

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
B01D 11/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02828043.1

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1267174C

[22] 申请日 2002.12.12 [21] 申请号 02828043.1

[30] 优先权

[32] 2001.12.12 [33] US [31] 60/341,180

[86] 国际申请 PCT/US2002/039930 2002.12.12

[87] 国际公布 WO2003/049832 英 2003.6.19

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.12

[71] 专利权人 马泰克生物科学博尔德公司

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 丹尼尔·G·杜彭

塞缪尔·G·泽勒

桑德拉·I·迪尔茨

罗伯特·H·德赖弗

审查员 张麦红

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

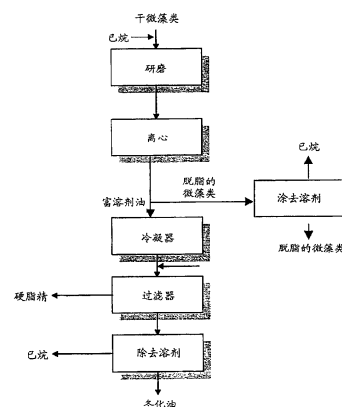
权利要求书 5 页 说明书 23 页 附图 5 页

[54] 发明名称

从含油种子和微生物来源提取和冬化脂类的方法

[57] 摘要

本发明公开了主要具有含有至少一种长链多不饱和脂肪酸的中性脂类成分的脂类组合物的纯化方法。该方法使用使所述的脂类组合物接触极性溶剂、诸如丙酮接触的步骤，其中对所述的溶剂进行选择，使得溶于该溶剂的污染物比溶于所述长链多不饱和脂肪酸的少。该方法一般在冷却温度、包括约 0℃ 下进行。在从所述脂类组合物中沉淀污染物时，进行分离以便从该脂类组合物中除去沉淀的物质。所述的长链多不饱和脂肪酸可以包括 ARA、DPA、EPA 和/或 DHA。该方法可以有效使脂类组合物冬化，由此减少这类组合物变浑浊的倾向。



使用己烷的富含DHA脂类提取方法的概述

1. 主要包括中性脂类的脂类组合物的纯化方法，其中所述的脂类组合物含有至少一种长链多不饱和脂肪酸和至少一种其它化合物，所述的方法
- 5 包括下列步骤：

(a) 使所述脂类组合物接触极性溶剂，其中所述的其它化合物在所述极性溶剂中的可溶性低于所述长链多不饱和脂肪酸在所述极性溶剂中的可溶性；

- (b) 将所述脂类组合物维持在有效沉淀至少部分所述其它化合物的温度范围；和
- 10

(c) 从所述脂类组合物中除去至少部分所述的其它化合物而形成脂类产物。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的脂类组合物包括至少 50 % 的中性脂类。

3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的脂类组合物包括至少 85 % 的中性脂类。
- 15

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的中性脂类包括甘油三酯。

5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的中性脂类包括至少 50 % 的甘油三酯。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的至少一种其它化合物是可形成浑浊的化合物，并且所述方法减少脂类组合物中的浑浊形成。
- 20

7. 权利要求 1 所述的方法，其中以重量百分比计，所述长链多不饱和脂肪酸的浓度在所述方法后大于它在此前的浓度。

8. 权利要求 1 所述的方法，其中以重量百分比计，所述其它化合物的浓度在所述方法后小于它在此前的浓度。
- 25

9. 权利要求 1 所述的方法，其中以重量百分比计，存在于所述脂类中的任意含磷化合物的浓度在所述方法后低于它在此前的浓度。

10. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的方法产生使下游加工程序减少的可接受的产品。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的方法产生使脱胶减少或不需
- 30
- 脱胶的可接受的产品。

12. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的极性溶剂选自丙酮、异丙醇、甲醇、乙醇、乙酸乙酯及其混合物组成的组。

13. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的极性溶剂包括丙酮。

14. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的温度范围为 $-20^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ 。

5 15. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的温度范围为 $-5^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$ 。

16. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的温度范围为 $-5^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$ 。

17. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的温度为 0°C 。

18. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的长链多不饱和脂肪酸选自花生四烯酸(ARA)、 ω -6 二十二碳五烯酸(DPA(n-6))、 ω -3 二十二碳五烯酸
10 (DPA(n-3))、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)组成的组。

19. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的其它化合物选自三饱和酸甘油酯类、含磷物质、蜡酯类、含饱和脂肪酸的甾醇酯类、甾醇类、角鲨烯和烃类组成的组。

20. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的其它化合物选自三饱和酸甘油
15 酯类、磷脂类和蜡酯类组成的组。

21. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的其它化合物选自月桂酸(C12 : 0)、肉豆蔻酸(C14 : 0)、棕榈酸(C16 : 0)和硬脂酸(C18 : 0)脂肪酸的三饱和酸甘油酯类及其混合物组成的组。

22. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的脂类组合物最初包括至少一种
20 长链多不饱和脂肪酸 和至少一种三饱和酸甘油酯。

23. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的其它化合物在以起始浓度存在于最初的脂类组合物中时形成浑浊。

24. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的长链多不饱和脂肪酸获自含长链多不饱和脂肪酸的生物材料, 这些生物材料选自含长链多不饱和脂肪酸的微生物生物物质和来自已经遗传修饰而产生含长链多不饱和脂肪酸的脂类的植物的含油种子组成的组。
25

25. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的长链多不饱和脂肪酸获自已经用来自微生物的产生长链多不饱和脂肪酸的基因修饰的植物。

26. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述的长链多不饱和脂肪酸获自选自
30 thraustochytrid 生物物质、腰鞭毛虫目生物物质、被孢霉属生物物质和含油种子组成的组的来源, 其中所述的含油种子来源于含有来自 thraustochytrids、

腰鞭毛虫目或被孢霉属的基因的遗传修饰的植物。

27. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的长链多不饱和脂肪酸获自包括 *Schizochytrium*、*Thraustochytrium* 或 *Crypthecodinium cohnii* 生物质或来源于含有来自 *Schizochytrium* 或 *Thraustochytrium* 的基因的遗传修
5 饰的植物的含油种子在内的组。

