



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **319194**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

C 11 C 3/04, C 12 P 7/64

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20025456	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2002.11.14	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2002.11.14	(30)	Prioritet	Ingen
(41)	Alm.tilgj	2004.05.18			
(45)	Meddelt	2005.06.27			
(73)	Innehaver	Pronova Biocare AS , Postboks 420, 1327 LYSAKER, NO			
(72)	Oppfinner	Gudmundur G Haraldsson, Klyfjasel 14, 109 Reykjavik, IS Olav Thorstad, Sølviveien 11, 3940 PORSGRUNN, NO Arnar Halldorsson, Fornhagi 13, 107 Reykjavik, IS			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Lipase-katalysert forestringsfremgangsmåte av marine oljer
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0073254 JP 06192683 Haraldsson G.G. et al., 1998. JAOCD, vol.75, no. 11, s. 1551-1556 Breivik et al., 1997. JAACS, vol. 74, no. 11 Tanaka et al., 1992. Yukagaku vol. 41, nr. 4, s. 312-316 Bousquet et al., 1995. Journal of Chromatography, vol. 704, s. 211-216
(57)	Sammendrag	

Marine oljesammensetninger som inneholder EPA og DHA som frie syrer eller heksylestere forestres med etanol i nærvær av en lipasekatalysator under hovedsakelig organisk løsningsmiddel-frie betingelser og separeres ved destillasjon.

Denne oppfinnelsen vedrører lipasekatalysert forestring av marine oljer.

Det er velkjent innenfor fagområdet å raffinere oljeprodukter av forskjellige typer, inkludert marine oljer, ved hjelp av lipasekatalysatorer, der lipasekatalysatorens spesifisitet under raffineringens betingelsene som benyttes øker utvinningen av et ønsket produkt.

Omfattende forskning er utført i den hensikt å utvikle lipasekatalyserte fremgangsmåter for å isolere slike kommersielt viktige flerumettede fettsyrer (PUFA) som EPA (eikosapentaensyre, C20:5) og DHA (dokosaheksaensyre, C22:6) fra sammensetninger slik som fiskeoljer som inneholder slike i relativt lave konsentrasjoner.

I PCT/NO05/00050 (WO 95/24459) beskrev vi for eksempel en fremgangsmåte for å behandle en oljesammensetning som inneholder mettede og umettede fettsyrer på formen av triglycider ved omforestringsreaksjonsbetingelser med en C₁₋₆ alkohol slik som etanol under hovedsakelig vannfrie betingelser i nærvær av en lipase som er virksom til fortrinnsvis å katalysere omforestringen av de mettede og monoumettede fettsyrene. Med de foretrukne lipasene, *Pseudomonas sp.* lipase (PSL) og *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL) var det mulig å fremstille konsentrater med mer enn 70 vekt-% av de kommersielt og terapeutiske viktige omega-3 flerumettede fettsyrene EPA og DHA på form av glycerider fra marine oljekilder.

Et antall lipasekatalyserte raffineringens fremgangsmåter har benyttet glycerol.

Som eksempel kan JP 62-91188 (1987); WO91/16443; Int. J. Food Sci. Technol. (1992), 27, 73-76, Lie og Molin; Myrnes m.fl. i JAOCS, Vol. 72, nr. 11 (1995), 1339-1344; Moore m.fl. i JAOCS, Vol. 73, nr. 11 (1996), 1409-1414; McNeill m.fl. i JAOCS, Vol. 73, nr. 11 (1996), 1403-1407; WO96/3758 og WO96/37587 nevnes.

I PCT/NO00/00056 (WO 00/49117) frembrakte vi en fremgangsmåte for å forester en marin oljesammensetning med EPA og DHA som frie fettsyrer for å danne en fri fettsyrefraksjon anrikt med minst en av disse fettsyrene sammenlignet med utgangssammensetningen, som omfatter trinnet å reagere den marine oljesammensetningen med glycerol i nærvær av en lipasekatalysator, *Rhizomucor miehei* lipase (MML), under redusert trykk og i det alt vesentlige organiske løsningsmiddelfrie betingelser, og å utvinne en fri fettsyrefraksjon anrikt med minst en

av EPA og DHA. Kortveisdestillasjon ble fortrinnsvis benyttet for å separere de gjenværende frie fettsyrene fra glyceridblandingen.

5 Imidlertid er det nå blitt åpenbart at denne strategien basert på kortveisdestillasjon for å separere de gjenværende frie fettsyrene fra glyceridblandingen, ikke er særlig anvendelig. Dette er et resultat av for høy flyktighet hos de kortkjedede monoglyceridene, som forurenses destillatet i stor utstrekning.

10 Haraldson G.G. m.fl.; 1998, JAOCS, vol 75, nr 11, s. 1551-1556 beskriver enzym-fremgangsmåten som er benyttet i denne søknaden og er derfor svært relevant. Imidlertid ble separasjon av frie fettsyrer og etylestere ved kortveisdestillasjon ("short path distillation"/SPD) betraktet å være umulig på dette tidspunkt, og det ble derfor ikke inkludert i denne artikkelen. Senere ble det funnet at SPD faktisk kunne benyttes for å separere FFA og etylestere i den hensikt å fremstille FFA anriket med DHA.

15 Internasjonal patentsøknad WO0073254 har det samme formål, men forskjellig tilnærming både når det gjelder enzymtrinnet og SPD-separasjonen. Enzym-fremgangsmåten er åpenbart basert på den som er beskrevet i Haraldsson m.fl. nevnt over ved å benytte fiskeoljeetylestere i stedet for FFA og forskjellig type alkohol (polyetylenglykol). Blandingen som oppnås inneholder derfor etylestere og ingen flyktige estere som separeres ved SPD. Dette er forskjellig fra separasjonen av FFA og etylestere i foreliggende søknad.

