

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Januar 2005 (27.01.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/007864 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 7/64**,
A23K 1/00, 1/16

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/007361

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Juli 2004 (06.07.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 32 151.9 15. Juli 2003 (15.07.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **COGNIS DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG**
[DE/DE]; Henkelstrasse 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHÖRKEN,**
Ulrich [DE/DE]; Pascalstrasse 16, 40591 Düssel-
dorf (DE). **BUSCH, Stefan** [DE/DE]; Lohstrasse 42,
46047 Oberhausen (DE). **BOTH, Sabine** [DE/DE];
Neustädter Weg 23, 40229 Düsseldorf (DE). **MAHNKE,**
Eike, Ulf [DE/DE]; Gustav-Linden-Strasse 12, 40878
Ratingen (DE). **CIRUELOS, Santiago** [ES/DE]; Al-
bert-Schweitzer-Weg 26, 41515 Grevenbroich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF CARBOXYLIC ACID METAL SOAPS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CARBONSÄURE-METALLSEIFEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of metal soaps, wherein alkyl esters of single or multiple un-
saturated carboxylic acids are enzymatically converted into hydrolase in the presence of a basic metal salt. The invention relates to
the use of multiple unsaturated carboxylic acid metal soaps produced according to the inventive method as food supplements and/or
as food additives and/or as pharmaceutical fatty acid derivatives. The invention also relates to preparations containing multiple un-
saturated carboxylic acid metal salts in the form of a granulate produced according to the inventive method as carriers or capsule
material and one or several additional components which are selected from the group which is made up of enzymes, vitamins, an-
tioxidants, conservation agents, colorants, carotinoides, sterols, flavone and isoflavone compounds and fatty acid derivatives. The
invention further relates to a method for the production of preparations, wherein one or several additional components are directly
incorporated into the granulate made of multiple unsaturated carboxylic acid metal soaps during enzymatic conversion, and to the
use of the inventive preparations as food supplements and/or food additives and/or as pharmaceutical fatty acid derivatives.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Herstellung von Metallseifen bei dem Alkylester von einfach- oder
mehrfach ungesättigten Carbonsäuren in Anwesenheit eines basischen Metallsalzes mit einer Hydrolase enzymatisch umgesetzt
werden, sowie die Verwendung von Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemässen
Verfahren als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat. Weiterhin
werden Zubereitungen vorgeschlagen, enthaltend Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren in Form von Granulat herge-
stellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren als Träger- oder Kapselmateriale und eine oder mehrere zusätzliche Komponenten die
ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Enzymen, Vitaminen, Antioxidantien, Konservierungsmitteln, Farbstoffen,
Carotinoiden, Sterolen, Flavon- und Isoflavonverbindungen und Fettsäurederivaten. Neben diesen Zubereitungen wird des weite-
ren ein Verfahren vorgeschlagen zur Herstellung der Zubereitungen bei dem eine oder mehrere der zusätzlichen Komponenten direkt
während der enzymatischen Umsetzung in das Granulat aus Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren eingearbeitet wer-
den, sowie die Verwendung der erfindungsgemässen Zubereitungen als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv
und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat.

WO 2005/007864 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Herstellung von Carbonsäure-Metallseifen

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Biotechnologie und beschreibt ein Verfahren zur enzymatisch katalysierten Herstellung von Carbonsäure-Metallseifen ernährungsphysiologisch und pharmakologisch relevanter Carbonsäuren sowie deren Verwendung.

Stand der Technik

In der chemischen und biochemischen Synthese werden vermehrt Enzyme als Katalysatoren eingesetzt. So werden in vielen Fällen aufgrund der oft milderen Reaktionsbedingungen bereits in großtechnischen Verfahren Hydrolasen, speziell Lipasen (EC 3.1.1.3) zur Fettspaltung eingesetzt.

Der Nachteil bei enzymatisch katalysierten Reaktionen liegt oft in der Verfügbarkeit und Stabilität der Polypeptide. Aus dem Stand der Technik sind bereits Enzyme bekannt, die durch Immobilisierung beispielsweise durch Mikroinkapselung stabilisiert vorliegen und mehrfach Verwendung finden können. Es gibt heutzutage jedoch bereits kommerziell erhältliche Enzympräparate, deren Stabilität und Verfügbarkeit enzymatisch katalysierte Reaktionen wirtschaftlich machen.

Die Synthese von Fettsäureseifen durch Neutralisation der freien Säure mit geeigneten Basen verläuft bereits bei Raumtemperatur vollständig und in ausreichender Geschwindigkeit. Dieser Darstellungsweg erweist sich im Falle von CLA-Seifen wegen der hohen Eduktkosten für viele Anwendungsbereiche als unwirtschaftlich: Die Herstellung qualitativ hochwertiger CLA erfolgt über die Transesterifizierung von linolsäurereichen Ölen zum Methyl- oder Ethylester, optional einer destillativen Anreicherung der Linolsäureester und dann einer basisch katalysierten Isomerisierung. Die so hergestellten Ester müss-

ten dann basisch verseift und anschliessend wieder neutralisiert werden um zur freien Säure zu gelangen, was zusätzliche Kosten und eine hohe Salzfracht erzeugt.

Alternativ lassen sich Metallseifen von C18-Fettsäuren durch Umsetzung ihrer Methylester mit geeigneten Basen herstellen. Dieser Syntheseweg erfordert jedoch Temperaturen deutlich über 130 °C, so dass CLA-Seifen mit der erforderlichen Reinheit über diesen Prozess nicht zugänglich sind. Ausgehend vom CLA-Ester erfordert es chemisch zwei Schritte zur Herstellung der Metallseife, während das enzymatische Verfahren in einer Stufe verläuft. Die chemische Hydrolyse des Esters erfordert stöchiometrische Mengen an Base (und zur Neutralisation entsprechende Mengen an Säure) was zu sehr kostenintensiven Prozessen führt.

Ester von PUFAs (polyunsaturated fatty acids) z.B. aus Fischöl oder Borretschöl können leicht über Transesterifizierung hergestellt werden. Die destillative Aufreinigung und Anreicherung von Estern ist generell einfacher als die von freien Säuren. Ausgehend von den Estern hat das enzymatische Verfahren die gleichen Vorteile gegenüber dem chemischen Zweistufenverfahren wie oben beschrieben.

Im Stand der Technik werden Metallseifen von Fettsäuren beschrieben, die als Trägermaterial und für Dispersionen von bioaktiven Wirkstoffen wie beispielsweise Aminosäuren in Futtermitteln speziell für Wiederkäuer eingesetzt werden (US 5532008).

Aus dem Stand der Technik ist weiterhin bereits bekannt, dass Öle, die in der Futtermittelindustrie verwendet werden sollen, als Metallseifen eingesetzt werden (JP 4117294). Ein Gemisch an Rohstoffen aus Triglyceriden nicht näher definierter Zusammensetzung wird mittels einer Lipase hydrolysiert und durch zweiwertige Metallsalze zu den Metallseifen umgesetzt. Die hier umgesetzten Rohstoffgemische sind undefiniert und die resultierenden Produktgemische im Futtermittelsektor noch tolerabel, doch in der Nahrungsmittelindustrie und Pharmazie nicht wünschenswert.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat darin bestanden, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Metallseifen ernährungsphysiologisch und pharmakologisch relevanter Carbonsäuren aus den jeweiligen Alkylestern zur Verfügung zu stellen, welches unter milden Reaktionsbedingungen arbeitet und dazu führt, dass die Metallseifen als Feststoffe direkt und einfach vom Reaktionsgemisch abgetrennt werden können und direkt einsetzbar sind. Die so erhaltenen Metallseifen sollten außerdem als Träger- oder Kapselmaterial für weitere Komponenten dienen. Insbesondere sollten die Metallseifen in hohen Ausbeuten erhalten werden und zu definierten Zusammensetzungen bis hin zur hohen Reinheit der einzelnen Metallseifen führen, da die Metallseifen neben der Futtermittelanwendung

auch für die Nahrungsmittelindustrie und Pharmazie zum Einsatz kommen sollen. Des weiteren sollte dieses Verfahren kostengünstig sein.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Metallseifen bei dem Alkylester von mehrfach ungesättigten Carbonsäuren in Anwesenheit eines basischen Metallsalzes mit einer Hydrolase enzymatisch umgesetzt werden. Die Reaktion kann sowohl im wässrigen Medium als auch in organischem Lösungsmittel mit einem geringen Anteil an Wasser durchgeführt werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren durch milde Reaktionsbedingungen und kostengünstig zu Metallseifen ernährungsphysiologisch und pharmakologisch relevanter Carbonsäuren in sehr hohen Ausbeuten führt, die als Feststoffe direkt dem Reaktionsgemisch entzogen werden können. Im Vergleich zum zweistufigen chemischen Verfahren verläuft das enzymatische Verfahren der Umsetzung der Ester über einen Reaktionsschritt und zeigt deshalb Vorteile durch Einsparung von Prozessschritten, Vermeidung von Abfall und daraus resultierend natürlich auch einen enormen Kostenvorteil.

Im Sinne der Erfindung zählen zu den ernährungsphysiologisch relevanten Carbonsäuren alle, die in der Human- oder Tierernährung verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich dabei um mehrfach ungesättigte Fettsäuren die zwei bis sechs Doppelbindungen aufweisen (polyunsaturated fatty acids PUFAs) mit einer Kettenlänge von 16 bis 22 C-Atomen oder um Mischungen aus Fettsäuren, die einen Anteil von größer als 10 % einer der mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten.

Insbesondere bevorzugt sind Arachidonsäure, Docosahexanoic acid (DHA), Eicosapentanoic acid (EPA), alpha- und gamma Linolensäure, konjugierte Linolsäuren (conjugated linoleic acid = CLA) insbesondere die cis9,trans11-Linolsäure und die trans10,cis12-Linolsäure sowie deren Gemische oder insbesondere um Gemische konjugierter Linolsäuren, die einen Anteil von mindestens 25 % der cis9,trans11-Linolsäure und der trans10,cis12-Linolsäure enthalten. Diese Gemische können nach allen herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, mit denen diese beiden Isomere angereichert werden können, oder mit denen man eines der beiden Isomere anreichern kann, sodass ein Mischungsverhältnis von konjugierten Linolsäuren von mindestens 25 % der cis9,trans11-Linolsäure und der trans10,cis12-Linolsäure entsteht.

Im Sinne der Erfindung werden ungesättigten Carbonsäuren in Form ihrer Alkylester oder Triglyceride eingesetzt, wobei die Alkylester besonders bevorzugt sind. Insbesondere Al-

kylester bei denen der Alkylrest eine Kettenlänge von 1-4 C-Atomen besitzt wobei die Alkoholkomponente von einem einwertigen oder zweiwertigen, primärem, sekundärem oder tertiärem Alkohol ausgeht. Insbesondere bevorzugt werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Methyl- oder Ethylester der Fettsäuren eingesetzt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Glyceride der Fettsäuren eingesetzt, wobei es sich um Mono-, Di- oder Triglyceride handeln kann und die Di- oder Triglyceride jeweils mit der gleichen oder mit unterschiedlichen Fettsäuren verestert sein können und wenigstens eine der Fettsäuren zu den erfindungsgemäßen einfach- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren zählen soll. Die Mono-, Di- oder Triglyceride können synthetisch hergestellt sein oder natürlich vorkommend isoliert werden.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden, natürlich vorkommenden Triglyceride werden bevorzugt aus Borretschöl, Leinsamenöl, Nachtkerzenöl, Walnussöl, Shrimp- und Fischöl oder Single Cell Öl isoliert, wobei das Single Cell Öl insbesondere aus Pilzen und Mikroalgen isoliert wird.

Der Unterschied zwischen Estern und Triglyceriden liegt darin, dass das Hydrolysegleichgewicht der Triglyceride sehr weit auf Seiten der Fettsäuren liegt (> 95 % Spaltgrad einstufig erreichbar bei 50 % Wasser), wogegen das Gleichgewicht bei den Estern sehr weit auf Seite der Ester liegt (< 50 % Spaltgrad bei 50 % Wasser).

Das erfindungsgemäße Verfahren verläuft beim Einsatz der Methyl- oder Ethylester ohne Entfernung der Alkoholkomponenten. Das Reaktionsgleichgewicht wird ausschließlich über die Seifenbildung zu den Edukten verschoben.

