

2440/96

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás olajok finomítására
NORSK HYDRO A.S, Oslo, NO

76707

KIVONAT

A találmány szerinti eljárás telített és telítetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozíció kezelése útján többszörösen telítetlen zsírsavakat nagyobb koncentrációban tartalmazó finomított termék előállítására szolgál. Az eljárás során

a) az olajkompozíciót lényegileg vízmentes körülmények között 1-6 szénatomos alkohollal, elsődlegesen telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezik, ahol a jelen lévő trigliceridre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használnak, és

b) a lipázzal katalizált átészterezési reakcióban kapott telített és telítetlen zsírsav-észtereket tartalmazó frakciótól többszörösen telítetlen zsírsavak gliceridjeiben dúsított frakciót választanak el.

A találmány szerinti eljárás egyes változatai alkalmasak olajkompozícióból környezetszennyező anyagok eltávolítására.

(1. ábra)

Hell.

2440/96

16290

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás olajok finomítására

NORSK HYDRO A.S, Oslo, NO

Feltalálók:

BREIVIK Harald

Skjelsvik, NO

HARALDSSON Gudmundur

Reykjavik, IS

A bejelentés napja:

1995. 03. 07.

Elsőbbsége:

1994. 03. 08. (9404483.1, GB)

A nemzetközi bejelentés száma:

PCT/NO95/00050

A nemzetközi közrebocsátás száma:

WO 95/24459



A találmány telített és telítetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozíció kezelése útján többszörösen telítetlen zsírsavakat nagyobb koncentrációban tartalmazó finomított termék új előállítási eljárására vonatkozik. A találmány előnyös változatai különösen halolaj-kompozícióban ejkozapentánsav és dokozahexánsav koncentrációjának növelésére vonatkoznak.

A leírásban a többszörösen telített zsírsavakat olyan rendszerben azonosítjuk, amelyben az ω - vagy n-számok az első kettős kötés helyét a láncvégi metilcsoporttól számítva adják meg, azaz egy ω -3 vagy n-3 típusú zsírsavban az első kettős kötés a sav láncvégi metilcsoportjától számított harmadik szénatomnál fordul elő. Egy C18:3 jelzéssel azonosított zsírsav továbbá a szénláncban 18 szénatomot és három kettős kötet tartalmazó zsírsavat jelent.

Ipari szempontból fontos többszörösen telítetlen zsírsavak az EPA (ejkozapentánsav, C20:5), a DHA (dokozahexánsav, C22:6) és az AA (arachidonsav, C20:4). E savak IUPAC rendszer szerinti teljes elnevezése a következő

- EPA - cisz-5,8,11,14,17-ejkozapentánsav,
- DHA - cisz-4,7,10,13,16,19-dokozahexánsav és
- AA - cisz-5,8,11,14-ejkozatetraénsav.

Ismeretes, hogy az EPA és DHA fontossága különösen a gyógyszeripar és az élelmiszerkiegészítőket gyártó ipar számára fokozatosan növekszik. Ezek a savak viszonylag nagy koncentrációkban található bizonyos tengeri állatokból előállított olajokban, azonban számos célra szükséges ezeknek az olajoknak a finomítása az EPA és/vagy DHA koncentrációjának



megfelelő növelésére vagy a nyers olajban természetesen előforduló bizonyos más anyagok eltávolítására vagy koncentrációjuk csökkentésére. Így gyógyszerek és élelmiszerek esetén szükség van a tengeri állatokból előállított olajokban szokásosan előforduló peszticidmaradványok lényegileg teljes eltávolítására még azoknak a halaknak az esetén is, amelyeket intenzíven művelt területektől egészen távol eső tengerekben fognak ki.

Természetes előfordulási állapotuknak megfelelően az EPA és DHA szerkezetében teljes cisz(Z-Z) konfigurációra van szükség ahhoz, hogy biológiai aktivitásuk toxikusság nélkül érvényesüljön. Ezek a savak azonban hevítés során rendkívül „törékenyek”, és nagyon könnyen gyors oligomerizálási, izomerizálási és peroxidációs reakciókban vesznek részt. Ennek megfelelően tengeri állatokból előállított, EPA- és DHA-tartalmú olajkompozíciók tisztítása rendkívül bonyolult annak veszélye nélkül, hogy ezeket a kívánt savakat hasznos formájukban elveszítsük.

A tengeri állatokból előállított olajokban az EPA és DHA főleg trigliceridjeik alakjában fordul elő. Az eddig alkalmazott legtöbb finomítási eljárás kezdetén vagy kis molekulatömegű alkohollal (szokásosan etanollal) észterezik az olajat, vagy az olajat szabad savakká vagy sóikká hidrolizálják, majd ezt követően a kívánt termék kinyerésére szakaszos lepárlást folytatnak le.

A tengeri állatokból előállított nyersanyagok bonyolult összetétele következtében azonban egyetlen szakaszos lepárlási eljárással nem könnyű többszörösen telítetlen zsírsavszárma-



zékokat nagy tisztaságú alakban előállítani. Ezért szokásosan eljárások kombinációját alkalmazzák, ahol az egyes esetekben megválasztott kombináció a nyersanyag összetételétől és koncentrációjától, valamint a termék szempontjából kívánatos minőségi kritériumoktól függ. Nagy EPA- és/vagy DHA-koncentrációjú készítmények előállítására szokásosan alkalmazott eljárásokban az egyik elválasztási módszer komplexek képzése karbamiddal.

A karbamid egyik hasznos tulajdonsága, hogy egyenes láncú szerves vegyületekkel szilárd komplexeket alkot. Ha tengeri állatokból előállított, zsírsavakat vagy -észtereket tartalmazó olajkompozíciót karbamidoldathoz adunk, a legkevésbé telítetlen savakkal kristályos komplex képződik. A kristályokat elválasztva telítetlenebb zsírsavak vagy zsírsav-észterek finomított terméke marad vissza.

A karbamiddal lefolytatott komplexképzést alkalmazzák mind szabad zsírsavak, mind zsírsavak metil- vagy etil-észterei esetén. Az eljárás lefolytatható folyamatos üzemmódban a karbamidkiválás reaktoraként kapart felületű hőcserélők használatával. Észterek szakaszos elválasztása esetén a szokásos eljárás szerint először az olajat alkohollal és/vagy alkohol/víz eleggyel reagáltatják, majd a karbamiddal lefolytatott komplexképzés előtt az észtereket és szabad zsírsavakat elválasztják. *In situ* észterezés és karbamiddal való elválasztás együttesen is lefolytatható (EP A 0 255 824).

Ha egy ilyen, a fentiekben vázolt eljárást többek között két vagy több lépésben lefolytatott molekuláris desztillációval kombinálnak, tengeri állatokból előállított nyers olajból előállít-

ható olyan finomított termék, amely legalább 85 tömeg% n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakat, főleg EPA és DHA komponenseket tartalmaz. A finomított termékre vonatkozó bruttó kinyerés azonban nemkívánt módon csekély. Ilyen hagyományos elválasztási műveleteket alkalmazó jellegzetes ipari eljárásban 1000 t tengeri állatokból előállított nyers olajból csak 60-80 t 85 tömeg%-os n-3 típusú zsírsavkoncentrátum várható, azaz a kinyerés csak 6-8%-os. Az ilyen csekély kitermelés nemcsak azt jelenti, hogy az ilyen finomítási eljárások nagyon költségesek, hanem azt is, hogy ezek az eljárások nagy méretű, bonyolult berendezéseket igényelnek.

Számos környezetszennyező anyag (így peszticidek és klóratommal többszörösen helyettesített bifenilek) lipofil jellege következtében ezek a vegyületek tengeri eredetű lipidekben felhalmozódnak. A karbamid számos ilyen szennyező anyaggal kedvezőtlen módon nem képez komplexeket, ennek eredményeként a karbamiddal lefolytatott komplexképzés útján kapott koncentrátum a tengeri állatokból előállított eredeti olajhoz viszonyítva peszticideket és egyéb környezetszennyező anyagokat megnövekedett - számos célra elfogadhatatlanul nagy - mértékben tartalmaz. Ennek következtében a karbamiddal lefolytatott komplexképzésen alapuló jelenlegi finomítási eljárások bonyolult és költséges tisztítási műveleteket igényelnek a szennyező anyagok elfogadható koncentrációra csökkentése céljából olyan esetekben, ha emberi fogyasztásra szánt finomított halolaj előállítására szolgálnak.

A találmány célja javított eljárás kidolgozása olajkompozíciók többszörösen telítetlen zsírsavtartalmának növelésére,

közelebbről olyan eljárás kidolgozása, amely ipari eljárásként alkalmas halolajból megnövelt kitermeléssel EPA és/vagy DHA kinyerésére.

Ismeretes, hogy lipázok katalizátorként alkalmasak olyan eljárásokhoz, amelyekkel tengeri állatokból előállított olajban előforduló, nagy mértékben labilis n-3 típusú, többszörösen telítetlen zsírsavakat, így EPA és DHA komponenseket kezelnek. Ez a lipázok alacsony hőmérsékleteken is érvényesülő hatásosságának, semleges pH-jának és kíméletes hatásának következménye, ami lehetővé teszi a nemkívánatos mellékreakciók, így a cisz-transz izomerizálódás, kettős kötések migrációja, polimerizálódás, oxidálódás és hasonlók minimális sebességben tartását. A lipázok alkalmazása tengeri állatokból előállított olajban lévő zsírsavak hidrolizálására ezért a szakirodalomban kellő részletességgel tárgyalva van.

Beszámoltak arról, hogy tőkehal beléiből kinyert lipáz a kapelinolajban trigliceridekként jelen lévő 18:4, 20:5 és 22:6 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakat hidrolizálta elsődlegesen [Lie és Lambertsen: *Comp. Biochem Physiol.* **80B**, (3), 447-450, (1985)]. Az ismertetés szerint ez a specifikus jelleg különösen a 20:5 típusú sav, azaz EPA esetében érvényesült.

Azt is megállapították, hogy a kapelinolajban trigliceridekként jelen lévő 14-18 szénatomos telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak kitüntetett hidrolizálásához vezetett a *Candida cylindracea* lipáz, míg a hosszú szénláncú egyszeresen telítetlen C20:1 és C22:1 típusú zsírsavak, és különösen a többszörösen telítetlen zsírsavak, így a C18:4 és kisebb mértékben az

EPA és DHA a hidrolízis szempontjából rezisztens volt [Lie és Lambertsen: *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **88**, 365 (1986)].

Többszörösen telítetlen zsírsavak koncentrátumainak előállítására ismertettek olyan eljárást, amely lipázok telített és telítetlen savakra vonatkozóan hasonló eltérő hatásán alapszik (JP 59-14 793). Különböző (*Candida cylindracea*, *Aspergillus rhizopus* és *Mucor miehei*) lipázokkal tengeri állatokból származó vegyes olajokban, így szardíniaolajban és makrélaolajban lévő etil-észtereket hidrolizáltattak. A hidrolizált zsírsavak elválasztását követően lefolytatott szelektív hidrolízis során kapott etil-észter-koncentrátumokban az EPA- és DHA-tartalom 25 tömeg%-ig, illetve 17 tömeg%-ig terjedt.

Tengeri állatokból előállított olaj hidrolízisére ismertettek *Candida sp.* lipázon alapuló eljárást is (JP 172 691). Az EPA-t vagy észterét szabad zsírsavkomponensből, a DHA-t vagy észterét a visszamaradó gliceridkomponensből nyerték ki. Az eljárás során lefolytatott műveletek a következők: a zsírsav- és gliceridkomponensek elválasztása, észterezés rövid szénláncú alkilcsoporttal, többszörösen telítetlen zsírsavak betöményítése karbamiddal lefolytatott komplexképzés útján és további finomítás molekuláris desztilláció, szuperkritikus CO₂ közeggel lefolytatott folyadékfázisú extrakció vagy folyadékkromatográfia alkalmazásával. EPA és DHA elválasztására fordított eljáráson alapuló módszert is ismertettek *Mucor miehei* lipáz alkalmazásával [Takagi: *Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 488 (1988)].

Japán szardíniaolajból a karbamidadalékot alkalmazó eljárással kapott többszörösen telítetlen zsírsav-koncentrátumokat szobahőmérsékleten n-hexán közegben metanollal észterezték.