28. 权利要求 1 所述的方法，其中溶剂：脂类组合物之比为 1：10 - 20：
1。

29. 权利要求 1 所述的方法，其中溶剂：脂类组合物之比为 1：8 - 10：
1。

10 30. 权利要求 1 所述的方法，其中溶剂：脂类组合物之比为 1：5 - 5：1。

31. 权利要求 1 所述的方法，其中溶剂：脂类组合物之比为 1：2 - 2.5：
1。

32. 权利要求 1 所述的方法，其中溶剂：脂类组合物之比为 1：1。

33. 权利要求 1 所述的方法，其中使用极性溶剂在低温下提取脂类以便
15 选择性地提取含有所述长链多不饱和脂肪酸的甘油三酯分子，而不提取不
溶于所述极性溶剂的其它化合物。

34. 权利要求 1 所述的方法，其中从生物质中提取所述的脂类组合物且
其中从包括所述长链多不饱和脂肪酸和所述极性溶剂的溶剂油中分离细胞
碎片和沉淀的其它化合物。

- 20 35. 权利要求 1 所述的方法，其中所述溶剂与所述脂类组合物的接触时
间为 0.5 - 12 小时。

36. 权利要求 1 所述的方法，其中所述溶剂与所述脂类组合物的接触时
间为 2 - 6 小时。

- 25 37. 权利要求 1 所述的方法，其中所述溶剂与所述脂类组合物的接触时
间为 4 小时。

38. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括下列步骤：

- (a) 使用所述的极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进
行的提取过程中回收脂类，形成包括所述脂类组合物和所述极性溶剂混合
物的溶剂油；
30 (b) 冷却所述溶剂油以便选择性沉淀其它化合物；和
(c) 从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。

39. 权利要求 38 所述的方法，其中从生物质中提取所述的脂类组合物且其中从包括所述长链多不饱和脂肪酸和所述极性溶剂的溶剂油中分离细胞碎片和所述沉淀的其它化合物。

40. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括下列步骤：

- 5 (a) 使用所述的极性溶剂从在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中的生物质中回收脂类，形成包括所述脂类组合物、所述极性溶剂和细胞碎片的混合物的溶剂油；
- (b) 从所述溶剂油中分离所述的细胞碎片；
- (c) 冷却所述溶剂油以便选择性沉淀其它化合物；和
- 10 (d) 从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。

41. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括下列步骤：

- (a) 使用非极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中回收脂类，形成包括所述脂类组合物和所述非极性溶剂混合物的溶剂油；
- 15 (b) 从所述溶剂油中除去大部分所述的非极性溶剂；
- (c) 向所述溶剂油中加入极性溶剂；
- (d) 冷却所述溶剂油以便选择性沉淀其它化合物；和
- (e) 从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。

42. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括下列步骤：

- 20 (a) 使用非极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中回收脂类，形成包括所述脂类组合物和所述非极性溶剂混合物的溶剂油；
- (b) 对所述溶剂油冬化；
- (c) 从所述溶剂油中除去至少 95 % 所述的非极性溶剂；
- 25 (d) 向所述溶剂油中加入极性溶剂；
- (e) 冷却所述溶剂油以便选择性沉淀其它化合物；和
- (f) 从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。

43. 权利要求 41-42 所述的方法，其中在从所述溶剂油中除去大部分所述非极性溶剂后残余的非极性溶剂为所述溶剂油的 0 - 4 % 重量。

- 30 44. 权利要求 41-42 所述的方法，其中在从所述溶剂油中除去大部分所述非极性溶剂后残余的非极性溶剂为所述溶剂油的 1 - 4 % 重量。

-
45. 权利要求 41-42 所述的方法，其中所述的非极性溶剂为己烷。
46. 权利要求 1 或 38-42 中任意一项所述的方法，其中所述的分离或除去步骤包括通过液相/固相分离技术分离或除去沉淀的其它化合物。
47. 权利要求 1 或 38-42 中任意一项所述的方法，其中所述的分离或除去步骤包括通过离心、过滤或其组合分离或除去沉淀的其它化合物。
- 5

从含油种子和微生物来源提取和冬化脂类的方法

发明领域

- 5 本发明涉及脂类且更具体的说是含有长链多不饱和脂肪酸(LCPUFAs)的脂类的提取和纯化方法。本发明特别提供了获得高浓度所需 LCPUFAs 和低浓度不需要的化合物、诸如三饱和酸甘油酯类(trisaturated glycerides)的方法。

10 发明背景

- 一般来说,冬化是对除去在低温下植物油中出现的沉降物的过程给予的名称。它来源于使棉子油在寒冷的冬月中保持户外储存并过滤出不含沉降物的油的早期实践。干燥分级结晶是具有最高熔点温度的甘油三酯类优选从纯液体(例如液液)中冷却过程中结晶的过程。在结晶完全后,通过几
- 15 种类型的物理方法之一从液相中分离固相。另一方面,将溶剂结晶用于促进甘油三酯晶体形成,因为在低温下,使用溶剂的甘油三酯类一般比不使用溶剂形成更稳定的晶体。

- 使用常规技术和溶剂(例如己烷)从通过发酵产生的 Schizochytrium 菌生物质中提取富含二十二碳六烯酸(DHA)的脂类且通过将所得提取的脂类
- 20 冷却至 $-2-2^{\circ}\text{C}$ 、随后离心而使其冬化。然后将脂类精制、漂白并除臭且放入胶囊而作为营养补充剂销售。从这种产品中产生的问题在于在一段时间内产品中会形成浑浊。

- 在从生物质中回收脂类的一种方法中,正如附图 1 中所示,使干燥的微生物类悬浮于商品级正己烷中并湿磨。己烷主要提取甘油三酯类、二脂酰
- 25 甘油酯类、单酸甘油酯类和酯化的甾醇类,不过,也可以提取较低程度的总脂类级分中的其它成分,诸如磷脂类、游离甾醇类和类胡萝卜素。将离心用于从富含脂类的溶剂油中分离剩余的生物质。所得脂类与溶剂的混合物称作溶剂油(miscella)。使用正己烷将澄清溶剂油中的脂类含量调整至约 45 wt%。使该溶剂油冬化,特别是将该溶剂油冷却至约 -1°C 并保持 8-
- 30 12 小时以便结晶出任何饱和脂肪或高熔点成分。然后过滤溶剂油以除去结晶的硬脂精相。从溶剂油中除去己烷,此后得到冬化脂类。

