



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 273 852 B3**

Teilweise bestätigt gemäß § 18
Absatz 1 Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983

5(51) C 11 B 1/00

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

DEUTSCHES PATENTAMT

(21) DD C 11 B / 317 685 1

(22) 07. 07. 88

(45) 21. 01. 93

(44) 29. 11. 89

(72) Mieth, Gerhard, Dr. Dipl.-Lebensm.-Chem.; Steffens, Werner, Prof. Dr. habil. Dipl.-Fischwirt;
Wirth, Manfred, Dipl.-Chem.; Lieder, Ulrich, Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Biol.;

(73) Friedrich, Manfred, Dr. Dipl.-Chem.; Wagenknecht, Walter, Dr. Dipl.-Chem.; Andree, Susanne, DE
Zentralinstitut für Ernährung, Arthur-Scheunert-Allee 114/116, O - 1505 Bergholz-Rehbrücke;
Institut für Hochseefischerei und Fischverarbeitung Rostock GmbH, O - 2520 Rostock;
Zentralinstitut für Herz-Kreislauf-Regulationsforschung, O - 1115 Berlin; Institut für Binnenfischerei,
O - 1160 Berlin-Friedrichshagen; Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, O - 1086 Berlin, DE

(54) **Verfahren zur Gewinnung und Aufkonzentrierung polyenfettsäurereicher Lipide**

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung und Aufkonzentrierung polyenfettsäurereicher Lipide in Form von Triglyceriden oder Fettsäurealkylestern aus ausgewählten Rohstoffen der Fischverarbeitung mittels Entfettung, Raffination, gegebenenfalls auch Modifizierung und Fraktionierung, **dadurch gekennzeichnet**, daß lipid- und polyenfettsäurereiche limnische oder maritime Fischarten, mit hohem Quotienten an essentiellen Polyenfettsäuren

$$Q = \frac{\% \text{Eicosapentaensäure} + \% \text{Docosahexaensäure}}{\% \text{Linolsäure} + \% \text{Arachidonsäure}} \geq 1,0$$