25 Breivik m.fl., 1997, JAOCS, vol 74, nr 11, s. 1425-1429 beskriver en enzymatisk omforestringsprosess for å konsentrere EPA og DHA i fiskeolje. En blanding som oppnås av acylglycoler anriket med EPA og DHA og etylestere som omfatter flere mettede fettsyrer, ble separert med SPD. Det er ingen konflikt mellom foreliggende fremgangsmåte og fremgangsmåten som er beskrevet i Breivik m.fl.

30 Tanaka m.fl., 1992, Yukagaku, vol 41, nr 4, s. 312-316 beskriver en sentrifugal-kromatografiskilleteknikk for å separere FFA fra acylglyceroler. Etylestere er forskjellige fra acylglyceroler både når det gjelder fysiske og kjemiske egenskaper. Derfor må en teknikk som anvendes for å separere FFA fra acylglyceroler nødvendigvis ikke virke godt med hensyn på å separere FFA fra etylestere.

35 JP 06192683 omfatter fjerning av FFA fra en blanding av acylglyceroler, og vi antar at det ikke kan anvendes for å separere FFA fra etylestere. Teknikken er basert på

membranfiltrering, som bør utelukke enhver konflikt mellom foreliggende søknad og JP 06192683.

5 Bousquet m.fl., 1995, Journal of chromatography, vol 704, s. 211-216 beskriver en motstrøms kromatografisk separasjonsteknikk for å anrike n-3 flerumettede fettsyrer, inkludert EPA og DHA, i en blanding av FFA. Dette er svært beslektet med HPLC-teknikken som er en meget velkjent konsentrasjonsteknikk og som anvendes i noen utstrekning ved rensing av spesielle FFA slik som EPA og DHA.

10 Vi har nå funnet lipase-katalyserte fremgangsmåter til fremstilling av konsentrater av EPA og DHA ved direkte forestring av frie fettsyrer med metanol eller etanol, eller omforestring av C_n alkylestere fra fiskeolje ($n = 2 - 18$) med C_m alkohol (alkoholyse) ($m = 1 - 12$; $n > m$), og påfølgende kortveisdestillasjon gir høy-DHA-konsentrater. Disse fremgangsmåtene er raske og enkle reaksjoner som gir fortreffelig separasjon mellom
15 EPA og DHA uten å generere ugunstige monoglycerider i destillatet. De essensielle trekkene ved fremgangsmåtene er definert i de vedlagte patentkravene.

Ved en foretrukken utførelsesform ifølge oppfinnelsen er C_1 - C_{12} alkoholen etanol (etanolyse). Blant C_2 - C_{18} alkylestere er heksylester foretrukket.

20 Molarforholdet av metanol eller etanol til frie fettsyrer i utgangsmaterialet med direkteforestringen er fra 0,5 til 10,0, det foretrukne forholdet er fra 0,5 til 3,0, og det mest foretrukne forholdet er fra 1,0 til 2,0 eller til og med fra 1,0 to 1,5.

25 Molarforholdet av C_m alkoholer til C_n alkylestere ved omforestringen er fra 0,5 til 10,0, det foretrukne forholdet er fra 0,5 til 3,0, og det mest foretrukne forholdet er fra 2,0 til 3,0.

30 Forestringene utføres ved en temperatur på 0°C til 70°C , og fortrinnsvis ved en temperatur på 20°C til 40°C .

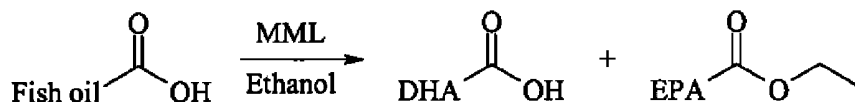
Lipasekatalysatorene som anvendes ved den foreliggende oppfinnelsen er immobiliserte på en bærer.

35 Noen lipaser som benyttes under alkoholysene har de egenskapene at de katalyserer alkoholysen av DHA ved en mye langsommere hastighet enn den tilsvarende alkoholysen av EPA. En foretrukken lipase med slike egenskaper er *Rhizomucor miehei*

(MML). Andre lipaser har den egenskapen at de katalyserer alkoholysen av både EPA og DHA ved en mye langsommere hastighet enn den tilsvarende alkoholysen av fettsyrer med kortere kjede og som er mer mettet. Lipaser med slike egenskaper er Pseudomonas sp. lipase (PSL) og Pseudomonas fluorescens lipase (PFL).

5

Direkte forestring av fiskeoljefrie fettsyrer med etanol ved MML er allerede kjent fra G. G. Haraldsson og B. Kristinsson, J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1551-1556(1998).

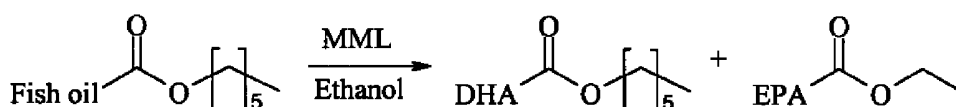


10

Skjema 1. Direkteforestring av fiskeoljefrie fettsyrer med etanol med MML.

Imidlertid ble det ikke antatt at en tilfredsstillende separasjon av de DHA-gjenværende frie fettsyrene og etylesterne var mulig ved kortveisdestillasjonsteknikk. Vi har nå
15 overraskende funnet at kortveisdestillasjonsteknikken kan benyttes med svært vellykket resultat. Dette er klart fra resultatene som er vist i eksemplene nedenfor.