A lipáz EPA és DHA tekintetében eltérő viselkedése folytán lejátszódó szelektív észterezés 51 tömeg% EPA- és 6 tömeg% DHA-tartalmú, EPA komponensben dúsított metil-észter koncentrátumot, valamint 52 tömeg% DHA- és 12 tömeg% EPA-tartalmú, DHA komponensben dús szabad zsírsav-koncentrátumot eredményezett 59:41 tömegarányban.

Újabban különböző lipázokat alkalmaztak csukamájolaj és finomított szardíniaolaj szelektív hidrolízisére [Agric. Biol. Chem. 54, 1459, (1990)]. A legjobb eredményeket a nem régió-specifikus *Candida cylindracea* és az 1,3-specifikus *Aspergillus niger* lipázok esetén kapták, azonban a gliceridtermékek EPA-tartalmát egyik lipáz sem növelte szignifikáns módon.

A technika állásából a lipázok tengeri állatokból előállított olajok zsírsav-észtereinek hidrolízisére történő alkalmazásából kitűnik, hogy a különböző lipázok eltérően viselkednek, valamint az egyik és másik zsírsav vagy az egyik típusú és a másik típusú zsírsav egészen eltérő szelektivitása gyakran a lipázok tulajdonságainak következménye.

Bizonyos lipázoknak ezt a szubsztrátumra vonatkozó szelektivitását használták ki n-3 típusú többszörösen telített zsírsavakban dús frakció előállítására csukamájolaj lipázzal katalizált alkoholízise útján [Zuyi és Ward: Enzyme Microb. Technol., 15, 601-606 (1993)]. Kilenc vizsgált lipáz közül a *Pseudomonas* sp. lipáz (CES, gyártó cég: Amano International Enzyme Co.) hatására a halolaj alkoholízise nagyobb sebességgel játszódott le, mint a többi lipáz jelenlétében, ennek következtében az EPA és DHA komponensekben jelentősen dúsított monoglicerideket állítottak elő. Ebben az ismert eljárásban az alkohol rea-

gens és egyúttal a reakcióközeg oldószere is volt (az eljárásban etanolt és izopropanolt alkalmaztak).

A fenti közlemény szerzői tanulmányozták a reakcióelegyben lévő vízkoncentráció hatását. Megállapították, hogy a 0-7,5 térfogat% víztartalom-tartományban a CES lipáz jelenlétében (izopropanollal) lefolytatott alkoholízis sebessége nő. A közölt adatok azt mutatják, hogy 5 térfogat% víztartalom optimális, és akár 2,5 térfogat% víztartalom esetén az olajban eredetileg jelen lévő trigliceridek több mint 40%-a 12 óra múlva is reagálatlan marad. (A víztartalomra vonatkozó fenti adatok a reakcióelegyhez hozzáadott vízre vonatkoznak, figyelmen kívül hagyva a halolajban és a „száraz” enzimben jelen lévő kis mennyiségű vizet.) Következésképpen a triglicerid szabad zsírsavvá hidrolízise nagyon jelentős volt (jellemzően meghaladta a 30%-ot), így 5 térfogat% víztartalom esetén a hidrolízis foka 18,9% volt (az alkoholízis csupán 15,5%-os mértékéhez hasonlítva).

A fenti eljárás tudományos értéke kétségtelen, azonban nem eredményezett javított eljárást tisztított EPA/DHA kompozíciók ipari előállítására. Közelebbről a lipázzal katalizált termékben jelentős mennyiségű szabad zsírsav elkerülhetetlen jelenléte megnehezíti a kívánt n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavak későbbi tisztítását. Így a szabad zsírsavak kis illékonyságuk következtében nem választhatók el a gliceridektől szokásos molekuláris desztillációs eljárásokkal. Ezenkívül - minthogy az észterek és a szabad zsírsavak polaritása lényegesen különböző, míg a mono- és digliceridek közbülső polaritásúak - az észterek és a szabad zsírsavak nem választhatók

el a gliceridektől extrakcióval. Az alábbiakban ismertettek szerint a találmány ezzel szemben előnyösen használhatja a molekuláris desztillációs eljárást nem csak többszörösen telítetlen zsírsav-gliceridek telített és egyszeresen telítetlen zsírsav-észterektől való elválasztására, hanem egyidejűleg arra is, hogy környezetszennyező anyagokat, így peszticideket és klórral többszörösen helyettesített bifenileket eltávolítsunk a kívánt többszörösen telítetlen zsírsav-glicerid frakcióból.

Váratlan módon azt állapítottuk meg, hogy - a találmánynak megfelelően - bizonyos lipázok, közöttük a *Pseudomonas sp.* lényegileg vízmentes reakciókörülmények között alkalmazhatók tengeri állatokból előállított olajban lévő trigliceridekben a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak észtercsoportjának szelektív átészterezésére. Megállapítottuk, hogy az ilyen átészterezés lényeges mértékű hidrolízis nélkül az érzékenyebb telített zsírsavak monoésztereinek elegyéhez vezet, és a visszamaradó n-3 típusú többszörösen telítetlen hosszú szénláncú zsírsavak a glicerinhez között állapotban maradnak észter alakjában, a konverzió mértékétől függően főleg mono- és digliceridekként, azonban még trigliceridek is előfordulnak.

A fentiek alapján a találmány eljárás telített és telítetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozíció kezelése útján többszörösen telítetlen zsírsavakat nagyobb koncentrációban tartalmazó finomított termék előállítására. Az eljárás során

a) az olajkompozíciót lényegileg vízmentes körülmények között 1-6 szénatomos alkohollal, elsődlegesen telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizáló lipáz

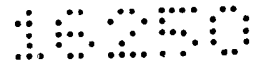
jelenlétében átészterezzük, ahol a jelen lévő trigliceridre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használunk, és

b) a lipázzal katalizált átészterezési reakcióban kapott telített és telítetlen zsírsav-észtereket tartalmazó frakciótól többszörösen telítetlen zsírsavak gliceridjeiben dúsított frakciót választunk el.

A fentiek szerint a találmány szerinti eljárás lipázt alkalmaz, amely a tengeri állatokból előállított olajban lévő telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizálja elsődlegesen. Megállapítottuk, hogy számos lipáz a találmány szerinti átészterezési reakcióban viszonylag csekély aktivitást fejt ki vagy ténylegesen nem aktív, vagy pedig csekély szelektivitást mutat egyrészt telített és egyszeresen telített zsírsavak, másrészt többszörösen telítetlen zsírsavak vonatkozásában. Ez érvényes többek között a következő lipázokra: *Geotrichum candidum* (GCL; Amano GC), *Aspergillus niger* (ANL; Amano A), *Candida rugosa* (CRL; Amano AY), *Chromobactaeirum viscosum* (CVL; Sigma), *Humicula lanuginosa* (HLL; Amano CE), *Rhizopus delemar* (RDL; Amano D), *Rhizopus oryzae* (ROL; Amano F), *Penicillium camembertii* (PCL; Amano G), *Candida lipolytica* (CLL; Amano L), *Mucor javanicus* (MJL; Amano M) és *Rhizopus niveus* (RNL; Amano N). A *Candida antarctica* (CAL; Novo SP435) az átészterezési reakcióban nagyon aktív, a zsírsavak különböző osztályai között azonban csekély szelektivitást mutat vagy egyáltalán nem szelektív, ezért a találmány szempontjából alkalmatlan.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazhatónak talált lipázok többek között a *Mucor miehei* lipáz (MML, Novo Lipozyme), amely jó átészterezési aktivitást, valamint elfogadható szelektivitást mutat a többszörösen telítetlen zsírsavak és a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak vonatkozásában; *Candida cylindracea* (CCL, Sigma) és *Penicillium roquefortii* (PRL, Amano R) lipázok, amelyek kielégítő szelektivitást mutatnak, bár aktivitásuk csekélyebb, mint néhány más lipázé; továbbá a *Pseudomonas fluorescens* (PFL, Amano PS) és *Pseudomonas sp.* (PSL, Amano AK) lipázok, amelyeknek aktivitása és szelektivitása egyaránt jó, ezért gyakran előnyösen használhatók a találmány megvalósításához.

A lipáz hordozóanyagon történő immobilizálása számos előnnyel járhat. Így az immobilizálás a lipázoknak nagyobb stabilitást kölcsönöz, ezért tovább használhatók. Az immobilizálás megkönnyíti visszanyerésüket és lehetővé teszi ismételt felhasználásukat, ami jelentősen csökkenti a lipázok költségét. Az észterezési reakciók is könnyebben befolyásolhatók, ha immobilizált enzimet használunk, és a lipáz folyamatos eljárások iránt érzékenyebbé válhat, ami alapvető fontosságú lehet enzimatikus ipari eljárások szempontjából. Az immobilizálás olykor javítja az enzimek alkalmasságát. Végül a lipáz diszperziója a hordozó felületén biztosítja a lipáz szubsztrátumokkal való érintkezését, ami lényegesen megnöveli az enzim tömegegységre vonatkoztatott aktivitását, jelentősen csökkentve ezáltal az adagolt enzim mennyiségét és az ezzel járó költségeket.



Ha az EPA és DHA komponensekben egyaránt dúsított finomított halolaj-kompozíció előállítása kívánatos, akkor előnyös olyan lipáz alkalmazása, amely e két n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakra nézve lényegileg inaktív, azaz amely lényegében nem tesz különbséget az EPA és DHA között. Ilyen esetben előnyösen a *Pseudomonas fluorescens* és *Pseudomonas sp.* lipázokat alkalmazzuk, amelyek közül az utóbbi különösen előnyös. E lipázok beszerzési forrása: Amano International Enzyme Co., Nagoya, Japan.

A találmány kritikus jellemzője, hogy a lipázzal katalizált átészterezést lényegében vízmentes reakciókörülmények között kell lefolytatni. A reakcióelegy teljes víztartalma - az összes forrásból, beleértve a tengeri állatokból előállított olajat és a lipázt - előnyösen legfeljebb 1 tömeg%, előnyösebben legfeljebb 0,5 tömeg%, legelőnyösebben 0,01-0,25 tömeg%. (Jellemző esetben a tengeri állatokból előállított olaj kiindulási anyag víztartalma 0,1-0,2 tömeg%, a reagensként használt abszolút etanol 0,2-0,5 tömeg% vizet tartalmaz, és a lipázkészítmény víztartalma 2-2,5 tömeg%.)

Teljesen vízmentes reakciókörülmények megvalósítása azonban nem lehetséges, minthogy kis mennyiségű, a lipáz tömegére számítva általában 1-2 tömeg% víz mindig szükséges enzimrendszerekben az aktivitás fenntartására, bár ennek mennyisége nagyon függ a kérdéses enzimtől (a *Candida cylindracea* lipáz így 10 tömeg% víz hozzáadását igényeli ahhoz, hogy a találmány szerinti eljárásban optimális aktivitást fejtsen ki). Amint az alábbi példákban bemutatjuk, ilyen kis mennyiségű víz nem vezet jelentős mértékű hidrolízishez, és

az átészterezett termékben a szabad zsírsavak koncentrációja 3 tömeg%-nál kisebb értéken tartható, azaz a Zuyi és Ward fenti közleményében ismertetett hidrolízis mértékének csak 10%-át teszi ki.

A találmány másik kritikus jellemzője, hogy a jelen lévő alkohol mennyiségét a jelen lévő trigliceridekre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens, előnyösen legfeljebb 9 mólekvalens mennyiségben kell korlátozni (a sztöchiometrikus mennyiség 3 mólekvalens alkohol). Az alkohol így elsődlegesen inkább reagensként szolgál, mint oldószerként. Meglepő, hogy a tengeri állatokból előállított olaj trigliceridjeinek lipázzal katalizált szelektív átészterzése ilyen eredményesen lefolytatható lényegében oldószermentes reakcióelegyben. Előnyösen lényegében sztöchiometrikus mennyiségű, azaz a jelen lévő trigliceridekre vonatkoztatva 2-5 mólekvalens mennyiségű alkoholt használunk, minthogy a sztöchiometrikus mennyiséghez képest nagy alkoholfelesleg a kívánt többszörösen telítetlen zsírsavak kisebb mértékű kinyerését eredményezi.

Jóllehet bármilyen 1-6 szénatomos alkoholt használhatunk, előnyösen abszolút (jellemzően 0,1-0,5 tömeg% víztartalmú) etanolt használunk a hozzáférhetőség és költségek okán, a lényegében vízmentes reakciókörülmények követelményét is szem előtt tartva.