正如附图 2 中所示, 加热冬化脂类并用柠檬酸或磷酸处理以水化脂类中存在的任何磷脂类。加入氢氧化钠以中和存在的任何游离脂肪酸。使用离心机除去产生的树脂(水合磷脂类)和皂脚(中性脂肪酸)。将脂类与水混合并重新离心以除去任何残余的树脂/皂脚。可以使用第一次离心进行该步骤。在用柠檬酸预处理后用二氧化硅和漂白土漂白精制的脂类以除去过氧化物、有颜色的化合物和微量皂脚、磷脂类和金属。在该循环结束时加入助滤剂以便有利于通过过滤从脂类中除去剩余的漂白化合物。

可以进行另一个步骤, 其中将漂白的脂类冷却至约 5°C - 约 15°C 并保持约 6 - 约 8 小时以结晶任何保留的硬脂精或蜡, 条件是显然在稳定时形成沉降物层。如果进行该步骤, 那么可以将过滤器用于促进通过过滤除去结晶。

将在高度真空中和升温下起作用的除臭机用于破坏过氧化物, 如果它完全保留下来, 则可以在随后分解和启动自由基反应。该步骤还可以除去任何残留的可以产生臭气和香味的低分子量化合物。使在除臭机中的接触时间最少以防止形成反式-脂肪酸。加入安全而合适的批准食品使用的抗氧化剂。在氮气环境中将稳定的脂类包装在含酚的 (phenolic-lined) 金属容器内以防止氧化。

分析脂类填充的胶囊中形成的浑浊物且发现它由含肉豆蔻酸 (C14 : 0) 和棕榈酸 (C16 : 0) 脂肪酸的甘油三酯类晶体、即一种三饱和脂肪酸甘油酯组成。这些晶体具有的熔点约为 50-55°C。三饱和酸甘油酯类包括 6-8% 的提取的粗脂类。上述冬化过程将这些三饱和酸甘油酯类的浓度降至 <1%; 然而, 还不足以低至完全消除脂类中浑浊 (haze) 的形成。另外, 用这种传统的己烷 (55% 己烷和 45% 粗油) 冬化方法除去了约 30% 的脂类和相应 30% 的 DHA。另一个问题是当温度降至结晶剩余 < 1% 的三饱和酸甘油三酯类时, 更多的所需 LCPUFA、例如含有一个 DHA 分子的二饱和酸甘油三酯类也会结晶出来。这会导致靶产物 DHA 显著损耗。还可能损耗 8-10% 的脂类。所以虽经试图解决一个问题, 而另一个问题又产生了。需要拥有可以将 LCPUFA 浓度维持在所需高水平上并可以减少或消除浑浊的方法。

30 概述

本发明包括主要具有中性脂类成分的脂类组合物的纯化方法, 其中该

组合物含有至少一种长链多不饱和脂肪酸(LCPUFA)和至少一种其它化合物。该方法包括使所述脂类组合物接触极性溶剂的步骤且对所述溶剂进行选择以使溶于该溶剂的其它化合物少于溶于该溶剂的LCPUFA。例如,所述的极性溶剂选自丙酮、异丙醇、甲醇、乙醇、乙酸乙酯及其混合物。该方法进一步包括将所述脂类组合物维持在有效沉淀至少部分其它化合物的温度范围的步骤。例如,该温度范围可以约为-20℃-约50℃、约-5℃-约20℃、约-5℃-约5℃或约0℃。该方法随后包括从脂类组合物中除去至少部分其它化合物而形成脂类产物的步骤。该方法可以特别用于减少脂类组合物中形成的浑浊,其中除去的化合物为形成浑浊的化合物。

10 在各种实施方案中,所述的脂类组合物可以包括至少50%或85%的中性脂类或至少50%的甘油三酯。以重量百分比计,所述LCPUFA的浓度在所述方法后大于它在此前的浓度;而以重量百分比计,其它化合物的浓度在所述方法后低于它在此前的浓度。例如,以重量百分比计,脂类中存在的任何含磷化合物的总浓度在所述方法后均低于它在此前的浓度。本发明的方法可以产生需要较少下游加工、诸如减少脱胶或不需要脱胶加工的可接受产品。

LCPUFA可以为花生四烯酸(ARA)、 ω -6二十二碳五烯酸(DPA(n-6))、 ω -3二十二碳五烯酸(DPA(n-3))、二十碳五烯酸(EPA)和/或二十二碳六烯酸(DHA)。其它化合物可以为三饱和酸甘油酯类、含磷物质、蜡酯类、含饱和脂肪酸的甾醇酯类、甾醇类、角鲨烯和/或烃类。另一方面,其它化合物可以为三饱和酸甘油酯类、磷脂类和蜡酯类。另一方面,其它化合物可以为月桂酸(C12:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0)脂肪酸的三饱和酸甘油酯类和/或其混合物。在具体的实施方案中,所述的脂类组合物最初包括至少一种LCPUFA和至少一种三饱和酸甘油酯。所述的LCPUFA可以获自含LCPUFA的生物材料,这些生物材料选自含LCPUFA的微生物生物质和来自已经遗传修饰而产生含LCPUFA的脂类的植物的含油种子。此外,所述的LCPUFA可以获自已经用来自微生物的产生LCPUFA的基因修饰的植物。在另一个实施方案中,所述的LCPUFA可以获自选自thraustochytrid生物质、腰鞭毛虫目(dinoflagellate)生物质、被孢霉属(Mortierella)生物质和含油种子(oilseed)组成的组的来源,其中所述的含油种子来源于含有来自thraustochytrids、腰鞭毛虫目或被孢霉属的基

因的遗传修饰的植物。在另一个实施方案中，所述的 LCPUFA 获自包括 Schizochytrium、Thraustochytrium 或 Crypthecodinium cohnii 生物质或来源于含有来自 Schizochytrium 或 Thraustochytrium 的基因的遗传修饰的植物的含油种子在内的组。