einer lipolytischen und/oder proteolytischen Behandlung mit Esterasen und/oder Proteasen in Kombination mit einem mechanischen und thermischen Aufschluß unterworfen werden und daraufhin die freigesetzten Lipide oder Spaltprodukte entweder direkt aus dem wäßrigen Hydrolysat durch Separation oder aus dem entwässerten Hydrolysat durch Extraktion abgeschieden, raffiniert, modifiziert, fraktioniert und/oder konzentriert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lipolyse durch Lipasen und Phospholipasen mikrobieller, tierischer oder pflanzlicher Provenienz, vorzugsweise Esterasen von Pankreasdrüsen, Zygomyceten oder Plectomyceten unter Bedingungen durchgeführt wird, die eine weitgehende Spaltung der Lipide unter Freisetzung der Fettsäuren unter Vermeidung der Bildung stabiler Emulsionen gewährleisten.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proteolyse durch unspezifische Proteasen und Peptidasen mikrobieller, pflanzlicher oder tierischer Provenienz, vorzugsweise Hydrolasen von Magenschleimhäuten, Bacilli oder Actinomyceten, unter Bedingungen durchgeführt wird, die einen weitgehenden Zellaufschluß und eine Freisetzung von Lipiden unter Vermeidung der Bildung stabiler Emulsionen gewährleisten.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die lipolytisch und/oder proteolytisch behandelten Rohstoffe einer Uperisation bei einem Temperatur-Zeit-Regime von max. 200°C über max. 15s unterworfen werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die separative Abtrennung freier Lipide oder ihrer Spaltprodukte mittels Zentrifugalabscheider, vorzugsweise bei einem Schwerefeld $\geq 10000g$, durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die extraktive Abtrennung gebundener Lipide oder ihrer Spaltprodukte mit binären oder ternären Gemischen azeotroper Lösungsmittel, vorzugsweise Isopropanol/Wasser = 91/9 (V/V), Aceton/Methanol = 88/12 (V/V) oder Hexan/Methanol/Wasser = 75/23/2 (V/V/V) durchgeführt wird und gegebenenfalls eine Entwässerung mit wassermischbaren organischen Solventien, vorzugsweise Ethanol oder Aceton, oder alternativ dazu eine schonende Trocknung, vorzugsweise in der Wirbelschicht unter Inertgas bei Guttemperaturen von max. 80°C, vorgeschaltet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die separativ oder extraktiv gewonnenen Lipide, gegebenenfalls nach vollständiger Reveresterung zu Triglyceriden, durch Entsäuerung, vorzugsweise mit Calciumhydroxyd, Entschleimung, vorzugsweise mittels Phosphorsäure, Bleichung, vorzugsweise mit überhitztem Wasserdampf bei Temperaturen $\leq 200^\circ\text{C}$ und Drücken $\leq 100\text{ mbar}$, raffiniert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die separativ und extraktiv gewonnenen Lipide oder ihre Spaltprodukte, gegebenenfalls nach Modifizierung mittels gerichteter oder ungerichteter chemischer oder enzymatischer Acylierung durch physikochemische Fraktionierung, vorzugsweise Molekulardestillation, Tieftemperaturkristallisation oder Flüssiggasextraktion, aufkonzentriert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die separativ oder extraktiv gewonnenen Lipidspaltprodukte, gegebenenfalls nach Modifizierung mittels vollständiger chemischer oder enzymatischer Deacylierung in freie Fettsäuren oder Natriumseifen, durch physikochemische Fraktionierung, vorzugsweise Harnstoff- oder Bromadduktbildung, aufkonzentriert und chemisch oder enzymatisch zu Triglyceriden oder Fettsäurealkylestern reverestert werden.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Rohstoffe Süßwassercypriniden der Spezies *Aristichthys nobilis* und *Hypophthalmichthys molitrix* eingesetzt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß für die separative Lipidgewinnung weitgehend hydrolysierte Rohstoffe, vor allem Neben- und Abprodukte der Fischfiletproduktion, vorzugsweise Bauchlappen und Innereien, mit Lipidgehalten $\geq 10\%$, für die extraktive Lipidgewinnung hingegen partiell hydrolysierte Rohstoffe, vorzugsweise geringmäßige Fische mit Lipidgehalten $\leq 10\%$, eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Anwendung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung und Aufkonzentrierung polyenfettsäurereicher Lipide aus aquatischen Rohstoffen, speziell maritimen und limnischen