



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 312973

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 12 P 7/64

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19990739	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1999.02.17	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1999.02.17	(30) Prioritet	Ingen
(41) Alm. tilgj.	2000.08.18		
(45) Meddelt dato	2002.07.22		

(71) Patenthaver	Norsk Hydro ASA, 0240 Oslo, NO
(72) Oppfinner	Gudmundur G. Haraldsson, Reykjavik, IS Olav Thorstad, 3940 Heistad, NO Björn Kristinsson, 105 Reykjavik, IS
(74) Fullmektig	Rita Lillegraven - Norsk Hydro ASA, 0240 Oslo

(54) Benevnelse **Lipase-katalysert forestring av marine oljer**

(56) Anførte publikasjoner EP 749468
MYRNES ET AL. (1995), JAOCS, 72(11):1339-1344
HARALDSSON ET AL. (1995), TETRAHEDRON 51(3):941-952
MCNEILL ET AL. (1996), JAOCS, 73(11):1403-1407
MOORE ET AL. (1996), JAOCS 73(11):1409-1414
ESTEBAN CERDAN ET AL. (1998), JAOCS, 75(10):1329-1337

(57) Sammendrag

Marine olje-sammensetninger som inneholder EPA og DHA som frie syrer forestres med glyserol sammen med en lipase-katalysator under redusert trykk og under vesentlig organisk løsningsmiddelfrie betingelser for å danne en fri fettsyrefraksjon anriket i minst en av EPA og DHA.

5

10 Denne oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for å isolere en
fettsyrefraksjon som er anriket i minst en av fettysrene EPA of DHA
sammenlignet med innholdet i en marin oljesammensetning i hvilken EPA og
DHA foreligger som frie fettsyrer ved hjelp av lipase-katalysert forestring av
marine oljer.

15

Det er velkjent innen dette fagområdet å raffinere oljeprodukter av ulike slag,
deriblant marine oljer, ved hjelp av lipase-katalysatorer der disses spesifisitet
under raffineringsbetingelsene forbedrer utbyttet av et ønsket produkt.

20 I PCT/NO95/00050 omtalte vi for eksempel en prosess for å behandle en
oljesammensetning som inneholder mettede og umettede fettsyrer av
triglyserider ved trans-forestrings reaksjonsbetingelser med en C₁₋₆ alkohol
som etanol under vesentlig vannfrie betingelser sammen med en lipase som
fortrinnsvis er aktivt for å katalyserer trans-forestringen av de mettede og
25 mono-umettede fettsyrene. Med de foretrukne lipasene, *Pseudomonas sp.*
lipase (PSL) og *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL) var det mulig å
fremstille konsentrater fra marine oljekilder, og disse konsentratene inneholder
mer enn 70 vekt% av de kommersielt – og terapeutisk viktige omega-3
flerumettede fettsyrer EPA (eicosapentaensyre, C20:5) og DHA
30 (docosaheksaensyre, C22:6) i form av glyserider.

En rekke lipase-katalyserte raffineringsprosesser har brukt glyserol.

For eksempel viser JP 62-91188 (1987) en prosess for å fremstille glyserider
35 av flerumettede fettsyrer (PUFA), der PUFA som fri syre eller ester reageres
med glyserol sammen med en termostabil lipase. Fettsyresammensetningen
til det resulterende glyseridproduktet er vesentlig det samme som i
utgangs-PUFA.

WO91/16443 beskriver en prosess for å omsette PUFA til triglyserider. De frie fettsyrene, for eksempel blandinger av EPA og DHA, reageres med omtrent støkiometriske mengder glyserol sammen med en lipase, spesielt *Candida antarctica*, under betingelser som vesentlig vannfrie, organisk løsningsmiddel-frie, der det er høy temperatur, og med kontinuerlig fjerning av vann og flyktige alkoholer. Vi er klar over at det var lite eller ikke noe skille mellom EPA og DHA i denne prosessen.

I en artikkel i Int. J. Food Sci. Technol. (1992), 27, 73-76, beskriver Lie og Molin forestringen av et fettsyre konsentrat fra fiskeolje med glyserol ved å bruke tre ulike lipaser, inkludert *Rhizomucor miehei* lipase (MML). Under betingelsene som ble brukt (5 % vann) fikk de en DHA-utarmet fri syrefraksjon (omtrent 50 % av utgangsmaterialet) og en glyserid fraksjon med det samme EPA innholdet som i det opprinnelige fiskeolje konsentratet. Således observerte de noe selektivitet

En artikkel av Myrnes m.fl. i JAOCS, Vol. 72, No. 11 (1995), 1339-1344 beskriver en organisk løsningsmiddelfri, lipase-katalysert glyserolyse av marine oljer. En rekke ulike lipaser er testet, og reaksjonene utføres ved lave temperaturer (12 °C eller lavere) sammen med relativt store (3.6 %) mengder vann. Analysen av den resulterende monoglyserid fraksjonen viste i noen tilfeller god selektivitet mellom umettede og mettede fettsyrer, men ingen betydelige forskjeller mellom enkelte PUFA.

Moore m.fl. i JAOCS, Vol. 73, No. 11 (1996), 1409-1414, beskriver hydrolysen av en fiskeolje sammen med *Candida rugosa* lipase (CRL) for å fremstille separate DHA-anrikede og EPA-anrikede fraksjoner. Deretter re-forestres den EPA anrikede frie fettsyrefraksjonen med glyserol sammen med MML.

En artikkel av McNeill m.fl. i JAOCS, Vol. 73, No. 11 (1996), 1403-1407 beskriver en MML-katalysert forestring av et n-3 PUFA konsentrat med støkiometriske mengder glyserol ved 55 °C med kontinuerlig fjerning av vann. Den resulterende triglyserid fraksjonen hadde det samme DHA nivået som utgangsmaterialet.