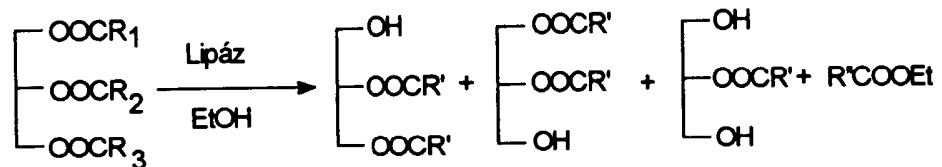
Az átészterezési reakció lefolytatásának hőmérséklete nem kritikus. Megállapítottuk azonban, hogy a reakció szelektivitása növekvő hőmérséklettel csökken, bár a reakciósebesség nő. A reakciót előnyösen általában 40-60 °C-ig terjedő hőmérsékle-

ten folytatjuk le az alkalmazott lipáztól függően, a reakciót még előnyösebben szobahőmérsékleten (20 °C körül) folytatjuk le.

Az átészterezést lefolytathatjuk oly módon, hogy reakcióközegként szuperkritikus folyadékokat, így szuperkritikus CO₂-ot használunk. Halolaj etanolízisét lefolytattuk szuperkritikus CO₂-ban 250 bar nyomáson 40 °C hőmérsékleten. A szuperkritikus CO₂ folyadék nem csak reakcióközegként használható, hanem az észterek és szabad zsírsavak maradék gliceridektől való elválasztására is.

Tengeri állatokból előállított olaj trigliceridjeinek találmány szerinti, lipázzal katalizált átészterezését sematikusán a következő, egyszerűsített reakcióegyenlettel szemléltethetjük, ahol 1-6 szénatomos alkoholként etanolt alkalmazunk.

a) reakciólépés



A fenti reakciólépésben

R₁, R₂ és R₃ jelöli az eredeti kompozícióban trigliceridek alakjában jelen lévő vegyes (telített, egyszeresen telítetlen és többszörösen telítetlen) zsírsavakat,

R' jelöli a n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakat, és

R'' jelöli a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat.

(Az egyszerűség kedvéért a reakciótermékek között csak 1,2- és 2,3-diglicerideket, valamint 2-monoglicerideket tüntettünk fel.)



Az etil-észter-frakciót alkalmasan molekuláris desztilláció útján választjuk el a gliceridfrakciótól, ahol a viszonylag illékony etil-észtereket könnyen eltávolíthatjuk a kevésbé illékony maradék gliceridelegytől. Minthogy az átészterezési reakció terméke - a lényegében vízmentes reakciókörülmények következtében - csak kis mennyiségű szabad zsírsavakat tartalmaz, a molekuláris desztillációt követően visszamaradó frakció a nemkívánatos telített és egyszeresen telítetlen zsírsavaktól lényegében mentes. Azonban még a molekuláris desztilláció művelete után is megjelenhet a desztillátumban a leginkább illékony monogliceridek kis része, amelyek főleg viszonylag rövid láncú zsírsav-észterek monogliceridjei (azaz a desztillátumba EPA vagy DHA nem jut be veszteséggént vagy csak nagyon csekély mértékben). Ennek megfelelően a kívánt, az átészterezésben részt vett többszörösen telítetlen zsírsavak viszonylag kis mennyisége marad a desztillációt követően a visszamaradó frakcióban. Ezért - bár a molekuláris desztillációt általában nem tekintik alkalmasnak bonyolult elválasztásokhoz - a találmány szerinti eljárásban meglepően előnyösnek bizonyult.

Minthogy a környezetszennyező anyagok így peszticidek és többszörösen klórozott bifenilek (PCB) illékonyabbak, mint hosszú szénláncú zsírsavak gliceridjei, a molekuláris desztilláció során ezek a vegyületek eltávoznak a gliceridfrakcióból, miközben a desztillátumban (észterfrakcióban) feldúsulnak. Ez további előnye a molekuláris desztilláció találmány szerinti eljárásban való használatának.

A fentiek alapján a találmány továbbá eljárás környezetszennyező anyagok eltávolítására telített és többszörösen telít-



tetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozícióból. Az eljárás során

a) az olajkompozíciót lényegileg vízmentes körülmények között 1-6 szénatomos alkohollal, elsődlegesen a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezzük, ahol a jelen lévő trigliceridekre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használunk, és

b) az a) lépésben kapott terméket egy vagy több lépésben lefolytatott molekuláris desztillációval kezeljük, és környezetszennyező anyagoktól lényegileg megtisztított, többszörösen telítetlen zsírsavak gliceridjeiben dúsított frakciót nyerünk ki.

A találmány szerinti eljárás különösen alkalmas tengeri eredetű nyersanyagoktól 40 tömeg%-ot, előnyösen 70 tömeg%-ot meghaladó EPA- és DHA-koncentrációjú kompozíciók előállítására. Minthogy a lipázzal katalizált átészterezés terméke tartalmazza a nemkívánatos telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat - (etil-alkohol használata esetén) inkább etil-észterek alakjában mint szabad savakként (a többszörösen telítetlen zsírsavak lényegében gliceridek alakjában maradnak) - a telített zsírsav-frakciót viszonylag kíméletes molekuláris desztilláció útján eltávolíthatjuk, ami a kívánt többszörösen telítetlen zsírsavkomponens viszonylag csekély veszteségével jár. Ugyanakkor a viszonylag illékony környezetszennyező anyagok, így a peszticidek és klóratommal többszörösen helyettesített bifenilek a fentiek szerint az etil-észter-frakcióval távoznak. EPA/DHA-koncentrátumok előállítására szokásos hagyo-

mányos eljárásokkal összehasonlítva a találmány szerinti eljárás - különösen az előnyös változatokban - ezáltal lényeges előnyökkel jár, amelyek közül a következőket említjük:

i) az oldószermentesség jelentősen csökkenti a reakcióelegy volumenét, amit fokoz az a körülmény, hogy elegendő csak sztöchiometrikus mennyiségű alkoholt használni,

ii) az átészterezési reakciót lefolytathatjuk kíméletes körülmények között, így szobahőmérsékleten, ami minimális mértékűre csökkenti a mellékreakciókat, továbbá nem igényel nagy energiaráfordítást,

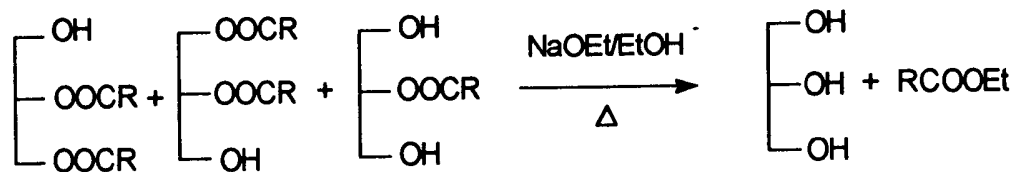
iii) az EPA és DHA komponensek kinyerése nagyon nagy mértékű, továbbá a kinyert termék lényegében mentes környezetszennyező anyagok okozta szennyeződésektől, és

iv) a használt, lényegében vízmentes reakciókörülmények következtében a hidrolízis minimális mértékű, ezáltal az átészterezés reakcióelegyéből a gliceridfrakció molekuláris desztillációja által jól elválaszthatók a kívánt többszörösen telítetlen zsírsavak a nemkívánatos telített és egyszeresen telítetlen zsírsavaktól.

A találmány szerinti eljárásban ismertetett alkoholízis ezért lehet EPA+DHA koncentrátum előállítására irányuló integrált termelési eljárás kezdeti szakasza. Egy ilyen integrált eljárásban a molekuláris desztillációt vagy egyéb műveletet követően a telített zsírsav-etil-észter-frakciónak a többszörösen telítetlen zsírsav-glicerid-frakciótól történő elválasztására a kívánt többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó utóbbi frakciót a jelen lévő meghatározott savak koncentrációjának növelésére tovább kezelhetjük. Ha nagy koncentrációjú



EPA+DHA komponenseket tartalmazó etil-észter kompozíció előállítása a cél, akkor a molekuláris desztillációt követően kapott gliceridfrakciót észterezhetjük többek között katalitikus mennyiségű nátrium-etoxid vagy kálium-etoxid jelenlétében abszolút etanollal lefolytatott kémiai átészterezés útján. Ezt az eljárást sematikusan a következő reakcióegyenlet szemlélteti:



(az egyszerűsítés érdekében a fenti reakcióegyenletben csak 1,2- és 2,3-diglicerideket, valamint 2-monoglicerideket tüntetünk fel).

A termelt glicerint ezután ismert eljárásokat használva eltávolíthatjuk. Ez az eljárás jellemző módon 45-50 tömeg% EPA+DHA-tartalomhoz vezet, ahol - hagyományos eljáráshoz hasonlítva - a többszörösen telítetlen zsírsavak kitermelése nagyon jó.

A fentiek alapján a találmány még előnyösebben integrált eljárás összesen legalább 40 tömeg% ejkozapentánsavat és dokozahexánsavat tartalmazó kompozíció előállítására. Az eljárás során továbbá

c) a b) lépésben kapott frakciót csak az átészterezés katalizálásához elegendő mennyiségű bázist, így nátrium- vagy kálium-etoxidot tartalmazó lúgos közegben kémiai katalízis vagy lipázt, így *Candida antarctica* lipázt alkalmazó, lényegileg vízmentes körülmények között lefolytatott enzimatis katalízis útján rövid szénláncú alkohollal, így etanollal átészterezzük,

d) a kapott alkil-észtert alkanolban karbamid feleslegével 55-99 °C hőmérsékletre hevítjük,

e) a d) lépésben kapott terméket (többek között 0-25 °C hőmérsékletre) hűtve karbamid/zsírsav-alkil-észter adduktumot csapatunk ki, majd az adduktumot elválasztjuk a főleg n-3 típusú zsírsav-észtereket tartalmazó oldattól,

f) az e) lépésben visszamaradó oldatból az n-3 típusú zsírsav-észtereket elválasztjuk, és

g) az f) lépésben kapott elegyet oldószermentesítjük.

Ezen integrált eljárás különösen előnyös változatában a kapott koncentrátumot a g) lépésben tovább töményítjük egy vagy több, így kilenc lépésben lefolytatott molekuláris desztillációval az (EPA+DHA) komponensek koncentrációjának legalább 85 tömeg%-ig történő növelésére.

A csatolt rajzok közül az 1. ábra ilyen, találmány szerinti integrált termelési eljárást szemléltet sematikusán 85 tömeg% EPA+DHA-etil-észter koncentrátum előállítására.

A gliceridfrakció kémiai átészterezésének, így etanollal katalitikus mennyiségű nátrium- vagy kálium-etoxid jelenlétében lefolytatott művelet helyett ezt az átészterezést lefolytathatjuk enzimatis úton, így *Candida antarctica* lipázt használva. Ez a lipáz n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakkal, valamint egyéb zsírsavakkal szemben nagy aktivitást mutat, és a gliceridfrakció átészterezésére enyhe reakciókörülmények között és oldószer nélkül nagyon hatásosan alkalmazható, ezáltal a reakcióelegy volumene tovább csökkenthető.

Bizonyos esetekben kívánatos lehet lényegében tisztán egyetlen telítetlen zsírsav izolálása a tengeri állatokból előállí-

tott kiindulási olajkompozícióból. Ilyen eljárást szemléltet szematikusan a 2. ábra külön-külön lényegében 100%-os EPA és 100%-os DHA előállítására. A találmány szerinti eljárásnak ez a változata nem csak *Pseudomonas* lipázt (PSL) alkalmaz telített és telítetlen zsírsavaknak a találmány kitanítása szerinti kezdeti elválasztására, hanem ezt követő lépésekben *Mucor miehei* lipázt (MML) is - amely szelektív módon inkább az EPA észterezésének kedvez, mint a DHA észterezésének, lehetővé téve ezáltal e két sav jó elválasztását -, valamint *Candida antarctica* lipázt (CAL) az utóbbi lépés során előállított DHA-komponensben dús gliceridelegy etanolízisének lefolytatására.