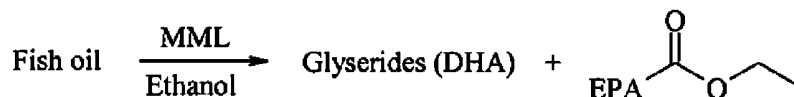
Den foreliggende oppfinnelsen beskriver videre etanolyse av fiskeoljehexsylestere med en lipase, og påfølgende kortveisdestillasjon for å separere gjenværende heksylestere og
20 mer flyktige etylestere.



25 Skjema 2. Etanolyse fiskeoljehexsylestere med lipase (MML).

For ytterligere å forbedre utvinningen av DHA og konsentrasjonen i produktet, kan en etanolysereaksjon som beskrevet i PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) benyttes som et fortrinn før direkteforestringen.

30



Skjema 3. Etanolyse av fiskeolje med lipase (MML).

Før direkteforestringen må glyceridblandingen hydrolyseres. I den hensikt å redusere volumet av utgangsmaterialet til halvparten før hydrolyse, er etanolysereaksjonen ifølge
5 PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) funnet å være anvendelig. Den foreliggende oppfinnelsen beskriver derfor også, som en alternativ fremgangsmåte, en to-enzymatisk-trinns reaksjon som starter med en etanolyse og en påfølgende direkteforestring, der hvert trinn etterfølges av konsentrasjon med kortveisdestillasjon. Denne to-trinnsreaksjonen er også egnet for oljer som er svært anrikt med langkjedede mono-
10 umettede stoffer, slik som sildeolje.

To-trinnsreaksjonen er også anvendelig og fordelaktig når fiskeoljeheksylestere er utgangsmaterialet.

15 Oppfinnelsen er illustrert ved eksemplene som følger.

Utgangsmaterialer slik som sardinolje (SO), ansjosolje (AO), sildeolje (HO), torskeleverolje (CLO), tunfiskolje (TO) og kålmuleolje (BWO) er undersøkt.

20 Eksperimentelle prosedyrer

Bakterielipasene fra *Pseudomonas* sp. (PSL; Lipase AK) og *Pseudomonas fluorescens* (PFL; Lipase PS) ble anskaffet fra Amano Enzyme Inc. De immobiliserte *Rhizomucor miehei* (MML; Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosa* (TLL; Lipozyme TM IM) og *Candida antarctica* (CAL; Novozym 435) lipasene ble anskaffet fra Novozyme i
25 Danmark. Sardinoljen (14% EPA og 15% DHA), ansjosoljen (18% EPA og 12% DHA), sildeoljen (6% EPA og 8% DHA), tunfiskoljen (6% EPA og 23% DHA), torskeleveroljen (9% EPA og 9% DHA) og kålmuleoljen (11% EPA og 7% DHA) ble alle anskaffet av Pronova Biocare.

30 Fettsyreanalyse ble utført ved å benytte en Perkin-Elmer 8140 gasskromatograf (GC) utstyrt med en flammeioniseringsdetektor (FID). Kapillærkolonne var 30 meter DB-225 30 N, 0,25 µm kapillærkolonne fra J&W Scientific. Kortveisdestillasjonen ble utført i et Leybold KDL 4 brenneri. Kjernemagnetiske resonans (NMR) spektre ble registrert på et Bruker AC 250 NMR spektrometer i deuterert kloroform som løsningsmiddel.

35 Preparativ tynnsjiktskromatografi (TLC) ble utført på silikagelplater fra Merck (Art 5721). Eluering ble utført med 80:20:1 blanding av petroleumeter : dietyleter : eddiksyre. Rhodamin G (Merck) ble benyttet for å visualisere bandene som deretter ble

skrapet av og metylert. Metylester av C_{19:0} (Sigma) ble tilsatt til prøvene som intern standard før injisering til GC.

Hydrolyse av fiskeolje

5 Fiskeolje (500 g, 0,55 mol) ble tilsatt til en løsning av natriumhydroksid (190 g, 4,75 mol), vann (500 ml) og 96% etanol (1,7 l). Den oppnådde blandingen ble kjørt med tilbakesløp i 30 minutter (inntil klar farget væske observeres) og avkjøles deretter til romtemperatur, med konstant røring. For å nøytralisere løsningen ble 6,0 M saltsyre (870 ml, 10% overskudd) forsiktig tilsatt og den oppnådde blandingen overføres til en
10 separasjonstrakt. De frie fettsyrene ble ekstrahert to ganger med 1:1 blanding av petroleumseter og dietyleter (1,5 l). Det organiske laget ble deretter vasket tre ganger med vann (1,5 l) og tørket over vannfri magnesiumsulfat. Tørkemidlet ble filtrert fra og løsningsmidlene ble fjernet ved fordampning, ferdigbehandlet med
15 høyvakuumfordampning i to timer ved 50°C. Analyse på analytisk TLC indikerte en enkelt flekk som rene frie fettsyrer. Fargen av produktet varierte fra gulaktig til mørk burgunderaktig farge, avhengig av fiskeoljen.

Direkteforestring av fiskeoljefrie fettsyrer med etanol

Immobilisert MML (15 g) ble tilsatt til en løsning av fiskeoljefrie fettsyrer (300 g,
20 tilnærmet 1,03 mol) og absolutt etanol (143 g, 3,10 mol). Den oppnådde enzymsuspensjonen ble forsiktig rørt under nitrogen ved 40°C inntil ønsket omdanning var nådd. Prøver ble tatt under reaksjonen og gjenværende mengde av frie fettsyrer ble detektert ved titrering med 0,02M NaOH i den hensikt å kontrollere utviklingen av reaksjonen. Fraksjonering ble utført på preparativ TLC og hver
25 væskefraksjon ble deretter kvantifisert og analysert med hensyn på fettsyreprofil GC. Etter å ha nådd ønsket omdanning, ble enzymet fjernet ved filtrering og overskuddet av etanol ble fordampet under vacuum. Høy-DHA-konsentratet ble oppnådd som rest etter kortveisdestillasjon av den oppnådde blandingen.