CLA-Isomere

Die konjugierten Linolsäuren (CLA) sind Bestandteil vieler Tierprodukte wie Fleisch oder auch Milch. Man findet die Isomere der CLA in geringen Konzentrationen auch in einigen pflanzlichen Produkten. Ihre ernährungsphysiologische Bedeutung ist seit vielen Jahren Thema vieler Forschungsarbeiten. So konnte gezeigt werden, dass die am häufigsten vorkommenden Isomere cis9,trans11-CLA und trans10,cis12-CLA pharmazeutisch und ernährungsphysiologisch sehr interessante und bedeutende Ergebnisse liefern. Die weiteren, weniger häufig vorkommenden Isomere trans9,cis11-CLA, trans9,trans11-CLA, cis9,cis11-CLA, cis10,trans12-CLA, trans10,trans12-CLA, cis10,cis12-CLA oder auch trans7,cis9-CLA, trans8,cis10-CLA, trans8,trans10-CLA, cis11,trans13-CLA, trans11,trans13-CLA sind bislang in ihren physiologischen Wirkungen wenig untersucht worden, da eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von CLA und CLA-Derivaten im Nahrungs- und Futtermittelsektor sowie in der Pharmazie die hohe Reinheit

des Produktes darstellt. Die Verfügbarkeit dieser Isomere durch Anreicherung mit einer benötigten hohen Reinheit stellt eine große Hürde dar. Das erfindungsgemäße Verfahren ist bevorzugt einzusetzen um Metallseifen beliebiger CLA-Isomere herzustellen, besonders bevorzugt ist jedoch die Herstellung von Metallseifen der am häufigsten vorkommenden ernährungsphysiologisch bedeutenden CLA-Isomere cis9,trans11-CLA und trans10,cis12-CLA. Insbesondere bevorzugt sind die Calcium- und Magnesiumseifen dieser Isomere, wobei die Calciumseifen wiederum bevorzugt sind.

Das cis9,trans11-CLA Isomer ist ein natürlicher Bestandteil der Milch, der eine anticarcinogene Wirkung in verschiedenen Tiermodellen zeigt (Chin et al., J. Food Compos. Anal. 5 (1992), 185 – 197; Pariza et al. Prog. Lipid Res. 40 (2001) 283-298; Parodi, Austral. J. Dairy Technol. 56 (2001), 65 - 73).

Das trans10,cis12-CLA Isomer reduziert die Bildung von Körperfett in Säugetieren (Baumgard et al., Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf. (2000), 180 – 190; Park et al., Lipids 34 (1999) 235 - 241) und reduziert den Anteil von MilCHFett in milchproduzierenden Säugetieren (Baumgard et al., J. Nutr. 131 (2001) 1764 – 1769; Masters et al., FASEB J. 13 (1999), A697; Harrell et al., J. Anim. Sci. 77 (2000), 137 – 138; Chouinard et al. J. Nutr. 129 (1999, 1579 - 1584).

Zusätzlich besitzt CLA eine antiarterosklerotische Wirkung (Roche et al., (Nutrition Research Reviews 14 (2001) 173 – 187, Stanley et al., Chemistry & Industry 19 (2001), 729 – 731).

Die basisch induzierte Isomerisierung von Linolsäureestern liefert als Primärprodukte lediglich die erwünschten cis9,trans11- und trans10,cis12-Isomere, deren positive physiologische Wirkung erwiesen ist. Wird das Produkt jedoch auf über 130 °C erhitzt, führen Umlagerungsreaktionen zur Bildung unerwünschter Isomere, die das erhaltene Material unbrauchbar machen.

Die Synthese von Fettsäureseifen durch Neutralisation der freien Säure mit geeigneten Basen verläuft bereits bei Raumtemperatur vollständig und in ausreichender Geschwindigkeit. Dieser Darstellungsweg erweist sich im Falle von CLA-Seifen wegen der hohen Eduktkosten für viele Anwendungsbereiche als unwirtschaftlich. Alternativ lassen sich Metallseifen von C18-Fettsäuren durch Umsetzung ihrer Methylester mit geeigneten Basen herstellen. Dieser Syntheseweg erfordert jedoch Temperaturen deutlich über 130 °C, so dass CLA-Seifen mit der erforderlichen Reinheit über diesen Prozess nicht zugänglich sind.

PUFAs

PUFAs (polyunsaturated fatty acids) kommen in verschiedenen tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Lipiden vor.

Fischöl enthält beispielsweise einen hohen Anteil an DHA (Docosahexanoic acid) und EPA (Eicosapentanoic acid). Diese Fettsäuren werden hauptsächlich von Mikroalgen produziert und werden über die Nahrungskette in Fischen angereichert. Mikroalgen produzieren zum Teil nur ein bestimmtes PUFA, was die Anreicherung erleichtert (Ratledge, TIBTECH 11 (1993), 278 - 284).

Gama-Linolensäure ist ein Bestandteil von Borage und Evening Primrose Öl. Alpha-Linolensäure findet sich z.B. in Leinsamenöl in hoher Konzentration.

Neben Algen produzieren auch Mikropilze PUFAs. So können z.B. aus der Gattung Mortierella Gamma-Linolensäure, Dihomo-Gamma-Linolensäure und Arachidonsäure isoliert werden (Ratledge, TIBTECH 11 (1993), 278 - 284; Shimizu et al., Comments Agric. Food Chem. 2 (1990) 211 - 235).

Linolsäure und alpha-Linolensäure sind essentielle Fettsäuren, aus denen die höher ungesättigten n-3 (aus Linolensäure) und n-6 (aus Linolsäure) PUFAs aufgebaut werden. Linolsäure wird zur Aufrechterhaltung der Wasserbarriere der Haut benötigt. Die höheren PUFAs sind Vorstufen zur Synthese der Eicosanoide und Prostaglandine. DHA wird zudem in Lipiden des Gehirns und in der Retina gefunden (Vishwanath et al., Nutr. Clin. Practice 7 (1992) 179 - 186).

Das Verhältnis der Aufnahme von omega-3-Fettsäuren (EPA, DHA, Alpha-Linolensäure) zu omega-6-Fettsäuren (Linolsäure) hat sich in den letzten Jahren deutlich zu einer erhöhten Aufnahme von omega-6-Fettsäuren verschoben, was z.B. auch zu einem Shift der Muttermilchkomponenten geführt hat (Sanders, Am. J. Clin. Nutr. 71 (2000) 176S - 178S). Es wird vermutet, dass das Verhältnis von omega 3 zu omega 6 Fettsäuren auch einen Einfluss auf depressive Zustände hat. Niedrige Level von omega-3-Fettsäuren im Gehirn und in der spinalen Flüssigkeit sind korreliert mit einer niedrigen Konzentration des Neurotransmitters Serotonin (Small, New Scientist (2002) 35 - 37). Bevölkerungen, die einen hohen Anteil an omega-3-Fettsäuren zu sich nehmen, wie Eskimos oder Japaner, haben ein deutlich niedrigeres Risiko an Herz- und Kreislauferkrankungen (Bilo et al., Biomed & Pharmacother 44 (1990) 169 - 174; Sugano et al., Am. J. Clin. Nutr. 71 (2000) 189S - 196S).

Eine Erhöhung des Anteils an omega-3-Fettsäuren wie alpha-Linolensäure, DHA und EPA wird daher empfohlen, um die Gefahr an coronary heart disease (Herzinfarkt, Erkrankung der Herzkranzgefäße) zu erniedrigen. Zusätzlich haben omega-3-PUFAs einen

lindernden Einfluss auf rheumatische Arthritis (de Deckere et al., *European J. Clin. Nutrition* 52 (1998) 749 – 753). Zudem besitzen omega-3 PUFAs immunomodulatorische Eigenschaften und besitzen ein antiinflammatorisches Potential (Calder, *Proc. Nutr. Soc.* 55 (1996) 737 – 774).

Für gamma-Linolensäure ist beschrieben, dass sie ein antiinflammatorisches Potential besitzt und zur Behandlung von rheumatoider Arthritis geeignet ist (Zurier et al., *Rec. Adv. Biotech. Clin. Appl.* (2001) 242 – 250; Zilberberg et al., *Rec. Adv. Biotech. Clin. Appl.* (2001) 90 – 104).

Säuglinge können zwar PUFAs (Arachidonsäure, DHA) aus Linol- und Linolensäure selbst synthetisieren, allerdings nur sehr langsam (Uauy et al., *Proc. Nutr. Soc.* 59 (2000) 3 – 15. Aus diesem Grund ist eine Supplementierung von PUFAs, insbesondere von Arachidonsäure und DHA für die visuelle und neuronale Entwicklung von Neugeborenen hilfreich. Einen wichtigen Einfluss scheint die richtige Balance zwischen DHA und Arachidonsäure zu haben (Horocks et al., *Pharmacol. Research* 40 (1999) 211 – 225; Jensen et al., *Clin. Perinatology* 29 (2002) 261 – 281; Forsyth et al., *New Comprehensive biochemistry* 35 (2002) 129 – 146; Gibson et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 501 (2001) 375 – 383; Wainwright et al., *Rec. Adv. Biotech. Clin. Appl.* (2001) 180 – 189).

Ungesättigte Fettsäuren werden im Pansen von Wiederkäuern über Biohydrierung modifiziert. Diese Biohydrierung kann zumindest zum Teil unterbunden werden, wenn Fettsäuren in geschützter Form, z.B. als Calciumseifen zugefüttert werden (Chalupa et al., *J. Dairy Sci* 69 (1986), 1293 – 1301). Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von Calcium Seifen geschützten Fettsäuremischungen die Fettzusammensetzung der Milch von Wiederkäuern beeinflusst, die Konzentration an unerwünschten Trans-Fettsäuren verringert und z.B. Butter streichfähiger macht (Chouinard et al., *J. Dairy Sci.* 81 (1998), 471 – 481, Precht et al., *Eur. J. lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 783 – 792, Precht et al., *Kieler Milchwirtschaftliche forschungsberichte* 54 (2002) 225 – 242.

Die Anreicherung von PUFAs (hauptsächlich DHA und EPA) aus Fischölen oder auch Algenlipiden erfolgt entweder über Hydrolyse des Öls oder aber über Transesterifizierung zum Ethylester (Wanasundara et al., *Seafoods – Quality, Technology and Nutraceutical applications* (2002) 157 – 174). Die Ethylesterroute ist die industriell gebräuchlichste. Die Anreicherung der PUFA-Ethylester erfolgt dann über Molekulardestillation und optional weitere Anreicherung z.B. über Harnstoffällung (WO 9524459; Nakajima et al., *Essential*

Fatty Acids and Eicosanoids, Invited Papers from the Third Int. Congress (1992), 57 – 64).

Die Anreicherung von alpha- und gamma-Linolensäure oder Arachidonsäure aus pflanzlichen Ölen und mikrobiellen Lipiden kann prinzipiell ebenfalls über Molekulardestillation und/oder Harnstoffällung nach Transesterifizierung der Öle durchgeführt werden.

Besonders bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren sind die Methyl- oder Ethylester der genannten Carbonsäuren. Insbesondere sollen die Methyl- und/oder Ethylester der konjugierten Linolsäuren (CLA) nach dem erfindungsgemäßen Verfahren umgesetzt und verseift werden.

Die basisch induzierte Isomerisierung von Linolsäureestern liefert als Primärprodukte lediglich die erwünschten cis9,trans11- und trans10,cis12-Isomere, deren positive physiologische Wirkung erwiesen ist. Wird das Produkt jedoch auf über 130 °C erhitzt, führen Umlagerungsreaktionen zur Bildung unerwünschter Isomere, die das erhaltene Material unbrauchbar machen.

Die Synthese von Fettsäureseifen durch Neutralisation der freien Säure mit geeigneten Basen verläuft bereits bei Raumtemperatur vollständig und in ausreichender Geschwindigkeit. Dieser Darstellungsweg erweist sich im Falle von CLA-Seifen wegen der hohen Eduktkosten für viele Anwendungsbereiche als unwirtschaftlich. Alternativ lassen sich Metallseifen von C18-Fettsäuren durch Umsetzung ihrer Methylester mit geeigneten Basen herstellen. Dieser Syntheseweg erfordert jedoch Temperaturen deutlich über 130 °C, so dass CLA-Seifen mit der erforderlichen Reinheit über diesen Prozess nicht zugänglich sind.

