

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200380106326.2

[51] Int. Cl.

C07C 67/03 (2006.01)

C11C 3/02 (2006.01)

C11C 3/06 (2006.01)

C07C 69/52 (2006.01)

C07C 69/587 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100338010C

[22] 申请日 2003.10.31

[21] 申请号 200380106326.2

[30] 优先权

[32] 2002.11.14 [33] NO [31] 20025456

[86] 国际申请 PCT/NO2003/000364 2003.10.31

[87] 国际公布 WO2004/043894 英 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.16

[73] 专利权人 普罗诺瓦·比奥凯尔有限公司

地址 挪威吕萨克

[72] 发明人 G·G·哈拉尔德森 A·霍尔多森
O·索斯塔德

[56] 参考文献

WO 0073254A1 2000.12.7

CN 1143384A 1997.2.19

Prepare of Highly Purified Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Harald Breivik, et al, JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, Vol. 74 No. 11 1997

分子蒸馏技术及其在工业上的应用 矫彩山等,应用科技,第29卷第10期 2002

审查员 王晓东

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 任宗华

权利要求书 3 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

脂酶 - 催化的海产品油的酯化

[57] 摘要

在基本不含有机溶剂的条件下,在脂酶催化剂存在下,使含有游离酸或己酯形式 EPA 和 DHA 的海产品油与乙醇进行酯化,并进行蒸馏分离。

1. 一种通过分子蒸馏分离富含二十碳五烯酸, C20:5 的乙酯或甲酯馏分和富含二十二碳六烯酸, C22:6 的游离脂肪酸馏分的方法, 所述乙酯或甲酯馏分和游离脂肪酸馏分通过使用脂酶的鱼油游离脂肪酸与乙醇或甲醇的直接酯化得到, 其中所述脂酶为米黑根毛酶脂酶或 *Thermomyces lanuginosa* 脂酶。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中鱼油游离脂肪酸起始原料通过脂酶催化的鱼油甘油三酯的醇解、随后的分子蒸馏和剩余甘油酯混合物的水解而获得。

3. 一种酯化含有二十碳五烯酸, C20:5 和二十二碳六烯酸, C22:6 的海产品油组合物的方法, 其中二十碳五烯酸, C20:5 和二十二碳六烯酸, C22:6 为脂肪酸 C_n 烷基酯形式, 其中 $n = 2-18$, 该方法用以形成 (1): 与起始原料相比富集了二十二碳六烯酸, C22:6 的脂肪酸 C_n 烷基酯馏分, 其中 $n = 2-18$, 以及与起始原料相比富集了二十碳五烯酸, C20:5 的脂肪酸 C_m 烷基酯馏分, 其中 $m = 1-12$; $n > m$, 或者 (2): 与起始原料相比富集了二十二碳六烯酸, C22:6 和二十碳五烯酸, C20:5 的脂肪酸 C_n 烷基酯馏分, 其中 $n = 2-18$, 以及与起始原料相比二十二碳六烯酸, C22:6 和二十碳五烯酸, C20:5 都降低的脂肪酸 C_m 烷基酯馏分, 其中 $m = 1-12$; $n > m$, 该方法包括以下步骤: 在不含有机溶剂的条件下, 在脂酶催化剂存在下, 使所述海产品油组合物与 C_m 醇反应, 其中 $m = 1-12$; $n > m$, 并通过分子蒸馏来分离馏分, 其中所述脂酶催化剂为米黑根毛酶脂酶、*Thermomyces lanuginosa* 脂酶、假单胞菌属脂酶或荧光假单胞菌脂酶。

4. 根据权利要求 3 的方法, 其中起始原料, C_2-C_{18} 烷基酯是通过脂酶催化的鱼油甘油三酯的醇解、随后的分子蒸馏, 以及剩余甘油酯

混合物与 C_2-C_{18} 烷基醇的醇解反应获得的。

5. 根据权利要求 3 或 4 的方法, 其中 C_2-C_{18} 烷基酯为乙酯。
6. 根据权利要求 3 的方法, 其中 C_1-C_{12} 醇为乙醇。
7. 根据权利要求 1 的方法, 其中在起始组合物中甲醇或乙醇与游离脂肪酸的摩尔比为 0.5-10.0。
8. 根据权利要求 7 的方法, 其中摩尔比为 0.5-3.0。
9. 根据权利要求 7 的方法, 其中摩尔比为 1.0-2.0。
10. 根据权利要求 7 的方法, 其中摩尔比为 0.5-1.5。
11. 根据权利要求 3 的方法, 其中 C_1-C_{12} 醇与 C_2-C_{18} 烷基酯的摩尔比为 0.5-10.0。
12. 根据权利要求 11 的方法, 其中摩尔比为 0.5-3.0。
13. 根据权利要求 11 的方法, 其中摩尔比为 2.0-3.0。
14. 根据权利要求 1 或 3 的方法, 其中酯化反应在 0°C - 70°C 的温度下进行。
15. 根据权利要求 14 的方法, 其中酯化反应在 20°C - 40°C 的温度下进行。
16. 根据权利要求 1 或 3 的方法, 其中所述脂酶催化剂固定在载