Etanolyse av fiskeolje med lipase

Immobilisert MML (20 g) ble tilsatt til en løsning av fiskeolje (400 g, 0,44 mol) og absolutt etanol (61 g, 1,32 mol). Den oppnådde enzymsuspensjonen ble forsiktig rørt under nitrogen ved romtemperatur inntil ønsket omdanning var nådd. Deretter ble enzymet fjernet ved filtrering og overskuddet av etanol ble fordampet under vacuum før
35 kortveisdestillasjon. Utviklingen av reaksjonen ble kontrollert ved analytisk TLC og ¹H-NMR. Fraksjonering ble utført ved preparativ TLC og hver lipidfraksjon ble deretter kvantifisert og analysert med hensyn på fettsyreprofil på GC.

Heksanolyse av fiskeolje med lipase

5 Immobilisert CAL (25 g) ble tilsatt til en løsning av fiskeolje (500 g, 0,55 mol) og 1-heksanol (338 g, 3,31 mol). Den oppnådde enzymsuspensjonen ble forsiktig rørt under nitrogen ved 65°C inntil the triacylglycerolene var fullstendig omdannet til heksylestere, i henhold til analytisk TLC og/eller ¹H-NMR. Enzymet ble fjernet ved filterning og overskuddet av heksanol ble fordampet under vacuum.

10

Etanolyse av fiskeoljeheksylestere med lipase

Immobilisert MML (15 g) ble tilsatt til en løsning av fiskeoljeheksylestere (300 g, 0,80 mol) og absolutt etanol (111 g, 2,41 mol). Den oppnådde enzymsuspensjonen ble forsiktig rørt under nitrogen ved 40°C inntil ønsket omdanning var oppnådd, i henhold
15 til ¹H-NMR. Enzymet ble fjernet ved filtrering og overskuddet av etanol ble fordampet under vacuum. Høy-DHA-konsentratet ble oppnådd som rest etter kortveisdestillasjon av den oppnådde blandingen. Fettsyresammensetningen fra hver estergruppe ble bestemt ved kjøring på GC.

20

Eksempel 1

Direkteforestring av fiskeoljefrie fettsyrer med etanol

Sardinolje (SO)

25 Utviklingen av direkteforestringsreaksjon av SO-frie fettsyrer, som inneholder 14% EPA og 15% DHA (14/15), med 3 ekvivalenter etanol i nærvær av MML (5% basert på vekten av frie fettsyrer) ved 40°C er vist i tabell 1. Under disse betingelsene viser lipasen ekstremt høy aktivitet mot de SO-frie fettsyrene. Over 70% omdanning (% etylestere) ble oppnådd etter kun 2 timer. Etter 4 timers reaksjon inneholdt de
30 gjenværende frie fettsyrene 49% DHA og 6% EPA i henholdsvis 73% og 10% utvinninger. Med hensyn på DHA-konsentrasjon og –gjenvinninger synes den optimale omdanningen å være rundt 75% omdanning. I tabell 1 ble vektprosenten av etylestere som er fremstilt under utviklingen av reaksjonen benyttet direkte som et mål på graden av omdanning.

35

Tabell 1. Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av SO fettsyrer (14/15) og etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
1 t	60	32	20	84	56
2 t	71	43	11	80	21
3 t	74	46	7	78	13
4 t	77	49	6	73	10
5 t	78	49	5	69	8
7 t	80	50	5	65	7

Fortreffelige resultater ble oppnådd ved direkteforestring av SO-frie fettsyrer etter separasjon med kortveisdestillasjon. SO-frie fettsyrer ble reagert med etanol i nærvær av MML i 4 timer ved 40°C for å oppnå 78% omdanning. De frie fettsyrene i reaksjonsblandingen omfattet 49% DHA og 6% EPA med 75% DHA- gjenvinninger. Etter destillasjon ved 115°C omfattet resten 69% DHA og 9% EPA i henholdsvis 65% og 10% gjenvinninger (tabell 2). Gjenvinningen av DHA ble forbedret ved å redusere destillasjonstemperaturen (se tabell 3). Vi var ikke i stand til å separere alle etylesterne fra de gjenværende frie fettsyrene ved destillasjonen. På tross av dette greide vi å oppnå høy-DHA-konsentrat av tilnærmet 90% frie fettsyrer og 10% etylestere etter kortveisdestillasjon ved 115°C. Etylestere oppnådd i resten er svært anriket med DHA slik som de frie fettsyrene. Videre destilleres de frie fettsyrene som er mer mettede og som har kortere kjede, hvilket resulterer i høyere DHA-konsentrasjon i resten enn for den frie fettsyrefraksjonen etter reaksjonen.

Tabell 2. Resultatene fra direkteforestringsreaksjonen av SO-frie fettsyrer (14/15) og etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 115°C.

Prøve	Vekt-%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
Etylester (EE)	78	4	19	25	95
Fri fettsyrer (FFA)	22	49	6	75	5
Destillat (D) 115°C	85	7	15	35	90
Rest (R) 115°C	15	69	9	65	10

Resultatene for SO ble forbedret ved å senke omdanningen og destillasjonstemperaturen som vist i tabell 3. Etter 4 timers reaksjon ble 75% omdanning oppnådd. Etter destillasjon ved 111°C inneholdt resten 66% DHA ved 88% gjenvinninger med

5 DHA/EPA forhold på 4,7. Ved svakt høyere destillasjonstemperatur omfattet resten 74% DHA ved 75% gjenvinning med et DHA/EPA forhold på nesten syv. Det skal bemerkes at DHA gjenvinningen etter destillasjonene er basert på prosent vekt av DHA i utgangsoljen.