Metallsalze

Im Sinne der Erfindung sind unter basischen Metallsalzen solche zu verstehen, die von Calcium, Magnesium, Zink oder Aluminium gebildet werden. Bevorzugt sind dabei jeweils die Hydroxide Calciumhydroxid $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Magnesiumhydroxid $\text{Mg}(\text{OH})_2$, Aluminiumhydroxid $\text{Al}(\text{OH})_3$ und Zinkhydroxid $\text{Zn}(\text{OH})_2$ oder die Oxide. Besonders bevorzugt für den Einsatz im erfindungsgemäßen Verfahren sind Calciumhydroxid und Magnesiumhydroxid.

Calcium zeigt Wirkung in der Krebsvorbeugung bei Dickdarmkrebs (Parodi, Austral. J. Dairy Technol. 56 (2001), 35 – 58). Insbesondere die Kombination aus Vitamin D und Calcium ist wirkungsvoll.

Calcium zeigte außerdem eine unterstützende Funktion beim Abbau von Fettgewebe. In Kombination mit einer Diät führte die Gabe von Calcium zu einem verbesserten Gewichtsverlust, wie eine 2-Jahresstudie an Frauen von der Purdue University zeigt.

Magnesium ist ebenso wie Calcium ein essentielles Mineral. Magnesium Unterversorgung führt zu Änderungen der gastrointestinalen, kardiovaskulären und neuromuskulären Funktionen (Bohl et al., Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42 (2002) 533 – 563). Die ausreichende Versorgung mit Magnesium in der Bevölkerung ist nicht immer gegeben.

Partikel oder Granulat Konfektionierung

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden die Metalsleifen direkt während der enzymatischen Herstellung zu einem Granulat konfektioniert, wobei die Partikel oder Granulate eine mittlere Teilchengröße von 0,05 mm bis 3 cm, bevorzugt von 0,1 mm bis 2 mm und insbesondere bevorzugt von 0,2 mm bis 3 mm besitzen. Die Partikelgrößen können je nach eingesetztem Verfahren und Reaktionsbedingungen variiert werden und innerhalb enger Grenzen eingestellt werden. Die Partikelgröße kann in Abhängigkeit der Anwendung (Humanernährung, Tierfutterzusatz, Fischfutterzusatz) flexibel eingestellt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl im wässrigen Medium als auch in organischem Medium eines Lösungsmittels mit einem Wasseranteil von mindestens 5 %, bevorzugt mit einem Wasseranteil von 5 % bis 50 % durchgeführt werden. Die Temperatur während des enzymatischen Herstellungsverfahrens liegt zwischen 15 und 60 °C wobei eine Temperatur zwischen 20 und 40 °C besonders bevorzugt ist. Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Anteil der wässrigen Phase und/oder des organischen Lösungsmittels enthaltend 5-50 % Wasser zwischen 50 Gew.-% und 90 Gew.-% im Reaktionsgefäß beträgt.

Prinzipiell sind alle möglichen Verfahren zur Vermischung der Edukte erfindungsgemäß einsetzbar, die zu Partikeln oder Granulaten führen.

In einer besondern Ausführungsform wird der Carbonsäureester während der enzymatischen Umsetzung zudosiert. Die Zudosierung kann entweder kontinuierlich oder in mehreren einzelnen Schritten erfolgen. Gegebenenfalls wird während der Reaktion weitere Hydrolase zudosiert. Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Carbonsäureester dem Reaktionsgemisch enthaltend Wasser und/oder Lösungsmittel, Hydrolase und Metallsalz über ein Düsenverfahren zudosiert wird. Die Dosierung kann hier entweder kontinuierlich oder in mehreren Schritten erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren wird der Carbonsäureester mit dem Reaktionsgemisch enthaltend Wasser und/oder Lösungsmittel und Metallsalz über Membranverfahren oder Dispergierv Verfahren emulgiert und die Hydrolase durch Rühren untergemischt. Bei dem Membranverfahren wird mittels keramischer Hohlfasermembran über eine Apparatur bestehend aus: Vorlagebehälter für wässrige Phase, Druckbehälter für den Methylester bis 2 bar, Membranmodul mit keramischer Membran (beispielsweise Membranmodul 100 my Einkanalmembran Typ C), Nachreaktionsbehälter und Schlauchpumpe eine Emulsion hergestellt. Bei dem Dispergierv Verfahren wird die Vermischung der Edukte mittels Rotor/Stator Verfahren durch eine Apparatur bestehend beispielsweise aus IKA Process-Pilot 2000/4 Generator Mittel 4 M, mit pumpenseitiger Dosierungseinrichtung durchgeführt.

Das Düsenverfahren ist erfindungsgemäß bevorzugt. Allen Verfahren ist gemeinsam, dass der Carbonsäureester in die wässrige Phase so vermischt wird, dass bei der Reaktion das Produkt durch Kristallisation gleichzeitig konfektioniert wird. Bevorzugt wird die Umsetzung nach dem Düsen-, Membran- oder Dispergierv Verfahren unter kontinuierlichem Rühren in einem Batch-Reaktor durchgeführt. Ebenfalls bevorzugt ist die Umsetzung in einem Roh- oder Säulenreaktor.

Die Teilchengröße der Partikel oder des Granulates lässt sich über die Zudosierung des Esters sowie der Rührergeometrie und -drehzahl einstellen.

Die granulierten Seife ist einfach über Filtration isolierbar und ist nach Trocknung ein rieselfähiges Produkt. Die so hergestellten Seifen sind staubarm und können direkt in Nahrungs- oder Futtermittel eingearbeitet werden. Die Metallsalze können jedoch ebenfalls in feste Speisen eingearbeitet sein oder vor der Einarbeitung verkapselt werden.

Kristallisierhilfe

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird dem Verfahren eine Kristallisierhilfe beigegeben um die Produktkonfektionierung zu verbessern. Auf diesem Wege werden Partikel oder Granulate mit einer mittleren Teilchengröße von 2 bis 5 mm erhalten, besonders bevorzugt werden Partikel oder Granulate mit einer mittleren Teilchengröße von 2 bis 3 mm erhalten.

Bei den erfindungsgemäßen Kristallisierhilfen handelt es sich um Stärke oder Cellulose, wobei die Stärke bevorzugt ist. Die durch die Kristallisierhilfe hergestellten Seifen sind ebenfalls staubarm und können direkt eingearbeitet werden, in feste Speisen eingearbeitet werden oder verkapselt vorliegen.

Bioverfügbarkeit der Seifen

Die Partikel oder Granulate besitzen eine gute Bioverfügbarkeit. Die mild getrockneten Granulate lösen sich innerhalb weniger Minuten in Magensaftflüssigkeit auf und liegen dann als freie Fettsäure vor. Die Abbaugeschwindigkeit der Granulate ist ähnlich oder sogar besser als technisch verfügbare Stearatseifen von Ca, Mg oder Zn.

Im sauren Milieu des Magens werden die Metallseifen in die freien Säuren und hauptsächlich die Chloride der Metalle umgewandelt. Im neutralen pH-Wert des Darms können die Seifen aus den Metallchloriden und den freien Säuren nicht zurückgebildet werden, so dass die Carbonsäuren vollständig adsorbiert werden können. Vergleichende Untersuchungen mit Metallchloriden haben gezeigt, dass es nicht oder nur in sehr geringem Maße zur Bildung von Metallseifen kommt.

Hydrolasen

Die erfindungsgemäß verwendeten Hydrolasen stellen Enzyme dar, die eine lipolytische Aktivität unter basischen Bedingungen aufweisen. Es handelt sich erfindungsgemäß bei den Hydrolasen bevorzugt um Lipasen, Esterasen oder Phospholipasen die bei einer Temperatur zwischen 15 und 60 °C aktiv sind. Sie können entweder allein oder in Kombination mit mehreren Enzymen eingesetzt werden. Speziell bevorzugt ist die Verwendung von technischer Lipolase Präparation, insbesondere Lipozym® TL 1001 (Novozym A/S) der Firma Novozym. Die Aktivität der einzusetzenden Enzymmenge an Lipozym TL 1001 beträgt typischerweise zwischen 200 – 10.000 kU pro kg eingesetztem Carbonsäureester (spezifiziert nach Aktivitätsassay der Firma Novozym A/S).

Typische Beispiele für geeignete Hydrolasen, die jedoch nicht einschränkend sein sollen, sind Hydrolasen von Organismen die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von *Thermomyces*, *Candida antarctica A*, *Candida antarctica B*, *Rhizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus javanicus*, *Porcine pancreas*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas sp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Fusarium oxysporum* und *Penicillium camemberti*.

Bevorzugt ist der Einsatz der alkalinen Lipase/Esterase aus dem Organismus *Thermomyces*.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Hydrolasen können in unterschiedlichen Formen eingesetzt werden. Prinzipiell sind alle dem Fachmann gebräuchlichen Darreichungsformen von Enzymen anwendbar. Vorzugsweise werden die Enzyme in reiner Form oder als technisches Enzympräparat in Lösung, insbesondere in wässriger Lösung eingesetzt. Der

Anteil an aktiven Enzym in den jeweiligen technischen Enzympräparaten variiert von Hersteller zu Hersteller. Der Anteil liegt jedoch im Mittel bei 2-10 % aktiven Enzym.

Die erfindungsgemäßen Reaktionsbedingungen der enzymatisch katalysierten Reaktion richten sich nach dem optimalen Reaktionsbereich der ausgewählten Enzyme und nach den verwendeten Alkylestern der Carbonsäuren. Im Besonderen handelt es sich um Bedingungen bei denen unter anderem die Reaktionstemperatur zwischen 15 und 60 °C, bevorzugt eine Temperatur zwischen 20 und 40 °C gewählt wird.

Die über dieses milde Verfahren hergestellten Partikel oder Granulate enthalten noch Lipaseaktivität, wenn Lipase als Hydrolase eingesetzt wurde, die nach Auflösung der Kapseln im Magen freigesetzt wird. Diese Lipaseaktivität kann durch den Abbau von Fetten eine zusätzliche verdauungsunterstützende Wirkung haben. Alternativ kann die Lipase über kurze Erhitzung der Seifen deaktiviert werden.

Verwendung der Metallseifen

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Metallseifen ernährungsphysiologisch relevanter Carbonsäuren, welche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat. Im Falle der Verwendung als Futtermitteladditive ist die Anwendung bei Wiederkäuern besonders bevorzugt.

Zubereitungen enthaltend Metallseifen und weitere Komponenten

Das enzymatische Herstellverfahren mit integrierter Konfektionierung erlaubt die direkte Einarbeitung insbesondere hydrophober Komponenten.

Aus diesem Effekt resultiert ein weiterer Gegenstand der Erfindung.

Dieser weitere Gegenstand der Erfindung sind Zubereitungen enthaltend Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren in Form von Granulat, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren als Träger- oder Kapselmateriale und eine oder mehrere zusätzliche Komponenten die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Enzymen, Vitaminen, Antioxidantien, Konservierungsmitteln, Farbstoffen, Carotinoiden, Sterolen, Flavon- und Isoflavonverbindungen und Fettsäurederivaten.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses weiteren Gegenstandes der Erfindung handelt es sich bei den Enzymen als zusätzliche Komponente in der erfindungsgemäßen Zu-

bereitung um Enzyme, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Esterasen, Amidasen und Phytasen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Vitaminen um fettlösliche Vitamine der Klassen A, D, E und K sowie deren Derivate und/oder um wasserlösliches Vitamin C sowie dessen Derivate.

Die Kombination aus Metallseifen ernährungsphysiologisch und pharmakologisch relevanter Carbonsäuren mit essentiellen Vitaminen macht eine Anwendung in der Nahrungsmittel und Futtermittelindustrie besonders attraktiv.