Til slutt nevnes WO96/37586 og WO96/37587. Eksempel 3 i WO96/37586 omhandler en prosess der et fritt fettsyre konsentrat som stammer fra chilensk fiskeolje, som omfatter (etter løsningsmiddel fraksjoneringer av natrium salter)

25 % EPA og 18 % DHA, ble direkte forestret med glyserol ved å bruke en immobilisert *Candida rugosa* lipase (CRL) sammen med 10 % vann ved 35 °C. Etter 120 timer hadde omfanget av omsetningen nådd omtrent 60 %. I den fremstilte glyseridblandingen inneholdt triglyseridene 28.2 % EPA og 3.8 % DHA og monoglyserid fraksjonen hadde 28.9 % EPA og 4.5 % DHA. De gjenværende frie fettsyrene omfattet 23.2 % EPA og 31.5 % DHA. Dette indikerer en god selektivitet mellom EPA og DHA. Derimot viste ikke den MML katalyserte re-forestringen av en fri fettsyrefraksjon med glyserol i Eksemlene 1 og 2 betydelig selektivitet mellom EPA og DHA.

10

WO96/37587 ligner WO96/37586. Eksemlene 1, 4, 6 og 8 viser glyserolysen av PUFA med MML uten noe skille mellom EPA og DHA.

Det vil fremgå av denne på ingen måte uttømmende drøftingen av teknikkens stand at omfattende forskning er utført for å utvikle lipase-katalyserte prosesser for å isolere kommersielt viktige PUFA som EPA og DHA fra sammensetninger som fiskeoljer som inneholder dem i relativt lave konsentrasjoner.

20

Vi har nå funnet en lipase-katalysert prosess for å fremstille konsentrater av EPA og DHA ved hjelp av direkte forestring av fri fettsyre fra fiskeolje som, ved at man velger lipasen, gjør det mulig å spesialtilpasse EPA/DHA innholdene i det resulterende konsentratet slik at man kan oppfylle kunders ulike behov. De vesentlige trekk ved denne prosessen er angitt i de vedheftede patentkravene.

25

Mer spesifikt fremskaffer den foreliggende oppfinnelsen en prosess for å forestre en marin oljesammensetning som inneholder EPA og DHA som frie fettsyrer for å danne en fri fettsyrefraksjon anriket i minst en av disse fettsyrene sammenlignet med utgangssammensetningen, og der denne prosessen omfatter trinnet der omtalte marine oljesammensetning reageres med glyserol sammen med en lipase-katalysator under redusert trykk og vesentlig organisk løsningsmiddel-fri betingelser, og å utvinne en fri fettsyrefraksjon anriket i minst en av EPA og DHA.

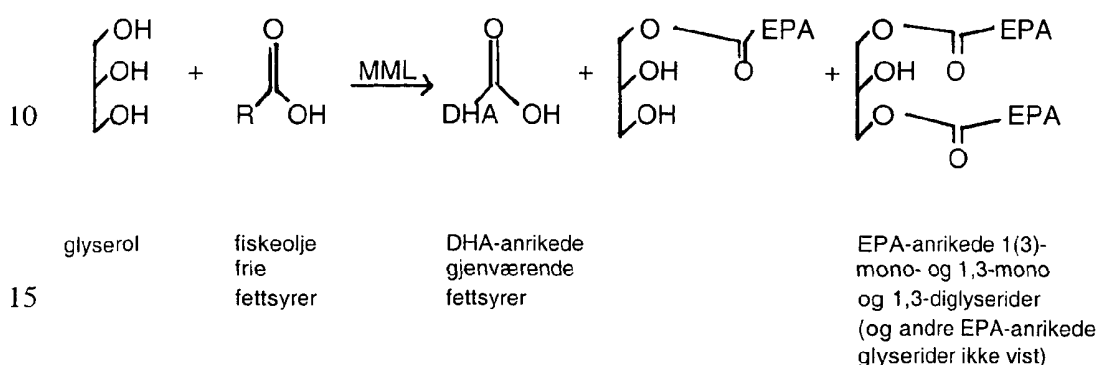
30

35

Den foreliggende oppfinnelsen bygger på at det er funnet at glyserol kan virke som et utmerket substrat for en lipase-katalysert direkte forestring av frie fettsyrer i marin olje, forutsatt at visse kritiske reaksjonsbetingelser følges. Dette kunne man slett ikke forvente på bakgrunn av tidligere forskning ved å

bruke glyserol som omtalt ovenfor. Den viktigste forestringsreaksjonen kan skjematisk fremstilles ved følgende ligning der lipase-katalysatoren er *Rhizomucor miehei* (MML):

5



- 20 Produktet inneholder også andre typer EPA-anrikede glyserider, som ikke vises i den skjematiske ligningen.

Som det vil forklares i nærmere detalj nedenfor og illustreres i Eksempel 8, kan valget av lipase-katalysatoren på en avgjørende måte påvirke produktets
 25 beskaffenhet. I tilfellet der MML er brukt i det illustrerte reaksjonsskjemaet, er produktet en DHA-anriket fri fettsyrefraksjon og en EPA-anriket glyserid fraksjon.

Et viktig trekk i den foreliggende prosessen er at den drar fordel av at en
 30 lipases selektivitet overfor enkelte fettsyrer er større når disse finnes i form av frie syrer enn når de finnes som glyserider, siden man da unngår komplikasjoner på grunn av lipase-regioselektivitet eller posisjonert selektivitet. Det er overraskende at reaksjonen med glyserol er mye mindre vellykket når EPA og DHA finnes som estere enn når de finnes som frie syrer, som vist i
 35 Eksempel 10 (sammenlignende) nedenfor.

Bruken av glyserol som substratet i henhold til den foreliggende oppfinnelsen har også den fordel at den bidrar til separasjon av glyseridet og fri fettsyre produktfraksjoner ved for eksempel molekylær destillasjon. Man antar at
 40 grunnen til dette er at esteren av et tertiært alkohol som glyserol er mindre

flyktig enn estere av kortkjede alkoholer, som metanol, etanol og propanol. Molekylær destillasjon utføres for å separere glyseridet og fri fettsyrefraksjoner fordi det er enkelt.

- 5 Det er blitt funnet at relative mengder glyserol er viktige for å få en vellykket forestringsreaksjonen. Fortrinnsvis bør det brukes et molforhold mellom glyserol og frie fettsyrer i utgangssammensetningen på fra 1:1.5 til 1:3, helst fra 1:1.5 til 1:2.5. I vårt eksperimentelle arbeid fram til i dag har vi funnet at et molforhold på omtrent 1:2 mellom glyserol og fettsyrer er optimalt (tilsvarende 10 et forhold mellom tilgjengelige hydroksylgrupper og frie fettsyrer på 1.5:1).