- 5 在本发明的各种实施方案中，溶剂：脂类组合物之比约为 1 : 10 - 约 20: 1、约为 1 : 8 - 约 10: 1、约为 1 : 5 - 约 5: 1、约为 1 : 2 - 约 2.5: 1 或约为 1 : 1。在其它实施方案中，所述溶剂与所述脂类组合物的接触时间约为 0.5 - 约 12 小时、约 2 - 约 6 小时或约为 4 小时。

- 10 在本发明的另一个实施方案中，使用极性溶剂在低温下提取脂类，使得选择性提取含有 LCPUFA 的甘油三酯分子，而不提取不溶于极性溶剂的其它化合物。在另一个实施方案中，从生物质中提取脂类组合物并从包括 LCPUFA 和极性溶剂的溶剂油中分离细胞碎片和沉淀的其它化合物。

- 15 本发明的另一个实施方案包括下列步骤：使用所述的极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中回收脂类、形成包括所述脂类组合物和所述极性溶剂的混合物的溶剂油；冷却所述溶剂油以便选择性沉淀不需要的化合物；和从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。在该实施方案中，可以从生物质中提取脂类组合物并从包括 LCPUFA 和极性溶剂的溶剂油中分离细胞碎片和沉淀的其它化合物。

- 20 本发明的另一个实施方案包括下列步骤：使用所述的极性溶剂从在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中的生物质中回收脂类、形成包括所述脂类组合物、所述极性溶剂和细胞碎片的混合物的溶剂油。该方法进一步包括从所述溶剂油中分离所述的细胞碎片并冷却所述溶剂油以便选择性沉淀不需要的化合物的步骤。最终从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。

- 25 本发明的另一个实施方案包括下列步骤：使用非极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的提取过程中回收脂类、形成包括所述脂类组合物和所述非极性溶剂的混合物的溶剂油。该方法进一步包括下列步骤：从所述溶剂油中除去大部分所述的非极性溶剂、向所述溶剂油中加入极性溶剂并冷却所述溶剂油以便选择性沉淀不需要的化合物。最终从所述溶剂油中分离所述沉淀的其它化合物。本发明的另一个实施方案包括下列步骤：使用非极性溶剂在基本上溶解全部甘油三酯成分的温度下进行的
- 30

提取过程中回收脂类、形成包括所述脂类组合物和所述非极性溶剂的混合物的溶剂油；并冬化该溶剂油。从所述溶剂油中除去大部分所述的非极性溶剂并向其中加入极性溶剂。冷却该溶剂油以便选择性沉淀不需要的化合物，然后将其从溶剂油中分离。当从该溶剂油中除去非极性溶剂时，除去
5 后残余的非极性溶剂约为 0 - 约 4 % 重量或约 1 - 约 4 % 重量。

在使用非极性溶剂的本发明的各种实施方案中，所述的非极性溶剂可以为己烷。在使用分离或除去步骤用于沉淀的其它化合物的本发明各种实施方案中，该步骤可以使用液相/固相分离技术，诸如离心、过滤或其组合。

10 附图简述

附图 1 是现有提取方法的流程图。

附图 2 是现有精制、漂白和除臭工艺的流程图。

附图 3 是在一个步骤中使用丙酮的本发明富含 DHA 的脂类提取方法的流程图。

15 附图 4 是在两个步骤中使用丙酮的本发明富含 DHA 的脂类提取方法的流程图。

附图 5 是本发明富含 DHA 的脂类的己烷提取方法和丙酮冬化方法的流程图。

20 发明详述

本发明提供了优选降低脂类中不需要成分的浓度、同时维持高浓度所需 LCPUFAs 的方法。本文所用的 LCPUFAs 是含有 20 个或 20 个以上碳原子和 2 个(优选 3 个)或 2 个以上双键的脂肪酸。所述的 LCPUFAs 可以为各种形式，诸如磷脂类、游离脂肪酸类和脂肪酸酯类、包括脂肪酸的甘油三酯
25 类。可以理解的是当指所需的 LCPUFA 时意味着是指以脂类形式存在的 LCPUFA、最典型的情况是甘油三酯且较低程度为单酸甘油酯类和二脂酰甘油酯类。正如以重量百分比为基础测定的，优选所需 LCPUFA 在所得脂类产物中的浓度高于它在起始脂类组合物中的浓度。不需要的成分优选为三饱和和酸甘油酯类，诸如月桂酸(C12 : 0)、肉豆蔻酸(C14 : 0)、棕榈酸(C16 :
30 0)和硬脂酸(C18 : 0)脂肪酸的三饱和酸甘油酯类及其混合物。除三饱和酸甘油酯类外，其它不需要成分的实例还包括含磷化合物(例如磷脂类)、蜡

酯类、含饱和脂肪酸的甾醇酯类、甾醇类、角鲨烯、烃类等。正如以重量百分比为基础测定的，优选在所得产物中不需要化合物中的两种或多种比起始脂类中减少。除非另有说明，本文所用的用量一般以重量百分比计。

在本发明优选的实施方案中，当与起始脂类相比时，使所得产物的浑浊或雾化程度较低。作为本发明方法的结果，可以减少或消除后续加工步骤、诸如精制。例如，后续加工步骤、诸如漂白和/或除臭可以帮助减少或消除精制(或脱胶)步骤。精制、漂白和除臭工艺的实例如对比例2中所述。如果不取消精制工艺，那么可以通过减少使用的腐蚀剂的量而减少它。尽管不希望受到任何理论约束，但是认为浑浊或雾化的主要原因是由三饱和甘油三酯类造成的。看起来减少单-取代或二-取代的甘油三酯类并非重要。