In einer weiteren Ausführungsform des weiteren Gegenstandes der Erfindung handelt es sich bei den Antioxidantien um die lebensmittelzugelassenen Stoffe ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von Ascorbinsäure E300, Calciumascorbat E302, Natriumascorbat E301, Ascorbylpalmitat E304, Vitamin E (Mischung von Tocopherolen E306 – E309), Propylgallat E310, Octylgallat E311, Dodecylgallat E312, Isoascorbinsäure E315, Natriumisoascorbat E316, Butyl-4-hydroxyanisol E320 und Butylhydroxytyrosol E321.

Bei den bevorzugten Konservierungsmitteln als zusätzliche Komponente in der erfindungsgemäßen Zubereitung handelt es sich um die lebensmittelzugelassenen Stoffe ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von E200 – E203 (Sorbinsäure, Natriumsorbat, Kaliumsorbat, Calciumsorbat), E210 – E219 (Benzoessäure, Natriumbenzoat, Kaliumbenzoat, Calciumbenzoat) E214 – E219 (Parahydroxybenzoeester), E236 – E238 (Ameisensäure, Natriumformiat, Calciumformiat), E260 – E263 (Essigsäure, Kaliumacetat, Natriumacetat, Calciumacetat), E270 (Milchsäure) und E280 – E283 (Propionsäure, Natriumpropionat, Calciumpropionat, Kaliumpropionat).

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den bevorzugten Carotinoiden insbesondere um Carotinoide ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von Carotin, Lycopon, Lutein, Astaxanthin, Zeaxanthin und Canthaxanthin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des weiteren Gegenstandes der Erfindung handelt es sich bei den Sterolen insbesondere um Sterole, die aus pflanzlichen Quellen isoliert werden wie beispielsweise um Sitosterol, Campesterol oder Stigmasterol.

Bei den bevorzugten Fettsäurederivaten handelt es sich um Liponsäure und dessen Derivate wie Ester oder Glyceride.

Die genannten zusätzlichen Komponenten werden entweder allein oder in Kombination mit mehreren Komponenten in die Granulate aus den Metallseifen, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingekapselt oder liegen gebunden an den Metallseifen vor, sodass diese als Trägermaterial fungieren. In welcher Weise die Komponenten mit den Metallseifen konfektioniert werden, hängt vom jeweiligen Herstellungsverfahren ab. Diese Substanzen werden mit der Auflösung der granulierten Seifen im sauren Milieu des Magens freigesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Zubereitungen enthaltend Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren in Form von Granulat hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren als Träger- oder Kapselmaterial und eine oder mehrere zusätzliche Komponenten die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Enzymen, Vitaminen, Antioxidantien, Konservierungsmitteln, Farbstoffen, Carotinoiden, Sterolen, Flavon- und Isoflavonverbindungen und Fettsäurederivaten wobei eine oder mehrere der zusätzlichen Komponenten direkt während der enzymatischen Umsetzung in das Granulat aus Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren eingearbeitet werden.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Metallseifen, insbesondere von ernährungsphysiologischen und/oder pharmakologisch relevanten Carbonsäuren liegt darin, dass die Metallseifen direkt als Granulate unterschiedlicher Teilchengröße herstellbar sind. Diese Herstellungsverfahren ermöglichen deshalb ein weiteres Verfahren, bei dem ein oder mehrere zusätzliche Komponenten direkt in die Granulate eingearbeitet werden oder die Granulate direkt als Trägermaterial für die zusätzlichen Komponenten fungieren. Es ist kein weiterer Verfahrensschritt notwendig um die zusätzlichen Komponenten einzuarbeiten. Je nach Reaktionsbedingungen des Herstellverfahrens lassen sich für die jeweilig bevorzugten Komponenten die optimalen Bedingungen einstellen um diese gewünscht einzuarbeiten.

In einer besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitungen handelt es sich bei den zusätzlichen Komponenten um fettlösliche Substanzen und/oder um Substanzen, die in Anwesenheit eines basischen Metallsalzes eine wasserunlösliche Seife bilden und/oder um Substanzen, die von einer Metallseife gebunden werden.

Die Begriffe zusätzliche Komponenten oder Substanzen werden im Sinne der Erfindung synonym verwendet. Es ist erfindungsgemäß möglich die zusätzlichen Komponenten vor oder während der enzymatischen Umsetzung dem Reaktionsgemisch enthaltend Wasser und/oder organisches Lösungsmittel, Metallsalz, Hydrolase und erfindungsgemäß zudo-

siertem Carbonsäureester zudosieren, wobei eine kontinuierliche Dosierung oder eine in mehreren Schritten vorzunehmende Dosierung möglich ist.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die fettlöslichen Substanzen vor der enzymatischen Umsetzung zu den Metallseifen im Carbonsäureester gelöst oder suspendiert und gleichmäßig verteilt werden und dass die wasserlöslichen Substanzen vor der Umsetzung zu Metallseifen im Reaktionsmedium enthaltend Wasser und Metallsalz in Form der Hydroxide oder Oxide gelöst oder suspendiert und gleichmäßig verteilt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Zubereitungen als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat.

Beispiele

A) Beispiele zur enzymatischen Herstellung

1. Enzymatische Synthese von Ca-CLA aus CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl

In 4 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Methylester und 45 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 0,75 g Ca(OH)_2 gegeben, zum Ansatz 3 wurde 1,2 g CaCl_2 gegeben. Zu allen Ansätzen werden 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen 1 und 2 jeweils 0,15 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 3 0,24 g CaCl_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Von Ansatz 2 wurde die unlösliche Calciumseife über eine Nutsche abfiltriert und eingefroren. Die Ansätze 1, 3 und 4 wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte nach Syllisierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	3	4	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	CaCl_2	ohne	
Umsatz	100 %	100 %	70 %	53 %	
Fettsäureverteilung					
Palmitinsäure	6,7	6,4			6,2
Stearinsäure	4,5	4,8			4,3
Ölsäure	26,7	27,1			25,4
Linolsäure	2,0	2,0			2,0

9,11-CLA	30,4	30,2			31,0
10,12-CLA	29,6	29,5			30,9

Ohne Zusatz eines basischen Metallsalzes läuft die enzymatische Hydrolyse bei einem Umsatz von etwa 50 % in ihr Gleichgewicht. Der Zusatz von nicht basischem CaCl_2 führt nicht zu einer kompletten Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur freien Säure. Der Zusatz von basischem Ca(OH)_2 bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Calciumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die Art der Aufarbeitung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Fettsäuren im Produkt.

2. Enzymatische Synthese von Ca-CLA aus CLA-Ethylester ex Distelöl

In 4 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Ethylester und 45 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 0,75 g Ca(OH)_2 gegeben, zum Ansatz 3 wurde 1,2 g CaCl_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen 1 und 2 jeweils 0,15 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 3 0,24 g CaCl_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Von Ansatz 2 wird die unlösliche Calciumseife über eine Nutsche abfiltriert und eingefroren. Die Ansätze 1, 3 und 4 wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde direkt gegen das Substrat CLA-Ethylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	3	4	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	CaCl_2	ohne	
Umsatz	100 %	100 %	70 %	56 %	

Fettsäureverteilung					
Palmitinsäure	2,1	2,2			1,8
Stearinsäure	3,1	3,2			2,8
Ölsäure	14,3	14,6			13,7
9,11-CLA	41,0	40,8			41,2
10,12-CLA	39,5	39,1			40,5

Ohne Zusatz eines basischen Metallsalzes läuft die enzymatische Hydrolyse bei einem Umsatz von etwa 50 % in ihr Gleichgewicht. Der Zusatz von nicht basischem CaCl_2 führt nicht zu einer kompletten Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur freien Säure. Der Zusatz von basischem Ca(OH)_2 bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Calciumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die Art der Aufarbeitung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Fettsäuren im Produkt.

3. Enzymatische Synthese von Mg-CLA aus CLA-Ethylester ex Distelöl

In 4 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Ethylester und 45 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 0,65 g Mg(OH)_2 gegeben, zum Ansatz 3 wurde 2,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen 1 und 2 jeweils 0,13 g Mg(OH)_2 und zum Ansatz 3 0,42 g MgCl_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 150 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Von Ansatz 2 wurde die unlösliche Magnesiumseife über eine Nutsche abfiltriert und eingefroren. Die Ansätze 1, 3 und 4 wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde direkt gegen das Substrat CLA-Ethylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	3	4	Vergleichs- CLA
Metallsalz	Mg(OH) ₂	Mg(OH) ₂	MgCl ₂	ohne	
Umsatz	100 %	99 %	56 %	56 %	
Fettsäureverteilung					
Palmitinsäure	2,1	2,1			1,8
Stearinsäure	3,1	3,1			2,8
Ölsäure	13,9	14,1			13,7
9,11-CLA	40,7	40,7			41,2
10,12-CLA	40,2	40,0			40,5

Ohne Zusatz eines basischen Metallsalzes läuft die enzymatische Hydrolyse bei einem Umsatz von etwa 50 % in ihr Gleichgewicht. Der Zusatz von nicht basischem MgCl₂ führt nicht zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur freien Säure. Der Zusatz von basischem Mg(OH)₂ bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Magnesiumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die Art der Aufarbeitung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Fettsäuren im Produkt.

4. Enzymatische Synthese von Zn-CLA aus CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl

In 4 Ansätze in verschliessbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Methylester und 45 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 0,85 g ZnO gegeben, zum Ansatz 3 wird 1,4 g ZnCl₂ gegeben. Zu Ansatz 1 wurden 300 µl Lipolase pipettiert, zu den Ansätzen 2, 3 und 4 wurden 150 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen 1 und 2 jeweils 0,17 g ZnO und zum Ansatz 3 0,28 g ZnCl₂ gegeben. Zu Ansatz 1 wurden 300 µl Lipolase pipettiert, zu den Ansätzen 2, 3 und 4 wurden erneut 150 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Von Ansatz 2 wurde die unlösliche Zinkseife über eine Nutsche abfiltriert und eingefroren. Die Ansätze 1, 3 und 4 wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert und die erhaltenen getrockneten Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter

milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	3	4	Vergleichs-CLA
Metallsalz	ZnO	ZnO	ZnCl ₂	ohne	
Umsatz	99 %	96 %	51 %	53 %	
Fettsäureverteilung					
Palmitinsäure	6,2	5,9			6,2
Stearinsäure	4,6	4,1			4,3
Ölsäure	25,2	25,5			25,4
Linolsäure	1,8	1,9			2,0
9,11-CLA	31,1	31,5			31,0
10,12-CLA	31,2	31,1			30,9

Ohne Zusatz eines basischen Metallsalzes läuft die enzymatische Hydrolyse bei einem Umsatz von etwa 50 % in ihr Gleichgewicht. Der Zusatz von nicht basischem ZnCl₂ führt nicht zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur freien Säure. Der Zusatz von basischem ZnO bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Zinkseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die Art der Aufarbeitung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Fettsäuren im Produkt.

5. Enzymatische Synthese von Al-CLA aus CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl

In 3 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Methylester und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 wurden 0,55 g Al(OH)₃ und zum Ansatz 2 0,9 g AlCl₃ gegeben. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 300 µl Lipolase pipettiert, zum Ansatz 3 wurden 150 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zum Ansatz 1 0,11 g Al(OH)₃ und zum Ansatz 2 0,18 g AlCl₃ gegeben. Zu den Ansätzen 1 und 2 wurden 300 µl Lipolase pipettiert, zum Ansatz 3 werden erneut 150 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Die Ansätze wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen getrockneten Produkte wurden nach Silylierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten

CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zum Umsatz sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	3
Metallsalz	Al(OH) ₃	AlCl ₃	ohne
Umsatz	63 %	10 %	53 %

Ohne Zusatz eines basischen Metallsalzes läuft die enzymatische Hydrolyse bei einem Umsatz von etwa 50 % in ihr Gleichgewicht. Der Zusatz von nicht basischem AlCl₃ führt zu einer Hemmung der enzymatischen Reaktion. Der Zusatz von basischem Al(OH)₃ hebt diese Hemmung auf und eine Hydrolyse von > 60 % kann erreicht werden. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt.

6. Enzymatische Synthese von Ca-CLA und Mg-CLA aus CLA-Triglycerid

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Triglycerid und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 wurden 0,75 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 wurden 0,65 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zum Ansatz 1 0,15 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 0,13 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Die Ansätze wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, di- und Triglyceriden bestimmt. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde direkt gegen das mit Methylierungsreagenz bei Raumtemperatur umgeesterte CLA-Triglycerid verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Mg(OH) ₂
Umsatz	99 %	100 %

Der Zusatz von basischem Ca(OH)₂ und Mg(OH)₂ bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Calcium oder Magnesiumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt.

