillään.

25

ESIMERKKI 6

C-vitamiinin stabiilisuus rehusa, joka sisältää kemiallisia yhteensopimattomuuksia

30 Esimerkissä 5, jossa käytettiin kahta yhteen sopimatonta entsyymiä yhdessä emulsiossa, havaitun stabilointivaikutuksen lisäksi samanlainen vaikutus havaittiin C-vitamiinia (askorbiinihappoa) rehupartikkeleihin pantaessa.

35 Askorbiinihapon ja hivenaineiden, kuten kuparin ja raudan, yhteensopimattomuus on hyvin dokumentoitu (katso esimerkiksi teos CRC Handbook of Food Additives, 2. painos, s.

85 ja siitä eteenpäin). Ravitsemustieteilijät voivat kuitenkin neuvoa sekä raudan että askorbiinihapon yhdistelmiä tiettyihin rehusovellutuksiin, kuten esimerkiksi broilerin loppurehuun (finisher feed). Tämä esimerkki osoittaa sen, että emulsioon pantu askorbiinihappo on merkittävästi stabiilimpi kuin ei-emulgoitu askorbiinihappoliuos sen jälkeen, kun se on sekoitettu broilerin loppurehupellettiin.

10 Materiaalit

Soijaöljy (puhdistettu OPG Farmalta, Hollanti)

Admul™ WOL 1403

Glyseroli 86 %

15 Sitruunahappo (monohydraatti p.a.)

Askorbiinihappo (p.a.)

Broilerin loppurehu (saatu Arkervaartilta, Hollanti)

6a. Askorbiinihapon ja sitruunahapon vesiliuos

20

Vesifaasi valmistettiin liuottamalla 1 g sitruunahappoa ja 4 g askorbiinihappoa 45 g:aan "demi"-vettä. Saadun vesiliuoksen pH oli noin 2,4. Täydellisen liukenemisen jälkeen lisättiin 50 g glyserolia ja seos sekoitettiin perusteellisesti.

25

6b. Askorbiinihappo/öljyemulsio

Stabiili emulsio voitiin saada noudattamalla esimerkissä 4 pääpiirteittäin esitettyä menettelyä liuottamalla 3 g Admul™ W 1403:a 87,5 g:aan soijaöljyä ja lisäämällä 75 g kohdassa 6a määritettyä vesifaasia.

30

6c. Askorbiinihappo/öljyemulsion laimentaminen rasvaan

35

Emulsiot on tarkoitettu käytettäväksi öljyyn tai nestemäiseksi tehtyyn rasvaan laimentamisen jälkeen. Laimennettua

emulsiota sumutetaan pelletoidun tai suulakepuristetun rehun päälle. Emulsion sekoittamiseksi rasvan kanssa 100 ml emulsiota (6b) lisättiin 100 ml:aan soijaöljyä, minkä jälkeen neste sekoitettiin perusteellisesti käsin.

5

6d. Askorbiinihappo/rasvaemulsion ja askorbiinihapon vesiliuoksen sekoittaminen broilerin loppurehun kanssa

10 Lähtien joko askorbiinihappo-rasvaemulsiosta tai askorbiinihapon vesiliuoksesta aloittamalla yhtä suuret määrät askorbiinihappoa (200 ppm lopullisena konsentraationa) pantiin broilerin loppurehupelletteihin, jotka oli saatu paikalliselta toimittajalta. Lopuksi sumutettiin 200 ml öljyemulsiota 10 kg:n päälle rehupellettejä, jotka pyöri-

15 vät betoninsekoittimessa. Samalla tavoin 50 ml askorbiinihapon vesiseosta (6a) sumutettiin 10 kg:n päälle rehupellettejä, jotka pyörivät betoninsekoittimessa. Sen jälkeen samojen pellettien päälle sumutettiin vielä 100 ml:n määrä soijaöljyä. Välittömästi sumutuksen ja sitä

20 seuraavan näytteenoton jälkeen näytteistä analysoitiin askorbiinihappo ja dehydroaskorbiinihappo.

6e. Askorbiinihappoanalyysi rehun loppurehusta

25 Askorbiinihappo ja dehydroaskorbiinihappo analysoitiin käyttämällä dehydroaskorbiini-/askorbiinihappotestiä, kuten on kuvattu teoksessa Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis using Single Reagents (Boehringer Mannheim, 1989).

30

10 g pellettejä uutettiin 10 ml:lla asetonia 10 minuutin ajan (rasva-aineen liuottamiseksi), minkä jälkeen lisättiin 90 ml "demi"-vettä, joka sisälsi 1 g/l Na-EDTA:ta. Sen jälkeen, kun pellettejä ja vesifaasia oli sekoitettu

35 Ultra Turraxissa 1 minuutin ajan, näytteet sentrifugoitettiin. Askorbiinihappo- ja dehydroaskorbiinihappotasot

määritettiin supernatantista käyttämällä pakkausta no. 409677 (Boehringer Mannheim).

- 5 Niistä pelleteistä, joita sumutettiin askorbiinihapon vesiliuoksella, 20 % askorbiinihaposta voitiin ottaa talteen. Sen sijaan niistä pelleteistä, joita sumutettiin laimennetulla askorbiinihapo/öljyemulsiolla, 90 % askorbiinihaposta otettiin talteen. Tämä kuvaa emulsion antamaa suojavaikutusta askorbiinihapon stabiilisuuteen rehuval-
- 10 misteessa.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Vesi-öljyemulsio, tunnettu siitä, että se sisältää seuraavat aineosat: vettä, öljyä, labiilia yhdistettä, stabilointiainetta ja emulgaattoria.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että stabilointiaine on veden aktiivisuutta alentava aine.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että stabilointiaine on polyoli.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että polyoli on glyseroli, sorbitoli, sakkaroosi, polypropeeniglykoli, laktoosi, trehaloosi, jokin maltodekstriini tai glukooosi.
5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että polyoli on läsnä emulsion vesifaasissa vähintään 10 %:n konsentraationa, edullisesti 10-70 %:n konsentraationa, edullisemmin 30-70 %:n (w/w) konsentraationa.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että emulgaattori on sellainen emulgaattori, joka aikaansaa vesi-öljyemulsion.
7. Jonkin patenttivaatimuksista 3-5 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että emulgaattori on aktiivinen suurten polyoli-konsentraatioiden läsnä ollessa.
8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että emulgaattori on monoglyseridi tai polyglyseroli polyrisinoleaatti.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että labiili yhdiste on entsyymi, vitamiini, rokote tai väriaine.
- 5 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen emulsio, tunnettu siitä, että entsyymi on proteaasi, karbohydraasi, lipaasi, fosfolipaasi, oksidoreduktaasi tai fytaasi.
- 10 11. Jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukaisen emulsion käyttö ihmisen tai eläinten ruoan tai kosmeettisen aineen valmistuksessa.
- 15 12. Ihmisen tai eläimen ruoka tai kosmeettinen aine, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukaista emulsiota.
- 20 13. Menetelmä elintarvike- tai rehupartikkelin käsittelymiseksi, joka menetelmä on tunnettu siitä, että haluttua labiilia yhdistettä sisältävää stabiilia vesi-öljyemulsiota käytetään partikkelien sumuttamiseen.