10 **Tabell 3.** Resultatene fra direkteforestringsreaksjonen av SO-frie fettsyrer (14/15) og etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 111 og 113°C.

Prøve	Vekt-%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	75	3	17	23	87
FFA	25	47	7	77	13
D 111°C	79	3	13	12	76
R 111°C	21	66	14	88	24
D 113°C	84	5	15	25	89
R 113°C	16	74	11	75	11

Etanolinnholdet kan reduseres til 1 ekvivalent, hvilket resulterer i økt reaksjonstid (tabell 4). Mindre lipase kan også tilføres, hvilket resulterer i betraktelig lavere

15 reaksjonshastighet.

Tabell 4. Utvikling av direkteforestringsreaksjonen av SO-fettsyrer (14/15) og 1 ekvivalent av etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
5 t	71	35	12	80	28
6 t	73	41	11	79	26
7 t	74	44	10	78	24
11 t	77	45	7	76	18

20 **Ansjosolje (AO)**

Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av AO-frie fettsyrer som omfatter 18% EPA og 12% DHA (18/12) under identiske betingelser med SO er vist i tabell 5. Slik det kan legges merke til, ble et DHA/EPA-forhold på tilnærmet 6:1 oppnådd ved 82%

omdanning etter 24 timer med EPA som omfatter 8% og DHA 50%. DHA gjenvinningen var rett under 80%. Også etter 18 timer, ved 79% omdanning, var et DHA/EPA-forhold på 5:1 med DHA gjenvinning så høyt som 84%. Derfor er både AO og SO svært potensielle utgangsmaterialer for å fremstille konsentrater med høyt DHA-innhold og også, for å fremstille konsentrater med høyt EPA innhold fra etylesterfraksjonen dersom dette er av interesse.

Tabell 5. Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av AO-frie fettsyrer (18/12) og etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
2 t	56	27	29	100	67
5 t	73	37	19	93	27
8 t	76	45	13	90	16
11 t	79	50	9	84	10
24 t	82	50	8	78	8

10

Resultatene for AO er gode når det gjelder DHA-konsentrasjon og DHA/EPA-forhold som vist i tabell 6. Frie fettsyrer av AO (19/12) ble reagert som tidligere for å nå 76% omdanningen i løpet av 11 timer. Etter destillasjon ved 121°C omfattet resten 61% DHA i kun 64% gjenvinning der DHA/EPA-forholdet er 5,5. Destillatet kan eventuelt benyttes til å fremstille høy-EPA-konsentrater ved en gjentakende destillasjon ved lavere temperatur. Som et eksempel anses et konsentrat på 45% EPA og 10% DHA å være en ønskelig sammensetning for et potensielt kommersielt produkt.

Tabell 6. Resultatene fra direkteforestringsreaksjonen av AO-frie fettsyrer (19/12) og etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 121°C.

Prøve	Vekt-%	Fettsyresammensetning		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	76	2	21	10	84
FFA	24	45	13	90	16
D 121°C	87	5	20	36	93
R 121°C	13	61	11	64	7

20

Sildeolje (HO)

Frie fettsyrer fra sildeolje som omfatter 6% EPA og 8% DHA (6/8) ble på lignende mate behandlet under direkteforestringsbetingelser som beskrevet over. Utviklingen av reaksjonen er vist i tabell 7. De gjenværende frie fettsyrene etter 12 timers reaksjon inneholdt 37% DHA og 6% EPA med henholdsvis 90% og 18% gjenvinninger.

Tabell 7. Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av HO-frie fettsyrer (6/8) og etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA Sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
4 t	62	20	12	97	71
6 t	70	24	12	96	61
8 t	74	26	11	96	52
12 t	80	37	6	90	18
24 t	82	37	7	84	10

10

Frie fettsyrer fra en annen HO som omfatter 9% EPA og 9% DHA (9/9) ble reagert i 12 timer, for å oppnå 84% omdanning på samme mate som tidligere. De frie fettsyrene i reaksjonsblandingen omfattet 39% DHA og 8% EPA med 76% DHA gjening. Etter destillasjon ved 110°C inneholdt resten 40% DHA og 7% EPA ved 68% DHA-gjenvinning med et DHA/EPA-forhold på bortimot 6:1 (tabell 8). Lav DHA-konsentrasjon fremkommer fra høye innhold av langkjedede monoumettede fettsyrer av 20:1 (4%) og 22:1 (37%). Dette høye innholdet av langkjedede monoumettede forbindelser i HO og loddeolje gjør dem til mindre anvendelige utgangsmaterialer for fremgangsmåten som er beskrevet. En enkel ureainklusjon av den gjenværende oljen kan benyttes for å fjerne det meste av disse monoumettede fettsyrene, hvilket resulterer i et verdifullt konsentrat av DHA. Det bør legges til at HO med dets lave EPA-innhold er mer egnet for å oppnå høye DHA/EPA-forhold enn SO og AO.

20

Tabell 8. Resultatene fra direkteforestringsreaksjonen av HO-frie fettsyrer (9/9) og etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 110°C.

Prøve	Vekt-%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	84	2	8	34	76
FFA	16	31	13	66	24
D 110°C	82	4	10	32	88
R 110°C	18	40	7	68	12

5 **Tunfiskolje (TO)**

Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av TO-frie fettsyrer som omfatter 6% EPA og 23% DHA (6/23) under betingelser som er identiske med SO som beskrevet over er vist i tabell 9 nedenfor. Etter 8 timers reaksjon ble omdanning av 68% oppnådd der de gjenværende frie fettsyrene omfatter 74% DHA og 3% EPA med 83% DHA
 10 gjenvinning og et DHA/EPA-forhold på 25:1 (tabelle 9). Denne type initielle EPA/DHA-sammensetning av utgangsoljen er klart ideell for konsentrering av DHA.