Közelebbről a találmány szerinti előnyös integrált eljárás lényegében tiszta EPA és lényegében tiszta DHA előállítására a következő lépéseket tartalmazza:

i) a tengeri állatokból előállított kiindulási olajat etanollal átészterezzük PSL alkalmazása mellett a fentiek szerinti, lényegében vízmentes reakciókörülmények között;

ii) a lipázzal katalizált átészterezés termékét molekuláris desztilláció útján kezelve 40-50 tömeg% EPA és DHA komponenseket tartalmazó gliceridfrakciót nyerünk ki;

iii) a ii) lépés során kapott gliceridfrakciót etanollal átészterezzük MML használata mellett a kezdeti átészterezés során alkalmazotthoz hasonló átészterezési reakciókörülmények között (azaz lényegében oldószer és víz nélkül sztöchiometrikus mennyiségű etanolt használva);

iv) a kapott, EPA komponensben dús etil-észter-frakciót és a visszamaradt, DHA komponensben dús gliceridelegyet a

ii) lépéshez hasonló módon molekuláris desztilláció útján kezeljük;

v) az EPA-etil-észter frakciót többek között karbamiddal lefolytatott kicsapás, kromatográfiás és hasonló eljárásokkal kombinált molekuláris desztilláció útján kezelve lényegileg 100%-os tisztaságú EPA-frakcióvá betöményítjük;

vi) az MML alkalmazásával lefolytatott átészterezés iii) lépésben kinyert, DHA komponensben dús glicerinelegyét etanollal CAL használata mellett átészterezzük; és

vii) a kapott DHA-etil-észter koncentrátumot az v) lépésben használt eljáráshoz hasonló módon feldolgozva lényegileg 100%-os tisztaságú DHA-t kapunk.

Bár a találmány sajátos előnye az, hogy jól alkalmazható nagy EPA- és/vagy DHA-koncentrációjú kompozíciók előállítására szolgáló integrált eljárásokban, megjegyzendő, hogy ugyanezen általános eljárások használhatók tengeri eredetű olajtermékekből egyéb telítetlen zsírsavak, így 18:4 n-3, 20:4 n-3, 21:5 n-3 és 22:5 n-3 típusú zsírsavak izolálására is. A találmány szerinti eljárás alkalmazható egyéb forrásból, így fermentációs termékekből és növényi olajokból származó, többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó olajokhoz is. A növényi olajokra jellemzőek az n-6 típusú többszörösen telítetlen zsírsavak. A fontos n-6 típusú zsírsavakhoz tartoznak többek között az arachidonsav (AA, 20:4 n-6), a biszhomo- γ -linolénsav (BHGLA, 20:3 n-6) és a γ -linolénsav (GLA, 18:3 n-6). Arachidonsavat tartalmazó olajtermékeket iparilag is előállítottak *Mortierella* alkalmazásával lefolytatott fermentálás útján.

Megállapítottuk, hogy a találmány szerinti eljárással könnyen előállíthatók növényi olajokból legalább 40 tömeg% arachidonsavat tartalmazó kompozíciók. Az eljárásban előnyösen alkalmazható lipázok a *Pseudomonas sp.* lipáz és a *Pseudomonas fluorescens* lipáz. Az arachidonsav-tartalmú frakciót tovább töményíthetjük lényegileg 100%-os tisztaságúvá.

A találmány szerinti eljárásban kiindulási anyagként alkalmazott tengeri eredetű olajkompozíció lehet bármilyen halból vagy egyéb tengeri forrásból származó nyers vagy részlegesen kezelt olaj, amely trigliceridek alakjában zsírsavakat, közöttük többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmaz. Az ilyen tengeri eredetű olajban lévő trigliceridmolekulák jellemzően - többé vagy kevésbé véletlenszerű eloszlásban - tartalmaznak különböző zsírsav-észter-származékokat, legyenek azok telítettek, egyszeresen vagy többszörösen telítetlenek, rövid vagy hosszú szénláncúak.

A következőkben a találmányt példákkal szemléltetjük.

1. példa

E kísérlet célja különböző lipázok alkalmazásának vizsgálata olyan eljárásban, amelyben többszörösen telítetlen zsírsavakat, különösen EPA és DHA komponenseket választunk el halolaj-kompozícióban lévő telített és egyszeresen telített zsírsavaktól.



A következő lipázokat tanulmányozzuk:

név	rövidítés	állapot	gyártó cég
<i>Mucor miehei</i>	MML	immobilizált	Novo
<i>Candida antartica</i>	CAL	immobilizált	Novo
<i>Candida cylindracea</i>	CCL	por	Sigma
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PFL	por	Amano
<i>Penicillium roqueforti</i>	PRL	por	Amano
<i>Pseudomonas sp.</i>	PSL	por	Amano

Az egyik vizsgálatban a fenti lipázokat 37 °C hőmérsékleten tanulmányozzuk, az erre vonatkozó eredményeket az I. táblázat foglalja össze. Egy további vizsgálatban a két *Pseudomonas* lipázt (PFL és PSL) vizsgáljuk 20 °C hőmérsékleten, az erre vonatkozó eredményeket a II. és III. táblázat mutatja.

Ezekben a vizsgálatokban a következő eljárás szerint járunk el. A vizsgálatokhoz 14,9 tömeg% EPA- és 9,8 tömeg% DHA-tartalmú halolaj-triglicerideket használunk (gyártó cég: Pronove Biocare a.s., Norvégia). Ezt a kiindulási anyagot szállítási állapotban további kezelés nélkül használjuk. Valamennyi alkalmazott oldószer analitikai tisztaságú (gyártó cég: Merck AG, NSZK). Egyéb utalás hiányában sztöchiometrikus mennyiségű, azaz a trigliceridre vonatkoztatva 3 mólekvivalens (abszolút) etanolt használunk. A reakcióelegyhez - a *Candida cylindracea* lipáz esetétől eltekintve - nem adunk vizet. A halolaj triglicerid kiindulási anyagból és a lipázból származó víz számított mennyisége 0,3-0,4 tömeg%. A *Candida cylindracea* lipáz esetén a lipáz tömegére számítva 10 tömeg% mennyiségű vizet adunk a reakcióelegyhez, ami a reakcióelegy tömegére

vonatkoztatva 0,8 tömeg% koncentrációnak felel meg, azaz még ebben az esetben is lényegileg vízmentes körülményeket alkalmazunk.

A zsírsavakat metil-észterek alakjában elemezzük, ehhez 30 m hosszúságú, DB-225 30N típusú 0,25 mm-es kapilláris oszloppal felszerelt Perkin-Elmer 8140 típusú gázkromatográfot használunk hidrogén vivőgázzal a szakirodalomban ismertetett módon [G. G. Haraldsson és Ö. Almarsson: Acta Chemica Scandinavica, 45, 723-730 (1991)]. A PSL és PFL esetén lefolytatott, a II., illetve III. táblázatban feltüntetett részletes vizsgálatokhoz preparatív vékonyréteg-kromatográfiás eljárást alkalmazunk, ennek során alkalmas időközökben a reakciók előrehaladásának követésére a lipidfrakciókat elválasztjuk a reakcióelegytől. Merck gyártmányú (5721 azonosítási számú) szilikagél lemezeket használunk kloroform és metanol 50:50 térfogatarányú elegyével végzett mosás és 30 percen át 110 °C hőmérsékletre való hevítés után. Eluálószerként petroléter/dietil-éter/ecetsav 80:20:1 térfogatarányú elegyét használjuk. Az egymást követően lekapart sávok megjelenítésére Merck gyártmányú Rhodamine 6G-t használunk, majd a zsírt metilezés után a fentiek szerint elemezzük. Belső standardként a mintákhoz injektálás előtt Sigma gyártmányú C_{19:0} vagy C_{21:0} metil-észtert adunk.

Az I. táblázatban bemutatott kísérletekben az etil-észtereket és glicerideket Waters PrepL 500A típusú berendezésen választjuk el. A Millipore gyártmányú PrepPak 500 típusú szilikabetétes oszlopon eluálószerként petroléterben lévő 10 térfogat% etil-étert használunk 250 ml/min áramlási sebesség

mellett. Mindegyik kísérlet két csúcsot szolgáltat a refrakciós detektor indexének megfelelően, ahol az első csúcs 1 névleges oszloptérfogatot követően jelenik meg, és tiszta etil-észterekből áll, míg a második csúcs 2 névleges oszloptérfogat után hagyja el az oszlopot, és TLC vizsgálat alapján tiszta triglicerideket tartalmaz. A visszamaradó mono- és diglicerideket metanollal mossuk ki az oszlopból.

Az általánosan alkalmazott eljárásban 0,5 g lipázt adunk 5,0 g (5,67 mmol, közelítő molekulatömeg 882) halolaj és 0,80 g (17,4 mmol) abszolút etanol elegyéhez. A kapott enzimsuszpenziót szobahőmérsékleten (az I. táblázatban bemutatott kísérletekben 37 °C hőmérsékleten) nitrogénatmoszféra alatt kíméletesen keverjük. Megfelelő időtartam után a reakciót kloroform hozzáadásával megszakítjuk, és az enzimet szűréssel eltávolítjuk. A szerves oldószert vákuumban (forgó rendszerű bepárlóban és nagy vákuumot létesítő szivattyúval kezelve) távolítjuk el, ennek során a nyers termékelegyet kvantitatív kitermeléssel kapjuk. A terméket azonos térfogatú kloroformban oldjuk, és a fentiekben leírtak szerint a HPLC berendezésbe injektáljuk. Az egyes frakciókat összegyűjtjük, az oldószert vákuumban elpárologtatjuk, a visszamaradó termék tömegét meghatározzuk, majd végül gázkromatográffal elemezzük.

Amikor preparatív HPLC helyett preparatív TLC eljárást használunk, alkalmas időpontokban Pasteur-pipettával kis (100-200 mg) tömegű mintákat veszünk a reakcióelegyből. Az enzimirészecskéket úgy választjuk el, hogy a mintát egy második Pasteur-pipetta belsejében elhelyezett gyapotbetéten ke-



resztül szűrjük. A TLC lemezre adás előtt mindegyik mintát kloroformmal (250 mg/ml koncentrációra) hígítjuk.

Az eredményeket az I-III. táblázatok foglalják össze.

Az I. táblázat (3 mólekvalens mennyiségű etanollal) 37 °C hőmérsékleten lefolytatott kísérletek eredményeit mutatja valamennyi vizsgált lipáz esetében.

I. táblázat

MML (10%*, 23 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	32,0	8,73	18,66	0,96	3,13
TG	35,0	20,12	47,04	11,49	41,14
MG/DG	32,0	16,07	34,35	17,01	55,70
MG/DG/TG	67,0	18,19	81,39	14,12	96,84

CAL (2%*, 10 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	47,3	18,51	54,51	4,33	20,36
TG	33,8	15,56	32,74	12,45	41,84
MG/DG	18,9	10,83	12,74	20,11	37,79
MG/DG/TG	52,7	13,68	45,49	15,20	79,64

CAL (2%*, 23 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	69,5	17,28	76,45	6,77	44,11
TG	16,6	13,16	13,91	14,73	22,92
MG/DG	13,9	10,90	9,64	25,30	32,97
MG/DG/TG	30,5	12,13	23,55	19,55	55,89

CCL (10%*, 71 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	5	6,52	2,17	2,73	1,45
TG	69	16,19	74,53	10,81	79,00
MG/DG	26	13,43	23,30	7,1	19,55
MG/DG/TG	95	15,43	97,83	9,79	98,55

PRL (10%*, 102 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	8,4	7,70	4,12	2,48	2,14
TG	61	17,08	66,37	10,53	65,90
MG/DG	30,6	15,14	29,51	10,18	31,96
MG/DG/TG	91,6	16,43	95,88	10,41	97,86

PSL (10%*, 5 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	40,3	2,42	6,00	2,92	11,70
TG	11,5	30,87	21,84	13,53	15,47
MG/DG	48,2	24,34	72,16	15,20	72,83
MG/DG/TG	59,7	25,60	94,00	14,88	88,30

PFL (10%*, 10 h)		EPA		DHA	
frakció	tömeg%	tömeg%	kinyerés (%)	tömeg%	kinyerés (%)
EE	36	2,87	6,44	2,39	8,48
TG	17,7	28,23	31,13	11,41	19,90
MG/DG	46	21,78	62,43	15,8	71,62
MG/DG/TG	63,7	23,57	93,56	14,58	91,52



* A %-ban megadott adatok a hozzáadott lipáz mennyiségét jelentik a trigliceridek tömegére vonatkoztatva.

A *Candida cylindracea* lipázra (CCL) megadott eredmények a lipáz tömegére vonatkoztatva 10 tömeg% vízadalékkal értendők, minthogy ez a lipáz víz hozzáadása nélkül inaktív. Megjegyezzük, hogy a *Candida antarctica* lipáz (CAL) EPA és DHA esetén csekély szelektivitást mutat, ezért ez a lipáz a találmány szempontjából nem használható. Ezzel szemben az összes többi lipáz megfelelő aktivitást és szelektivitást mutat, e tekintetben a két *Pseudomonas* típusú lipáz kiemelkedő.