- Det er helt vesentlig at forestringsreaksjonen utføres under redusert trykk for å fjerne vann fra reaksjonssystemet etter hvert som det dannes. Dette er nødvendig for å gjøre reaksjonen ikke-reversibel, og dermed å gjøre det mulig 15 å oppnå høy grad av utvinning av de ønskede EPA/DHA produktene. Forestringen vil derfor generelt utføres ved et trykk lavere enn 50 torr, og normalt under 10 torr, f.eks. fra 1-10 torr, selv om vi overraskende har observert at betingelsene for redusert trykk for optimal lipase aktivitet i noen grad avhenger av den bestemte lipasen som er brukt. I noen tilfeller kan det 20 derfor være gunstig å bruke et trykk på fra 0.01 til 1 torr, og i eksemplene som følger viser vi utmerkede resultater med trykk så lavt som 0.01-0.1 torr. Optimalt lavt trykk for en bestemt lipase kan selvfølgelig enkelt bestemmes ved rutinemessige eksperimenter.

- 25 Organiske løsningsmidler bør ikke være tilstede i den foreliggende prosessen, til forskjell fra mange allerede kjente lipase baserte systemer, fordi organiske løsningsmidler er flyktige og vil fordampe under vakuum.

- Temperaturen som brukes under forestringsreaksjonen vil avhenge av marin 30 olje-sammensetningen som behandles og også av lipasen som brukes. Det er ønskelig at viskositeten til marin olje-sammensetningen bør være tilstrekkelig lav slik at sammensetningen kan bli tilstrekkelig blandet under reaksjonen, og derfor er det ofte nødvendig å bruke temperaturer på minst 20 °C. På den annen side er for høye temperaturer uønskelige fordi høye temperaturer 35 motarbeider den kinetiske oppløsning som fettsyre-lipase-atskillelse baseres på, og også fordi EPA og DHA kan ødelegges ved å utsettes for høye temperaturer over lengre tid, mens lipaser heller ikke tåler høye temperaturer. Når vi tar disse faktorene i betraktning, foretrekkes det vanligvis å operere

innenfor område 20 °-40 °C, ofte helst ved 37 °-40 °C, selv om temperaturer på 0 °-20 °C kan brukes for fiskeolje sammensetninger med høye EPA og/eller DHA innhold der sammensetningen forblir tilstrekkelig flytende ved disse lave temperaturene og omvendt kan høyere temperaturer, i området 40 °-70 °C være mulige for stabile immobiliserte lipaser som MML og CAL.

Utgangsmaterialet i den foreliggende prosessen kan være en hvilken som helst sammensetning fra en marin kilde som inneholder EPA og DHA i fri syreform. En slik sammensetning kan fås ved forsåpning av rå-fiskeoljer, f.eks. med natrium hydroksid, fulgt av surgjøring med f.eks. svovelsyre, i henhold til standard prosedyrer som er velkjent for folk i fiskeolje prosessindustrien. Typisk vil sammensetningene ha totale innhold av EPA og DHA i fri syreform på 15-35 % basert på vekt, fortrinnsvis 25-35 %. Fiskeoljer som er rike på DHA, som tunfiskolje som inneholder omtrent 5 % EPA og 25 % DHA basert på vekt, egner seg spesielt godt for å fremstille DHA konsentrater med prosessen i den foreliggende oppfinnelsen, mens fiskeoljer som er rike på EPA (f.eks. sardinolje med omtrent 18 % EPA og 12 % DHA basert på vekt og chilensk fiskeolje med 20 % EPA og 7 % DHA basert på vekt) er spesielt godt egnede råstoffer for å fremstille EPA konsentrater. Det er imidlertid en fordel at den foreliggende oppfinnelsen kan bruke billigere fiskeoljer med lavere totale EPA og DHA innhold, som sildolje (omtrent 6 % EPA og omtrent 8 % DHA i vekt), som utgangsmaterialer for å fremstille EPA og/eller DHA-anrikede fraksjoner i prosessen til denne oppfinnelsen, som vist i eksemplene nedenfor i denne beskrivelsen.

Som nevnt tidligere i denne spesifikasjonen, er det en egenskap ved den foreliggende prosessen at det er mulig å variere beskaffenheten til de anrikete fraksjonene ved å velge å bruke en bestemt lipase. For eksempel observeres følgende virkninger med de angitte lipasene:

(i) en DHA-anriket fri fettsyrefraksjon og en EPA-anriket glyserid fraksjon fås med *Rhizomucor meihei* lipase (MML), *Mucor javanicus* lipase (MJL), og *Aspergillus niger* lipase (ANL); og

(ii) en EPA/DHA-anriket fri fettsyre fraksjon og en glyserid fraksjon anriket med mettede fettsyrer fås med *Pseudomonas sp.* - Amano AK (PSL), *Pseudomonas fluorescens* - Amano PS (PFL), *Rhizopus*

oryzae - Amano F (ROL) og *Humicola Lanuginosa* - Amano CE (HLL).

Muligheten til å variere produktets beskaffenhet ved et egnet valg av lipase-katalysatoren er gunstig fordi prosessen kan spesialtilpasses for oppfylle kunders spesielle krav. For eksempel kan en kunde ønske et DHA konsentrat for morsmelkerstatning, mens en annen kunde kan ønske et blandet EPA/DHA konsentrat for å fremstille et helseprodukt, og kravene fra begge kunder kan oppfylles ved ganske enkelt å bytte lipase-katalysatorene som brukes.

Selvfølgelig kan man få enda flere muligheter for å spesialtilpasse sammensetningen av sluttproduktet ved å utføre prosessen i to eller flere adskilte trinn med ulike lipase-katalysatorer som brukes i de ulike trinnene.

De foretrukne lipasene i den foreliggende prosessen er *Rhizomucor miehei* (MML), som skiller skarpt mellom EPA og DHA; og *Pseudomonas sp.* (PSL), som skiller mellom EPA og DHA, på den ene siden og de resterende fettsyrene i fiskeolje på den annen side.