Tabell 9. Utvikling av direkteforestringsreaksjonen av TO-frie fettsyrer (6/23) og etanol med MML ved 40°C.

15

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
1 t	43	47	9	98	78
2 t	52	69	9	97	65
3 t	62	68	9	96	50
5 t	65	70	6	92	47
8 t	68	74	3	83	14
11 t	70	77	2	78	11
24 t	73	74	2	71	8

Torskeleverolje (CLO)

Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av CLO-frie fettsyrer som omfatter 9% EPA og 9% DHA (9/9) under lignende betingelser som beskrevet over er vist i tabell
 20 10. Rundt 79% omdanning ved et DHA/EPA-forhold på 5:1 ble oppnådd for de gjenværende fettsyrene med 50% DHA-konsentrasjon og over 80% gjenvinning. Disse resultatene er til og med bedre enn de for SO og AO med tanke på potensielle DHA-

gjenvinninger. Men med hensyn på kostnader er SO og AO foretrukne i forhold til CLO. Det kan ha interesse å sammenligne resultatene av CLO (9/9) med de for HO (9/9) i lys at det faktisk at CLO inneholder langt færre langkjedede monoumettede forbindelser (20:1 og 22:1).

5

Tabell 10. Utviklingen av den direkte forestrede reaksjon av CLO-frie fettsyrer (9/9) og etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
2 t	65	37	20	96	62
3 t	71	42	17	94	43
5 t	75	46	13	91	27
8 t	79	48	10	86	17
11 t	80	50	7	76	12
24 t	82	53	5	76	8

10 **Kålmuleolje (BWO)**

Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av BWO-frie fettsyrer som omfatter 11% EPA og 7% DHA (11/7) under betingelsene som er beskrevet over er vist i tabell 11. Ved omtrent 73% omdanning omfattet de gjenværende frie fettsyrene 24% DHA ved 95% gjenvinninger. EPA ble ikke overført til etylestere så hurtig som forventet. Det var 15 interessant å observere, og til forskjell fra HO, var de langkjedede monoumettede frie fettsyrene i en mye høyere grad omdannet til etylestere. Høyere omdanning er nødvendig for å oppnå bedre separasjon av EPA og DHA. Årsaken til den lave omdanningen for BWO er uklar, men flere forsøk har ikke resultert i en høyere omdanning.

20

Tabell 11. Utviklingen av direkteforestringsreaksjonen av BWO-frie fettsyrer (11/7) og etanol med MML ved 40°C.

Tid	Omdanning (mol%)	FA sammens. (FFA)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
4 t	70	22	23	95	51
7 t	71	23	23	95	50
9 t	72	23	23	95	49
24 t	73	24	21	95	44

5

Eksempel 2

Kombinert etanolyse og direkteforestring av fiskeolje

En to-trinns reaksjon, som starter med en etanolyse og en påfølgende direkteforestring, der hvert trinn etterfølges av kortveisdestillasjon, kan benyttes for å forbedre gjenvinningene av DHA og konsentrasjonen i produktet. Før direkteforestringen må glyceridblandingen som oppnås fra etanolysen hydrolyseres. Derfor kan etanolysereaksjonen benyttes som et fortrinn, hvilket reduserer volumet av utgangsmaterialet med halvparten før hydrolyse. Bemerk de høye gjenvinningene som oppnås ved etanolysen ved 40°C etter separasjon ved destillasjon (tabell 12). Bedre resultater ble oppnådd ved romtemperatur som diskutert over og vist i tabellene 13 og 14. Resten fra romtemperaturreaksjonen omfattet 23% DHA og 25% EPA med henholdsvis 97% og 65% gjenvinninger (tabell 13). Disse resultatene indikerer at DHA-gjenvinningene kan forbedres betraktelig ved to-trinnsfremgangsmåten. Det er også en dramatisk reduksjon i volumet på grunn av hydrolyseaksjonen. Endelig kan denne tilnærmingen være egnet for oljer som er høyt anrikt med langkjedede monoumettede forbindelser slik som HO.

Tabell 12. Resultatene fra den kombinerte etanolysen og direkteforestringen av AO. Etanolyse av AO (19/12) med etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 125°C, etterfulgt av direkteforestring av de oppnådde frie fettsyrene med etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 115°C.

Prøve	Vekt%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125°C	41	1	14	3	27
R 125°C	59	18	24	97	73
D 115°C	66	4	22	12	69
R 115°C	34	54	22	88	31

5 **Tabell 13.** Resultatene fra etanolysereaksjonen av AO (18/12) og etanol med MML ved romtemperatur og separasjon ved destillasjon ved 125°C.

Prøve	Vekt%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125°C	47	2	15	3	35
R 125°C	53	23	25	97	65

10 **Tabell 14.** Resultatene fra etanolysereaksjonen av AO (18/12) og etanol med MML ved 40°C og separasjon ved destillasjon ved 125°C.

Prøve	Vekt%	Fettsyresammens.		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
D 125°C	41	1	14	3	27
R 125°C	59	18	24	97	73

Eksempel 3

15 Etanolyse av fiskeoljehexsylestere

Etanolyse av heksylestere (HE) fra fiskeolje er et alternativt til den tidligere beskrevne etanolyse av fiskeoljetriglycerider (skjema 2). Resultatene indikerer at forskjellige lipaser inkludert *Rhizomucor miehei* lipase (MML) og *Pseudomonas* lipasene (PSL og PFL) kan benyttes så vel som den nylig kommersialiserte *Thermomyces lanuginosa* lipasen (TLL) fra Novozyme. Det er også bekreftet at kortveisdestillasjon er ganske egnet for å separere restheksylestere og de mer flyktige etylestere.