II. táblázat

PSL 3 mólékvalens etanollal 20 °C hőmérsékleten

lipidosztályok (tömeg%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	5,0	9,4	13,0	17,9	16,8	15,9
DG	29,1	35,6	31,6	23,3	24,9	25,9
FFA	2,6	2,9	2,5	2,7	2,7	2,7
TG	42,9	17,9	14,2	9,1	7,5	3,7
EE	20,4	34,2	38,7	47,0	48,1	51,8

EPA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	12,0	12,8	16,4	19,2	22,5	26,1
DG	19,3	21,6	26,0	28,1	32,3	32,3
FFA	3,0	2,7	5,0	6,2	5,7	9,0
TG	19,2	23,2	30,3	31,8	32,7	32,0
EE	1,1	1,2	1,6	2,0	2,2	2,8
MG/DG/TG	18,8	20,7	24,9	25,6	29,0	30,1

DHA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	15,5	16,2	16,4	17,3	18,4	17,7
DG	12,7	13,2	13,7	14,1	15,1	14,9
FFA	2,5	2,7	4,9	6,4	6,7	9,9
TG	9,8	10,3	11,6	12,2	12,9	12,3
EE	1,5	1,4	1,9	2,4	2,8	3,6
MG/DG/TG	11,3	12,8	13,8	14,9	15,9	15,7

EPA + DHA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	27,5	29,0	32,8	36,5	40,9	43,8
DG	32,0	34,8	39,7	42,2	47,4	47,2
FFA	5,5	5,4	9,9	12,6	12,4	18,9
TG	29,0	33,5	41,9	44,0	45,6	44,3
EE	2,6	2,6	3,5	4,4	5,0	6,4
MG/DG/TG	30,0	33,6	38,7	40,5	44,9	45,8

EPA (tömeg%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	3,5	7,8	12,1	21,4	21,8	22,4
DG	37,2	56,5	53,5	51,3	53,1	51,7
FFA	0,6	0,7	0,9	1,2	1,2	1,6
TG	57,3	32,2	29,4	20,3	17,0	15,4
EE	1,5	2,9	4,1	5,7	6,9	9,0
MG/DG/TG	98,0	96,5	95,0	93,0	91,9	89,5

DHA (tömeg%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	13 h	24 h
MG	7,5	15,6	22,8	33,0	29,9	26,2
DG	40,4	55,0	48,3	38,6	41,5	41,0
FFA	0,8	1,1	1,5	2,2	2,3	3,0
TG	48,1	22,6	19,4	13,8	11,4	10,3
EE	3,3	5,7	8,0	12,4	14,8	19,6
MG/DG/TG	96,0	93,2	90,5	85,4	82,8	77,5

A II. táblázat adatai szemléltetik, hogy a *Pseudomonas sp.* lipázzal kitűnő eredményeket érünk el az átészterezési reakcióban. Így 13 óra reakcióidő után a konverzió 48%-os, a gliceridek együttes EPA- és DHA-koncentrációja 44,9 tömeg%. Az EPA kinyerése 91,9%-os, míg a DHA kinyerése 82,8%-os. 24 óra reakcióidő után a konverzió 52%-os, a gliceridekben az együttes EPA- és DHA-koncentráció 45,8 tömeg%. Az EPA és DHA kinyerése 89,5%-os, illetve 77,5%-os, ez azt mutatja, hogy a gyakorlatban célszerű a reakciót egy korábbi stádiumban megszakítani. A hidrolízis melléktermékeinek mennyisége a reakció során alacsony állandó értéken marad a 2,5-2,9% tartományban.

III. táblázat

PFL 3 mólekvivalens etanollal 20 °C hőmérsékleten

lipidosztályok (tömeg%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	2,2	2,9	4,8	10,2	15,1	18,1	16,7
DG	10,8	15,6	23,4	34,8	29,2	22,5	16,0
FFA	0,9	0,9	1,3	1,2	1,2	1,0	1,4
TG	81,9	71,0	49,1	27,3	15,8	9,9	6,3
EE	4,2	9,6	21,3	26,5	38,7	48,4	59,7

EPA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	11,6	12,7	13,7	12,7	14,5	16,9	21,5
DG	17,9	19,6	16,9	17,8	25,5	28,9	27,1
FFA	3,5	4,5	6,3	5,1	5,5	8,8	14,2
TG	15,9	16,4	18,0	22,0	29,2	31,8	26,7
EE	0,0	1,5	1,3	1,9	2,2	3,1	4,7
MG/DG/TG	16,0	16,8	17,4	18,7	23,7	25,2	24,6

DHA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	10,5	14,7	18,1	18,1	18,6	18,7	13,2
DG	12,2	12,9	13,5	10,9	13,8	14,4	11,8
FFA	3,4	3,5	4,3	4,4	3,2	9,4	8,4
TG	9,6	9,6	9,3	9,8	10,8	11,4	10,1
EE	0,0	1,3	1,1	1,5	2,0	2,7	3,7
MG/DG/TG	9,9	10,3	11,1	11,5	14,2	15,4	12,1

EPA + DHA terület (%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	22,1	27,4	31,8	30,8	33,1	35,6	34,7
DG	30,1	32,5	30,4	28,7	39,3	43,3	38,9
FFA	6,9	8,0	10,6	9,5	8,7	18,2	22,6
TG	25,5	26,0	27,3	31,8	40,0	43,2	36,8
EE	0,0	2,8	2,4	3,4	4,2	5,8	8,4
MG/DG/TG	25,9	27,2	28,5	30,2	37,9	40,5	36,8

EPA (tömeg %)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	1,4	2,0	4,1	8,0	12,7	18,8	25,5
DG	12,1	19,4	28,0	43,6	49,2	46,1	35,3
FFA	0,2	0,3	0,6	0,5	0,5	0,7	1,7
TG	86,3	77,5	65,4	44,4	32,2	23,7	14,4
EE	0,0	0,9	1,9	3,5	5,5	10,6	23,0
MG/DG/TG	99,8	98,9	97,5	96,0	94,1	88,6	75,2

DHA (tömeg%)

osztály	1 h	2 h	4 h	8 h	14 h	25 h	49 h
MG	2,0	3,8	8,5	18,5	27,1	33,7	28,1
DG	13,3	20,7	35,1	44,0	44,3	36,9	27,6
FFA	0,4	0,4	0,7	0,7	0,4	1,2	1,8
TG	84,3	73,9	53,2	32,5	19,9	13,5	9,8
EE	0,0	1,3	2,5	4,4	8,2	14,7	32,6
MG/DG/TG	99,6	98,4	96,8	95,0	91,3	84,1	65,5

A III. táblázat azt mutatja, hogy a *Pseudomonas fluorescens* lipázzal is jó eredményeket érünk el az átészterzésben, bár a konverzió sebessége valamivel kisebb, mint PSL esetén. Így 25 óra után 48%-os a konverzió mértéke, ami 49 óra után 60%-ra nő. Másrészt a hidrolízis mértéke valamelyest csekélyebb. A *Pseudomonas sp.* lipázhoz hasonlítva az EPA és DHA kinyerés (88,6%, illetve 84,1%) és az együttes EPA- és DHA-koncentráció (40,5 tömeg%) tekintetében ezen lipáz alkalmassága is alárendelt 25 óra reakcióidő után.

A fenti I-III. táblázatokban a következő jelöléseket alkalmazzuk:

- MG monoglicerid
 - DG diglicerid
 - TG triglicerid
 - FFA szabad zsírsav
 - EE etil-észter
- | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - EPA terület (%) - DHA terület (%) - EPA + DHA terület (%) | } | <p>a %-ban megadott terület
a megfelelő GC-kromatogram
integrálásán alapszik.</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------|

Ezeket a rövidítéseket a további példákban is alkalmazzuk.

Az előző táblázatokból kitűnik, hogy mindkét *Pseudomonas* lipáz egyedülállóan csekély aktivitást mutat az EPA és DHA komponensekkel szemben, viszont a kezdeti trigliceridekkel szembeni aktivitásuk nagy.

Az is megjegyezendő, hogy a két *Pseudomonas* lipáz bizonyos mértékben inkább a DHA átészterzésének kedvez, mint az EPA átészterzésének. Ez rendkívül szokatlan viselkedés,

minthogy az összes többi vizsgált lipáz ellentétes tendenciát mutat.

A II. és III. táblázat adataiból látható továbbá, hogy bizonyos idő után az MG/DG/TG arány az optimumhoz képest csökkenni kezd. Ennek megfelelően általában kívánatos az átészterezési reakció megszakítása annak befejeződése előtt.

2. példa

Ebben a kísérletben a két *Pseudomonas* lipázt (PSL és PFL) nagyobb anyagmennyiséggel lefolytatott vizsgálatban tanulmányozzuk.

2a példa - PSL vizsgálata

100 g (25 200 aktivitás egység/g) *Pseudomonas sp.* lipázt adunk 1000 g (1,13 mol) halolaj és 170 g (3,70 mol) abszolút etanol elegyéhez. A kapott enzimszuszpenziót mágneses keverővel szobahőmérsékleten nitrogénatmoszféra alatt kíméletesen keverjük. A reakcióelegy számított víztartalma 0,3-0,4 tömeg%.

25 óra múlva az 1. példában ismertetett módon mintát veszünk és megelemezük. A reakciót további 24 órán át folytatjuk. A reakcióelegyből a lipáz elválasztására centrifugálást alkalmazunk (percenként 5000 fordulat mellett 10 perc időtartamig).

A reakciót 50 óra után megszakítjuk, az ekkor kapott termék összetételét a IV. táblázat tünteti fel.

IV. táblázat

50 h lipidosz- tályok	EPA		DHA		EPA + DHA	
	tömeg%	terület (%)	tömeg%	terület (%)	tömeg%	terület (%)
MG	17,1	17,0	18,0	17,8	28,9	34,8
DG	26,0	28,9	53,1	14,5	42,1	43,4
FFA	2,8	5,7	1,2	6,0	1,9	11,7
TG	8,9	28,8	19,3	11,8	12,2	40,6
EE	46,2	2,6	8,4	2,9	14,8	5,5
MG/DG/TG	52,0	25,0	90,4	15,1	83,2	40,1

A termék egy (902,4 g tömegű) részét az illékony komponensek eltávolítására 80 °C hőmérsékleten vákuum alatt gáztalanítjuk. Az illékony komponenseket cseppfolyós nitrogénnel hűtött kifagyasztóedényben gyűjtjük össze. Gáztalanítás után 844,1 g glicerid/etil-észter elegy marad vissza. Ennek 756,3 g tömegű részét 125 °C hőmérsékleten és 0,005 mbar nyomáson lefolytatott molekuláris desztillációval kezeljük. Ennek során 358,6 g (47,4%) desztillátumot kapunk, míg a maradék tömege 388,3 g (51,3%). A frakciók összetételét az V. táblázat mutatja be.

V. táblázat

	TG	DG	MG	EE	EPA	DHA	EPA+DHA
	terület (%)						
gáztalanítás után	11,2	35,5	19,7	33,6	16,4	11,0	27,4
desztillátum	-	0,9	10,6	88,5	3,6	3,4	7,0
maradék	18,5	54,0	25,2	2,3	29,1	18,2	47,3



A táblázat adatai szerint a maradék együttes EPA- és DHA-koncentrációja 47,3 tömeg%, azaz ezen kívánatos n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavak koncentrációja meghaladja a molekuláris desztilláció előtti értéket (lásd a IV. táblázatot). Ez azt jelenti, hogy ismert eljárásokat, így a karbamiddal lefolytatott frakcionálást követően további betöményítés szempontjából ideális a molekuláris desztilláció alkalmazása.

Megjegyezzük, hogy a desztillátum figyelemreméltó mennyiségű (10,6 tömeg%) monoglicerideket tartalmaz, míg a maradékban 2,3 tömeg% mennyiségű etil-észterek vannak jelen. Az előzőekben tárgyaltak szerint ezek főleg viszonylag rövid szénláncú zsírsavak monogliceridjei, illetve hosszú szénláncú zsírsavak etil-észterei.

2b példa

A 2a példában használttal azonos minőségű 1 kg tömegű olajat a PFL enzim alkalmazásával etanollal átészterezünk. A reakciót 48 óra múlva megszakítjuk. A közbülső termék összetételét a VI. táblázat foglalja össze.