体上。

17. 根据权利要求 1 的方法，其中所述脂酶催化二十二碳六烯酸，C22:6 醇解的速率低于催化相应的二十碳五烯酸，C20:5 醇解的速率。

脂酶-催化的海产品油的酯化

本发明涉及脂酶催化的海产品油(marine oil)的酯化。

本领域公知可以借助脂酶催化剂来精制包括海产品油的各种油产品,在所用的精制条件下,该脂酶催化剂的特异性可提高对所需产品的回收。

为了开发由组合物,例如由含有较低量下述化合物的鱼油中分离商业上很重要的诸如 EPA(二十碳五烯酸, C20:5)和 DHA(二十二碳六烯酸, C22:6)的 PUFA 的脂酶-催化方法,人们进行了大范围的研究工作。

例如,在 PCT/N095/00050(W095/24459)中公开了一种在基本无水条件下,在对饱和与单不饱和脂肪酸的酯交换有优先催化活性的脂酶存在下,用 C₁₋₆ 醇,例如乙醇处理含有甘油三酯形式饱和与不饱和脂肪酸的鱼油组合物的方法。使用优选的脂酶,假单胞菌属脂酶(PSL)和荧光假单胞菌脂酶(PFL)可由海产品油来源的浓缩物制备甘油酯形式的 EPA 和 DHA,该海产品油来源的浓缩物含有 70 重量%以上的商业和治疗上很重要的 Ω -3 聚不饱和脂肪酸。

许多脂酶-催化的精制方法中都已使用甘油。

以举例的方式,可提及的有 JP 62-91188(1987); W091/16443; Int. J. Food Sci. Technol., (1992), 27, 73-76, Lie 和 Molin; Myrnes 等人的 JAOCs, Vol. 72, No. 11(1995), 1339-1344; Moore 等人的 JAOCs, Vol. 73, No. 11(1996), 1409-1414; McNeill 等人的 JAOCs, Vol. 73, No. 11(1996), 1403-1407; W096/3758 和 W096/37587。

在 PCT/N000/00056(W000/49117)中提供了一种酯化含有作为游离脂肪酸的 EPA 和 DHA 的海产品油组合物,以形成与起始组合物相比至少一种脂肪酸得到富集的游离脂肪酸馏分的方法,其包括以下步骤:在脂酶催化剂,米黑根毛酶(Rhizomucor miehei)脂酶(MML)存在下,在减压且基本不含有机溶剂的条件下使所述海产品油组合物与甘油反

应，并回收富集了 EPA 和 DHA 中至少一种物质的游离脂肪酸馏分。优选将短程蒸馏用于从甘油酯混合物中分离剩余的游离脂肪酸。

但是，现在已很明显，基于短程蒸馏方法从甘油酯混合物中分离剩余游离脂肪酸的策略并不是非常可行。这是较短链甘油单酯的挥发性太大所导致的结果，该甘油单酯在很大程度上污染了馏出物。

我们现在已发现，脂酶-催化方法制备 EPA 和 DHA 浓缩物可提供高 DHA 浓缩物，该方法通过游离脂肪酸与甲醇或乙醇的直接酯化，或来自鱼油的 C_n 烷基酯 ($n = 2-18$) 与 C_m 醇 (醇解) ($m = 1-12$; $n > m$) 的酯交换，和随后的短程蒸馏来进行。这些方法是快速简单的反应，其提供 EPA 和 DHA 之间优异的分离作用，而馏出物中不会产生不利的甘油单酯。该方法的主要特征定义在所附的权利要求中。

在本发明优选的实施方案中， C_1-C_{12} 醇为乙醇 (乙醇解)。在 C_2-C_{18} 烷基酯中，己基酯为优选的。

在直接酯化的起始原料中，甲醇或乙醇与游离脂肪酸的摩尔比为 0.5-10.0，优选的摩尔比为 0.5-3.0，最优选的摩尔比为 1.0-2.0，甚至为 1.0-1.5。

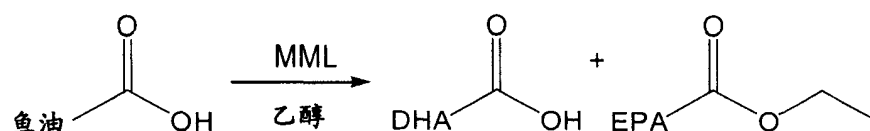
在酯交换中， C_m 醇与 C_n 烷基酯的摩尔比为 0.5-10.0，优选的摩尔比为 0.5-3.0，最优选的摩尔比为 2.0-3.0。