Det foretrekkes, i det minste i industriell målestokk, å bruke en immobilisert form av den utvalgte lipasen siden det er oppdaget at immobilisering ikke bare øker enzymets aktivitet, spesielt ved svært lavt trykk, i området 0.01 til 1 torr, men også forbedrer dets stabilitet og bidrar til gjenvinningen av det. Alle disse faktorene innvirker på prosessens økonomi.

Tilstrekkelig mengde av lipasen bør brukes for å utføre den ønskete forestringsreaksjonen. I vårt arbeid med immobilisert MML har vi brukt omtrent 10 vekt% av det immobiliserte produktet, basert på innholdet av fettsyrer i den marine sammensetningen som behandles, som tilsvarer en konsentrasjon av MML på omtrent 1 vekt% (det kommersielt tilgjengelig immobiliserte MML består av omtrent 10 % lipase og 90 % bærer).

Ved å bruke ikke-immobiliserte lipaser, har vi derimot brukt lipase konsentrasjoner på 10 vekt% av fettsyreinholdet.

Etter at forestringsreaksjonen er fullført, kan produktet behandles videre, for eksempel for å separere den frie fettsyren og glyserid fraksjonene. Denne

separasjonen utføres med molekylær destillasjon. Selvfølgelig kan produktet fra en første lipase-katalysert forestring senere konsentreres ytterligere i en eller flere påfølgende lipase-katalyserte forestringer, ved å bruke den samme - eller en annen lipase.

5

Den frie syrefraksjonen som fås ved slutten av prosessen kan enten brukes slik den er, eller dersom et produkt i fri syreform ikke kan godtas for den tiltenkte bruken, kan det først omsettes til etylester, glyserid eller andre mer akseptable former med en hvilken som helst egnet metode.

10

På samme måte kan fraksjonen, der den separerte glyserid fraksjonen inneholder EPA eller DHA i økonomisk interessante konsentrasjoner, behandles videre, for eksempel med hydrolyse med vannholdige baser for å danne frie syrer, eller med forestring med etanol for å danne etylestere av

15 fettsyrene. Den frie fettsyren eller etylester fraksjonen som dannes på denne måten kan deretter konsentreres ytterligere om ønskelig, f.eks. ved molekylærdestillasjon.

Forestringsprosessen i den foreliggende oppfinnelsen har en rekke fordeler som gjør den spesielt egnet for industriell bruk. Muligheten til å spesialtilpasse sammensetningen av produktene, spesielt av lipase-katalysatoren, er allerede nevnt, men andre fordeler som kan gjøre prosessen kommersielt attraktiv

20 omfatter:

25 (i) de høye utbyttene av svært konsentrerte EPA, DHA eller EPA- + DHA-produkter som kan oppnås,

(ii) fraværet av alle slags organiske løsningsmidler, noe som ikke bare forebygger renseproblemer som ofte kan forårsakes av slike

30 løsningsmidler, men også reduserer prosessens omfang, hvilket er økonomisk viktig (lavere energibehov osv.),

(iii) muligheten til gjenbruk av immobiliserte lipase-katalysatorer i flere -, kanskje inntil 20 eller flere, påfølgende ganger, noe som igjen

35 bidrar til å holde kostnadene lave.

9

(iv) muligheten til å bruke en hvilken som helst egnet marin olje-sammensetning som inneholder de interessante flerumettede fettsyrene, og

5 (v) den generelle enkelheten i forestringsprosessen og de påfølgende separasjonsprosessene.

Oppfinnelsen illustreres av eksemplene som følger, og der arealprosent-andeler fås ved GLC analyse.

10

Eksempel 1

I dette eksperimentet ble et hydrolyseprodukt av sildolje (SO) som inneholder 5.5 areal% av EPA og 8.0 areal% DHA (i begge tilfeller som den frie syren) reagert med glyserol sammen med *Rhizomucor miehei* lipase (MML; Novo's Lipozyme). Forestringsbetingelsene var:

10	MML:	10 vekt% dosering, basert på fettsyresubstratet
	Glyserol:	1 ekvivalent per to ekvivalenter frie fettsyrer (1.5 støkiometrisk overskudd av hydroksylgrupper)
15	Temperatur:	40 °C
	Trykk:	0.01 til 0.1 torr
20	Organisk løsningsmiddel:	Ingen

Den eksperimentelle fremgangsmåten var som følger. To frie fettsyrer fra sildolje (10 g; M.vekt ca. 290 g/mol; ca. 34.5 mmol) og glyserol (1.56 g; M.vekt 92.1 g/mol; 17.3 mmol) ble tilsatt immobilisert *Mucor miehei* lipase (Novo's Lipozyme, 1.0 g). Blandingen ble lett omrørt ved 40 °C på en varmeplate med magnetisk røreverk ved kontinuerlig vakuum på 0.01-0.1 torr. Det flyktige vannet som ble produsert under reaksjonsforløpet ble kontinuerlig kondensert i en kjøler avkjølt med flytende nitrogen. Titrering ble brukt for å overvåke reaksjonsforløpet. Etter en bestemt tid ble reaksjonen stanset ved å separere enzymet ved hjelp av filtrering. Fraksjonering ble utført med preparativ TLC på silika gel og hver lipidfraksjon ble deretter fettsyre-analysert med GLC etter metylering med standard fremgangsmåter.

Resultatene vises i Tabell 1 under:

Tabell 1

5

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av SO frie fettsyrer med glyserol med MML.

tid	% Omsett. (titrering)	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		areal%		vekt%		areal%		vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 t	30.4	3.4	0.5	14.5	1.4	8.1	15.7	84.5	98.6
2 t	59.0	3.8	0.6	30.1	3.8	8.5	21.9	60.9	96.2
3 t	60.2	4.7	1.0	45.3	5.5	8.6	26.2	54.7	94.5
7 t	79.5	5.5	1.7	81.9	17.4	4.7	31.2	18.2	82.6
12 t	87.4	6.0	2.3	92.2	25.5	3.5	46.7	7.8	74.5
24 t	89.3	6.0	2.9	96.3	32.4	1.9	50.6	3.1	67.6
47 t	89.9	6.5	3.1	95.7	32.9	2.6	56.2	4.3	67.1

10

Etter 7 t ved 80 % omsetting var DHA til EPA forholdet 6.6:1 med DHA som omfatter 31 % og EPA mindre enn 5 % av de gjenværende frie fettsyrene. DHA gjenvinningen var 83 %. Etter 12 t hadde dette forholdet øket til 13:1 og etter 24 t ved 89 % omsetting til 27:1 med gjenvinning av DHA var det ennå nær 70 %. Over dette nivået hadde det klart oppnådd likevekt.