Fischarten. Bevorzugtes Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Lipidisolierung aus Cypriniden der Spezies *Aristichthys nobilis* und *Hypophthalmichthys molitrix* mit hohem Gehalt an Gesamtlipiden- und -polyenfettsäuren sowie spezifischen Quotienten von n3- zu n6-Polyenfettsäuren, insbesondere die Verwertung von Neben- und Abprodukten der Fischverarbeitung. Bevorzugtes Applikationsfeld der in Form von Triglyceriden oder Fettsäurealkylestern anfallenden Lipiden oder Lipidkonzentraten ist der Einsatz als Diätetika oder Pharmaka zur Prävention bzw. Therapie von Gefäß- und Kreislauferkrankungen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Polyenfettsäuren der n6-Fettsäurefamilie, speziell Linol- und Arachidonsäure, sind seit längerem als Substrate der In-vivo-Eikosanoid-Synthese bekannt; der physiologische Bedarf dieser für den menschlichen Organismus essentiellen Nahrungskomponenten wird bei einer gemischten Kostform im allgemeinen gedeckt. Neuerdings treten aber auch höher ungesättigte Polyenfettsäuren der n3-Fettsäurefamilie, speziell Eicosapentaen- und Docosahexansäure, als für den Menschen vermutlich gleichfalls essentielle Verbindungen aus medizinischer Sicht, u. a. im Hinblick auf eine Senkung von Blutdruck und Blutungszeit sowie antithrombotische und antiinflammatorische Effekte, in den Blickpunkt weltweiten Interesses. In diesem Zusammenhang werden eine günstige Verschiebung des Tromboxan-Prostaglandin-Gleichgewichtes in Richtung auf Antithrombose, Vasodilatation und eine Abschwächung chemotaktischer Reaktionen weißer Blutzellen als Wirkungsmechanismen postuliert und als eine biochemische Ursache für überraschende Gegenläufigkeit von Fischverzehr sowie atherothrombotischen und chronischen entzündlichen Erkrankungen diskutiert. Darauf ist vermutlich nicht nur die Gesamtzufuhr an Polyenfettsäuren, sondern vielmehr auch die Relation von n3- zu n6-Polyenfettsäuren von maßgeblichem Einfluß, so daß davon ausgegangen wird, daß die für eine Reihe hochindustrialisierter Länder charakteristische hohe Mortalitätsrate an ernährungsbedingten Gefäß- und Kreislauferkrankungen auf ein Defizit von n3-Polyenfettsäuren im Nahrungsangebot zurückzuführen ist. Fischöle und daraus hergestellte mit n3-Polyenfettsäuren angereicherte Lipidkonzentraten werden daher im zunehmenden Maße als Gesundheitspflgemittel oder Pharmaka zur Prävention bzw. Therapie von Herz-Kreislauf-Krankheiten eingesetzt. Prädestinierte Nahrungsquellen für hochgesättigte n3-Fettsäuren sind nach dem bisherigen Stand der Kenntnisse planktonfressende maritime Fische aus arktischen Fangplätzen, die sich durch einen hohen Anteil dieser physiologisch aktiven Fettsäuren bei zugleich hohem Gesamtlipidgehalt auszeichnen. Verfahren der Gewinnung qualitativ hochwertiger Fischöle – das betrifft vor allem einen enzymatischen Zellaufschluß in Kombination mit einer Verdrängungsextraktion von Fetten mittels wäßriger Medien und den mechanischen Zellaufschluß in Kombination mit einer Lösungsmittelextraktion mittels superkritischer Gase. Was dabei speziell den enzymatischen Zellaufschluß durch zellulolytische Enzymsysteme angeht, so wird dieser derzeit lediglich bei der Gewinnung von Oliven-Jungferölen praktiziert. Weiterhin ist der Einsatz substratspezifischer Hydrolyasen (Lipasen und Proteasen) bei der Gewinnung und Modifizierung von Proteinen wie auch extraktiven Isolierung granzflächenaktiver Struktur lipide als bekannt vorauszusetzen. Prinzipiell bekannt ist darüber hinaus die Aufkonzentrierung polyenfettsäurereicher Lipide aus Fischen oder Samen durch physikochemische, chemische und enzymatische Modifizierung bzw. Fraktionierung. Voraussetzung für die Effektivität letztgenannter Manipulationen ist allerdings ein hoher Gesamtlipid- und -polyenfettsäuregehalt der Rohstoffe. Im Falle hochgesättigter Vertreter der n3-Polyenfettsäurefamilie in extrazellulären Triglyceriden, die durch Verdrängungsextraktion mittels wäßriger Medien technologisch leicht zugänglich sind, ist dies wiederum auf Grund der erörterten spezifischen Zusammensetzung nur unter Einschränkung gegeben, und im Falle von n3-Polyenfettsäuren in membrangebundenen Phospholipiden erfordert deren Gewinnung technologisch aufwendige Verfahren der Lösungsmittelextraktion.