酯化在 $0^{\circ}\text{C}-70^{\circ}\text{C}$ 下进行，并且优选在 $20^{\circ}\text{C}-40^{\circ}\text{C}$ 下进行。

用在本发明中的脂酶催化剂固定在载体上。

在醇解过程中使用的一些脂酶确实具有这样的性质：其催化 DHA 醇解的速率要比催化相应的 EPA 醇解的速率慢得多。优选的具有此性质的脂酶为米黑根毛酶 (MML)。其它脂酶具有这样的性质：其催化 EPA 和 DHA 醇解的速率要比催化相应的较短链和饱和度更大的脂肪酸醇解的速率慢得多。具有此性质的脂酶为假单胞菌属脂酶 (PSL) 和荧光假单胞菌脂酶 (PFL)。

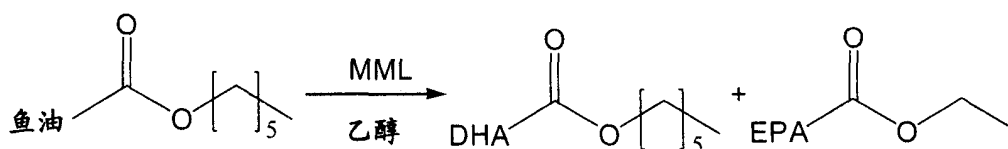
由 G.G. Haraldsson 和 B. Kristinsson, J. Am. Oil Chem. Soc., 75: 1551-1556 (1998) 中已经已知了使用 MML 进行鱼油游离脂肪酸和乙醇的直接酯化。



方案 1. 使用 MML 进行鱼油游离脂肪酸与乙醇的直接酯化

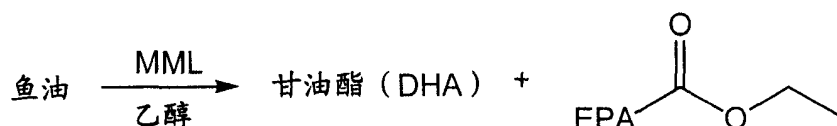
但是，人们不相信通过短程蒸馏技术可使 DHA 剩余游离脂肪酸和乙基酯进行满意的分离。现在，我们已惊奇地发现，可高度成功地使用短程蒸馏技术。从下面实施例所示的结果中很明显地得出该结论。

本发明进一步公开了用脂酶乙醇解鱼油己酯，随后再进行分子蒸馏，以分离剩余己基酯和挥发性更大的乙基酯。



方案 2. 用脂酶 (MML) 乙醇解鱼油己酯

为了进一步改进 DHA 回收率并提高其在产物中的浓度，在直接酯化之前可使用 PCT/N095/00050 (W095/24459) 中描述的乙醇解反应作为预-步骤。



方案 3. 用脂酶 (MML) 乙醇解鱼油

在直接酯化之前，该甘油酯混合物需要进行水解。为了在水解前将起始原料的量减小一半，我们发现 PCT/N095/00050 (W095/24459) 中的乙醇解反应是有用的。因此，本发明还公开了，作为可选择的方法，

首先乙醇解随后直接酯化的两步-酶反应,每个步骤之后都用分子蒸馏法进行浓缩。该两步反应还适用于高度富含长链单不饱和物质的油,例如鲱鱼油。

当鱼油己酯为起始原料时也可使用该两步反应,而且该反应也是有利的。

借助下面实施例对本发明进行说明。

测试了类似沙丁鱼油(SO)、 鱼油(AO)、鲱鱼油(HO)、鳕鱼肝油(CLO)、金枪鱼油(TO)和蓝鳕鱼油(Blue whiting oil)(BW0)的起始原料。

试验步骤

从 Amano Enzyme Inc. 购买来自假单胞菌属(PSL; 脂酶 AK)和荧光假单胞菌(PEL; 脂酶 PS)的细菌性脂酶。固定的米黑根毛酶(MML; Lipozyme RM IM)、*Thermomyces lanuginosa*(TLL; Lipozyme TM IM)和南极洲假丝酵母(*Candida antarctica*)(CAL; Novozym 435)脂酶由丹麦的 Novozyme 提供。沙丁鱼油(14% EPA 和 15% DHA)、 鱼油(18% EPA 和 12% DHA)、鲱鱼油(6% EPA 和 8% DHA)、金枪鱼油(6% EPA 和 23% DHA)、鳕鱼肝油(9% EPA 和 9% DHA)和蓝鳕鱼油(11% EPA 和 7% DHA)都由 Pronova Biocare 提供。