本文所用的术语“脂类”一般指的是各种脂类，诸如：磷脂类；游离脂肪酸类；脂肪酸酯类，包括脂肪酸甘油三酯；甾醇类；色素(例如类胡萝卜素和氧化类胡萝卜素)及其它脂类；和与脂类相关的化合物，诸如植物甾醇类、麦角硫因(ergothionine)、硫辛酸和抗氧化剂、包括 β -胡萝卜素、生育三烯酚类和生育酚。优选的脂类和与脂类相关的化合物包括、但不限于：胆固醇；植物甾醇类；链甾醇；生育三烯酚类；生育酚类；泛醌类；类胡萝卜素和叶黄素，诸如 β -胡萝卜素、黄体素、番茄红素、虾青素、玉米黄质、角黄素；和脂肪酸类，诸如共轭亚油酸；以及 ω -3和 ω -6高级不饱和脂肪酸，诸如二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸、花生四烯酸、十八碳四烯酸、双高亚麻酸和 γ -亚麻酸或其混合物。为方便起见，除非另有说明，术语“脂类”指的是脂类和/或与脂类相关的化合物。

不需要的成分共有相对不溶于冷丙酮或类似极性溶剂的常见特征。另一方面，所需的LCPUFAs、诸如花生四烯酸(ARA)、 ω -6二十二碳五烯酸(DPA(n-6))， ω -3二十二碳五烯酸(DPA(n-3))、二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)溶于冷丙酮或类似溶剂。无论是丙酮还是类似极性溶剂，关键特征在于所需的LCPUFAs在所需温度下溶于该溶剂，而不需要的化合物在相同温度下不溶于该溶剂。有用的指导在于选择具有与丙酮或乙酸乙酯近似介电常数的溶剂。用于本发明该方面的优选溶剂包括丙酮和类似极性溶剂，诸如异丙醇、甲醇、乙醇、乙酸乙酯或这些溶剂的混合物。这些溶剂均为极性溶剂且含有双键和长碳链的LCPUFAs也是极性的且由此溶于

这些极性溶剂。然而，如果这些溶剂极性过强，那么 LCPUFAs 也可能不溶。所述溶剂还优选用于食品应用。

令人意外地发现丙酮可以用于从粗脂类中选择性沉淀三饱和酸甘油酯类。当用 5 个体积的丙酮处理来自 *Schizochytrium* 属的大量未冬化富含 DHA 的脂类并冷却时，通过结晶、随后离心除去基本上全部的三饱和酸甘油酯类。该方法几乎不会除去或不会除去含 DHA 的甘油三酯类。与通过标准冬化方法得到的 37% 相比，所得冬化脂类含有 41% DHA。

通过将丙酮或类似溶剂提取与“原位”冬化法合并而更好地改善在破坏了三饱和酸甘油酯类情况下含有长链多不饱和脂肪酸的甘油三酯类或来自含有两种饱和脂肪酸和一种单不饱和脂肪酸的甘油三酯类的回收效率可以找到进一步利用该发现的方式。本发明该方法的一个优点在于几乎不损耗所需 LCPUFAs。例如，在现有的方法中，含有所需 LCPUFAs 的约 30% 提取脂类在冬化过程中损耗。相反，最直接的与现有技术方法相差无几的本发明方法的实施方案（即己烷提取，随后进行丙酮冬化）仅使起始提取的脂类损耗了约 7% - 约 10% 作为丙酮冬化的结果。结果是在本发明的该实施方案中，在产率损失上实现了约 40% 或 40% 以上的下降。这是超过现有技术方法（己烷提取和冬化 + 完全精制、漂白和除臭（RBD））的显著改进。在现有技术方法的冬化步骤中导致的 DHA 和脂类的损耗最大。

首先，在优选的方法中，使用丙酮或类似极性溶剂（不是己烷）在低温下提取脂类以便从 *Schizochytrium* 属生物质中选择性提取含有 LCPUFA 的甘油三酯分子。这类方法的流程图如附图 3 中所示。由于丙酮在低温下的选择性（三饱和酸甘油酯类不溶于冷丙酮，而含 LCPUFA- 的甘油三酯类溶于冷丙酮），所以易于从生物质中选择性提取出含 LCPUFA 的甘油三酯且由此消除了对单独的冬化步骤的需求。可以按照任意适当的方式进行溶剂提取。例如，可以在有冷溶剂存在的情况下对干生物质进行机械（例如使用研磨机或匀化器）或化学（例如使用酸、酶或碱）裂解。在一步法中从溶剂油中分离细胞碎片和沉淀的三饱和酸甘油酯类。如果需要，在加工步骤后，可以进行诸如经精制、漂白和除臭这样的纯化步骤。

第二个选择是在常用提取方法（包括任意类型的研磨技术）中使用丙酮或类似极性溶剂从生物质中定量回收脂类。在使全部甘油三酯成分溶解的温度下进行这种提取。在从溶剂油中除去细胞碎片前（含有甘油三酯类的脂

类在溶剂中), 冷却溶剂油以便选择性除去三饱和酸甘油酯类。然后将冷却的溶剂油离心、过滤或使用其它技术分离以便除去细胞碎片和三饱和酸甘油酯成分。这种选择将提取与冬化方法并入了一步中。

第三种选择是在常用提取方法(包括任意类型的研磨技术)中使用丙酮或类似极性溶剂从生物质中定量回收脂类。在使全部甘油三酯成分溶解的温度下进行这种提取。使用常规分离技术从溶剂油中除去细胞碎片(含有甘油三酯类的脂类在溶剂中)。然后冷却溶剂油以便结晶出三饱和酸甘油酯类, 通过离心、过滤或使用其它技术分离除去它们。这种选择在两个阶段中使用了提取和冬化; 然而, 使用丙酮或类似极性溶剂可以完成这两项任务。这类方法的流程图如附图 4 中所示。

第四种选择是将诸如己烷(例如正己烷、异己烷或其组合)这样的非极性溶剂用作提取溶剂并将丙酮用作冬化溶剂。优选在冬化前除去至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%且更优选至少 99%的非极性溶剂。可以在除臭前的任意阶段上使用冬化步骤。这类方法的流程图入附图 5 中所示。

第五种选择是使用常规己烷提取和基于己烷的冬化以便除去大部分三饱和酸甘油酯成分并在除臭前使用"磨光(polishing)"步骤以除去少量使脂类中形成浑浊的三饱和酸甘油酯类。该磨光步骤使用丙酮和/或类似溶剂。这种选择除去了因浑浊产生的问题, 但脂类浓度也下降了。