Candida antarctica lipase (CAL) ble benyttet for å omdanne AO-triglycerider til de tilsvarende heksylesterne ved en behandling med heksanol. Behandling av de oppnådde heksylesterne med etanol og PSL etterfulgt av kortveisdestillasjon av reaksjonsblandingen kan gi restheksylesteres med tilnærmet 80% EPA og DHA ved et enkelt eller ved to enzymatiske trinn. Ved å konsentrere DHA i heksylesterne kan vi ikke bare separere etylesterne fra heksylesterne, men også destillere fra de mer mettede heksylesterne. Det kan være mulig å omdanne heksylesterne til etylestere enten kjemisk eller enzymatisk ved å benytte CAL. Alternativt er det mulig å behandle ansjosoljeheksylesterne ved etanololyse ved å benytte MML som kan gi 70% DHA ved et enkelt enzymatisk trinn som heksylestere. De kan videre konsentreres med en ytterligere MML-behandling. Fra massen av etyleesterne som inneholder mesteparten av EPA kan det være mulig å rense EPA opp til $\geq 95\%$ nivåene.

En alternativ to-trinns tilnærming er basert på etanolysen av sardinolje for å fremstille et konsentrat av 50% EPA + DHA (30/20) som en glyceridblanding etter kortveisdestillasjon. Behandling av de gjenværende glyceridene med heksanol og CAL gir heksylestere av identisk sammensetning. De kan enten behandles med etanol og PSL til å gi heksylestere med tilnærmet 80% EPA og DHA, eller med etanol og MML for å separere DHA fra EPA, etterfulgt av ytterligere konsentrering av både EPA og DHA. Denne prosessen kan ha fordel med at massen av fiskeolje behandles med etanol i stedet for heksanol, hvilket både er enklere, mindre voluminøst og mer anvendelig fra et industrielt synspunkt. Man skal også huske på at svært høy til foretrefelig gjenvinning av både EPA og DHA kan forventes ved denne metoden.

25 Ansjosolje (AO)

Som for etanolysen av fiskeoljetriglycerider kan fettsyreselektiviteten og –aktiviteten for MML i stor grad påvirkes av temperatur. Således kan MML benyttes for å konsentrere både EPA og DHA ved eller under 20°C, men ved 40°C separeres EPA fra DHA, hvilket resulterer i høy-DHA-konsentrater. Ansjosoljeheksylestere som omfatter 18% EPA og 12% DHA ble reagert med 2 ekvivalenter av etanol i nærvær av MML (10 vekt-% av heksylesterne) i 24 timer ved 40°C for å oppnå 59% omdanning. Etter fjerning av lipasen ble overskudd etanol fordampet og etylester/heksylester (EE/HE) blandingen ble destillert ved 135°C ved 3×10^{-3} mbar. Resten (26 vekt-%) omfattet 43% DHA ved kun 65% gjenvinning. DHA/EPA-forholdet var kun 2,2 (tabell 15).

Tabell 15. Resultatene fra etanolysen av AO-heksylestere (18/12) og etanol ved MML ved 40°C og separasjon ved kortveisdestillasjon ved 135°C.

Prøve	Vekt% ^a	FA sammens (HE)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	59	6	18	30	62
HE	41	21	13	70	38
R 135°C	26	43	20	65	28

- 5 ^a I tabellene 15 og 16 er omdanningen av de lipasekatalyserte reaksjonene basert på molprosent, mens destillasjonsresultatene er basert på vekt.

Interessante resultater ble oppnådd når reaksjonstemperaturen ble senket til 20°C i en lignende reaksjon med ansjosoljeheksylestere (18/13). Etter destillasjon ved 135°C omfattet resten 45% DHA og 30% EPA med henholdsvis 85% og 55% gjenvinninger (tabell 16).

Tabell 16. Resultatene fra etanolysen of AO-heksylestere og etanol med MML ved 20°C og separasjon med kortveisdestillasjon ved 135°C.

15

Prøve	Vekt%	FA sammens. (HE)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
EE	50	1	9	4	26
HE	50	23	25	96	74
R 135°C	32	45	30	87	53

Pseudomonas-lipasene ble undersøkt på en liten skala med gode resultater, hvilket ga høy EPA-gjenvinning, men betraktelig lavere DHA-gjenvinning, spesielt dersom reaksjonen overskred 50% omdanning. Resultatene av etanolysereaksjonen for AO (18/12) med 2 ekvivalenter etanol i nærvær av PSL og PFL ved romtemperatur er vist i tabell 16. For PFL, etter kun 44% omdanning av sardinoljeheksylesterle i løpet av 24 timer, ble innholdet av 28% EPA og 21% DHA oppnådd, mens 57% omdanning for PSL i løpet av 24 timer ga 33% EPA og 17% DHA

20

Tabell 17. Resultatene fra etanolysereaksjonen av AO-heksylestere (18/12) og etanol med PFL og PSL ved romtemperatur.

Prøve	Omdanning (mol%)	FA sammens. (HE)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
PFL	44	21	28	81	89
PSL	57	17	33	53	79

5 Den nye Novozyme-lipase (TLL), immobilisert på granulær silikagel, ble sammenlignet med MML. Den nye lipase ble funnet å være sensitive i forhold til etanol og aktiviteten sank hurtig med økt temperatur. Ved 20°C var begge lipasene aktive og i løpet av 24 timer ble 54% omdanning oppnådd for MML, men kun 43% for TLL. De gjenværende heksylestere av TO, som omfattet 6% EPA og 28% DHA (6/28), fra

10 TLL-reaksjonen inneholdt 8% EPA og 45% DHA. MML-reaksjonen resulterte i gjenværende heksylestere med 7% EPA og 54% DHA (tabell 18). Disse lipasene er åpenbart like når det gjelder fettsyreselektivitet, men TLL er mer følsom for etanolkonsentrasjon, hvilket gjør at den er dårlige enn MML.