使用装备有火焰电离检测器(FID)的 Perkin-Elmer 8140 气相色谱(GC)进行脂肪酸分析。毛细管柱为来自 J&W Scientific 的 30 米 DB-225 30N, 0.25 μm 的毛细管柱。短程蒸馏在 Leybold KDL 4 蒸馏釜内进行。在 Bruker AC 250 NMR 光谱仪上记录核磁共振(NMR)谱图,氘代氯仿为溶剂。在来自 Merck 的硅胶板(Art 5721)上进行制备性薄层色谱(TLC)操作。用 80:20:1 的石油醚:乙醚:乙酸混合物进行洗脱。Rhodamin G (Merck)用于显示出随后被刮去并进行甲基化的光谱带。注入 GC 之前将 $\text{C}_{19:0}$ 甲基酯(Sigma)加入到试样中作为内标。

鱼油的水解

将鱼油(500g, 0.55mol)加入到氢氧化钠(190g, 4.75mol)、水(500ml)和 96% 乙醇(1.7L)的溶液中。不停搅拌过程中,使所得混合

物回流 30 分钟(直至观察到清澈的有色液体),然后冷却至室温。为了中和该溶液,向其中小心加入 6.0M 盐酸(870ml, 10% 过量),并将所得混合物转移至分液漏斗中。用 1:1 的石油醚和乙醚混合物(1.5L)洗涤游离脂肪酸两次。然后用水(1.5L)洗涤有机层三次,并在无水硫酸镁上干燥。滤去干燥剂并蒸发除去溶剂, 50℃ 下高真空蒸发 2 小时结束蒸馏。在分析性 TLC 上进行分析, 单个点表明为纯的游离脂肪酸。取决于鱼油的不同, 产物颜色为黄色-深酒红色。

鱼油游离脂肪酸与乙醇的直接酯化

将固定的 MML(15g)加入到鱼油游离脂肪酸(300g, 约 1.03mol)和无水乙醇(143g, 3.10mol)的溶液中。在 40℃ 的氮气氛下温和搅拌所得的酶悬浮液, 直至达到希望的转化率。为了监测反应进程, 在反应过程中抽取试样, 用 0.02M NaOH 滴定剩余的游离脂肪酸量。用制备性 TLC 进行分级分离, 随后对每种脂类成分进行定量, 并用 GC 根据脂肪酸峰型进行分析。达到希望的转化率后, 过滤除去酶并真空蒸除过量的乙醇。所得混合物经短程蒸馏后以剩余物形式得到高 DHA 浓缩物。

用脂酶乙醇解鱼油

将固定的 MML(20g)加入到鱼油(400g, 约 0.44mol)和无水乙醇(61g, 1.32mol)的溶液中。在室温的氮气氛下温和搅拌所得的酶悬浮液, 直至达到希望的转化率。然后过滤除去酶, 并在短程蒸馏之前真空蒸除过量乙醇。用分析性 TLC 和 $^1\text{H-NMR}$ 监测反应进程。用制备性 TLC 进行分级分离, 随后对每种脂类成分进行定量, 并用 GC 根据脂肪酸峰型进行分析。

用脂酶己醇解鱼油

将固定的 CAL(25g)加入到鱼油(500g, 0.55mol)和 1-己醇(338g, 3.31mol)的溶液中。在 65℃ 的氮气氛下温和搅拌所得的酶悬浮液, 直至根据分析性 TLC 和/或 $^1\text{H-NMR}$ 得知三酰基甘油已完全转化为己酯。过滤除去酶, 并且真空蒸除过量的己醇。

用脂酶乙醇解鱼油己酯

将固定的 MML(15g)加入到鱼油己酯(300g, 0.80mol)和无水乙醇

(111g, 2.41mol) 的溶液中。在 40℃ 的氮气氛下温和搅拌所得的酶悬浮液，直至根据 $^1\text{H-NMR}$ 得知达到希望的转化率。过滤除去酶，并真空蒸除过量乙醇。所得混合物经短程蒸馏后以剩余物形式得到高 DHA 浓缩物。通过在 GC 上单程分析确定了各酯基团的脂肪酸组分。

实施例 1

鱼油游离脂肪酸与乙醇的直接酯化

沙丁鱼油 (S0)

表 1 中显示了 40℃ 下，在 MML (基于游离脂肪酸重量，其为 5%) 存在下，含有 14% EPA 和 15% DHA (14/15) 的 S0 游离脂肪酸与 3 当量乙醇的直接酯化的进程。在这些条件下，脂酶对 S0 游离脂肪酸显示出极高的活性。仅仅 2 小时后就达到超过 70% 的转化率 (% 乙酯)。反应 4 小时后，剩余游离脂肪酸中含有 49% DHA 和 6% EPA，回收率分别为 73% 和 10%。就 DHA 浓度和回收率而言，最优的转化率显示为约 75%。表 1 中，反应进行过程中制得的乙酯的重量百分数被直接作为转化程度的量度。