VI. táblázat

lipidosz- tályok	EPA		DHA		EPA + DHA	
	tömeg%	terület (%)	tömeg%	terület (%)	tömeg%	terület (%)
MG	16,2	14,3	14,0	16,4	27,3	30,7
DG	26,8	26,5	48,6	13,7	43,1	40,2
TG	14,9	26,3	28,3	9,0	17,9	36,2
EE	42,2	2,9	9,9	2,4	11,6	5,3
MG/DG/TG	57,9	23,0	90,9	13,5	88,3	36,5

A 2a példában ismertetett körülmények között a közbülső terméket gáztalanítjuk és molekuláris desztillációval kezeljük. A kapott eredményeket a VIA táblázat foglalja össze.

VIA táblázat

	TG	DG	MG	EE	EPA	DHA	EPA+DHA
	terület (%)						
gáztalanítás után	15,8	31,4	20,1	32,8	15,9	10,0	25,9
desztillátum	-	-	13,7	86,3	4,2	2,9	7,1
maradék	25,7	48,8	23,5	2,0	27,8	18,1	45,9

3. példa

A 2. példában ismertetetthez hasonló körülmények között lefolytatott három félüzemi kísérlet termékeit elemezzük a környezetszennyező anyagok mennyiségének meghatározására. Az eredményeket a VII. táblázat szemlélteti.

VII. táblázat

Három minta alapján meghatározott értékek (mg/kg)

vizsgált anyag	α -BCH	HCB	összes DDT	toxafén
kiindulási anyag	nk	nk	0,03	nk
PSL gliceridtermék	nk	nk	nk	nk
PSL etil-észter melléktermék	nk	0,01	0,03	nk



VII. táblázat (folytatás)

Három minta alapján meghatározott értékek (mg/kg)

vizsgált anyag	α -BCH	HCB	összes DDT	toxafén
PFL #1 gliceridtermék	nk	nk	nk	nk
PFL #1 etil-észter melléktermék	0,005	0,02	0,03	0,4
PFL #2 gliceridtermék	nk	nk	nk	nk
PFL #3 etil-észter melléktermék	nk	0,03	0,03	0,4

nk = nem kimutatható

HCH = hexaklór-ciklohexán

HCB = hexaklór-benzol

DDT = diklór-difenil-triklór-etán

Az előzőekben közölt eredmények azt mutatják, hogy a szennyező anyagok az etil-észter-frakciókban dúsulnak fel. A peszticidek némelyikére a kiindulási anyagban lévő koncentráció láthatóan az analitikai módszer kimutatási határa alatt van. Ez az oka annak, hogy ezeket a peszticideket az etil-észter-frakciókban vizsgáljuk és nem az eredeti halolajban. Furcsa módon a DDT koncentráció az eredeti olajhoz viszonyítva az etil-észter-frakcióban nem növekszik. Az etil-észterek és gliceridek (molekuláris desztillációval lefolytatott) elválasztása előtt kíméletes molekuláris desztillációt folytatunk le a reagálatlan etanolnak a reakcióelegyből való kihajtására. Ez az etanolki-

hajtás nyilvánvalóan elegendő a DDT részleges eltávolítására. A visszanyert etanol (PSL minta) elemzése 0,03 mg/kg DDT-összkoncentrációt mutat, míg a többi peszticid nem mutatható ki.

4. példa

E vizsgálat célja a lipáz immobilizálására szolgáló különböző eljárások összehasonlítása, továbbá a találmány szerinti eljárásban immobilizált alakban lévő lipázok használatának tanulmányozása.

A) Immobilizációs eljárások

i) PSL és PFL immobilizálása Duolite hordozón

Büchner-tölcséren 10,0 g Duolite A 562 kereskedelmi nevű terméket (gyártó cég: Duolite International) egyenként 250 ml 30 mmol/l koncentrációjú NaOH-oldattal 3-4 alkalommal mosunk, majd 40 ml vízzel és mágneses keverő forgórészével együtt 150 ml térfogatú főzőpohárba visszük át. Az oldat pH-ját (1,00 mol/l koncentrációjú NaOH-oldattal) 8-ra állítjuk be automatikus titrálóberendezést használva. Ha az oldat kezdeti pH-ja <5,0, az egyensúlyi 8-as pH-érték elérése jelentős időt vehet igénybe. Ha viszont a pH-értéke >8,0, a lipázoldat hozzáadásáig nem csökken. A (20 ml) vízben oldott 2,0 g (PSL/PFL) lipázt Pasteur-pipettával adjuk a Duolite-oldathoz. Az oldat adagolása közben az automatikus titrálóberendezéssel a pH értékét 8,0 és 8,4 között tartjuk, és az oldatot 1 órán át mágneses keverővel keverjük. Ezen időtartam után a lipáz 95-99%-a a Duolite hordozón immobilizálódott. A keverést követően a lipázkészítményt (8,0 pH-jú Tris-HCl) pufferoldattal mossuk. Az immobilizált lipázkészítményt végül 0,5-1 órán át



(133,3-13,3 Pa nyomáson) vákuumban szárítjuk. A szárítási eljárás gyorsítására használhatunk (40 °C hőmérsékletet biztosító) gőzfürdőt. Az immobilizált lipázkészítményt hűtőszekrényben (4 °C hőmérsékleten) tároljuk.

ii) PSL immobilizálása Amberlite hordozón

50 g 70 tömeg% víztartalmú Amberlite XAD-7 gyantát (gyártó cég: Rohm and Haas) alaposan mosunk (két alkalommal, egyenként 125 ml) 0,1 mol/l koncentrációjú 7-es pH-jú nátrium-foszfát-pufferral. 200 ml 7,0 pH-jú 0,1 mol/l koncentrációjú nátrium-foszfát pufferoldatban 1,5 g [20 000 lipázegység (LU, amely definíció szerint tributirin hidrolízissel 1 perc alatt előállított szabad zsírsav mennyisége μmol egységben; 17 LU/mg por), gyártó cég: Amano AK] oldunk. A pH értékében beállt esetleges csökkenést követően a pH értékét 7,0-ra állítjuk be. A lipázoldatot ezután a gyantához adjuk, és a kapott szuszpenziót addig keverjük, amíg legalább 95%-os immobilizálás végbement (1 óra), amit a felülúszó folyadék tributirin hidrolízis során mutatott aktivitásának mérésével állapítunk meg.

iii) Immobilizált lipázkészítmények aktivitásának mérése

40 mg névleges tömegű immobilizált gyantát pontosan lemérünk és 310-315 mg n-butyl-palmitáthoz adjuk. Az elegyhez 120 μl 95 tömeg%-os etanolt adunk, és a kapott elegyet 90 percen át intenzíven keverjük. A mintát összegyűjtjük és GLC útján elemezzük. A lipáz-alkohol-egységek (LAU) mennyiségét az 1 perc alatt keletkezett (μmol egységben kifejezett) etil-palmitát mennyiségeként definiáljuk.

B) A termelékenység vizsgálata immobilizált PSL alkalmazásával

Halolaj etanolízisének termelékenységi vizsgálatát Duolite, illetve Amberlite hordozón immobilizált PSL alkalmazása esetén az alábbi eljárás szerint folytatjuk le.

100 g halolajat, 20 ml abszolút etanolt és 1 ml vizet összekeverünk, és a kapott elegyet intenzíven addig keverjük, amíg finom eloszlású diszperzió képződik. A diszperzióhoz 10 g nedvességmentes immobilizált lipázt adunk, és a kapott elegyet átlátszó oldat keletkezéséig intenzíven keverjük. Ezután az elegyet 50%-os konverzió eléréséig (24 óra időtartamig) kíméletesen keverjük. A lipázt szűréssel elválasztjuk és a következő kísérletsorozatban használjuk, míg a zsírt a fentiek szerint elemezzük.

A Duolite hordozón immobilizált PSL alkalmazásával lefolytatott termelékenységi vizsgálatok eredményeit a VIII. táblázat foglalja össze.

VIII. táblázat
Termelékenységi vizsgálatok Duolite hordozón lévő
PSL alkalmazásával

osztály	k í s é r l e t				
	1	2	3	4	5
lipidosztályok (tömeg%)					
EE	46,1	51,0	51,7	49,2	46,9
FFA	4,5	4,4	5,0	4,1	5,6
MG	15,9	16,8	17,3	16,5	17,0
DG	26,3	22,8	21,3	25,2	25,1
TG	7,3	5,1	4,7	5,0	5,5
MG/DG/TG	49,5	44,7	43,3	46,7	47,6

EPA terület (%)					
EE	1,6	1,9	1,9	1,8	1,8
FFA	7,6	8,9	9,8	6,8	6,9
MG	26,5	26,5	25,1	23,7	22,9
DG	42,0	37,6	37,1	35,3	35,7
TG	41,0	35,8	35,2	35,6	42,7
MG/DG/TG	36,9	33,2	32,1	32,1	31,9

DHA terület (%)					
EE	1,9	2,3	2,3	2,2	2,1
FFA	9,3	10,8	9,8	8,1	18,4
MG	20,2	20,0	19,8	18,0	18,5
DG	17,5	15,6	15,0	14,6	14,5
TG	15,5	12,5	13,2	12,7	13,9
MG/DG/TG	18,1	16,9	16,7	15,6	15,9

EPA + DHA terület (%)					
EE	3,5	4,2	4,2	4,0	3,9
FFA	16,9	19,7	19,6	14,9	25,3
MG	46,7	46,5	44,8	41,7	41,4
DG	59,6	53,2	52,1	49,8	50,2
TG	56,5	48,4	48,3	48,3	56,5
MG/DG/TG	55,0	50,1	48,8	46,8	47,8

EPA (tömeg%)					
EE	3,8	6,1	6,4	5,7	5,1
FFA	2,0	2,7	3,6	2,0	2,6
MG	19,1	24,3	25,0	21,9	20,8
DG	57,9	54,3	52,8	57,7	55,5
TG	17,1	12,6	12,2	12,7	16,0
MG/DG/TG	94,2	91,2	90,0	92,3	92,3

DHA (tömeg%)					
EE	8,7	13,2	14,1	12,7	10,6
FFA	4,7	5,9	6,3	4,4	12,1
MG	27,9	32,7	34,2	30,7	29,1
DG	46,4	40,3	37,5	43,8	39,2
TG	12,4	7,9	8,0	8,4	9,0
MG/DG/TG	86,7	80,8	79,6	82,9	77,3

VIII. táblázat (folytatás)
Termelékenységi vizsgálatok Duolite hordozón lévő
PSL alkalmazásával

osztály	k í s é r l e t				
	6	7	8	9	10
lipidosztályok (tömeg%)					
EE	55,4	53,7	54,9	48,3	48,9
FFA	2,5	2,3	3,0	3,6	4,4
MG	16,5	14,7	13,5	16,7	14,6
DG	23,7	27,4	26,1	25,5	25,9
TG	1,8	1,9	2,5	5,9	6,2
MG/DG/TG	42,0	44,0	42,1	48,1	46,7

EPA terület (%)					
EE	1,7	1,9	1,6	1,4	1,4
FFA	11,2	11,8	11,1	8,2	7,7
MG	22,4	19,5	17,4	20,9	21,6
DG	35,1	36,7	34,2	36,3	38,7
TG	29,1	31,7	34,8	44,4	42,6
MG/DG/TG	29,9	30,7	30,0	32,0	33,9

DHA terület (%)					
EE	1,9	2,2	1,8	1,5	1,6
FFA	18,8	20,6	21,5	9,0	7,7
MG	15,4	16,3	14,9	17,6	18,9
DG	13,2	15,0	14,1	15,1	16,1
TG	9,8	10,7	11,7	14,2	14,0
MG/DG/TG	13,9	15,3	14,2	15,9	16,7

EPA + DHA terület (%)					
EE	3,6	4,1	3,4	2,9	3,0
FFA	30,0	32,4	32,6	17,2	15,4
MG	37,8	35,7	32,1	38,5	40,5
DG	48,3	51,7	48,3	51,4	54,7
TG	38,9	42,4	46,6	58,7	56,6
MG/DG/TG	43,8	45,8	44,2	47,9	50,6

EPA (tömeg%)					
EE	7,1	7,0	6,8	4,1	4,1
FFA	2,3	2,1	2,8	2,0	2,2
MG	23,9	17,0	15,3	18,7	16,4
DG	62,4	69,3	67,9	57,4	60,0
TG	4,4	4,6	7,3	17,7	17,4
MG/DG/TG	90,6	90,9	90,5	93,8	93,7

DHA (tömeg%)					
EE	15,0	14,4	13,1	8,8	8,9
FFA	7,3	6,5	9,6	4,2	4,2
MG	30,7	25,4	23,4	30,3	27,7
DG	44,2	50,9	49,7	45,7	48,1
TG	2,8	2,8	4,4	10,9	11,1
MG/DG/TG	77,7	79,2	77,4	87,0	86,8

A VIII. táblázat adatai szemléltetik, hogy egymást követő 10 kísérletben egyöntetűen magas fokú (46-55%-os) konverziót érünk el, ami az immobilizált lipáz termelékenységét igazolja. Az EPA és DHA kinyerése rendszerint legalább olyan jó vagy

meghaladja a II. táblázatban a por alakú lipázra bemutatott értéket, bár a lipáz mennyiségének csak 1/5 részét használjuk. Ennek megfelelően a glicerid termékelegyben az együttes EPA- és DHA-tartalom ténylegesen nagyon magas, a 44-55 tömeg% tartományban marad. A hidrolízis mellékreakció mértéke valamelyest meghaladja a II. táblázatban közölt értéket, ez vélhetően az immobilizált lipáz esetében szükséges nagyobb víztartalom eredménye, bár a reakcióelegy víztartalma a kitűzött 1%-os határ alatt van.