Ziel der Erfindung

Als Ziel der Erfindung leitet sich daraus die Entwicklung eines Verfahrens zur schonenden Gewinnung, gegebenenfalls auch Aufkonzentrierung, polyenfettsäurereicher Lipide unter Nutzbarmachung auch einheimischer verfügbarer Rohstoffquellen ab. Der Erfindung liegt demzufolge die Aufgabe zugrunde, Rohstoffe und Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die eine Gewinnung und Aufkonzentrierung qualitativ hochwertiger polyenfettsäurereicher Lipide in hohen Ausbeuten gestatten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden polyenfettsäurereiche Lipide aus aquatischen Rohstoffen in Form von Triglyceriden oder Fettsäurealkylestern nach einem eigenartigen Verfahren durch Kombination von Zellaufschluß, Entfettung, Raffination, gegebenenfalls auch Modifizierung und Fraktionierung gewonnen und aufkonzentriert, indem lipid- und polyenfettsäurereiche

limnische oder maritime Fischart, vorzugsweise seestonfressende Süßwasser-Cypriniden der Spezies *Aristichthys nobilis* und *Hypophthalmichthys molitrix* mit hohem Quotienten an essentiellen Polyenfettsäuren

$$Q = \frac{\% \text{Eicosapentaensäure} + \% \text{Docosahexaensäure}}{\% \text{Linolensäure} + \% \text{Arachidonsäure}} \geq 1,0$$

einer lipolytischen und/oder proteolytischen Behandlung von Esterasen und/oder Proteasen in Kombination mit einem mechanischen und thermischen Aufschluß unterworfen werden und daraufhin die freigesetzten Lipide oder Spaltprodukte entweder direkt aus dem wäßrigen Hydrolysat durch Separation oder alternativ dazu aus dem entwässerten Hydrolysat durch Extraktion abgeschieden und raffiniert, gegebenenfalls auch nach Zwischenschaltung einer chemischen oder enzymatischen Modifizierung durch physikochemische oder chemische Fraktionierung aufkonzentriert und stabilisiert werden.

Vie nämlich zum einen überraschenderweise gefunden wurde, ermöglicht eine enzymatische Behandlung genannter Rohstoffe mit lipolytischen und/oder proteolytischen Enzymen eine markante Effektivierung der separativen oder extraktiven Lipidgewinnung unter Einsatz wäßriger bzw. nichtwäßriger Lösungsmittel bei zugleich weitgehender Inhaltsstoffschonung. Das Ausmaß der Lipidfreisetzung wie auch -spaltung hängt dabei hauptsächlich von der Aktivität und Selektivität der eingesetzten Esterasen (Lipasen, Phospholipasen und Lipoproteidlipasen) sowie Peptidhydrolasen (Proteasen und Peptidasen) ab; es ist relativ unabhängig vom Anteil und der Zusammensetzung intrazellulärer Lipide (Triglyceride), wird aber durch membrangebundene Lipide (Phospholipide) beeinflusst.

Wie zum anderen gefunden wurde, läßt sich die separative Lipidabtrennung aus den enzymatisch vorbehandelten Rohstoffen bereits bei Temperaturen unter 50°C bewerkstelligen, ohne daß stabile Emulsionen gebildet werden. Gleichmaßen begünstigt eine enzymatische Vorbehandlung eine extraktive Fettabtrennung, da membrangebundene Lipide leichter zugänglich werden. Eine zusätzliche thermische Behandlung der Rohstoffe ist somit zwar nicht zwingend notwendig, jedoch erweist sich eine Uperisation, vorzugsweise bei einem Temperatur-Zeit-Regime von max. 200°C über 15 s, sowohl hinsichtlich der nachzuschaltenden Enzyminaktivierung als auch der Fettabtrennung als vorteilhaft. Letzteres gilt im besonderen Maße bei einer Partialhydrolyse der Rohstoffe, bei der eine zusätzliche thermische Behandlung die Fettabtrennung begünstigt.

Zur Proteolyse eignen sich erfindungsgemäß unspezifische Proteasen und Peptidasen mikrobieller pflanzlicher oder tierischer Provenienz, vorzugsweise Hydrolasen von Magenschleimhäuten, Bacilli oder Actinomyceten, zur Lipolyse wiederum spezifische und unspezifische Lipasen und Phospholipasen mikrobieller tierischer oder pflanzlicher Provenienz, vorzugsweise Esterasen von Pankreasdrüsen, Zygomyceten oder Plectomyceten.

Die Auswahl der eingesetzten Enzymsysteme richtet sich dabei vorrangig nach der angestrebten Art und Zusammensetzung der Finalprodukte. In einer zur Gewinnung von Triglyceriden bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden daher neutrale Proteasen eingesetzt, die frei von lipolytischen Nebenaktivitäten sind. In einer anderen zur Gewinnung von Lipidspaltprodukten, d. h. freien Fettsäuren oder Partialglyceriden, bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden demgegenüber saure oder alkalische Proteasen mit hoher lipolytischer Nebenaktivität oder Kombinationen von Proteasen mit Esterasen eingesetzt. Die Inkubationsbedingungen sind dabei so zu wählen, daß eine maximale Freisetzung von Lipiden unter Vermeidung der Bildung stabiler Emulsionen gewährleistet wird.