表 1. 使用 MML，在 40℃ 下，S0 游离脂肪酸 (14/15) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
1h	60	32	20	84	56
2h	71	43	11	80	21
3h	74	46	7	78	13
4h	77	49	6	73	10
5h	78	49	5	69	8
7h	80	50	5	65	7

经短程蒸馏后，S0 游离脂肪酸的直接酯化得到了优异的结果。40℃ 下，在 MML 存在下，S0 游离脂肪酸与乙醇反应 4 小时达到 78% 的转化率。反应混合物的游离脂肪酸包括 49% 的 DHA 和 6% EPA，DHA 回收

率为 75 %。在 115℃ 下蒸馏后, 剩余物包括 69 % DHA 和 9 % EPA, 其回收率分别为 65 % 和 10 % (表 2)。通过稍微降低蒸馏温度使 DHA 回收率得到改善(参见表 3)。我们不能通过蒸馏从剩余游离脂肪酸中分离出所有的乙酯。尽管如此, 115℃ 下短程蒸馏后, 我们设法获得了约 90 % 游离脂肪酸和 10 % 乙酯的高 DHA 浓缩物。像游离脂肪酸一样, 在剩余物中得到的乙酯高度富集了 DHA。此外, 蒸馏出更多饱和与较短链游离脂肪酸, 导致剩余物中 DHA 浓度高于反应后游离脂肪酸馏分中的浓度。

表 2. 使用 MML, 在 40℃ 下, S0 游离脂肪酸(14/15)与乙醇直接酯化的结果, 以及在 115℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
乙酯 (EE)	78	4	19	25	95
游离脂肪酸 (FFA)	22	49	6	75	5
馏出物 (D) 115℃	85	7	15	35	90
剩余物 (R) 115℃	15	69	9	65	10

如表 3 所示, 通过降低转化率和蒸馏温度使 S0 结果得到改善。反应 4 小时后得到 75 % 的转化率。在 111℃ 下进行蒸馏后, 剩余物含有 66 % DHA, 回收率为 88 %, DHA/EPA 比例为 4.7。在稍高的蒸馏温度下, 剩余物包括 74 % DHA, 回收率为 75 %, DHA/EPA 比例近乎为 7。应该指出的是, 蒸馏后 DHA 的回收率基于 DHA 在原料油中的重量百分数。

表 3. 使用 MML, 在 40℃ 下, S0 游离脂肪酸(14/15)与乙醇直接酯化的结果, 以及在 111 和 113℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	75	3	17	23	87
FFA	25	47	7	77	13
D 111℃	79	3	13	12	76
R 111℃	21	66	14	88	24
D 113℃	84	5	15	25	89
R 113℃	16	74	11	75	11

可将乙醇含量降低至 1 当量，导致反应时间增加(表 4)。还可以引入更少的脂酶，导致反应速率大幅度降低。

表 4. 使用 MML，在 40℃下，S0 游离脂肪酸(14/15)与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分(FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
5h	71	35	12	80	28
6h	73	41	11	79	26
7h	74	44	10	78	24
11h	77	45	7	76	18

鳕鱼油(A0)

表 5 显示了在与 S0 相同的条件下，包括 18 % EPA 和 12 % DHA(18/12)的 A0 游离脂肪酸进行直接酯化的进程。正如能够看到的，反应 24 小时后，以 82 % 的转化率得到约 6:1 比例的 DHA/EPA，包括 8 % 的 EPA 和 50 % 的 DHA。DHA 回收率刚刚低于 80 %。而且，11 小时后，在 79 % 的转化率下，DHA/EPA 比例为 5:1，DHA 回收率高达 84 %。因此，A0 和 S0 都是制备高 DHA 含量的极具潜力的起始原料，而且，如果需要的话，还可以从乙酯馏分中制备高 EPA 含量的浓缩物。

表 5. 使用 MML, 在 40℃ 下, A0 游离脂肪酸 (18/12) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
2h	56	27	29	100	67
5h	73	37	19	93	27
8h	76	45	13	90	16
11h	79	50	9	84	10
24h	82	50	8	78	8

如表 6 所示, 就 DHA 浓度和 DHA/EPA 比例而言, A0 的结果很好。使 A0 游离脂肪酸 (19/12) 按前述方式反应, 从而在 11 小时内达到 76 % 的转化率。在 121℃ 下蒸馏后, 剩余物包括 61 % DHA, 回收率只有 64 %, DHA/EPA 比例为 5.5。馏出物在低温下重复蒸馏, 则可用于制备 EPA 的高度浓缩物。作为例子, 45 % EPA 和 10 % DHA 的浓缩物被认为是希望的组合物, 其可用作有潜力的商业产品。