A Duolite hordozó esetében alkalmazottal azonos reakciókörülmények között Amberlite hordozón lévő PSL alkalmazásával lefolytatott termelékenységi vizsgálatok eredményeit a IX. táblázat mutatja.

IX. táblázat

Termelékenységi vizsgálatok Amberlite hordozón lévő PSL alkalmazásával

kísérlet	konverzió (%)	EPA			DHA		
		EE terület (%)	EE tömeg%	GL terület (%)	EE terület (%)	EE tömeg%	GL terület (%)
1	48,2	2,3	6,6	30,1	3,1	15,0	16,3
2	48,6	2,5	7,5	29,6	3,1	16,2	15,2
3	49,2	2,4	7,4	29,4	3,2	16,6	16,4
4	47,6	2,6	7,1	30,8	3,2	15,6	15,7
5	45,7	2,6	6,5	31,6	3,4	14,2	17,3
6	48,8	2,7	7,8	30,7	3,5	16,8	16,8
7	48,5	2,6	7,4	30,4	3,4	16,8	15,7
8	50,1	2,8	8,6	30,1	3,0	16,7	15,3

GL: glicerid termék (MG/DF/TG)

A IX. táblázat adataiból nyilvánvaló, hogy az immobilizálás még kedvezőbb az Amberlite hordozón, mint a Duolite hordozó esetén. Az immobilizált lipáz hasonló eredmények eléréséhez szükséges mennyisége csak 50%-a a Duolite hordozó esetén használnak (10%-a a por alakú lipáz eredeti mennyiségének). Így nyolc egymást követő kísérletben 24 óra reakcióidő után (48-50%-os) állandó konverziót érünk el, ahol a glicerid termékelegy együttes EPA- és DHA-koncentrációja állandó jelleggel a 45-47%-os tartományban marad. Az EPA és DHA kinyerése, valamint a hidrolízis mellékreakció mértéke a Duolite készítményhez hasonlítva hasonló marad (a víztartalom a kitűzött 1%-os határ alatt van, a hidrolízis eredménye a táblázatban nincs feltüntetve).

5. példa

E vizsgálatok célja a *Candida antarctica* lipáz (CAL) és *Mucor miehei* lipáz (MML) aktivitásának meghatározása halolaj PSL jelenlétében a fentiek szerint lefolytatott átészterezéssel kapott gliceridelegy etanolízisében.

a) Glicerinek etanolízise CAL jelenlétében

2,5 g (8,5 mmol) észterekvivalens, halolaj PSL által katalizált átészterezése útján kapott, 25,0 tömeg% EPA és 15,1 tömeg% DHA kezdeti koncentrációjú gliceridelegyhez 0,5 g 1-2 tömeg% víztartalmú, SP 435 kereskedelmi nevű immobilizált CAL terméket (gyártó cég: Novo-Nordisk) és 0,80 g (17,4 mmol) abszolút etanolt adunk. A kapott enzimszuszpenziót szobahőmérsékleten nitrogénatmoszféra alatt kíméletesen keverjük. A megfelelő időpontokban vett mintákat a fentiek szerint elemezzük. 22 óra reakcióidő után a reakciót az enzim szű-

réssel történő elválasztásával megszüntetjük. Az eredményeket a X. táblázat foglalja össze.

X. táblázat

Gliceridelegy etanolízisének folyamata 20 °C hőmérsékleten CAL jelenlétében (EE termék)

idő	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
EE (tömeg%)	12,7	20,3	29,1	29,0	35,8
EE terület (%)	29,0	29,3	31,2	34,5	29,4
EPA (tömeg%)	15,4	24,6	36,8	42,6	34,2
DHA terület (%)	5,7	6,3	6,9	6,9	7,2
DHA (tömeg%)	5,4	9,5	14,7	14,7	14,7

idő	1 h	3 h	6 h	10 h	22 h
EE (tömeg%)	40,2	68,1	76,6	80,4	100,0
EE terület (%)	28,1	25,5	27,0	26,0	25,3
EPA (tömeg%)	47,1	72,6	83,4	83,9	98,0
DHA terület (%)	7,1	8,2	10,3	10,4	14,8
DHA (tömeg%)	20,8	40,4	55,4	54,9	100,0

A X. táblázat adatai gliceridelegy etanolízisének folyamatát szemléltetik 20 °C hőmérsékleten CAL jelenlétében. A kezdeti gliceridelegyben lévő mólekvalensben megadott észtercsoportokra vonatkozóan az etanolt közelítőleg kétszeres feleslegben alkalmazzuk. A táblázatban csak az etil-észter termék összetétele van feltüntetve. Látható, hogy 22 óra reakcióidő után a reakció teljesen lejátszódik. Az is látható, hogy bár a

lipáz nagy aktivitást fejt ki mind az EPA, mind a DHA komponenssel szemben, az előbbi zsírsav, azaz EPA esetén aktivitása jelentősen nagyobb.

b) Gliceridek etanolízise MML jelenlétében

CAL jelenlétében lefolytatott etanolízis reakciókörülményeivel azonos, a fenti a) pont alatt ismertetett reakciókörülményeket alkalmazunk. 0,5 g 10 tömeg% víztartalmú Lipozyme kereskedelmi nevű immobilizált MML terméket (gyártó cég: Novo-Nordisk) adunk 2,5 g (8,5 mmol észterekvivalens, halolaj PSL által katalizált átészterezésével kapott, 25 tömeg% EPA és 15,1 tömeg% DHA kezdeti koncentrációjú) gliceridelegyhez és 0,80 g (17,4 mmol) abszolút etanolhoz. A kapott enzimszuszpenziót szobahőmérsékleten nitrogénatmoszféra alatt kíméletesen keverjük. A megfelelő időközökben vett mintákat a fentiekben ismertetett módon elemezzük. A reakciót 27 óra reakcióidő után az enzim szűréssel történő elválasztásával megszakítjuk.

A CAL jelenlétében lefolytatott reakcióban használttal azonos gliceridminta MML által 20 °C hőmérsékleten lefolytatott etanolízis folyamatát szemléltetik a XI. táblázat adatai.

XI. táblázat
Gliceridelegy etanolízisének folyamata 20 °C hőmérsék-
leten MML jelenlétében

idő	1 h	2 h	3 h	6 h	9 h	12 h	27 h
konverzió (%)	15,8	21,7	25,4	33,7	39,5	43,0	50,1
etil-észterek							
EPA terület (%)	25,4	28,7	30,4	32,1	31,5	32,3	28,4
EPA (tömeg%)	14,4	24,1	27,5	39,3	47,1	50,2	55,0
DHA terület (%)	3,7	2,9	3,7	5,0	5,5	6,6	6,3
DHA (tömeg%)	4,0	4,7	6,4	11,2	15,2	16,7	21,7
maradék MG/DG/TG							
EPA terület (%)	26,4	26,5	30,1	23,1	21,8	20,8	20,9
EPA (tömeg%)	85,6	75,9	72,5	60,7	52,9	49,8	45,0
DHA terület (%)	18,3	20,9	23,2	23,2	23,0	22,9	24,9
DHA (tömeg%)	96,0	95,7	93,6	88,8	86,8	83,3	78,3

A XI. táblázat adataiból kitűnik, hogy az EPA/DHA komponensekben dús gliceridek etanolízisének folyamatában MML jó hatásfokkal tesz különbséget EPA és DHA között. 27 óra reakcióidő után 50%-os konverziónál a kezdeti DHA-tartalom közel 80%-a van a visszamaradó gliceridelegyben. Az EPA eloszlása nem ilyen előnyös, 55%-a van az etil-észterekben és még mindig 45%-a a visszamaradó gliceridben. Javíthatunk ezen a helyzeten oly módon, hogy a visszamaradó gliceriddel azonos körülmények között egy második etanolízist folytatunk le. Megjegyezzük, hogy az MML aktivitása lehetővé teszi, hogy EPA komponensben dús halolajat használjunk EPA és DHA

komponensekben dús halolaj (így tonhalolaj), illetve DHA előállítására az ismertetett eljárással.

6. példa

Ezzel a kísérlettel azt szemléltetjük, hogy a találmány szerinti eljárás alkalmazható növényi olajokhoz.

Arachidonsavat (AA) tartalmazó extraktum PSL által katalizált etanolízise

31,1 tömeg% arachidonsavat (AA, 20:4 n-6) tartalmazó extraktumot (gyártó cég: Pronova Biocare) kezelünk az 1. példában halolajra megadott eljárás szerint, azaz por alakjában lévő 10 tömeg% PSL jelenlétében 20 °C hőmérsékleten 50%-os konverzióig 24 órán át.

Az eredményeket a XII. táblázat tünteti fel.

XII. táblázat

osztály	osztály (tömeg%)	AA terület (%)	AA (tömeg%)
EE	50	7,6	12
FFA	2	23,3	1
MG	17	49,0	24
DG	24	57,4	47
TG	8	58,9	16
MG/DG/TG	49	54,2	87

A XII. táblázat adatai szerint a gliceridelegységben AA kinyerése nagyon magas, 50%-os konverzióval 87% értéket ér el, ami a halolajjal lefolytatott megfelelő reakciókkal összehasonlítva magasabb, mint DHA esetén, azonban alacsonyabb, mint EPA esetében. A hidrolízis mellékreakciója összehasonlítható

mértékű (2%) a halolajjal lefolytatott kísérletekben megállapítottal. A glicerid termékelegy AA-tartalma 54,2%. Meglepő módon ez a TG-frakcióban volt a legnagyobb és az MG-frakcióban a legkisebb.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás telített és telítetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozíció kezelése útján többszörösen telítetlen zsírsavakat nagyobb koncentrációban tartalmazó finomított termék előállítására, **azzal jellemezve**, hogy

a) az olajkompozíciót lényegileg vízmentes körülmények között 1-6 szénatomos alkohollal, elsődlegesen telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezzük, ahol a jelen lévő trigliceridre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használunk, és

b) a lipázzal katalizált átészterezési reakcióban kapott telített és telítetlen zsírsav-észtereket tartalmazó frakciótól többszörösen telítetlen zsírsavak gliceridjeiben dúsított frakciót választunk el.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy immobilizált alakban lévő lipázt használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy 1-6 szénatomos alkoholként abszolút etanolt használunk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a jelen lévő trigliceridre vonatkoztatva 2-5 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használunk.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az átészterezési reakciót szobahőmérsékleten folytatjuk le.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a b) elválasztási lépésben egy vagy több molekuláris desztillációs műveletet folytatunk le.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olajkompozícióként tengeri állatokból előállított olajat vagy n-3 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó fermentációs terméket kezelünk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy ejkozapentánsavra és dokozahexánsavra nézve lényegileg inaktív lipázt használunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy *Pseudomonas sp.* lipázt vagy *Pseudomonas fluorescens* lipázt használunk.