优选所述的脂类组合物开始包括至少一种 LCPUFA 和至少一种三饱和酸甘油酯。其它或不需要的化合物在以起始起始浓度包含在脂类组合物中时优先使浑浊形成。优选从包括下列物质的组中选择用于脂类提取的含 LCPUFA 的生物材料: 含 LCPUFA 的微生物生物质或来自已经遗传修饰产生含有 LCPUFA 的脂类的植物、特别是已经用来自微生物(藻类、真菌、原生生物或细菌)的产生 LCPUFA 的基因修饰的植物的含油种子。更优选用于脂类提取的含 LCPUFA 的生物材料选自包括下列物质的组: thraustochytrid 生物质、腰鞭毛虫目生物质和/或被孢霉属生物质和/或含油种子, 其中所述的含油种子来源于含有来自 thraustochytrids、腰鞭毛虫目和/或被孢霉属的基因的遗传修饰的植物。更优选用于脂类提取的含 LCPUFA 的生物材料选自包括下列物质的组: Schizochytrium、Thraustochytrium 和/或 Crypthecodinium(优选 Crypthecodinium cohnii)生物质或来源于含有来自

Schizochytrium 或 Thraustochytrium 和 / 或 Crypthecodinium (优选 Crypthecodinium cohnii) 的基因的遗传修饰的植物的含油种子。

5 优选起始的脂类组合物主要由中性脂类组成。优选起始的脂类组合物包括至少 50% 的中性脂类、优选至少 60% 的中性脂类、优选至少 75% 的中性脂类、优选至少 85% 的中性脂类且优选至少 90% 的中性脂类。优选该中性脂类主要包括甘油三酯。优选起始的脂类组合物包括至少 50% 的甘油三酯、优选至少 60% 的甘油三酯、优选至少 75% 的甘油三酯且优选至少 85% 的甘油三酯。在本段落中上述的百分比指的是重量百分比。优选所需 LCPUFA 在所得产物中的浓度高于在起始脂类组合物中的浓度。

10 为提取或冬化过程而基于重量优选的极性溶剂：脂类之比约为 1: 10 - 约 20: 1、更优选约 1: 8 - 约 10: 1、优选约 1: 5 - 约 5: 1 且优选约 1: 2 - 约 2.5: 1。优选极性溶剂与脂类的接触时间约为 0.5 - 约 12 小时、优选约 2 - 约 6 小时优选约 4 小时。如果使用非极性脂类，则优选残余的非极性脂类约为 0 - 约 4 重量百分比且优选约 1 - 约 4 重量百分比。

15 为下列方法和目的优选的温度为脂类凝固点 - 不需要成分 (例如三饱和和酸甘油酯类) 的熔点、更优选约 -20°C - 约 50°C、更优选约 -5°C - 约 20°C、更优选约 -5°C - 约 5°C、更优选约 0°C: (i) 冷提取法; (ii) 提取、随后冷却并过滤/离心; (iii) 提取、过滤/离心细胞碎片;、随后冷却和过滤/离心和 (iv) 溶剂冬化或磨光步骤的冷却条件。

20 本方法其它优选的属性包括在破坏在冷丙酮中相对不溶的三饱和酸甘油酯类和其它成分的情况下仅选择性回收含 LCPUFA 的甘油三酯类，所述的其它成分包括磷脂类、蜡酯类、含饱和脂肪酸的甾醇酯类、甾醇类、角鲨烯、烃类等。通过在破坏这些不需要的成分情况下仅选择性回收含 LCPUFA 的甘油三酯类使得消除或减少其它下游纯化步骤 (诸如冬化、精制和漂白)
25 的可能性得以实现。

实施例 1

概述

分析获自 Schizochytrium 的富含 DHA 的脂类的样品 (样品 1, 未冬化的脂类, a. k. a. "高熔点") 和从获自 Schizochytrium 的另一种富含 DHA 的脂类中分离的沉降物 (样品 2) 以便测定固相 (样品 1) 和絮凝物/沉降物 (样品

2) 的性质。

将植物等级(scale) (环境温度下为半固体) 下产生的未冬化脂类样品 1 溶于 4 个体积的冷丙酮并混合。通过经玻璃纤维滤器过滤分离固体白色粉末(约 7%重量)。经证实具有 52.4-53.5℃熔点温度的该固体白色粉末为甘油三酯类(基于通过薄层色谱法(TLC)的单斑点)且当用 GLC 分析时主要含有肉豆蔻酸(26%)和棕榈酸(66%)。这种高熔点甘油三酯级分含有几乎不含 DHA/DPA 的饱和脂肪酸。分离的脂类级分(91%重量)在室温下为橙色液体且含有 41.0%DHA 和 16.0% DPA。与样品 1 的原料脂肪酸分布相比, 富集了约 8%的 DHA 和 DPA - 这是确切的 DHA 和 DPA "纯化"。

10 另一种来自 Schizochytrium 的富含 DHA 的重新加工的脂类在环境温度下储存数天期限时含有明显絮凝样的物质(浑浊)。通过离心分离这种絮凝物。将絮凝物/沉降物("样品 2 沉降物")溶于 10 个体积的冷丙酮、混合并过滤。通过经玻璃纤维滤器过滤分离约 15%重量的固体白色粉末。该固体白色粉末具有 50.1-51.4℃熔点温度且证实为含有肉豆蔻酸(29%)和棕榈酸(59%)的甘油三酯类(基于 TLC 的单斑点)。这就是含有几乎不含 DHA/DPA 的饱和脂肪酸的高熔点甘油三酯级分。分离的脂类级分(85%重量)在室温下为澄清的橙色液体且含有 41.1%DHA 和 16.3% DPA。认为来自 Schizochytrium 的重新加工的脂类中有絮凝物形成是因含有在稳定时从脂类中结晶出的肉豆蔻酸和棕榈酸的高熔点温度的甘油三酯导致的。

20

实验

一般情况-从冷冻储存中取出来自样品 1(250g 瓶)的富含 DHA 的样品。这是未冬化的脂类样品。将该样品温至环境温度并照此使用。

25 使用实验室用离心机从富含 DHA 的脂类中分离沉降物(样品 2)。富含 DHA 的脂类是大量重新加工的脂类, 它们在环境温度下保持稳定时含有可见的絮凝物。通过离心样品并从沉降物中离心液体级分来分离这种絮凝物。液体级分中在环境温度下保持澄清; 因此, 认为这种絮凝物存在于分离的沉降物中。