表 6. 使用 MML, 在 40℃ 下, A0 游离脂肪酸 (19/12) 与乙醇直接酯化的结果, 以及在 121℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	76	2	21	10	84
FFA	24	45	13	90	16
D 121℃	87	5	20	36	93
R 121℃	13	61	11	64	7

鲱鱼油 (H0)

类似地, 按照上述方式, 在直接酯化条件下处理包括 6 % EPA 和 8 % DHA (6/8) 的来自鲱鱼油的游离脂肪酸。反应进程如表 7 所示。反应 12 小时后, 剩余游离脂肪酸含有 37 % DHA 和 6 % EPA, 回收率分别为

90%和18%。

表 7. 使用 MML, 在 40℃ 下, H0 游离脂肪酸 (6/8) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
4h	62	20	12	97	71
6h	70	24	12	96	61
8h	74	26	11	96	52
12h	80	37	6	90	18
24h	82	37	7	84	10

按照前面的方式, 使来自 H0、包括 9% EPA 和 9% DHA (9/9) 的游离脂肪酸反应 12 小时, 达到 84% 的转化率, 反应混合物的游离脂肪酸包括 39% DHA 和 8% EPA, DHA 转化率为 76%。在 110℃ 下蒸馏后, 剩余物含有 40% DHA 和 7% EPA, DHA 回收率为 68%, DHA/EPA 比例几乎为 6:1 (表 8)。低 DHA 浓度是由于 20:1 (4%) 和 22:1 (37%) 的长链单不饱和脂肪酸的含量高造成的。长链单不饱和脂肪酸在 H0 和毛鳞鱼油中的高含量使其不太可能作为所述方法的起始原料。在剩余油中加入简单的尿素可用来除去大部分的单不饱和脂肪酸, 产生有价值的 DHA 浓缩物。应该补充的是, 具有低 EPA 含量的 H0 比 S0 和 A0 更适合用来获得高 DHA/EPA 比例。

表 8. 使用 MML, 在 40℃ 下, H0 游离脂肪酸 (9/9) 与乙醇直接酯化的结果, 以及在 110℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	84	2	8	34	76
FFA	16	31	13	66	24
D 110℃	82	4	10	32	88
R 110℃	18	40	7	68	12

金枪鱼油 (T0)

下表 9 中显示了在与上述 S0 相同的条件下, 包括 6 % EPA 和 23 % DHA (6/23) 的 T0 游离脂肪酸进行直接酯化的进程。8 小时后得到 68 % 的反应转化率, 剩余游离脂肪酸包括 74 % DHA 和 3 % EPA, DHA 转化率为 83 %, DHA/EPA 比例为 25:1 (表 9)。明显地, 将原料油的该类型初始 EPA/DHA 组合物用于浓缩 DHA 是理想的。

表 9. 使用 MML, 在 40℃ 下, T0 游离脂肪酸 (6/23) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
1h	43	47	9	98	78
2h	52	69	9	97	65
3h	62	68	9	96	50
5h	65	70	6	92	47
8h	68	74	3	83	14
11h	70	77	2	78	11
24h	73	74	2	71	8

鳕鱼肝油 (CLO)

表 10 显示了在上述类似的条件下, 包括 9 % EPA 和 9 % DHA (9/9) 的 CLO 游离脂肪酸进行直接酯化的进程。得到了约 79 % 的转化率, DHA/EPA 比例为 5:1, 剩余游离脂肪酸具有 50 % 的 DHA 浓度, 且回收率大于 80 %。这些结果甚至优于被认为是具有潜力的 DHA 回收物的 S0 和 A0。但是就成本而言, S0 和 A0 要有利于 CLO。考虑到 CLO 含有少得多的长链单不饱和物质 (20:1 和 22:1), 将 CLO (9/9) 结果与 H0 (9/9) 进行比较可能会有用。

表 10. 使用 MML, 在 40℃ 下, CLO 游离脂肪酸 (9/9) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
2h	65	37	20	96	62
3h	71	42	17	94	43
5h	75	46	13	91	27
8h	79	48	10	86	17
11h	80	50	7	76	12
24h	82	53	5	76	8

蓝鳕鱼油 (BWO)

表 11 显示了在上述条件下, 包括 11 % EPA 和 7 % DHA (11/7) 的 BWO 游离脂肪酸进行直接酯化的进程。约 73 % 的转化率下, 剩余游离脂肪酸包括 24 % 的 DHA 浓度, 回收率为 95 %。EPA 并没有按照预期情况转化为乙酯。有趣的是, 不同于 H0, 长链单不饱和游离脂肪酸以远远高出的程度被转化为乙酯。需要更高的转化率来获得更好的 EPA 和 DHA 分离效果。BWO 的低转化率的原因并不清楚, 但是进行了若干尝试均没有产生更高的转化率。