10. A 7-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás összesen legalább 40 tömeg% ejkozapentánsavat és dokozahexánsavat tartalmazó kompozíció előállítására, **azzal jellemezve**, hogy továbbá

c) a b) lépésben kapott frakciót lúgos közegben kémiai katalízis vagy lipázt alkalmazó enzimatis katalízis útján rövid szénláncú alkohollal átészterezzük,

d) a kapott alkil-észtert alkanolban karbamid feleslegével 55-99 °C hőmérsékletre hevítjük,

e) a d) lépésben kapott terméket hűtve karbamid/zsírsav-alkil-észter adduktumot csapatunk ki, majd az adduktumot elválasztjuk a főleg n-3 típusú zsírsav-észtereket tartalmazó oldattól,

f) az e) lépésben visszamaradó oldatból az n-3 típusú zsírsav-észtereket elválasztjuk, és

g) az f) lépésben kapott elegyet oldószermentesítjük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a g) lépésben kapott koncentrátum betöményítését egy vagy több lépésben lefolytatott molekuláris desztilláció útján legalább 85 tömeg% együttes ejkozapentánsav- és dokoza-hexánsav-koncentráció eléréséig tovább folytatjuk.

12. A 7-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás lényegi-leg tiszta ejkozapentánsav és lényegileg tiszta dokoza-hexán-sav előállítására, **azzal jellemezve**, hogy továbbá

i) a gliceridfrakciót 1-6 szénatomos alkohollal lényegileg vízmentes körülmények között elsődlegesen ejkozapentánsav észterezését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezzük,

ii) a kapott, ejkozapentánsavban dúsult 1-6 szénatomos alkohol-észter frakciót és a maradék, dokoza-hexánsavban dúsult glicerinelegyet elválasztjuk,

iii) az ejkozapentánsav-(1-6 szénatomos)alkohol-észter frakciót feldolgozzuk, és az ejkozapentánsav frakciót lényegi-leg 100%-os tisztaságúra betöményítjük,

iv) a dokoza-hexánsavban dúsult glicerinelegyet 1-6 szénatomos alkohollal elsődlegesen dokoza-hexánsav észtere-zését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezzük, és

v) a kapott dokoza-hexánsav-(1-6 szénatomos)alkohol-észter frakciót feldolgozzuk, és a dokoza-hexánsav frakciót lényegileg 100%-os tisztaságú dokoza-hexánsavvá betöményítjük.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az i) lépésben *Mucor miehei* lipázt használunk.

14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az iv) lépésben *Candida antarctica* lipázt használunk.

15. A 12-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az i) és/vagy iv) lépésben 1-6 szénatomos alkoholként etanolt használunk.

16. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olajkompozícióként növényi olajkompozíciót vagy n-6 típusú többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó fermentációs terméket használunk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy arachidonsavra nézve lényegileg inaktív lipázt használunk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy *Pseudomonas sp.* lipázt vagy *Pseudomonas fluorescens* lipázt használunk.

19. A 16-18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás legalább 40 tömeg% arachidonsavat tartalmazó kompozíció előállítására, **azzal jellemezve**, hogy továbbá

c) a b) lépésben kapott frakciót lúgos közegben kémiai katalízis vagy lipázt alkalmazó enzimatikus katalízis útján rövid szénláncú alkohollal átészterezzük,

d) a kapott alkil-észtert alkanolban karbamid feleslegével 55-99 °C hőmérsékletre hevítjük,

e) a d) lépésben kapott terméket hűtve karbamid/zsírsav-alkil-észter adduktumot csapatunk ki, majd az adduktumot elválasztjuk a főleg n-6 típusú zsírsav-észtereket tartalmazó oldattól,

f) az e) lépésben visszamaradó oldatból az n-6 típusú zsírsav-észtereket elválasztjuk, és

g) az f) lépésben kapott elegyet oldószermentesítjük.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a g) lépésben kapott koncentrátum betöményítését egy vagy több lépésben lefolytatott molekuláris desztilláció útján legalább 85 tömeg% együttes arachidonsav-koncentráció eléréséig tovább folytatjuk.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az arachidonsav-frakciót lényegileg 100%-os tisztaságúvá betöményítjük.

22. Eljárás környezetszennyező anyagok eltávolítására telített és többszörösen telítetlen zsírsavakat trigliceridek alakjában tartalmazó olajkompozícióból, azzal jellemezve, hogy

a) az olajkompozíciót lényegileg vízmentes körülmények között 1-6 szénatomos alkohollal, elsődlegesen a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak átészterezését katalizáló lipáz jelenlétében átészterezzük, ahol a jelen lévő trigliceridekre vonatkoztatva legfeljebb 15 mólekvalens mennyiségű 1-6 szénatomos alkoholt használunk, és

b) az a) lépésben kapott terméket egy vagy több lépésben lefolytatott molekuláris desztillációval kezeljük, és környezetszennyező anyagoktól lényegileg megtisztított, többszörösen telítetlen zsírsavak gliceridjeiben dúsított frakciót nyerünk ki.

23. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépést a 2-5. igénypontok bármelyikében meghatározott módon folytatjuk le.

2 lap rajz
Kelt

NORSK HYDRO A.S.
helyett a meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Vitális László
szabadalmi ügyvivő

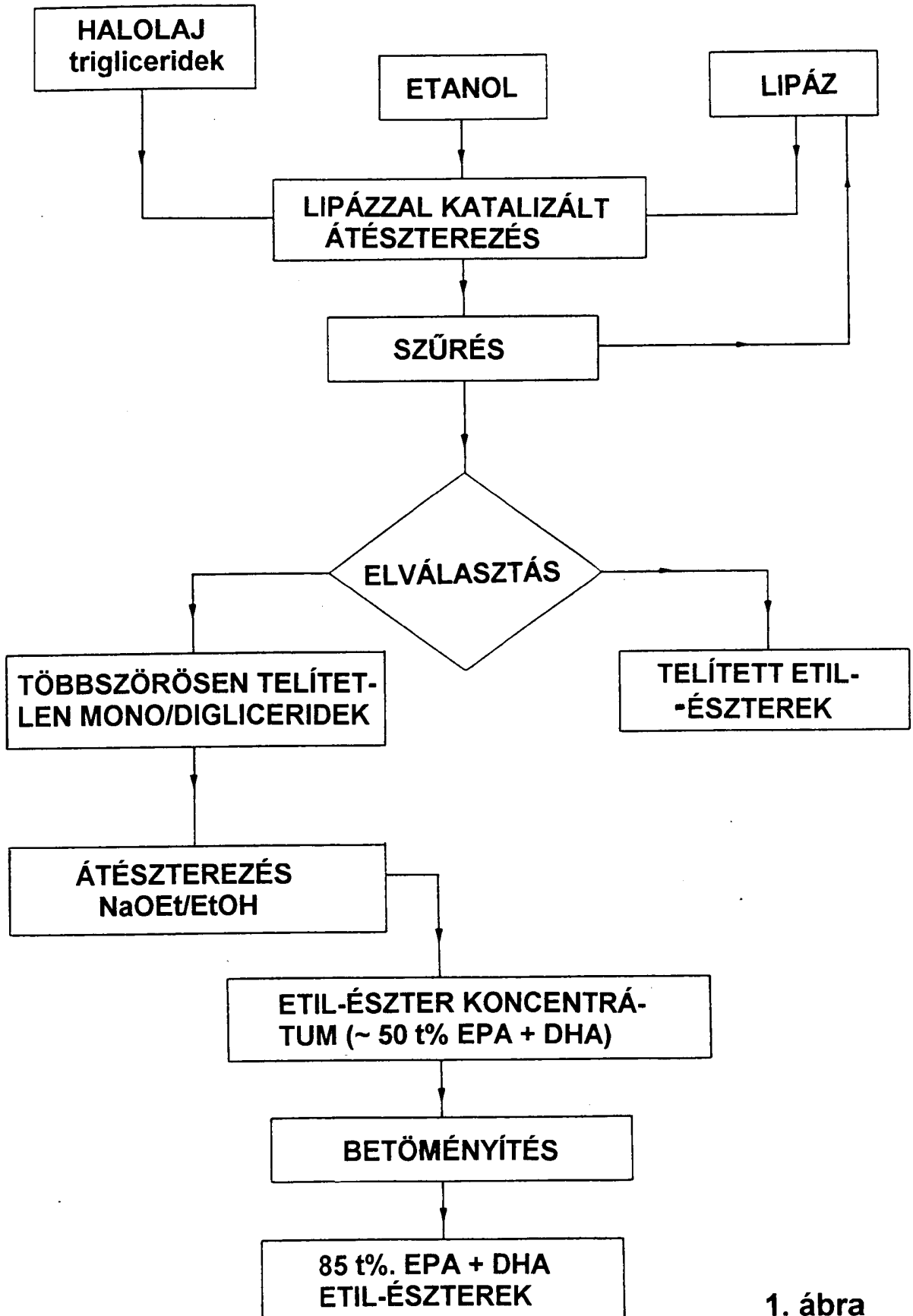
2460/96

10000

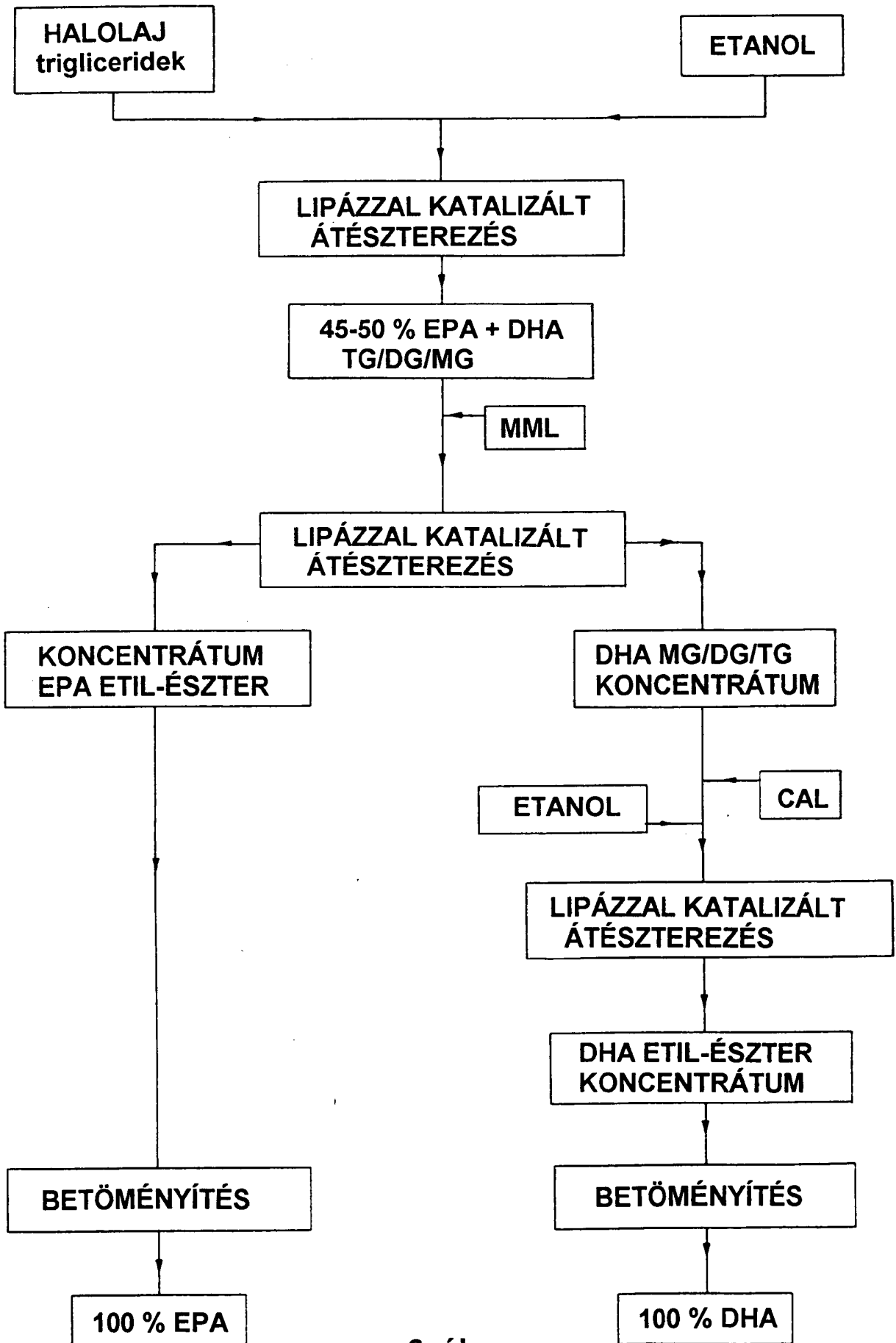
76707

F KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1/2



1. ábra



2. ábra