7. Enzymatische Synthese von Ca-CLA aus CLA-Ethylester in Lösungsmittel

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Ethylester und 5 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen wurden 0,75 g Ca(OH)₂ gegeben. Zu Ansatz 1 wurden 40 g Hexan und zu Ansatz 2 wurden 40 g Aceton gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen jeweils 0,15 g Ca(OH)₂ und erneut 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Das Lösungsmittel wurde in einem Rotationsverdampfer abgezogen und die noch feuchten Proben wurden eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde direkt gegen das Substrat CLA-Ethylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Ca(OH) ₂	
Umsatz	100 %	100 %	
Fettsäureverteilung			
Palmitinsäure	2,1	2,2	1,8
Stearinsäure	3,1	3,1	2,8
Ölsäure	14,0	13,8	13,7

9,11-CLA	40,7	40,8	41,2
10,12-CLA	40,1	40,2	40,5

Der Zusatz von basischem Ca(OH)_2 bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Calciumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die enzymatische Umsetzung funktioniert sowohl im hydrophilen Lösungsmittel Aceton als auch im hydrophoben Lösungsmittel Hexan.

8. Enzymatische Synthese von Mg-CLA aus CLA-Ethylester in Lösungsmittel

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Ethylester und 5 g Wasser eingewogen. Zu den Ansätzen wurden 0,65 g Mg(OH)_2 gegeben. Zu Ansatz 1 wurden 40 g Hexan und zu Ansatz 2 wurden 40 g Aceton gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu den Ansätzen jeweils 0,13 g Mg(OH)_2 und erneut 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Das Lösungsmittel wurde in einem Rotationsverdampfer abgezogen und die noch feuchten Proben wurden eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde direkt gegen das Substrat CLA-Ethylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Mg(OH)_2	Mg(OH)_2	
Umsatz	98 %	100 %	
Fettsäureverteilung			
Palmitinsäure	1,9	1,9	1,8
Stearinsäure	2,8	3,0	2,8

Ölsäure	13,1	13,5	13,7
9,11-CLA	41,4	41,1	41,2
10,12-CLA	40,7	40,4	40,5

Der Zusatz von basischem $Mg(OH)_2$ bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Magnesiumseife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die enzymatische Umsetzung funktioniert sowohl im hydrophilen Lösungsmittel Aceton als auch im hydrophoben Lösungsmittel Hexan.

9. Enzymatische Synthese von Zn-CLA und Al-CLA aus CLA-Methylester in Aceton

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g CLA-Methylester und 5 g Wasser eingewogen. Zu Ansatz 1 wurden 0,85 g ZnO und zu Ansatz 2 werden 0,55 g $Al(OH)_3$ gegeben. Zu beiden Ansätzen wurden 40 g Aceton gegeben und die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 300 μ l einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) gestartet. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zu Ansatz 1 0,17 g ZnO und zu Ansatz 2 0,11 g $Al(OH)_3$ und jeweils erneut 300 μ l einer technischen Lipolase-Präparation zupipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Das Lösungsmittel wurde in einem Rotationsverdampfer abgezogen und die noch feuchten Proben wurden eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert und die erhaltenen Produkte wurden nach Syllierung der gebildeten freien Fettsäuren gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Bildung von neuen CLA-Isomeren während Reaktion und Aufreinigung lag unter 1 %. Die Ergebnisse zu Umsatz und Isomerenverteilung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Ansatz	1	2	Vergleichs-CLA
Metallsalz	ZnO	$Al(OH)_3$	

Umsatz	100 %	81 %	
Fettsäureverteilung			
Palmitinsäure	6,0	6,1	6,2
Stearinsäure	4,3	4,3	4,3
Ölsäure	25,8	26,3	25,4
Linolsäure	2,0	2,1	2,0
9,11-CLA	31,0	30,9	31,0
10,12-CLA	30,9	30,3	30,9

Der Zusatz von basischem ZnO und Al(OH)₃ bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zur vollständigen bzw. nahezu vollständigen Hydrolyse durch Bildung einer Seife. Über die Seifenbildung wird das Reaktionsprodukt CLA-Fettsäure kontinuierlich entfernt. Die enzymatische Umsetzung funktioniert im hydrophilen Lösungsmittel Aceton.

10. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Seifen aus Fischöl

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g Fischöl und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 wurden 0,75 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 wurden 0,65 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zum Ansatz 1 0,15 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 0,13 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Die Ansätze wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschlossen und die freigesetzten Fettsäuren wurden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren wurden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, Di- und Triglyceriden bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Mg(OH) ₂
Umsatz	98 %	99 %

11. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Seifen aus Leinsamenöl

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen werden 5 g Leinsamenöl und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 werden 0,75 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 2 werden 0,65 g Mg(OH)_2 gegeben. Zu allen Ansätzen werden 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze werden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h werden zum Ansatz 1 0,15 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 2 0,13 g Mg(OH)_2 gegeben. Zu allen Ansätzen werden erneut 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Ansätze werden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschossen und die freigesetzten Fettsäuren werden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren werden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, Di- und Triglyceriden bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	Ca(OH)_2	Mg(OH)_2
Umsatz	99 %	98 %

12. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Seifen aus Borretschöl

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen wurden 5 g Borretschöl und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 wurden 0,75 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 2 wurden 0,65 g Mg(OH)_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h wurden zum Ansatz 1 0,15 g Ca(OH)_2 und zum Ansatz 2 0,13 g Mg(OH)_2 gegeben. Zu allen Ansätzen wurden erneut 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze wurden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wurde die Inkubation beendet. Die Ansätze wurden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze wurden lyophilisiert, die gebildeten Seifen wurden sauer aufgeschossen und die freigesetzten Fettsäuren wurden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren wurden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen

der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, Di- und Triglyceriden bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Mg(OH) ₂
Umsatz	96 %	97 %

13. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Seifen aus Single Cell Öl

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen werden 5 g Single Cell Öl aus *Mortierella alpina* und 45 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 werden 0,75 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 werden 0,65 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen werden 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze werden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h werden zum Ansatz 1 0,15 g Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 0,13 g Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen werden erneut 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Ansätze werden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschlossen und die freigesetzten Fettsäuren werden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren werden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, Di- und Triglyceriden bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Mg(OH) ₂
Umsatz	96 %	99 %

14. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Arachidonat aus Arachidonsäuremethylester

In 2 Ansätze in verschließbaren Flaschen werden 200 mg Arachidonsäuremethylester und 1,8 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 werden 30 mg Ca(OH)₂ und zum Ansatz 2 werden 30 mg Mg(OH)₂ gegeben. Zu allen Ansätzen werden 300 µl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze werden bei 30 °C auf einem La-

borschüttler inkubiert. Nach 5 h werden zum Ansatz 1 6 mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und zum Ansatz 2 6 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ gegeben. Zu allen Ansätzen werden erneut 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Ansätze werden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschossen und die freigesetzten Fettsäuren werden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren werden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenem Methylester bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
Umsatz	99 %	99 %

15. Enzymatische Synthese von Ca- und Mg-Linolenat aus Linolensäureethylester

In 2 Ansätze in verschliessbaren Flaschen werden 200 mg Linolensäureethylester und 1,8 g Wasser eingewogen. Zum Ansatz 1 werden 30 mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und zum Ansatz 2 werden 30 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ gegeben. Zu allen Ansätzen werden 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation (Novozymes A/S) pipettiert. Die Ansätze werden bei 30 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach 5 h werden zum Ansatz 1 6 mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und zum Ansatz 2 6 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ gegeben. Zu allen Ansätzen werden erneut 300 μl einer technischen Lipolase-Präparation pipettiert. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Ansätze werden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschossen und die freigesetzten Fettsäuren werden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren werden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenem Ethylester bestimmt.

Ansatz	1	2
Metallsalz	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
Umsatz	100 %	100 %

16. Enzymscreening – Identifizierung geeigneter Lipasen und Esterasen

In 16 Eppendorf-Cups werden jeweils 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eingewogen. Die Umsetzungen werden jeweils durch Zugabe einer Lipase bzw. Esterase, wie in der Tabelle aufgelistet, gestartet. Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und erneut Lipase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Ansätze werden komplett ohne Produktabtrennung eingefroren. Alle Ansätze werden lyophilisiert, die gebildeten Seifen werden sauer aufgeschlossen und die freigesetzten Fettsäuren werden mit Isooktan extrahiert. Die erhaltenen Fettsäuren werden nach Syllierung gaschromatographisch analysiert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu noch vorhandenen Mono-, di- und Triglyceriden bestimmt.

Ansatz	Lipase aus Organismus	Menge	Menge nach 5 h	Mg(OH) ₂ nach 5 h	Umsatz
1	Thermomyces	5 µl	5 µl	3 mg	100%
2	Candida antarctica B	10 µl	10 µl	3 mg	27%
3	Rhizomucor miehei	10 µl	10 µl	3 mg	98%
4	Candida antarctica A	10 µl	10 µl	3 mg	26%
5	Candida cylindracea	10 mg	10 mg	3 mg	96%
6	Rhizopus javanicus	10 mg	10 mg	3 mg	96%
7	Porcine pancreas	10 mg	10 mg	3 mg	67%
8	Aspergillus niger	10 mg	10 mg	3 mg	9%
9	Candida rugosa	10 mg	10 mg	3 mg	71%
10	Mucor javanicus	10 mg	10 mg	3 mg	98%
11	Pseudomonas fluorescens	10 mg	10 mg	3 mg	100%
12	Rhizopus oryzae	10 mg	10 mg	3 mg	96%
13	Pseudomonas sp.	10 mg	10 mg	3 mg	85%
14	Chromobacterium viscosum	10 mg	10 mg	3 mg	99%
15	Fusarium oxysporum	10 mg	10 mg	3 mg	99%
16	Penicillium camemberti	10 mg	10 mg	3 mg	40%

Fazit: Alle Lipasen haben unter den alkalischen Reaktionsbedingungen Aktivität gezeigt. Die meisten der getesteten Lipasen erreichten einen Spaltgrad von > 80 %.

B) Beispiele zur enzymatischen Herstellung und gleichzeitigen Konfektionierung

17. Enzymatische Synthese von Ca-CLA mit Dosierung von CLA-Methylester

In ein Becherglas wurden 2 Liter Wasser und 40 g Ca(OH)₂ vorgelegt. Unter Rühren wurden zu der Suspension 3 ml Lipolase (Novozymes A/S) zupipettiert. Bei Raumtemperatur wurden 326 g CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl über einen Zeitraum von 6 h kontinuierlich zudosiert, wobei die Dosierung über eine Glaskapillare direkt in die wässrige Ca(OH)₂ Suspension erfolgt. Während dieser Zeit wird die Reaktionslösung kontinuierlich mit einem dreiblättrigen Flügelrührer gerührt. Nach 2 h und nach 4,5 h wurden jeweils 1 ml Lipolase nachdosiert. Die Reaktion wurde für insgesamt 24 h unter Rühren inkubiert. Anschliessend wurde die ausgefallene Calciumseife abfiltriert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen.

Ergebnis:

Der Umsatz der enzymatischen Reaktion beträgt 100 %.

Die Zudosierung des CLA-Methylesters bewirkt die Bildung von gut ausgehärteten leicht filtrierbaren Ca-CLA Partikeln in einem Größenbereich von 0,2 – 2 cm. Die Reaktion war über die gesamte Reaktionsdauer rührbar. Vergleichende Untersuchungen mit kompletter Zugabe des Methylesters am Anfang der Reaktion führten zur Bildung von sehr großen Klumpen und zur Verblockung des Rührers.