表 11. 使用 MML, 在 40℃ 下, BWO 游离脂肪酸 (11/7) 与乙醇直接酯化的进程。

时间	转化率 (mol %)	FA 成分 (FFA)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
4h	70	22	23	95	51
7h	71	23	23	95	50
9h	72	23	23	95	49
24h	73	24	21	95	44

实施例 2

鱼油的联合乙醇解和直接酯化

可将两步反应用于改善 DHA 的回收率和产物浓度，该两步反应中首先进行乙醇解，随后再进行直接酯化。在直接酯化之前，由乙醇解反应得到的甘油酯混合物需要进行水解。因此，乙醇解反应可作为预-步骤，用于在水解前将起始原料的量减小一半。应注意，蒸馏分离后 40℃ 下乙醇解反应中获得的高回收率(表 12)。如上面所讨论的，在室温下得到了更好的结果，并列于表 13 和 14 中。室温反应获得的剩余物包括 23 % DHA 和 25 % EPA，回收率分别为 97 % 和 65 % (表 13)。这些结果表明，通过两步方法可显著提高 DHA 回收率。而且，显著降低了水解的膨松度。最后，该方法可能适于富含长链但不饱和物质的油，例如 H0。

表 12. A0 的联合乙醇解和直接酯化的结果。使用 MML，在 40℃ 下，A0 (19/12) 与乙醇进行乙醇解反应，并在 125℃ 下进行蒸馏分离，之后使用 MML，在 40℃ 下使所得游离脂肪酸与乙醇进行直接酯化，并在 115℃ 下进行蒸馏分离。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125℃	41	1	14	3	27
R 125℃	59	18	24	97	73
D 115℃	66	4	22	12	69
R 115℃	34	54	22	88	31

表 13. 使用 MML，室温下 A0 (18/12) 与乙醇进行乙醇解反应的结果，以及 125℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125℃	47	2	15	3	35
R 125℃	53	23	25	97	65

表 14. 使用 MML, 在 40℃ 下, A0(18/12) 与乙醇进行乙醇解反应的结果, 以及在 125℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	脂肪酸成分		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125℃	41	1	14	3	27
R 125℃	59	18	24	97	73

实施例 3

鱼油己酯的乙醇解

鱼油己酯(HE)的乙醇解反应是上述鱼油甘油三酯乙醇解反应(方案 2)的替代方案。该结果表明, 包括米黑根毛酶脂酶(MML)和假单胞菌脂酶(PSL 和 PFL)的各种脂酶都可像近来商业化的来源于 Novozyme 的 *Thermomyces lanuginosa* 脂酶(TLL)一样使用。而且, 已确信分子蒸馏非常适于分离剩余的己酯和挥发性更大的乙酯。

用己醇处理 A0 甘油三酯时, 南极洲假丝酵母脂酶(CAL)用来将其转化为相应的己酯。在单个或两个酶步骤中, 用乙醇和 PSL 处理所得的己酯, 之后对反应混合物进行分子蒸馏, 则可以得到含有约 80% EPA 和 DHA 的剩余己酯。在己酯中浓缩 DHA 不仅能够从己酯中分离出乙酯, 还能蒸馏除去更多的饱和乙酯。使用 CAL 可以以化学或酶方式将己酯转化为乙酯。可选择地, 在单一的酶步骤中使用 MML 的乙醇解反应处理鳕鱼油, 其可提供 70% 的作为己酯的 DHA。还可通过额外的 MML 处理来进一步浓缩。从含有大部分 EPA 的乙酯松散材料中可将 EPA 纯化至 ≥ 95% 的水平。

一种可选择的两步方法是基于沙丁鱼油的乙醇解反应, 该反应在分子蒸馏后生产出作为甘油酯混合物的 50% 的 EPA+DHA(30/20)浓缩物。用己醇和 CAL 处理剩余的甘油酯则得到相同组分的己酯。可用乙醇和 PSL 对其进行处理以得到含有约 80% EPA 和 DHA 的己酯, 还可用乙醇和 MML 进行处理以将 DHA 从 EPA 中分离出来, 之后再进一步浓缩 EPA 和 DHA。该方法可能具有优越性, 因为从工业角度考虑, 用乙醇代

替己醇对大量鱼油进行处理的方法更简单、量更小且更可行。还应该想到的是,使用该方法可预计达到非常高的优异的 EPA 和 DHA 回收率。

鳕鱼油 (A0)