Die separative Abtrennung freigesetzter Lipide erfolgt erfindungsgemäß zweckmäßigerweise in Hochleistungsseparatoren, vorzugsweise bei einem Schwerefeld $\geq 10000\text{ g}$, wogegen zur extraktiven Abtrennung binäre oder ternäre Gemische azeotroper Lösungsmittel, vorzugsweise Isopropanol/Wasser = 91/9 (V/V), Aceton/Methanol = 88/12 (V/V) oder Hexan/Methanol/Wasser = 75/23/2 (V/V/V) angewandt werden. Die extraktive Fettabtrennung erfordert dabei eine partielle oder vollständige Entwässerung mit wassermischbaren organischen Solventien, vorzugsweise Ethanol oder Aceton, oder alternativ dazu eine schonende Trocknung, vorzugsweise in der Wirbelschicht, unter Inertgas bei Guttemperaturen von max. 80°C.

Darüber hinaus wurde gefunden, daß sich die erfindungsgemäß unter inhaltsstoffschonenden Bedingungen gewonnenen Lipide, speziell Triglyceride, bei einer dem hohen Anteil von Polyenfettsäuren Rechnung tragenden spezifischen Raffination und Lagerung als relativ oxydationsstabil erweisen. Wesentliche Voraussetzung dafür ist eine Eliminierung prooxydativ wirkender freier Fettsäuren und Schwermetallionen durch Entsäuerung und Entschleimung, vorzugsweise mittels Kalziumhydroxid bzw. Phosphorsäure, eine Hintanhaltung der Isomerisierung von Polyenfettsäuren bei gleichzeitiger Adsorption von chlororganischen Pestiziden durch Bleichung, vorzugsweise mittels Aktivkohle, und eine destillative Abtrennung flüchtiger Oxydationsprodukte durch Vakuum-Desodorierung, vorzugsweise mit erhitztem Wasserdampf bei Temperaturen $\leq 200^\circ\text{C}$ und Drücken $\leq 10\text{ mbar}$.

Im Falle der Gewinnung von Lipidkonzentraten in Form von reveresterten Triglyceriden oder Fettsäurealkylestern ist weitere unabhängige Voraussetzung für die angestrebte Oxydationsstabilität ein Zusatz von Antioxydantien und/oder Synergisten, vorzugsweise α -Tocopherol und/oder Zitronensäure, gegebenenfalls auch fettlöslichen Vitaminen, vorzugsweise Vitamin A, sowie den Einschluß in eine Protein- und/oder Polysaccharid-Matrix, vorzugsweise Cyclodextrine, Pektinate und/oder Gelatine. Schließlich wurde gefunden, daß sich die erfindungsgemäß gewonnenen Lipide sowie auch ihre Spaltprodukte auf Grund ihrer spezifischen Zusammensetzung, insbesondere des hohen Polyenfettsäuregehaltes der eingesetzten Rohstoffe, besonders leicht durch an sich bekannte chemische, physikochemische oder enzymatische Verfahren der Modifizierung und/oder Fraktionierung aufkonzentrieren lassen.

Die im Rahmen der Erfindung vorzugsweise eingesetzten adaptierten einheimischen Cypriniden weisen nämlich gleichfalls im Vergleich zu anderen maritimen oder limnischen Fischarten einen besonders hohen Gehalt an Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in den mengenmäßig dominierenden und technologisch leicht zugänglichen Triglyceriden auf. Sie sind demzufolge prädestinierte Rohstoffe für die Gewinnung diätetisch oder pharmakologisch wirksamer Lipide zur Prävention oder Therapie von Gefäß- und Kreislauferkrankungen.

Bevorzugte Modifizierungs- und Fraktionierungsverfahren für Lipide oder ihre Spaltprodukte sind dabei eine gerichtete oder ungerichtete chemische oder enzymatische Acylierung in Kombination mit einer Molekulardestillation, Tieftemperaturkristallisation oder Flüssiggasextraktion. Bevorzugte Modifizierungs- und Fraktionierungsverfahren der Lipidspaltprodukte sind demgegenüber eine Harnstoff- oder Bromadduktbildung.