30 丙酮冬化-使用丙酮冬化步骤对分离自重新加工的脂类(样品 2)的未冬化的脂类(样品 1)和沉降物进行分级分离。将沉降物与未冬化的样品溶于过量丙酮(冰/水浴温度)并混合以溶解和悬浮液体成分。立即在真空中通过玻

玻璃纤维滤器过滤该溶液/混悬液。用少量冷丙酮洗涤滤纸和保留在滤纸上的内含物。使滤纸上的内含物风干并称重。在真空中浓缩脂类/丙酮级分而得到纯脂类并称重。

- 5 TLC-进行 TLC 以便使用硅胶 60 板测定脂类组合物。研发的溶剂系统由石油醚: 乙醚: 乙酸的 90: 10: 1 混合物组成。将斑点的 R_f 值与那些列在 Morris Kates 的 "Techniques in Lipidology" 中的值进行比较。

熔点测定-使用实验室结构的熔点设备测定熔点。

红外光谱法-使用 Perkin Elmer 283B 红外分光计获得红外光谱。经分析液体级分为纯的。在氯仿中分析来自丙酮冬化的固体级分。

- 10 脂肪酸甲酯类 (FAMES)-使用无水 HCl 的甲醇溶液、按照用于测定 C12 - C22: 6 游离脂肪酸分布的步骤对富含 DHA 的脂类样品 1、样品 2 (重新加工的) 与丙酮冬化级分的等分部分进行酯交换。完成了全部 FAME 制备和 GLC 操作。鉴定 FAME's 并使用 NuChek Prep 分析参比标准品 502、应用标准内标 (C19 : 0) 定量以便测定实验响应因子。
- 15 气相-液相色谱法-使用安装了 Hewlett-Packard 自动取样器、ChemStation 软件、30 m x 0.32mm SP-2380 毛细管柱 (Supelco) 和火焰离子化检测器的 Hewlett-Packard Model 6890 Series II 气相-液相色谱仪对甲酯类进行气相-液相色谱。将烘干温度保持在 120℃ 下 3 分钟、按照程序以 5℃/分钟达到 190℃ 下、保持在 190℃ 下 1 分钟、按照程序以 20℃/分钟达到 260℃ 下且然后保持在 260℃ 下 3 分钟。将注射器温度设定在 295℃ 并将检测器温度设定在 280℃。将氦用作载气并使用分流注射技术。
- 20

结果

富含 DHA 的脂类样品 1

- 25 从冷冻储存中取出来自的富含 DHA 的脂类样品 (250g 瓶)、即样品 1。该样品在环境温度下保持半固体且在技术术语上称作 "脂肪" 而不称作 "油"。将这种脂肪的等分部分 (14.44 g) 转入锥形瓶并加入 60 ml 冷丙酮 (冰/水浴)。涡动该瓶至溶解/悬浮脂肪成分并立即在真空中通过玻璃纤维滤器过滤。固体白色级分保留在滤纸上并用几微升冷丙酮洗涤且干燥。分离到
- 30 产率为 6.3% 的固体白色级分 (从 14.44g 脂肪原料得到 0.91g)。

通过旋转蒸发浓缩通过过滤得到的脂类/丙酮级分而得到 13.13 g 橙色

液体物质(环境温度下为液体)。该步骤得到 91%的总回收率;因此,在实验室规模上损耗了约 2%的物质。

为测定脂类组合物而通过 TLC 分析"丙酮冬化"后分离的固体白色级分和液体级分。基于 TLC 证实固体白色级分为甘油三酯类(观察到了一个具有相当于甘油三酯的 R_f 值的斑点)。通过 TLC 在点样并展开液体级分时观察到了许多斑点。这些斑点的 R_f 值与包括角鲨烯、甾酯类、甘油三酯类和甾醇类的脂类成分一致(全部是初步的分布)。没有进一步对脂类组合物进行分析。

丙酮冬化后分离的固体白色级分具有的熔点范围在 52.4-53.5℃。

10 将丙酮冬化后分离的固体和液体级分酯交换成甲酯类并通过气相-液相色谱法分析甲酯类。通过丙酮冬化分离的固体和液体级分的 FAME's 的完整分布与未冬化的富含 DHA 的脂肪(样品 1)如表 1 中所示。正如显而易见的,固体级分中含有极少的 DHA (2.4%)和 DPA (0.9%),而含有主要的脂肪酸肉豆蔻酸甲酯(26%)和棕榈酸甲酯(66%)。丙酮冬化后分离的液体级分中含有

15 肉豆蔻酸酯(8.3%)、棕榈酸酯(23.1%)、DPA (16.0%)、DHA (41.0%)与其它少量脂肪酸。当将这种分布与起始的未冬化脂类比较时,观察到富集了约 8%的 DHA,这一结果与除去了主要的三饱和酸甘油酯成分的结果一致。这一阶段代表纯化步骤。

20 富含 DHA 的液体沉降物(样品 2)

由重新精制的脂类产生的沉降物在己烷中完全溶混,而在甲醇中不溶混。当向沉降物中加入少量丙酮时,从液体黄色脂类/丙酮相中分离的白色沉淀形成。基于这些溶出试验,将丙酮分级分离用于分离白色粉末。

将沉降物的等分部分(1.11 g)转入锥形瓶并加入 10 ml 冷丙酮(冰/水浴)。

25 涡动该瓶至溶解/悬浮脂肪成分并立即在真空中通过玻璃纤维滤器过滤。固体白色级分保留在滤纸上并用几微升冷丙酮洗涤且干燥。分离到产率为 15%的固体白色级分(从 1.11g 沉降物得到 0.17g)。