15 **Tabell 18.** Resultatene fra etanolysereaksjonen av TO-heksylester (6/28) og etanol med MML og TLL ved romtemperatur.

Prøve	Omdanning (mol%)	FA sammens. (HE)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
MML	54	54	7	89	54
TLL	42	45	8	93	77

Resultatene fra etanolysen av TO-heksylestere (6/28) og etanol ved 40°C er vist i tabell

20 19. Det er interessant å observere at ved 40°C ble kun 15% omdanning oppnådd for TLL og 47% omdanning for MML. Det antas at lipase blir mer følsom for det polare etanolet og dets skadelige effekter ved høyere temperatur. For MML, etter 47% omdanning i løpet av 24 timer, omfatter heksylestere 9% EPA og 49% DHA, mens kun 15% omdanning for TLL i løpet av 24 timer ga 33% EPA og 17% DHA.

Tabell 19. Resultatene fra etanolysereaksjonen av TO-heksylestere (6/28) og etanol med MML og TLL ved 40°C.

Prøve	Omdanning (mol%)	FA sammens. (HE)		Gjenvinning	
		DHA%	EPA%	DHA%	EPA%
MML	47	49	9	93	79
TLL	15	30	7	97	95

- 5 Ved den foreliggende oppfinnelsen er separasjon av EPA og DHA ved løsningsmiddelfri direkte forestring av fiskeoljefrie fettsyrer eller fiskeoljehexylestere og etanol i nærvær av en lipase oppnådd på en vellykket måte. Problemene med monoglycerider i destillatet unngås ved fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

P a t e n t k r a v

1.
Fremgangsmåte for å separere en etyl- eller metylesterfraksjon som er anrikt med EPA
5 (eikosapentaensyre, C20:5) og en fri fettsyrefraksjon som er anrikt med DHA
(dokosaheksaensyre, C22:6),
som oppnås ved direkteforestring av frie fettsyrer fra fiskeolje med etanol eller metanol
ved å benytte lipase, ved kortveisdestillasjon.
- 10 2.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, der utgangsmaterialet for frie fettsyrer fra fiskeolje
oppnås ved lipasekatalysert alkoholyse av triglycider fra fiskeolje, påfølgende
kortveisdestillasjon og hydrolyse av de gjenværende glyceridblandingen.
- 15 3.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, der molarforholdet av metanol eller etanol til frie
fettsyrer i utgangsmaterialet er fra 0.5 til 10.0.
4.
20 Fremgangsmåte ifølge krav 3, der molarforholdet er fra 0.5 til 3.0.
5.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, der molarforholdet er fra 1.0 til 2.0.
- 25 6.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, der molarforholdet er fra 0.5 til 1.5.
7.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, der den nevnte lipasen katalyserer alkoholyse av DHA
30 ved en mye lavere hastighet enn den tilsvarende alkoholyse av EPA.
8.
Fremgangsmåte ifølge krav 7, der den nevnte lipasekatalysatoren er *Rhizomucor miehei*
lipase (MML) eller *Thermomyces lanuginosa* lipase (TLL).

9.

Fremgangsmåte for å forestre en marin oljesammensetning som inneholder EPA og DHA, som Cn alkylestere av fettsyrer ($n = 2-18$) for å danne

(1): en Cn alkylester-fettsyrefraksjon ($n = 2-18$) anrikt med DHA i forhold til

5 utgangsmaterialet og en Cm alkylester-fettsyrefraksjon ($m = 1-12; n > m$) anrikt med EPA i forhold til utgangsmaterialet, eller

(2): en Cn alkylester-fettsyrefraksjon ($n = 2-18$) anrikt med både DHA og EPA i forhold til utgangsmaterialet og en Cm alkylester-fettsyrefraksjon ($m = 1-12; n > m$) med både lavere DHA og EPA i forhold til utgangsmaterialet,

10 som omfatter trinnet med å reagere den nevnte marine oljesammensetningen med en Cm alkohol ($m = 1-12; n > m$) i nærvær av en lipasekatalysator under hovedsakelig organisk løsningsmiddelfrie betingelser, og å separere fraksjonene ved kortveidestillasjon.

10.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 9, der utgangsmaterialet, C2-C18 alkylester, oppnås ved lipasekatalysert alkoholyse av triglycerider fra fiskeolje, påfølgende kortveidestillasjon og alkoholyse av den gjenværende glyceridblandingen med en C2-C18 alkylalkohol.

11.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 9 og 10, der C2-C18 alkylesteren er heksylester.

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, der C1-C12 alkoholen er etanol.

25 13.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, der den nevnte lipasekatalysatoren er Rhizomucor miehei lipase (MML), Thermomyces lanuginosa lipase (TLL), Pseudomonas sp. lipase (PSL) eller Pseudomonas fluorescens lipase (PFL).

30 14.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, der molarforholdet av C1-C12 alkohol til C2-C18 alkylester er fra 0.5 til 10.0.

15.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 14, der molarforholdet er fra 0.5 til 3.0.

16.

Fremgangsmåte ifølge krav 14, der molarforholdet er fra 2.0 til 3.0.

17.

- 5 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der forestringsreaksjonen utføres ved en temperatur på 0 °C til 70 °C.

18.

- 10 Fremgangsmåte ifølge krav 17, der forestringsreaksjonen utføres ved en temperatur på 20 °C til 40 °C.

19.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der den nevnte lipasekatalysatoren er immobilisert på en bærer.

15