Der eindeutige Vorteil der Erfindung gegenüber bereits praktizierten technischen Lösungen der Gewinnung polyenfettsäurereicher Lipide und Lipidkonzentrate besteht demzufolge darin, daß diese auf verschiedenartige aquatische Rohstoffe, speziell maritime und limnische Fischarten, problemlos übertragbar ist. Dabei eignen sich naturgemäß zur separativen Lipidgewinnung vor allem weitgehend hydrolysierte Neben- oder Abprodukte der Fischfiletproduktion, vorzugsweise Bauchlappen und Innereien, mit Lipidgehalten $\geq 10\%$, für die extraktive Lipidgewinnung demgegenüber partiell hydrolysierte Rohstoffe, vorzugsweise geringmaßige Fische, mit Lipidgehalten $\leq 10\%$. Die resultierenden Finalprodukte zeichnen sich gegenüber konventionell produzierten Fischölen und daraus hergestellten Fettsäurealkylestern in wichtigen Ausbeute- und Qualitätskriterien in positiver Weise aus; das betrifft hauptsächlich den hohen Triglycerid- und Polyenfettsäuregehalt, das günstige Verteilungsverhältnis von n3- zu n6-Polyenfettsäuren und den niedrigen Gesamtoxydationsstatus. Die Erfindung wird anhand der Tabelle 1 und 2 sowie nachstehender Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

1 kg der bei der Filetproduktion geköpfter, ausgeweideter und entgräteter Silberkarpfen als Nebenprodukt anfallenden Bauchlappen (Lipidgehalt 19,1 %) wird nach Homogenisierung und Zusatz von 1 kg Wasser mittels „Neutrase“ von *Bacillus subtilis* (Gesamtaktivität 1×10^{10} E) 8 h bei 30°C und pH 6,0 proteolysiert. Der Inkubationsansatz wird nachfolgend mit Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt und mittels Düsenskocher 3 s auf 150°C erhitzt. Die Suspension wird durch Separation bei 20000 g in Feststoff, Hydrolysat und Lipid getrennt.

Die Lipidausbeute beläuft sich, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, auf ca. 91 %, wobei der Gehalt an freien Fettsäuren ca. 2 % beträgt.

Das Rohöl wird in an sich bekannter Weise raffiniert, jedoch werden als Agentien bei der Entsäuerung, Entschleimung und Bleichung Kalkmilch, Phosphorsäure und Aktivkohle eingesetzt, und die Desodorierung erfolgt mit überhitztem Wasserdampf in Gegenwart von Zitronensäure bei einer Temperatur von 180°C und einem Vakuum von 10 mbar.

Das Raffinat weist einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,1 sowie einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 57 % auf. Das Raffinat wird gegebenenfalls zwecks Aufkonzentrierung von Polyenfettsäuren einer gerichteten intramolekularen Umesterung in acetonischer Lösung und Gegenwart von Natriummethylat als Katalysator bei 10°C unterworfen und durch Tieftemperaturkristallisation bei – 15°C weiterfraktioniert.

Das Lipidkonzentrat in Form von hochungesättigten Triglyceriden weist einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,5 und einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 27 % auf, wobei die Ausbeute, bezogen auf das Raffinat, ca. 55 % beträgt.

Beispiel 2

1 kg der bei der Filetproduktion gemäß Beispiel 1 als Abprodukte anfallenden Innereien und Köpfe (Lipidgehalt 35,4 %) wird nach Homogenisierung und Zusatz von 1 kg Wasser mittels „Thermitase“ von *Thermoactinomyces vulgaris* (Gesamtaktivität 1×10^5 E) 3 h bei 60°C und pH 8,0 proteolysiert. Der Inkubationsansatz wird anschließend mit Phosphorsäure auf pH 6,5 eingestellt und mittels Düsenskocher 2 s auf 190°C erhitzt. Die Suspension wird durch Separation bei 12000 g in Feststoff, Hydrolysat und Lipid getrennt.

Die Lipidausbeute beläuft sich, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, auf ca. 97 %, wobei der Gehalt an freien Fettsäuren ca. 6 % beträgt.

Das Rohöl wird entsprechend Beispiel 1 raffiniert, wobei das Raffinat einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,0 sowie einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 64 % aufweist.