15

Dette eksperimentet viser at ved å bruke MML som lipasen, gjør den foreliggende oppfinnelsen det mulig å fremstille et DHA konsentrat med en høy omsetningshastighet.

20

Eksempel 2 (Sammenlignende)

Eksempel 1 ble gjentatt men med en redusert konsentrasjon av glyserol (3 ekvivalenter av frie fettsyrer per ekvivalent glyserol). Resultatene vises i Tabell

5 2 under:

Tabell 2

Forløpet til den direkte forestringen av SO frie fettsyrer med glyserol ved MML

10 ved 40 °C

Tid	% Omsett. (titrering)	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
0.5 t	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	8.3	100	100
1 t	8.5	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9	10.3	100	100
2 t	15.1	5.3	3.3	16.8	5.6	6.0	9.9	84.2	94.4
3 t	21.5	5.7	3.5	27.0	7.2	7.7	12.4	73.0	92.8
6 t	30.8	6.9	3.1	27.6	11.1	5.9	11.1	72.4	88.9
10 t	34.7	6.6	3.0	33.7	11.8	6.3	11.9	66.3	88.2
24 t	45.1	6.6	3.7	43.6	18.7	6.2	13.2	56.4	81.3
58 t	72.1	6.1	5.5	72.7	45.1	6.3	17.3	27.3	54.9
80 t	82.5	5.7	5.6	83.3	58.5	5.4	18.7	16.7	41.5

- 15 Som man vil legge merke til, er resultatene i dette eksperimentet langt mindre tilfredsstillende enn de man fikk med 2:1 forholdet som ble brukt i Eksempel 1. Det er ikke lett å forklare grunnen til denne endringen. Det kan ha sammenheng med utilstrekkelig tilgjengelighet av hydroksylgrupper eller en overskuddsmengde av fettsyrer, når man tar i betraktning at midtposisjonen til
- 20 glyserol er langt mindre tilgjengelig eller, i det minste, mye langsommere i sin medvirkning. Konsekvensen er at likevekt nås alt for tidlig og det er ingen effektiv separasjon mellom EPA og DHA.

Eksempel 3

Eksempel 1 ble gjentatt, men temperaturen under forestringsreaksjonen ble variert mellom 30 ° og 60 °C. Resultatene vises i Tabell 3 under:

5

Tabell 3

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av SO frie fettsyrer og glyserol med MML ved å variere temperaturen

10

Temp. (°C)	% Omsett. (titrering)	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
30	60.0	4.4	0.7	45.2	5.6	8.0	17.6	54.8	94.4
40	85.7	6.4	1.7	86.7	18.9	5.5	43.8	13.3	81.1
50	84.7	5.6	1.3	79.1	15.6	8.2	39.0	20.9	84.4
60	81.7	5.2	1.3	71.2	13.7	4.4	37.9	28.8	86.3

Resultatene fastslår at 40 °C er den beste temperaturen under disse spesielle reaksjonsbetingelsene. Ved 30 °C var røring vanskelig, noe som forklarer de dårlige resultatene ved denne temperaturen. Imidlertid kan man legge merke til det gunstige forholdet mellom DHA og EPA, 8.6:1 ved 60 °C, sammenlignet med 8.0:1 ved 40 °C, siden det ved den temperaturen kunne forventes en lavere selektivitet.

20

Eksempel 4

Eksempel 1 ble gjentatt men ved å variere forholdet mellom glyserolet og de frie fettsyrene ved både 40 °C og 60 °C. Resultatene vises i Tabell 4 under:

5

Tabell 4

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av SO frie fettsyrer og glyserol med MML ved å variere glyserolinnholdet.

10

G1/ FFA forhold	% Omsett. (titrering)	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
40 °C									
1/1	84.4	5.7	2.0	63.7	22.5	11.2	37.2	32.3	77.5
1/2	84.3	6.2	2.0	71.4	21.1	9.3	40.2	28.6	78.9
1/3	67.8	6.3	2.5	77.9	19.7	7.3	21.4	22.1	80.3
60 °C									
1/2	91.9	5.4	3.3	97.3	42.2	1.5	38.9	2.7	57.8
1/3	83.7	5.9	2.9	86.8	28.5	7.0	37.3	13.2	71.5
1/4	69.5	5.2	3.0	59.6	22.5	6.8	19.3	40.4	77.5

Disse resultatene bekrefter det som tidligere var funnet, nemlig at et gunstig
 15 DHA/EPA forhold, og en høy grad av gjenvinning av DHA kan oppnås ved 40 °C med 1:2 molforhold mellom glyserol og frie fettsyrer.

Eksempel 5

Dette eksperimentet viser den direkte forestringen av en fri
fettsyresammensetning oppnådd ved hydrolyse fra chilensk fiskeolje
5 (sardinolje) ved å bruke MML som katalysator.

Den chilenske oljen (sardinolje) inneholdt 16.8 område % EPA og 12.3 område
% DHA.

10 Betingelsene under forestringsreaksjonen var de samme som i Eksempel 1.
Resultatene vises i Tabell 5 under:

Tabell 5

15 Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av frie fettsyrer fra sardinolje og
glyserol med MML.