18. Enzymatische Synthese von Ca-CLA mit Dosierung von CLA-Methylester – Einfluß von Zusätzen auf die Produktkonfektionierung

In 5 l Bechergläser wurden 4 Ansätze bestehend aus 2 l Wasser und 30 g Ca(OH)_2 eingewogen. Alle Ansätze wurden bei einer Temperatur von 35 °C mit einem Flügelrührer gerührt. Zu allen Ansätzen wurden 2 ml Lipolase zupipettiert. Zum Ansatz 1 wurden 20 g Kartoffelstärke, zum Ansatz 2 20 g Weizenmehl, zum Ansatz 3 20 g Polyvinylalkohol und zum Ansatz 4 20 g 1,2-Propylenglykol gegeben. 200 g CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl wurden über einen Zeitraum von 4 h kontinuierlich zudosiert, wobei die Dosierung über eine Glaskapillare direkt in die wässrige Ca(OH)_2 Suspension erfolgte. Während dieser Zeit wurde die Reaktionslösung kontinuierlich mit einem dreiblättrigen Flügelrührer gerührt. Die Reaktion wurde für insgesamt 24 h unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene Calciumseife abfiltriert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen wurden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen.

Ergebnis:

Durch Kombination aus Dosierung von CLA-Methylester und Zugabe von Stärke wird ein gut konfektioniertes Produkt mit kleiner Partikelgröße erhalten. Die Zugabe von Stärke führt unter obigen Reaktionsbedingungen zur Bildung von runden Partikeln mit einer Teilchengröße von 2 – 5 mm. Die Teilchen sind gut ausgehärtet und leicht zu filtrieren. Das getrocknete Produkt ist ein leicht rieselfähiges Material. Die Umsetzung beträgt 100 %.

Alle anderen Zusätze bewirkten keine Verbesserung in der Produktkonfektionierung, verglichen mit dem Produkt aus Beispiel 10. Die Umsetzung mit Propylenglykol erreicht 100 %, wogegen die Umsetzungen mit Mehl und Polyvinylalkohol unter identischen Reakti-

onsbedingungen noch einen Rest nicht umgesetzten Methylesteranteil von $\geq 10\%$ enthalten.

19. Enzymatische Synthese von Mg-CLA mit Dosierung von CLA-Methylester

In ein Becherglas werden 2 Liter Wasser und 10,9 g $\text{Mg}(\text{OH})_2$ vorgelegt. Unter Rühren werden zu der Suspension 2 ml Lipolase (Novozymes A/S) zupipettiert. Bei einer Reaktionstemperatur von 35°C werden 100 g CLA-Methylester ex Sonnenblumenöl über einen Zeitraum von 4 h kontinuierlich zudosiert, wobei die Dosierung über eine Glaskapillare direkt in die wässrige $\text{Mg}(\text{OH})_2$ Suspension erfolgt. Während dieser Zeit wird die Reaktionslösung kontinuierlich mit einem dreiblättrigen Flügelrührer gerührt. Die Reaktion wird für insgesamt 24 h unter Rühren inkubiert. Anschliessend wird die ausgefallene Magnesiumseife abfiltriert. Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen.

Ergebnis:

Der Umsatz der enzymatischen Reaktion beträgt 91 %.

Die Zudosierung des CLA-Methylesters bewirkt die Bildung von weichen runden Mg-CLA Partikeln in einem Größenbereich von 2 - 5 mm. Die Reaktion war über die gesamte Reaktionsdauer gut rührbar. Das Produkt ist leicht filtrierbar.

Das Produkt ist weniger gut rieselfähig als Ca-Seifen entsprechender Partikelgröße. Die Zugabe von Stärke zur Reaktion führt zur Bildung eines weichen pulverförmigen Produktes.

20. Enzymatische Synthese von Ca-CLA im Pilotmaßstab – Einfluß von Rührergeschwindigkeit auf Produktkonfiguration

In einem 60 l Reaktor ausgerüstet mit einem doppelstöckigen zweiflügeligen Schrägblattrührer werden 40 l Wasser vorgelegt. Unter Rühren werden 660 g gemahlene $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 400 g Kartoffelstärke und zuletzt 80 g Lipozym TL 1001 (Novozym A/S) zugegeben. Bei einer konstanten Temperatur von 30°C werden über einen Zeitraum von 4 h 4 kg CLA-Methylester über eine am Reaktorboden montierte Ringdüse unter Druck eingeleitet. Nach 3 h Reaktionszeit werden noch einmal 220 g festes gemahlene $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in

den Reaktor gegeben. Nach Beendigung der CLA-Methylester Dosierung wird die Reaktion noch für 2 h weitergerührt und dabei mit Kaltwasser auf etwa 15 °C abgekühlt. Die gebildeten Ca-CLA Kügelchen werden über eine Nutsche abfiltriert und unter Vakuum getrocknet.

In der Pilotanlage wurden zwei Versuche nacheinander gefahren, wobei im ersten Ansatz eine Rührerdrehzahl von 100 Upm und im zweiten Ansatz eine Rührerdrehzahl von 50 Upm eingestellt wurde.

Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Korngröße der gebildeten CLA-Seifen wurde über Siebanalyse analysiert.

Ergebnisse:

Nach Filtration und Trocknung wurden gut ausgehärtete und rieselfähige Produkte erhalten. Die Korngröße der Produkte ist kleiner bei Dosierung des Methylesters über eine Düse als bei Eintropfen des Esters wie in Beispiel 12 beschrieben. Die Korngröße des Produktes kann über die Rührerdrehzahl eingestellt werden.

Ansatz	1	2	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Ca(OH) ₂	Ca(OH) ₂	
Umsatz	100 %	100 %	
Fettsäureverteilung			
Palmitinsäure	6,1	6,2	6,2
Stearinsäure	4,4	4,5	4,3
Ölsäure	26,0	26,3	25,4
Linolsäure	2,0	2,0	2,0
9,11-CLA	31,1	30,9	31,0
10,12-CLA	30,5	30,2	30,9
Korngröße			
> 3150 µm		24,3 %	
> 2000 µm		43,7 %	
> 1600 µm	0,5 %	12,8 %	
> 1250 µm	0,8 %	8,8 %	
> 1000 µm	5,2 %	4,5 %	
> 800 µm	14,6 %	2,0 %	
> 630 µm	38,4 %	1,3 %	
< 630 µm		2,6 %	
> 400 µm	34,3 %		
> 200 µm	6,1 %		
< 200 µm	0,1 %		

21. Enzymatische Synthese von Ca-CLA im Pilotmaßstab

In einem 60 l Reaktor ausgerüstet mit einem doppelstöckigen zweiflügeligen Schrägblattrührer werden 40 l Wasser vorgelegt. Unter Rühren werden 1320 g gemahlene Ca(OH)₂, 800 g Kartoffelstärke und zuletzt 160 g Lipozym TL 1001 (Novozym A/S) zugegeben. Bei einer konstanten Temperatur von 30 °C werden über einen Zeitraum von 4 h 8 kg CLA-Methylester über eine am Reaktorboden montierte Ringdüse unter Druck eingeleitet. Die Reaktion wird kontinuierlich bei einer Rührerdrehzahl von 100 Upm gerührt. Nach 3 h Reaktionszeit werden noch einmal 440 g festes gemahlene Ca(OH)₂ in den Reaktor gegeben. Nach Beendigung der CLA-Methylester Dosierung wird die Reak-

tion noch für 2 h weitergerührt und dabei mit Kaltwasser auf etwa 15 °C abgekühlt. Die gebildeten Ca-CLA Kügelchen werden über eine Nutsche abfiltriert und unter Vakuum getrocknet.

Die Umsätze der enzymatischen Hydrolysen werden über Vergleich der Peakflächen der gebildeten freien Säuren zu den nicht umgesetzten CLA-Methylestern bestimmt. Zur Analyse wurden die drei Hauptbestandteile Ölsäure, 9cis,11trans-CLA und 10trans,12cis-CLA herangezogen. Die Fettsäureverteilung der Produkte wurde gegen einen enzymatisch unter milden Bedingungen hydrolysierten CLA-Methylester verglichen. Die Korngröße der gebildeten CLA-Seifen wurde über Siebanalyse analysiert.

Ergebnisse:

Die Dosierung der doppelten Menge CLA-Methylester im Vergleich zu Beispiel 14 führt ebenfalls zu gut ausgehärteten leicht rieselfähigen Ca-CLA Kügelchen. Die Korngrößen der Produkte sind vergleichbar.

Ansatz	1	Vergleichs-CLA
Metallsalz	Ca(OH) ₂	
Umsatz	100 %	
Fettsäureverteilung		
Palmitinsäure	6,1	6,2
Stearinsäure	4,3	4,3
Ölsäure	26,2	25,4
Linolsäure	2,0	2,0
9,11-CLA	31,0	31,0
10,12-CLA	30,4	30,9

22. Enzymatische Synthese von Ca-CLA nach Membranverfahren

Apparatur bestehend aus: Vorlagebehälter für wässrige Phase, Druckbehälter CLA-Methylester bis 2 bar, Membranmodul mit keramischer Membran (Membranmodul 100 my Einkanalmembran Typ C), Nachreaktionsbehälter, Schlauchpumpe

Die wässrige Phase bestehend aus 500 ml VE-Wasser, 55 g Calciumhydroxid, 25 g Stärke und 5 ml Lipozym TL 100 L wird mittels Ultra-Turrax gemischt und in den Vorlagebehälter gefüllt.

100 g CLA-methylester werden in den Druckbehälter gefüllt. Die Schlauchpumpe wird eingeschaltet (6,7 l/h) und der Druckbehälter mit 2 bar beaufschlagt. Nach 7 Minuten ist der Vorlagebehälter leer, das Produkt rührt im Nachreaktionsbehälter 30 min nach. Insgesamt wurden 22 g CLA-Methylester eindosiert. Im Nachrührbehälter haben sich 2 mm lange stäbchenförmige Partikel gebildet, die sich sehr leicht trocknen lassen.

Ansatz	1
Metallsalz	Ca(OH) ₂
Umsatz	100 %

23. Enzymatische Synthese von Ca-CLA nach Dispergiervverfahren

Apparatur bestehend aus: IKA Process-Pilot 2000/4 Generator Mittel 4 M, mit pumpenseitiger Dosierungseinrichtung für CLA-Methylester Dosierung.

Als weitere Alternative zur Ca-CLA Herstellung wurde das Dispergiervverfahren untersucht.

Dabei wurde zur Ca-CLA Partikel Herstellung als Versuchsanlage der IKA Process-Pilot eingesetzt. In den Vorlage Behälter wurden 200 g VE-Wasser, 10 g Stärke, 22 g Calciumhydroxid und 2 g Lipozym TL 100 l vorgelegt und vermischt. Anschließend wurde das Gerät mit 6500 U/min in Betrieb genommen. Innerhalb 3 min wurden 100 ml CLA-Methylester dosiert. Danach wurde ca. 5 g Calciumhydroxid nachdosiert und nach 3 weiteren Minuten der Versuch beendet. Es bildeten sich Partikel-Agglomerate von bis zu 1 cm Durchmesser.

Ansatz	1
Metallsalz	Ca(OH) ₂
Umsatz	100 %

24. Untersuchung der Lipase-Aktivität in Produkt und Überstand

In einem Eppendorf-Cup werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eingewogen. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 10 μl Lipolase gestartet. Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und 10 μl Lipolase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet und der Überstand wird durch Zentrifugation von der Mg-Seife getrennt. Die Seife wird einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, eingefroren und lyophilisiert. Die Lipolaseaktivität in Überstand und Seife wird über Hydrolyse von Sonnenblumenöl bestimmt. Dazu werden in kleine Fläschchen 50 mg der lyophilisierten Seife bzw. 0,5 ml des Überstandes gegeben. Zum Lyophilisat werden 2 ml Wasser und zum Überstand werden 1,5 ml Wasser pipettiert. Anschliessend werden 2 g Sonnenblumenöl und 200 mg Laurinsäure als interner Standard zugegeben. Als Vergleichsstandard werden 10 μl Lipolase mit 1,5 ml Wasser, 0,5 ml gesättigter $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Lösung, 2 g Sonnenblumenöl und 200 mg Laurinsäure gemischt. Die 3 Ansätze werden auf einem Schüttler bei 30 °C inkubiert. Nach 30 min, 3 h und 24 h werden jeweils Proben entnommen, die Ölphase wird abgetrennt, silyliert und gaschromatographisch auf die Bildung von Partialglyceriden und Fettsäuren analysiert. Als Maß für die hydrolytische Aktivität wurde die Bildung von Diglyceriden pro Stunde aus Sonnenblumenöl gewählt. Die eingesetzten Mengen an Lyophilisat und Überstand entsprechen einer Maximalmenge von 10 μl Lipolase, die im Vergleich eingesetzt wurden.