Das Raffinat wird gegebenenfalls durch Flüssigextraktion mit Propan bei 25 bar fraktioniert, wobei ein Lipidkonzentrat in Form von hochungesättigten Triglyceriden mit einem Polyenfettsäure-Quotienten von 1,3 und einem Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 35 % resultiert und die Ausbeute, bezogen auf das Raffinat, ca. 61 % beträgt.

Beispiel 3

1 kg geringmaßige Marmorkarpfen (Gesamtlipidgehalt 12,8 %) wird nach Homogenisierung unter Zusatz von 1 kg Wasser mittels „Pankreatin“ aus Schweinepankreas (Gesamtaktivität 1×10^6 E) und „Thermitase“ (Gesamtaktivität 1×10^4 E) 6 h bei 50°C und pH 7,5 proteolysiert und lipolysiert. Der Inkubationsansatz wird mit Kalilauge auf pH 8,0 eingestellt, im Düsenskocher 10 s auf 150°C erhitzt und durch Separation bei 18000 g in Feststoff, Hydrolysat und Lipidspaltprodukte getrennt.

Die Ausbeute an Lipidspaltprodukten beläuft sich, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, auf ca. 93 %.

Die einen Polyenfettsäure-Quotienten von ca. 1,1 sowie einen Gesamtgehalt von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 60 % aufweisenden Lipidspaltprodukte werden durch Harnstoffadduktbildung in methanolischer Lösung fraktioniert, mittels Phosphorsäure zu freien Fettsäuren umgesetzt und mit Glycerol in Gegenwart von ZnCl_2 als Katalysator reverestert.

Die Triglyceride weisen einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,4 sowie einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 38 % auf, wobei die Ausbeute, bezogen auf die Lipidspaltprodukte, ca. 65 % beträgt.

Beispiel 4

1 kg der gemäß Beispiel 1 anfallenden Bauchlappen wird nach Homogenisierung und Zusatz von 1 kg Wasser mittels selektiver Lipase von *Rhizopus japonicus* (Gesamtaktivität 1×10^{10} E) und Thermitase (Gesamtaktivität 1×10^5 E) bei 35°C und pH 8,0 proteolysiert und lipolysiert. Der Inkubationsansatz wird im Düsenskocher 4 s auf 160°C erhitzt und durch Separation bei 15000 g in Feststoff, Hydrolysat und Lipidspaltprodukte getrennt. Die Ausbeute an Lipidspaltprodukten beläuft sich, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, auf ca. 94 %.

Das Gemisch von Monoglyceriden und Seifen wird durch Extraktion mit Isopropanol getrennt, wobei ein Lipidkonzentrat in Form hochungesättigter 2-Monoglyceride mit einem Polyenfettsäure-Quotienten von 1,5 sowie einem Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren um ca. 10% resultiert und die Ausbeute, bezogen auf die Lipidspaltprodukte, ca. 91% beträgt.

Beispiel 5

1 kg gemäß Beispiel 3 anfallende geringmaßige Fische wird nach Homogenisierung und Zusatz von 1,0 kg Wasser mittels „Pepsin“ aus Schweinemagen (Gesamtaktivität 1×10^4 E) 2 h bei 30°C und pH 2,0 proteolysiert. Der Inkubationsansatz wird mit Kalilauge auf pH 6,5 eingestellt, im Düsenskoher 1 s auf 180°C erhitzt sowie mittels eines azeotropen Gemisches von Aceton/Methanol = 88/12 (V/V) entwässert und extrahiert.

Die nach Miszelladestillation unter Stickstoffatmosphäre bei 100 bar in einer Ausbeute von 93%, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, anfallenden Lipidspaltprodukte weisen einen Polyenfettsäure-Quotienten von ca. 1,0 und einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 60% auf.

Die Lipidspaltprodukte werden durch Alkoholyse in Gegenwart von Kaliumhydroxyd als Katalysator verestert.

Das Lipidkonzentrat in Form hochungesättigter Fettsäureethylester weist einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,2 sowie einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 50% auf, wobei die Ausbeute, bezogen auf die Lipidspaltprodukte, ca. 86% beträgt.

Beispiel 6

Ein gemäß Beispiel 3 nach enzymatischer Behandlung anfallender Inkubationsansatz wird mit Phosphorsäure auf pH 5,0 eingestellt, im Düsenskoher 2 s auf 170°C erhitzt und durch Separation bei 16000 g in Feststoff, Hydrolysat und Lipidspaltprodukte getrennt.