Tid	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 t	18.6	12.1	1.0	12.0	1.5	20.4	14.3	88.0	98.5
2 t	39.4	14.3	1.2	31.4	4.0	20.4	18.7	68.7	96.0
3 t	48.3	13.4	1.2	38.2	4.9	21.7	22.4	61.8	95.1
5 t	53.6	16.3	1.4	45.4	5.5	22.1	28.1	54.6	94.4
7 t	68.0	16.7	1.9	60.9	11.0	22.7	32.0	39.1	89.0
28 t	80.0	20.1	3.5	85.9	21.6	13.2	50.0	14.1	78.4

20

Resultatene i Tabell 5 viser at sardinoljen er et egnet råmateriale for å
separere både EPA og DHA effektivt med MML. Etter 28 t reaksjonstid hadde
eksempelvis 86 % av det opprinnelige EPA blitt separert til glyserid fraksjonen,
og 78 % av DHA forblir i den gjenværende fettsyrefraksjonen som omfatter 50

25 % DHA og 13 % DHA.

Eksempel 6

Eksempel 1 ble gjentatt ved å bruke rå tunfiskolje som omfatter 5.0 % EPA og 18.2 % DHA, som utgangsmateriale. Resultatene er gitt i Tabell 6 under:

5

Tabell 6

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av frie fettsyrer fra tunfiskolje og glyserol med MML.

10

Tid	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
2 t	55.2	4.8	2.0	42.3	5.6	8.1	42.2	57.7	94.4
4 t	70.6	6.0	6.5	68.9	21.7	6.5	56.0	31.1	78.3
6 t	77.1	5.3	3.6	73.2	14.0	5.6	64.3	26.8	86.0
8 t	78.1	5.5	9.0	91.5	45.4	2.0	63.9	8.5	64.6
24 t	89.0	4.6	16.4	91.1	76.9	3.7	39.7	8.9	23.1

Når man tar i betraktning at det ble brukt rå tunfiskolje som inneholdt relativt små mengder DHA, var de oppnådde resultatene utmerkede.

15

Eksempel 7

Eksempel 1 ble gjentatt i større (100 g) målestokk. De samme betingelsene som tidligere ble brukt, med et 1:2 molforhold mellom glyserol og frie fettsyrer
5 under vakuum ved 40 °C. 10 % dosering av MML ble brukt og hver reaksjon ble stanset etter 16 timer. Etter hver kjøring ble lipasen filtrert bort med en sintret glasstrakt i en strøm med nitrogen atmosfære. Når det var nødvendig ble lipasen mellom kjøringer lagret i nitrogen ved værelsestemperatur. Resultatene fra tyve påfølgende kjøringer er vist i Tabell 7.

Tabell 7

Resultater av produktivtetsstudier av den direkte forestringen av frie fettsyrer fra sildolje og glyserol med MML.

5

Kjøring Nr.	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1	80.0	6.7	2.2	79.8	25.8	6.8	25.3	20.2	74.2
2	90.0	6.8	4.1	93.5	53.4	4.2	32.5	6.5	46.6
3	92.3	7.3	5.1	96.0	62.4	3.6	36.6	4.0	37.6
4	92.5	6.9	3.2	93.4	53.2	6.0	34.4	6.6	46.8
5 ^a	89.9	6.0	4.4	92.6	67.1	4.3	19.3	7.4	32.9
6	91.1	6.7	5.5	91.4	60.8	6.5	36.1	8.6	39.2
7 ^a	83.0	6.8	6.2	82.3	58.3	7.1	21.7	17.7	41.7
8	89.3	5.6	3.5	86.2	50.1	7.4	28.9	13.8	49.9
9	88.1	5.5	3.3	89.4	42.9	4.8	32.6	10.6	57.1
10 ^b	55.0	-	-	-	-	-	-	-	-
11	90.1	9.6	3.2	92.6	38.6	7.0	46.4	7.4	61.4
12	93.2	7.3	5.4	95.1	64.0	5.2	41.3	4.9	36.0
13	93.7	6.0	4.8	93.9	57.8	3.8	34.3	6.1	42.2
14 ^a	86.4	5.3	4.6	85.3	56.1	5.8	22.7	14.7	43.9
15	93.0	6.2	5.7	95.0	68.5	4.4	34.6	5.0	31.5
16 ^a	87.9	7.5	5.0	91.9	59.0	4.9	25.3	8.1	41.0
17	91.1	5.6	4.5	92.3	55.0	4.7	37.6	7.7	45.0
18	93.5	6.4	4.0	95.4	93.5	4.4	33.4	4.6	36.5
19	91.2	6.1	4.2	91.9	54.4	5.6	36.5	8.1	45.6
20	90.0	7.2	3.5	91.5	47.4	6.1	35.4	8.5	52.6

a) Denne prøven ble ikke oppsamlet for molekylærdestillasjon-separasjonen

b) Denne prøven ble verken analysert eller samlet opp for den molekylære destillasjonen

10

Som man vil legge merke til i Tabell 7, beholdt lipasen sin aktivitet under tyve påfølgende kjøringar uten noen betydelig forringelse.

Eksempel 8

Formålet med dette eksperimentet var å vise at andre lipaser enn MML kan brukes i prosessen i henhold til den foreliggende oppfinnelsen.

5

Sytten (17) ulike lipaser eller lipase preparater ble testet under de samme reaksjonsbetingelsene som i Eksempel 1 men ved høyere trykk, i området fra 1 til 20 torr, ved å bruke den samme sildoljen som i Eksempel 7 og med en fastsatt reaksjonstid på 16 timer. Titrering ble brukt for å overvåke omsettingens omfang. Glyseridblandingen ble separert fra de gjenværende frie fettsyrene ved hjelp av preparativ TLC i tilfeller som oppviste en viss aktivitet, og fettsyresammensetningen fra de to resulterende fraksjonene ble bestemt med GLC. Resultatene er gitt i Tabell 8 under.

10

Tabell 8

Resultater fra bruken av ulike lipaser i den direkte forestringsreaksjonen av frie fettsyrer fra sildolje og glyserol.