Ergebnis: Im Lyophilisat wurde eine Lipolaseaktivität detektiert, die 100 % der Lipolaseaktivität des Standards entspricht. Im Überstand wurden 4 % der Enzymaktivität des Standards detektiert. Die Wiederfindungsrate beträgt 104 %. Etwa 96 % der eingesetzten Lipolaseaktivität befinden sich im Produkt.

Fazit: Die CLA-Seife ist als Enzymcarrier für hydrophobe Enzyme geeignet. Lipaseaktivität findet sich zum größten Teil im Produkt. Vergleiche zum Standard zeigen, dass während der Produktaufarbeitung keine Deaktivierung des Enzyms stattgefunden hat.

25. Deaktivierung der Lipase-Aktivität

In fünf Eppendorf-Cup werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eingewogen. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 10 μl Lipolase gestartet.

Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und 10 μl Lipolase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Die Probe 2 wird für 10 min auf 95 °C erhitzt und die Probe 4 wird für 60 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend werden jeweils die Überstände durch Zentrifugation von der Mg-Seife getrennt. Die Seifen werden einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat der Probe 4 wird für 10 min auf 95 °C erhitzt und das Lyophilisat der Probe 5 wird für 60 min auf 95 °C erhitzt. Die Lipolaseaktivität in den Überständen und Seifen werden über Hydrolyse von Sonnenblumenöl bestimmt. Dazu werden in kleine Fläschchen 50 mg der lyophilisierten Seifen bzw. 0,5 ml der Überstände gegeben. Zu den Lyophilisaten werden 2 ml Wasser und zu den Überständen werden 1,5 ml Wasser pipetiert. Anschliessend werden 2 g Sonnenblumenöl und 200 mg Laurinsäure als interner Standard zugegeben. Die Ansätze werden auf einem Schüttler bei 30 °C inkubiert. Nach 30 min, 3 h und 24 h werden jeweils Proben entnommen, die Ölphase wird abgetrennt, silyliert und gaschromatographisch auf die Bildung von Partialglyceriden und Fettsäuren analysiert. Als Maß für die hydrolytische Aktivität wurde die Bildung von Diglyceriden pro Stunde aus Sonnenblumenöl gewählt. Die eingesetzten Mengen an Lyophilisat und Überstand entsprechen einer Maximalmenge von 10 μl Lipolase.

Probe	Deaktivierung	Aktivität	bezogen auf
1, Lyophylisat	ohne	100 %	100 % als Referenz gesetzt
1, Überstand	ohne	4 %	1, Lyophilisat
2, Lyophilisat	10 min bei 95 °C	0,13 %	1, Lyophilisat
2, Überstand	10 min bei 95 °C	0,29 %	1, Lyophilisat
3, Lyophilisat	60 min bei 95 °C	0 %	1, Lyophilisat
3, Überstand	60 min bei 95 °C	0 %	1, Lyophilisat
4, Lyophilisat	10 min bei 95 °C nach Trocknung	46 %	1, Lyophilisat
5, Lyophilisat	60 min bei 95 °C nach Trocknung	11 %	1, Lyophilisat

Fazit: Eine Erhitzung der Proben vor der Trocknung führt zu einer schnellen Deaktivierung des Enzyms. Nach 10 min ist nur noch eine sehr schwache Enzymaktivität detektierbar, nach 60 min Inkubation bei 95 °C liegt die Restaktivität auch nach 24 h Reaktionszeit unter der Nachweisgrenze, die bei etwa 0,05 – 0,1 % der Referenzaktivität liegt. Eine thermische Deaktivierung der getrockneten Proben ist deutlich langsamer.

C) Vergleichende Untersuchung: Direkte chemische Umsetzung des CLA-Esters mit Ca(OH)_2

26. Versuche zur chemischen Bildung einer Ca-CLA Seife aus CLA Methylester ex Sonnenblumenöl

Der CLA-Methylester wird im Rundkolben vorgelegt und Calciumhydroxid (96%ig) eingerührt. Nach zweistündigem Rühren der Reaktionslösung bei 130 °C wird für 1.5 Stunden auf 140–150 °C erhitzt. Auch anschließendes Rühren im Wasserstrahlvakuum bei 150 °C führt nicht zur Umsetzung des Methylesters. Da bereits Temperaturen von über 130 °C die Bildung unerwünschter CLA-Isomere begünstigen, erscheint die Wahl höherer Reaktionszeiten und Temperaturen nicht sinnvoll.

D) Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der CLA-Seifen

27. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Ca-CLA

4 Kolben mit jeweils 50 ml Magensaftflüssigkeit (70 mM HCl) werden für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Zu zwei Ansätzen werden jeweils 250 mg getrocknete Ca-CLA und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Zu zwei Vergleichsansätzen werden jeweils 250 mg technisches Ca-Stearat und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Myristinsäuremethylester dient dabei als interner Standard. Jeweils eine der Ca-Stearat und Ca-CLA Proben werden für 10 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, die anderen beiden Proben werden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird sofort 10 g Isooktan zugegeben. Die fettlöslichen Bestandteile (hydrolytisch freigesetzte Fettsäure und Myristinsäuremethylester) werden für 60 Sekunden mit einem Ultraturrax extrahiert, die organische Phase wird separiert und sofort abgetrennt. Die organische Phase wird syliliert und gaschromatographisch analysiert. Der Hydrolysegrad wird gegen eine in 1 M HCl bei 60 °C komplett aufgeschlossene Probe bestehend aus 250 mg Seife und 75 mg Myristinsäuremethylester bestimmt.

Probe	Ca-CLA	Ca-CLA	Ca-Stearat	Ca-Stearat
Inkubationszeit	10 min	60 min	10 min	60 min
%-Abbau	95 %	116 %	53 %	91 %

Fazit: Die Ca-CLA ist bereits nach 10 min fast komplett in Magensaftflüssigkeit bei 30 °C aufgelöst, so dass die freie CLA vorliegt. Die Ca-CLA ist demnach sehr gut bioverfügbar. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist höher als die von Ca-Stearat.

28. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Mg-CLA

4 Kolben mit jeweils 50 ml Magensaftflüssigkeit (70 mM HCl) werden für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Zu zwei Ansätzen werden jeweils 250 mg getrocknete Mg-CLA und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Zu zwei Vergleichsansätzen werden jeweils 250 mg technisches Mg-Stearat und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Myristinsäuremethylester dient dabei als interner Standard. Jeweils eine der Mg-Stearat und Mg-CLA Proben werden für 10 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, die anderen beiden Proben werden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird sofort 10 g Isooktan zugegeben. Die fettlöslichen Bestandteile (hydrolytisch freigesetzte Fettsäure und Myristinsäuremethylester) werden für 60 Sekunden mit einem Ultraturrax extrahiert, die organische Phase wird separiert und sofort abgetrennt. Die organische Phase wird syliliert und gaschromatographisch analysiert. Der Hydrolysegrad wird gegen eine in 1 M HCl bei 60 °C komplett aufgeschlossene Probe bestehend aus 250 mg Seife und 75 mg Myristinsäuremethylester bestimmt.

Probe	Mg-CLA	Mg-CLA	Mg-Stearat	Mg-Stearat
Inkubationszeit	10 min	60 min	10 min	60 min
%-Abbau	88 %	89 %	95 %	123 %

Fazit: Die Mg-CLA ist bereits nach 10 min komplett in Magensaftflüssigkeit bei 30 °C aufgelöst, so dass die freie CLA vorliegt. Die Mg-CLA ist demnach sehr gut bioverfügbar. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist vergleichbar mit der von Mg-Stearat.

29. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Zn-CLA

4 Kolben mit jeweils 50 ml Magensaftflüssigkeit (70 mM HCl) werden für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Zu zwei Ansätzen werden jeweils 250 mg getrocknete Zn-CLA und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Zu zwei Vergleichsansätzen werden jeweils 250 mg technisches Zn-Stearat und 75 mg Myristinsäuremethylester gegeben. Myristinsäure-

methylester dient dabei als interner Standard. Jeweils eine der Zn-Stearat und Zn-CLA Proben werden für 10 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, die anderen beiden Proben werden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird sofort 10 g Isooktan zugegeben. Die fettlöslichen Bestandteile (hydrolytisch freigesetzte Fettsäure und Myristinsäuremethylester) werden für 60 Sekunden mit einem Ultraturrax extrahiert, die organische Phase wird separiert und sofort abgetrennt. Die organische Phase wird syliliert und gaschromatographisch analysiert. Der Hydrolysegrad wird gegen eine in 1 M HCl bei 60 °C komplett aufgeschlossene Probe bestehend aus 250 mg Seife und 75 mg Myristinsäuremethylester bestimmt.

Probe	Zn-CLA	Zn-CLA	Zn-Stearat	Zn-Stearat
Inkubationszeit	10 min	60 min	10 min	60 min
%-Abbau	95 %	110 %	102 %	75 %

Fazit: Die Zn-CLA ist bereits nach 10 min komplett in Magensaftflüssigkeit bei 30 °C aufgelöst, so dass die freie CLA vorliegt. Die Zn-CLA ist demnach sehr gut bioverfügbar. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist vergleichbar mit der von Zn-Stearat.

E) Verwendung der CLA-Seifen als Trägermaterial

30. Einarbeitung von nahrungsmittelzugelassenen Antioxidantien und Konservierungsmitteln in Ca-CLA

In 7 Eppendorf-Cup werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg Ca(OH)_2 eingewogen. Zu den Ansätzen werden jeweils 10 mg nahrungsmittelzugelassenen Antioxidantien und Konservierungsmittel wie unten aufgeführt zugegeben. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 5 μl Lipolase gestartet. Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg Ca(OH)_2 und 5 μl Lipolase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Dann werden die Überstände durch Zentrifugation von den Ca-Seifen getrennt. Die Seifen werden einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, anschließend werden die Seifen und die Überstände eingefroren und lyophilisiert. Die Überstände werden direkt in Syllierungsmittel aufgenommen und gaschromatographisch untersucht. Die getrockneten Seifen werden sauer aufgeschlossen, syliert und anschließend gaschromatographisch untersucht. Als Standards werden die sylierten Zusätze parallel analysiert.

Probe	Zusatz	E-Nummer	% in Seife	% in Überstand
1	Ascorbinsäure	E300 (E302)	40	60
2	Ascorbylpalmitat	E304	100	0
3	Tocopherol	E306-E309	100	0
4	Octylgallat	E311	100	0
5	Dodecylgallat	E312	100	0
6	Butyl-4-hydroxyanisol	E320	93	7
7	Benzoessäure	E210 (E213)	79	21

Fazit: Die hydrophoben Zusätze finden sich komplett oder zum größten Teil in der Seife wieder. Somit können diese Zusätze alle direkt während der Synthese in das Produkt eingeformuliert werden.

Die Wiederfindungsrate von Vitamin C und Ascorbylpalmitat ist gering, da das meiste Produkt ungelöst als Ca-Seife zurückbleibt und nicht mit der Analysenmethode erfasst wird. Daher ist der Anteil an Vitamin C höher als der gaschromatographisch ermittelte Wert.

31. Einarbeitung von Vitaminen und Vitaminderivaten in Ca-CLA

In 11 Eppendorf-Cups werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg Ca(OH)_2 eingewogen. Zu den Ansätzen werden jeweils 10 mg Vitamine oder Vitaminderivate wie unten aufgeführt zugegeben. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 5 μl Lipolase gestartet. Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg Ca(OH)_2 und 5 μl Lipolase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Dann werden die Überstände durch Zentrifugation von den Ca-Seifen getrennt. Die Seifen werden einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, anschliessend werden die Seifen und die Überstände eingefroren und lyophilisiert. Die Überstände werden direkt in Syllierungsmittel aufgenommen und gaschromatographisch untersucht. Die getrockneten Seifen werden sauer aufgeschlossen, syliert und anschliessend gaschromatographisch untersucht. Als Standards werden die sylierten Zusätze parallel analysiert. Die Substanzen Riboflavin, Retinylpropionat und Thiamin werden photospektrometrisch analysiert. Dazu werden die Seifen sowie die Überstände in DMSO aufgenommen. Die Adsorptionen der Substanzen werden jeweils an ihrem Adsorptionsmaximum gegeneinander verglichen.