Die einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,1 aufweisenden freien Fettsäuren werden einer Bromadduktbildung unterworfen und direkt mit Ethanol in Gegenwart von Zink als Katalysator verestert.

Die Fettsäure-Ethylester weisen einen Polyenfettsäure-Quotienten von 1,6 sowie einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 8% auf, wobei die Ausbeute, bezogen auf die Lipidspaltprodukte, ca. 28% beträgt.

Beispiel 7

1 kg Hering (Lipidgehalt 19,6%) wird nach Homogenisierung und Zusatz von 1 kg Wasser mittels „Trypsin“ aus Schweinepankreas (Gesamtaktivität 2×10^3 E) bei 40°C und pH 7,0 3 h proteolysiert. Der Inkubationsansatz wird gemäß Beispiel 1 weiterbehandelt. Die Lipidausbeute beläuft sich, bezogen auf den Lipidgehalt des Rohstoffes, auf etwa 89%, wobei der Gehalt an freien Fettsäuren im Rohöl etwa 2,5% und im Raffinat etwa 0,1% beträgt.

Das nichtaufkonzentrierte Rohöl weist einen Polyenfettsäure-Quotienten von 7,5 und einen Gesamtgehalt an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren von etwa 79,1% auf, wobei die Ausbeute, bezogen auf das Rohöl, etwa 90% beträgt.

In Betracht gezogene Druckschrift:

US 4675 132

Tabelle 1: Fettgehalt verschiedener Gewebepartien von Silberkarpfen

	Masse [g]	% rel. ¹⁾	Fett [g]	% abs.	% rel. ¹⁾	% rel. ²⁾
Gesamt	3 675	100	594,9	16,2	–	100
ohne Schuppen	3 635	–	–	–	–	–
Rückenfilet mit Haut	1 235	33,6	10,5	8,5	2,9	17,7
Bauchmuskulatur (-lappen)	515	14,0	98,4	19,1	2,7	16,5
Ovar	345	9,4	25,5	7,4	0,7	4,3
Eingeweide ohne Ovar	340	9,3	128,9	37,9	3,5	21,7
Rippen und Fleischreste	130	3,5	15,0	11,5	0,4	2,5
Skelett, Flossen und Kopf	1 075	29,3	222,1	20,7	6,0	37,3

rel.¹⁾ = bezogen auf die Masse des Gesamtfisches.

rel.²⁾ = bezogen auf die Masse des Gesamtfettes.

Tabelle 2: Fettsäurespektrum der Triglyceridfraktion von Silberkarpfen (Eingeweide-Lipide)

Fettsäure %	Lipide nach Folch-Extraktion	Lipide nach Kochung	Lipide nach Proteolyse
10:0	Spur	Spur	Spur
12:0	0,1	0,1	0,1
12:1	0,1	0,1	0,1
12:2	Spur	Spur	Spur
13:0	0,1	0,1	0,1
14:0	3,8	5,7	5,2
14:1	0,4	0,5	0,5
14:2	0,2	0,2	0,2
15:0	0,5	0,7	0,7
16:0	13,8	16,1	15,8
16:1	11,4	11,8	10,8
16:2	1,0	1,1	1,2
17:0	0,7	0,6	0,8
18:0	2,6	3,1	3,6
18:1	27,5	27,8	27,7
n-9			
18:1	–	–	–
n-6			
18:2	4,5	5,2	4,6
n-6			
18:3	0,2	0,3	0,2
n-6			
18:3	6,8	7,8	6,7
n-3			
18:0	–	–	–
20:0	1,6	1,2	1,4
20:1	2,1	2,5	1,9
n-9			
20:2	0,3	0,4	0,4
n-6			
20:3	0,4	0,5	0,4
n-6			
20:4	3,5	3,6	3,0
n-6			
20:5	6,9	7,0	5,2
n-3			
22:1	3,0	3,1	2,5
n-9			
22:4	0,5	0,5	0,4
n-6			
22:5	1,2	0,7	1,1
n-6			
22:5	1,7	0,8	1,3
n-3			
22:6	5,0	5,3	4,0
n-3			