5

Lipase	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
PSL	17.4	0	0	0	0	4.4	5.6	100	100
PFL	23.5	0	0	0	0	6.1	7.9	100	100
CAL ^a	75.9	6.5	7.7	75.3	72.1	6.7	9.3	24.7	27.9
CAL ^a	69.2	5.8	8.5	66.1	70.9	6.7	7.8	33.9	29.1
MJL	71.8	4.0	0	62.2	0	6.2	10.3	37.8	100
LNL ^b	40.2	0	0	0	0	6.4	9.2	100	100
PRL	17.9	4.8	8.2	15.1	17.1	5.8	8.6	84.9	82.9
ANL	20.4	4.7	0	20.1	0	4.8	6.1	79.9	100
ROL	31.6	0	0	0	0	5.7	7.0	100	100
PCL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
HLL	32.4	0	0	0	0	1.1	1.5	100	100
RDL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
CLL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
MML ^d	76.0	-	-	-	-	-	7.2	-	-
PPL	24.4	4.3	6.3	19.3	22.0	5.7	5.6	80.7	78.0
RNL	11.9	3.9	1.6	18.2	3.6	2.4		81.8	96.4

a) Lipase SP 382 fra Novo Nordisk.

b) Lipase SP 435 fra Novo Nordisk.

10 c) Lipase N con. 05501.

d) MML ble inkludert for å sammenligne omsettingens omfang. Ikke analysert videre.

Ut fra tabellen er det interessant å legge merke til at *Mucor javanicus* lipasen (MJL) fra Amano synes å skille skarpt mellom EPA og DHA under disse betingelsene og viste høy aktivitet. En lignende aktivitet som skiller mellom EPA og DHA til fordel for EPA ble også vist av *Aspergillus niger* lipasen (ANL), og også av *Rhizopus niveus* lipasen (RNL), men aktiviteten var mye lavere. PSL og PFL viste aktivitet under disse betingelsene uten å skille betydelig mellom EPA og DHA. Disse lipasene egner seg derfor for å konsentrere både EPA og DHA sammen fra fiskeolje under disse betingelsene. LNL, ROL og

HLL har også vist seg egnet til å konsentrere både EPA og DHA i fiskeolje siden de viser en høy aktivitet.

- 5 *Candida antarctica* lipasen, derimot, skilte ikke mellom EPA og DHA. Selv om den viste høy aktivitet, som var sammenlignbar med MML, viste denne lipasen ikke noe skarpt skille mellom disse og andre fettsyrer som fantes i fiskeoljen. CAL egner seg derfor ikke til bruk under disse betingelsene.

Eksempel 9 (Sammenlignende)

Eksempel 8 ble gjentatt for flere av lipasene men ved å bruke et betraktelig
5 høyere vakuum på 0.01-0.1 torr. Resultatene vises i Tabell 9 under:

Tabell 9

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen under høyt vakuum for fettsyrer
10 fra sardinolje og glyserol med ulike lipaser ved å bruke 2 ekv. av FFA og 1 ekv.
av glyserol etter 24 timer ved 40 °C.

Lipase	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
PRL	4.9	7.3	4.5	2.1	2.0	17.1	11.0	97.9	98.0
PFL	2.5	5.5	4.8	0.8	1.1	17.1	11.5	99.2	98.9
LNL	4.3	4.6	1.5	1.1	0.6	18.1	10.9	98.9	99.4
ROL	6.4	8.0	1.0	2.9	0.6	18.2	11.8	97.1	99.4
CAL	94.0	12.6	7.7	93.4	90.1	14.0	13.3	6.6	9.9
ANL	1.7	13.4	9.5	1.3	1.6	18.0	10.2	98.7	98.4

15

Resultatene i Tabell 9 står i ganske sterk kontrast til resultatene i Tabell 8 for
de samme lipasene.

20 Omsettingens omfang var dermed mye mindre for alle lipasene unntatt for
CAL, og for ingen av lipasene var det noen tydelig skille mellom EPA og DHA.
Man antar at den lavere aktiviteten til alle lipasene unntatt CAL sannsynligvis
skrives seg fra det svært høye vakuumet som var brukt for å fjerne det
vesentlige vanninnholdet i lipasen med en svært forringende virkning på
25 lipasens aktivitet.

Eksempel 10 (Sammenlignende)

I dette eksperimentet ble sardinolje etylestere direkte forestret med glyserol ved å bruke en rekke ulike lipaser. Reaksjonene ble utført under røring ved 40 °C for 24 timer under vakuum ved å bruke lipasen med en konsentrasjon på 10 % og to ekvivalenter av etylestere per ekvivalent av glyserol. Resultatene vises i Tabell 10 under. Omsettingens omfang var basert på mengden av gjenværende etylestere i reaksjonsblandingen.

Tabell 10

Resultater av enzymgjennomgang for reaksjonen av etylester fra sardinolje med glyserol etter 24 timer ved 40 °C.

Lipase	%Omsett.	Etilestere			Glyserider			Frie fettsyrer		
		vekt%	EPA (%)	DHA (%)	vekt%	EPA (%)	DHA (%)	vekt%	EPA (%)	DHA (%)
under vakuum										
MML	61.6	38.4	17.8	18.1	55.7	17.4	6.7	5.7	0.9	1.8
CRL	2.6	97.4	15.1	9.4	1.2	5.9	3.6	1.4	6.5	3.8
RDL	3.5	96.5	18.0	11.5	2.8	10.1	3.7	0.8	4.7	0.0
ROL	3.5	96.4	17.4	10.5	2.5	6.6	2.6	1.1	6.0	6.2
PCL	3.2	96.8	18.2	11.4	1.0	3.1	1.6	0.4	-	-
PSL	7.1	92.9	15.7	10.5	5.8	4.6	5.4	0.6	-	-
PFL	3.8	96.2	16.7	11.0	3.9	9.0	5.0	0.0	-	-
MJL	5.2	94.8	18.5	11.6	5.0	4.8	2.3	0.0	-	-
PPL	3.2	96.8	18.2	11.4	1.0	3.1	1.6	1.2	10.6	7.1

Det går fram av Tabell 10 at glyserolyse reaksjonen forløp mye langsommere hva angår omsetting sammenlignet med den direkte forestringen av frie fettsyrer med glyserol. Bare MML viste merkbar omsetting, og de andre lipasene viste svært liten - eller ingen aktivitet.

5

Dette forsøket viser at etylestere, selv om de er gunstigere og lettere tilgjengelige som råstoff, ikke utgjør et foretrukket utgangsmateriale i denne oppfinnelsen.

Eksempel 11

Eksempel 1 ble gjentatt ved å bruke som en semi-raffinert tunfiskolje som inneholder 5.2 % EPA og 24.5 % DHA som utgangsmateriale. Resultatene er gitt i Tabell 11 under.