与鱼油甘油三酯的乙醇解类似, MML 的脂肪酸选择性和活性会受到温度的显著影响。因此, MML 可用于在 20℃ 或更低的温度下浓缩 EPA 和 DHA, 而在 40℃ 下, EPA 则从 DHA 中分离出来, 得到 DHA 的高度浓缩物。40℃ 下, 在 MML (10% 重量的己酯) 存在下, 包括 18% EPA 和 12% DHA 的鳕鱼油己酯与 2 当量乙醇反应 24 小时, 达到 59% 的转化率。除去脂酶后, 蒸除过量乙醇并在 135℃, 3×10^{-3} mbar 下蒸馏乙酯/己酯 (EE/HE) 混合物。剩余物 (26% 重量) 包括 43% DHA, 回收率仅为 65%。DHA/EPA 比例仅为 2.2 (表 15)。

表 15. 使用 MML, 在 40℃ 下, A0 己酯 (18/12) 与乙醇进行乙醇解反应的结果, 以及在 135℃ 下蒸馏分离的结果。

试样	Wt % ^a	FA 成分 (HE)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	59	6	18	30	62
HE	41	21	13	70	38
R 135℃	26	43	20	65	28

^a在表 15 和 16 中, 脂酶催化的反应转化率基于摩尔百分数, 而蒸馏结果基于重量。

在鳕鱼油己酯 (18/13) 的类似反应中, 当反应温度降低至 20℃ 时得到了有趣的结果。在 135℃ 下蒸馏后, 剩余物包括 45% DHA 和 30% EPA, 转化率分别为 85% 和 55% (表 16)。

表 16. 使用 MML, 在 20℃ 下, AO 己酯与乙醇进行乙醇解反应的结果, 以及在 135℃ 下分子蒸馏分离的结果。

试样	Wt %	FA 成分 (HE)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	50	1	9	4	26
HE	50	23	25	96	74
R 135℃	32	45	30	87	53

小规模测试假单胞菌脂酶具有良好的结果, 得到了很高的 EPA 回收率, 但是 DHA 回收率非常低, 尤其反应转化率超过 50% 时更是如此。室温下, 在 PSL 和 PFL 存在下, AO (18/12) 与 2 当量乙醇的乙醇解反应结果如表 16 所示。对于 PFL, 经 24 小时沙丁鱼油己酯转化率仅为 44% 之后, 得到了 28% EPA 和 21% DHA 的含量, 而对于 PSL, 经 24 小时 57% 的转化率时得到了 33% 的 EPA 和 17% 的 DHA。

表 17. 使用 PFL 和 PSL, 在室温下, AO 己酯 (18/12) 与乙醇进行乙醇解反应的结果。

试样	转化率 (mol %)	FA 成分 (HE)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
PFL	44	21	28	81	89
PSL	57	17	33	53	79

将固定在硅胶颗粒上的新型 Novozyme 脂酶 (TLL) 与 MML 进行比较。发现新的脂酶对乙醇非常敏感, 而且活性随温度升高迅速降低。20℃ 下, 两种脂酶都具有活性, 而且经 24 小时 MML 得到 54% 的转化率, 而 TLL 仅得到 43% 的转化率。包括 6% EPA 和 28% DHA (6/28) 的剩余 TO 己酯经 TLL 反应后含有 8% EPA 和 45% DHA。MML 反应导致剩余的己酯含有 7% EPA 和 54% DHA (表 18)。这些脂酶的脂肪酸选择性显然很相似, 但是 TLL 对乙醇浓度更敏感, 这就使其不如 MML。

表 18. 使用 MML 和 TLL, 在室温下, T0 己酯 (6/28) 与乙醇进行乙醇解反应的结果。

试样	转化率 (mol %)	FA 成分 (HE)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
MML	54	54	7	89	54
TLL	42	45	8	93	77

40℃ 下, T0 己酯 (6/28) 与乙醇进行乙醇解反应的结果列于表 19 中。有趣的是, 40℃ 下, TLL 只得到 15% 的转化率, 而 MML 为 47% 的转化率。人们认为更高的温度下脂酶对极性乙醇及其损害效应更敏感。对于 MML, 经 24 小时 47% 的转化率后, 己酯包括 9% EPA 和 49% DHA, 而 TLL 经 24 小时只有 15% 的转化率, 得到 33% EPA 和 17% DHA。

表 19. 使用 MML 和 TLL, 在 40℃ 下, T0 己酯 (6/28) 与乙醇进行乙醇解反应的结果。

试样	转化率 (mol %)	FA 成分 (HE)		回收率	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
MML	47	49	9	93	79
TLL	15	30	7	97	95

通过本发明, 在脂酶存在下, 成功地通过鱼油游离脂肪酸或鱼油己酯与乙醇的无溶剂直接酯化来分离 EPA 和 DHA。根据本发明的方法避免了在馏出物中含有甘油单酯的问题。