Probe	Zusatz	Vitamin	% in Seife	% in Überstand
1	Ascorbinsäure	Vitamin C	40	60
2	Ascorbylpalmitat	Vitamin C-Ester	100	0
3	Tocopherol	Vitamin E	100	0
4	Tocopherolacetat	Vitamin E-ester	99,9	0,1
5	Thiamin	Vitamin B1	3	97
6	Riboflavin	Vitamin B2	47	53
7	Pyridoxin	Vitamin B6	19	81
8	Retinylpropionat	Vitamin A-ester	99,5	0,5
9	Ergocalciferol	Vitamin D	100	0
10	2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon	Vitamin K1	100	0
11	Nicotinamid	Vitamin PP	2,4	97,6

Fazit: Die fettlöslichen Vitamine werden komplett oder nahezu komplett in die Ca-CLA eingebaut. Die wasserlöslichen Vitamine finden sich dagegen zum größten Teil im Überstand, mit Ausnahme von Vitamin C und Ascorbylpalmitat, die unlösliche Calciumseifen bilden. Die Wiederfindungsrate von Vitamin C und Ascorbylpalmitat ist gering, da das meiste Produkt ungelöst als Ca-Seife zurückbleibt und nicht mit der Analysenmethode

erfasst wird. Daher ist der Anteil an Vitamin C höher als der gaschromatographisch ermittelte Wert.

Zur Formulierung in Seifen eignen sich daher die Vitamine und Vitaminderivate der Klassen A, C, D, E und K.

32. Einarbeitung von weiteren Zusätzen in Ca-CLA

In 5 Eppendorf-Cups werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg Ca(OH)_2 eingewogen. Zu den Ansätzen werden jeweils 10 mg Zusätze wie unten aufgeführt zugegeben. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 5 μl Lipolase gestartet. Die Proben werden bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden jeweils 3 mg Ca(OH)_2 und 5 μl Lipolase zugegeben. Die Ansätze werden für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Dann werden die Überstände durch Zentrifugation von den Ca-Seifen getrennt. Die Seifen werden einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, anschliessend werden die Seifen und die Überstände eingefroren und lyophilisiert. Die Überstände werden direkt in Syllierungsmittel aufgenommen und gaschromatographisch untersucht. Die getrockneten Seifen werden sauer aufgeschlossen, syliert und anschliessend gaschromatographisch untersucht. Als Standards werden die sylierten Zusätze parallel analysiert. Die Substanzen Carotin und Astaxanthin werden photospektrometrisch analysiert. Dazu werden die Seifen sowie die Überstände in DMSO aufgenommen. Die Adsorptionen der Substanzen werden jeweils an ihrem Adsorptionsmaximum gegeneinander verglichen.

Probe	Zusatz	% in Seife	% in Überstand
1	Carotin	100	0
2	Astaxanthin	100	0
3	Naringin	100	0
4	Sitosterol	99,5	0,5
5	Liponsäure	92	8

Fazit: Alle getesteten Zusätze finden sich komplett oder nahezu komplett in den Seifen wieder. Demnach eignen sich Metallseifen von Fettsäuren als Träger für Carotenoide, Sterole, Sterine, Flavonverbindungen und Fettsäurederivate.

33. Einarbeitung von Enzymen in Ca-CLA

In ein Eppendorf-Cup werden 100 mg CLA-Methylester, 0,9 ml Wasser und 15 mg Ca(OH)_2 eingewogen. Zu dem Ansatz werden 5 mg einer technischen Cellulase Lösung zugegeben. Die Umsetzung wird durch Zugabe von 5 μl Lipolase gestartet. Die Probe wird bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 5 h werden erneut 3 mg Ca(OH)_2 und 5 μl Lipolase zugegeben. Der Ansatz wird für insgesamt 24 h bei 30 °C auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach 24 h wird die Inkubation beendet. Dann wird der Überstand durch Zentrifugation von der Ca-Seife getrennt. Die Seife wird einmal mit 1 ml Wasser gewaschen, anschliessend wird die Seife und der Überstand eingefroren und lyophilisiert. 200 μl Überstand und 20 mg Seife werden in 1 ml Citratpuffer, pH 5,0 aufgenommen und photometrisch auf Enzymaktivität analysiert.

Probe	Zusatz	% in Seife	% in Überstand
1	Cellulase	91	9

Fazit: Cellulaseaktivität wurde zum größten Teil in der Seife detektiert, was auch schon für die Lipaseaktivität (Beispiel 24) gezeigt wurde. Das bedeutet, dass die granulierten Calcium-CLA als Trägermaterial für Enzyme gut geeignet ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Metallseifen dadurch gekennzeichnet, dass Alkylester von mehrfach ungesättigten Carbonsäuren in Anwesenheit eines basischen Metallsalzes mit einer Hydrolase enzymatisch umgesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu verseifenden Carbonsäuren um mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 24 C-Atomen handelt oder um Mischungen aus Fettsäuren handelt, die einen Anteil von > 10 % einer der mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 24 C-Atomen enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Carbonsäuren um Säuren handelt, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Arachidonsäure, Docosahexanoic acid (DHA), Eicosapentanoic acid (EPA), alpha- und gamma Linolensäure, konjugierte Linolsäuren (CLA) sowie deren Gemische.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den konjugierten Linolsäuren um cis9,trans11-Linolsäure und/oder trans10,cis12-Linolsäure handelt oder um Gemische konjugierter Linolsäuren, die einen Anteil von mindestens 25 % der cis9,trans11-Linolsäure und der trans10,cis12-Linolsäure enthalten.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkylestern der Carbonsäuren um Alkylester mit einem Alkylrest einer Kettenlänge von 1 bis 4 C-Atomen handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Estern der Carbonsäuren um Methyl- oder Ethylester handelt.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Estern der Carbonsäuren um Glyceride handelt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass natürlich vorkommende Triglyceride eingesetzt werden, insbesondere Borretschöl, Leinsamenöl, Nachtkerzen-

- öl, Walnussöl, Shrimp- und Fischöl, Single Cell Öl insbesondere aus Pilzen und Mikroalgen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den basischen Metallsalzen um Salze von Calcium, Magnesium, Zink oder Aluminium handelt, insbesondere um die Hydroxide und/oder Oxide.
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallseifen direkt während der enzymatischen Umsetzung zu einem Granulat konfektioniert werden, wobei die Partikel oder Granulate eine mittlere Teilchengröße von 0,05 mm bis 3 cm aufweisen.
 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die enzymatische Umsetzung mit integrierter Konfektionierung der Metallseife in einem wässrigen Medium oder in einem organischen Medium welches einen Wasseranteil von 5 – 50 % enthält durchgeführt wird bei einer Temperatur zwischen 15 und 60 °C.
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der wässrigen und/oder organischen Phase zwischen 50 und 90 Gewichts % beträgt.
 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Carbonsäureester während der enzymatischen Umsetzung zudosiert wird.
 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Carbonsäureester dem Reaktionsmedium, enthaltend Wasser und/oder Lösungsmittel, Hydrolase und Metallsalz, über ein Düsenverfahren zudosiert wird.
 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Carbonsäureester mit dem Reaktionsmedium, welches Wasser und/oder Lösungsmittel und Metallsalz enthält, über Membranverfahren oder Dispergiervverfahren emulgiert wird, wobei die Hydrolase durch Rühren untergemischt wird
 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung unter kontinuierlichem Rühren in einem Batch-Reaktor erfolgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in einem Rohr- oder Säulenreaktor erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass durch Zugabe einer Kristallisierhilfe die Produktkonfektionierung während der Umsetzung verbessert wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kristallisierhilfe um Stärke und/oder Cellulose handelt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hydrolasen um Lipasen, Esterasen oder Phospholipasen handelt, die bei einer Temperatur zwischen 15 und 60 °C aktiv sind.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolasen eine lipolytische Aktivität unter basischen Bedingungen aufweisen.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolasen aus Organismen stammen, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von *Thermomyces*, *Candida antarctica A*, *Candida antarctica B*, *Rhizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus javanicus*, *Porcine pancreas*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas sp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Fusarium oxysporum* und *Penicillium camemberti*.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass bevorzugt alkaline Lipase / Esterase isoliert aus dem Organismus *Thermomyces* eingesetzt wird.
24. Verwendung von Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren hergestellt nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23 als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat.
25. Verwendung von Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren nach Anspruch 23 als Futtermitteladditiv insbesondere zur Anwendung bei Wiederkäuern.

26. Zubereitungen enthaltend Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren in Form von Granulat hergestellt nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23 als Träger- oder Kapselmaterial und eine oder mehrere zusätzliche Komponenten die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Enzymen, Vitaminen, Antioxidantien, Konservierungsmitteln, Farbstoffen, Carotinoiden, Sterolen, Flavon- und Isoflavonverbindungen und Fettsäurederivaten.
27. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Enzymen um Enzyme handelt, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Esterasen, Amidasen und Phytasen.
28. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Vitaminen um Vitamine ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von fettlöslichen Vitaminen der Klassen A, D, E und K sowie deren Derivate und/oder um wasserlösliches Vitamin C sowie dessen Derivate handelt.
29. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Antioxidantien um die lebensmittelzugelassenen Stoffe ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von Ascorbinsäure E300, Calciumascorbat E302, Natriumascorbat E301, Ascorbylpalmitat E304, Vitamin E (Mischung von Tocopherolen E306 – E309), Propylgallat E310, Octylgallat E311, Dodecylgallat E312, Isoascorbinsäure E315, Natriumisoascorbat E316, Butyl-4-hydroxyanisol E320 und Butylhydroxytyrosol E321 handelt.
30. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Konservierungsmitteln um die lebensmittelzugelassenen Stoffe ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von E200 – E203 (Sorbinsäure, Natriumsorbat, Kaliumsorbat, Calciumsorbat), E210 – E219 (Benzoessäure, Natriumbenzoat, Kaliumbenzoat, Calciumbenzoat E214 – E219: Parahydroxybenzoeester), E236 – E238 (Ameisensäure, Natriumformiat, Calciumformiat), E260 – E263 (Essigsäure, Kaliumacetat, Natriumacetat, Calciumacetat), E270 (Milchsäure) und E280 – E283 (Propionsäure, Natriumpropionat, Calciumpropionat, Kaliumpropionat) handelt.
31. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Carotinoiden insbesondere um Carotinoide ausgewählt aus der Gruppe die gebildet wird von Carotin, Lycopon, Lutein, Astaxanthin, Zeaxanthin und Canthaxanthin handelt.

32. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Sterolen insbesondere um Sterole handelt, die aus pflanzlichen Quellen isoliert werden wie Sitosterol, Campesterol oder Stigmasterol.
33. Zubereitungen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Fettsäurederivaten insbesondere um Liponsäure und dessen Derivate handelt.
34. Verfahren zur Herstellung von Zubereitungen nach einem der Ansprüche 26 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere der zusätzlichen Komponenten direkt während der enzymatischen Umsetzung in das Granulat aus Metallseifen mehrfach ungesättigter Carbonsäuren eingearbeitet werden.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet dass die zusätzlichen Komponenten fettlösliche Substanzen sind und/oder Substanzen, die in Anwesenheit eines basischen Metallsalzes eine wasserunlösliche Seife bilden und/oder Substanzen, die von einer Metallseife gebunden werden.
36. Verfahren nach den Ansprüchen 34 und 35, dadurch gekennzeichnet, dass die fettlöslichen Substanzen vor der Umsetzung im Carbonsäureester gelöst oder suspendiert und gleichmäßig verteilt werden und dass die wasserlöslichen Substanzen vor der Umsetzung im Medium enthaltend Wasser und Metallsalz gelöst oder suspendiert und gleichmäßig verteilt werden.
37. Verwendung der Zubereitungen, gemäß Ansprüche 26 bis 33 als Nahrungsergänzungsmittel und/oder als Futtermitteladditiv und/oder als pharmazeutisches Fettsäurederivat.