Tabell 11

Forløpet til den direkte forestringsreaksjonen av frie fettsyrer fra semi-raffinert tunfiskolje og glyserol med MML.

Tid	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 t	16.8	3.4	1.6	12.0	1.3	5.1	24.5	88.1	98.7
2 t	29.1	3.9	3.3	19.7	3.9	6.5	33.5	80.3	96.1
3 t	40.5	3.9	2.0	29.3	4.0	6.4	32.4	70.7	96.0
4 t	45.5	3.7	1.6	31.6	3.4	6.6	36.9	68.4	96.6
5 t	51.1	3.7	1.9	35.8	4.5	7.0	41.3	64.2	95.5
6 t	56.2	3.9	1.8	41.1	5.0	7.2	44.4	58.9	95.0
7 t	57.6	3.6	1.7	39.5	4.8	7.4	45.7	60.5	95.2
11 t	64.2	4.1	1.9	52.2	6.7	6.8	48.1	47.8	93.4
24 t	74.2	5.2	2.8	71.4	10.3	6.0	71.1	28.6	89.8
48 t	90.0	6.7	5.0	90.9	21.4	2.9	77.5	9.1	78.7

15

Man ser at det ble oppnådd god omsetting med effektivt skille av EPA og DHA.

Eksempel 12

Eksempel 1 ble gjentatt ved å bruke en rå fiskeolje som inneholder 20.0 %

5 EPA og 7.2 % DHA som utgangsmateriale. Resultatene vises i Tabell 12.

Tabell 12

Forløpet til den direkte forestringen av frie fettsyrer fra rå fiskeolje og glyserol

10 med MML.

Tid	% Omsett.	Glyserider				Gjenværende frie fettsyrer			
		Areal%		Vekt%		Areal%		Vekt%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 t	29.4	15.2	0.6	22.0	3.1	22.4	7.8	78.0	96.9
2 t	56.4	19.7	1.1	50.2	10.3	25.2	12.8	49.8	89.7
3 t	73.0	23.0	1.9	75.3	24.5	20.4	15.8	24.7	75.5
4 t	78.4	23.5	2.4	83.0	32.5	17.4	18.4	17.0	67.5
5 t	79.2	25.6	3.1	84.4	37.0	18.0	20.3	15.6	63.0
6 t	82.1	25.6	3.1	87.5	37.5	16.7	23.9	12.5	62.5
7 t	82.3	23.2	3.6	86.8	40.4	16.4	25.1	13.2	59.6
12 t	82.3	22.7	5.4	86.9	48.5	15.8	26.7	13.1	51.5
24 t	97.2	20.7	6.9	98.1	94.3	14.2	14.5	1.9	5.7
33 t	97.2	19.5	6.4	97.7	94.9	15.7	11.8	2.3	5.1

15

Det går klart fram av resultatene i Tabell 12 at glyserider med et svært gunstig forhold mellom EPA og DHA ble oppnådd med en høy omsetningshastighet.

Den illustrerte prosessen kan derfor danne grunnlag for en prosess for å
20 fremstille et konsentrat av EPA.

KRAV

1. Fremgangsmåte for å isolere en fettsyrefraksjon som er anriket i minst en av fettsyrene EPA og DHA sammenlignet med innholdet i en marin oljesammensetning i hvilken EPA og DHA foreligger som frie fettsyrer

karakterisert ved

kombinasjonen av de følgende trinn:

(i) å forestre nevnte marine oljesammensetning med glycerol i nærvær av en lipase-katalysator ved redusert trykk og i det vesentlige løsningsmiddelfrie betingelser, slik at de fettsyrer som ikke skal anrikes i det vesentlige går over på glyceridform, hvorved det oppnås en blanding av fettsyrer på glyceridform og fri fettsyreform,

og (ii) å separere fraksjoner av fettsyrer på glyceridform og fri fettsyreform ved molekylær destillasjon.

2. Fremgangsmåte i henhold til krav 1 der molforholdet mellom glyserol og frie fettsyrer i utgangssammensetningen er fra 1:1.5 til 1:3.

3. Fremgangsmåte i henhold til krav 2 der molforholdet mellom glyserol og frie fettsyrer i utgangssammensetningen er fra 1:1.5 til 1:2.5.

4. Fremgangsmåte i henhold til krav 3 der molforholdet mellom glyserol og frie fettsyrer i utgangssammensetningen er omtrent 1:2.

5. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene der forestringsreaksjonen utføres ved et trykk på under 50 torr.

6. Fremgangsmåte i henhold til krav 5 der forestringsreaksjonen utføres ved et trykk lavere enn 10 torr.

7. Fremgangsmåte i henhold til krav 6 der forestringsreaksjonen utføres ved et trykk på fra 1 til 10 torr.

8. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av kravene 1-6 der forestringsreaksjonen utføres ved et trykk på fra 0.01 til 1 torr.

9. Fremgangsmåte i henhold til krav 8 der forestringsreaksjonen utføres ved et trykk på fra 0.01-0.1 torr.

10. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene der forestringsreaksjonen utføres ved en temperatur på 20 °- 40 °C.

11. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene der omtalte lipase-katalysator immobiliseres på en bærer.

12. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene der omtalte lipase-katalysator er *Rhizomucor melhei*.

13. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene der omtalte lipase fortrinnsvis katalyserer forestringen av EPA, sammenlignet med DHA.

14. Fremgangsmåte i henhold til et hvilken som helst av kravene 1-12 der omtalte lipase fortrinnsvis katalyserer forestringen av DHA, sammenlignet med EPA.

15. Fremgangsmåte i henhold til et hvilket som helst av kravene 1-12 der omtalte lipase fortrinnsvis katalyserer forestringen av både EPA og DHA, sammenlignet med andre fettsyrer i omtalte marin olje-sammensetning.

16. Fremgangsmåte i henhold til krav 1-15

karakterisert ved

at en eller flere ytterligere trinn, så som lipase eller kjemisk katalysert forestring med alkohol for å danne estere eller hydrolyse for å danne frie fettsyrer, kan utføres etter forestringstrinnet (i) i krav 1.