通过旋转蒸发浓缩通过过滤得到的脂类/丙酮级分而得到 0.94 g 橙色液体物质(环境温度下为液体)。该步骤得到 85%的从回收率。

30 通过 TLC 分析丙酮分级分离后分离的固体白色级分和液体级分。基于 TLC 证实固体白色级分为甘油三酯类(观察到了一个具有相当于甘油三酯的

R_f值的斑点)。通过 TLC 在点样并展开液体级分时观察到了许多斑点。这些斑点的 R_f值与包括角鲨烯、甾酯类、甘油三酯类和甾醇类的脂类成分一致(全部是初步的分布)。没有进一步对脂类组合物进行分析。

丙酮冬化后分离的固体白色级分具有的熔点范围在 50.1~51.4℃。

- 5
- 将丙酮冬化后分离的固体和液体级分酯交换成甲酯类并通过气相-液相色谱法分析甲酯类。通过丙酮冬化分离的固体和液体级分的 FAME's 的完整分布与样品 2 的沉降物如表 1 中所示。正如显而易见的, 固体级分中含有极少的 DHA (6.4%) 和 DPA (2.6%), 而含有主要的脂肪酸肉豆蔻酸甲酯 (29%) 和棕榈酸甲酯 (59%)。丙酮冬化后分离的液体级分中含有肉豆蔻酸酯 (8.4%)、棕榈酸酯 (23.2%)、DPA (16.3%)、DHA (41.1%) 与其它少量脂肪酸。
- 10

表 1. 未冬化油 (样品 1)、样品 2 的沉降物和通过丙酮分级分离自样品 1 和样品 2 的沉降物的级分的脂肪酸分布

FA 名称	未冬化的 样品 1	分离的固 体级分	分离的液体 级分样品 1	样品 2 沉降物	分离的固体级分 样品 2 沉降物	分离的液体级分批 次 21A 沉降物
14:0	9.6	25.9	8.3	12.2	27.0	8.4
16:0	25.9	66.0	23.1	30.5	58.8	23.2
16:1	0.3	<0.1	0.3	0.3	0.2	0.3
18:0	0.7	1.8	0.6	0.7	1.5	0.6
18:4 n3	0.4	<0.1	0.4	0.3	<0.1	0.4
20:3 n6	0.4	0.2	0.4	0.3	0.2	0.5
20:4 n7	2.8	<0.1	2.6	1.8	<0.1	2.4
20:4 n6	0.9	<0.1	1.0	0.8	0.1	1.0
20:4 n3	0.8	<0.1	0.9	0.8	<0.1	0.9
20:5 n3	2.2	<0.1	2.3	1.9	0.3	2.3
22:4 n9	0.2	<0.1	0.1	0.2	<0.1	0.2
22:5 n6	14.7	0.9	16.0	13.6	2.6	16.3
22:6 n3	37.7	2.4	41.0	34.2	6.4	41.1

- 15
- 对比例

下面所列的表 2 表示如对比附图 1 和后面的对比附图 2 中所示的相差

无几的现有技术方法。

表 2

分析证明

5

(Schizochytrium 生物质)

添加抗氧化剂后精制、除臭、漂白的 (RDB) 冬化的 Schizochytrium 油

表 2A

	规格	结果	方法参考
过氧化物值, meq/kg	最大值 3.0	0.42	AOCS Cd 8-53
游离脂肪酸, %	最大值 0.25	0.06	AOCS Ca 5a-40
水分和挥发性物质, %	最大值 0.05	0.03	AOCS Ca 2d-25
痕量金属, ppm			POS AS.SOP-103
铅	最大值 0.20	<0.20	
砷	最大值 0.20	<0.20	
铁	最大值 0.20	0.04	
铜	最大值 0.05	<0.05	
汞	最大值 0.20	<0.20	
DHA, % of FAME, wt/wt	最小值 32.0	43.5	POS AS.SOP-104
DHA, mg/g 油	最小值 300	397.3	POS AS.SOP-104
残余己烷, ppm	最大值 10	<1.0	AOCS Ca 3b-87

表 2B

	规格	值	方法参考
中性油, %	N/A	99.69	
对茴香胶值	N/A	0.74	AOCS Cd 18-90
颜色, 1.0" Lovibond (PFX 990 AOCS)	N/A	70.0Y 7.1R	AutoTintometer Colour
颜色, Gardner 级, (1cm)	N/A	12.3	
β -胡萝卜素(PFX990), ppm, (0.01cm)	N/A	276.41	
注意: not true β -胡萝卜素			

不皂化, %	N/A	2.24	AOCS Ca 6b-53
不溶性杂质, %	N/A	0.01	AOCS Ca 3-46
AOM, 小时	N/A	7.66	AOCS Cd 12-57
Rancimat (80°C), 小时	N/A	22.7	
自旋试验, 按体积计的固体%, 20°C/加入 抗氧化剂后 24 小时	N/A	~0.2*	
自旋试验, 按体积计的固体%, 加入抗氧化 剂前	N/A	0	
脂肪酸组成(绝对值), mg/g	N/A		POS AS.SOP-104
C12		2.6	
C14		69.4	
C14:1		0.8	
C15		3.1	
C16		187.8	
C16:1		4.4	
C18		4.6	
C18:1		7.2	
C18:2		3.6	
C18:3n6		2.3	
C18:4		3.0	
C20		1.2	
C20:4n6		7.4	
C20:4n3 AA		8.5	
C20:5n3 EPA		18.2	
C22		0.6	
C22:5n6+ DPA		151.6	
C22:6n3 DHA		397.3	
C24		1.8	
C24:1		1.9	

其它		35.1	
总计, mg/g		912.4	
DHA, FAME 的%		43.5	
棕榈酸抗坏血酸酯, ppm		224	
生育酚类, ppm		1,760	

* 因添加迷迭香提取物得到的 ppte.

下面所列的表 3 表示本发明的方法, 正如附图 5 中所示, 后面是对比附图 2 的漂白、除臭和精制。

5

表 3

丙酮冬化的 Schizo 油

添加抗氧化剂后的 RDB Schizo 油

(来自 Schizochytrium 生物质)

10 表 3A

	规格	结果	方法参考
-过氧化物值, meq/kg	最大值 3.0	1.32	AOCS Cd 8-53
游离脂肪酸, %	最大值 0.25	0.06	AOCS Ca 5a-40
水分和挥发性物质, %	最大值 0.05	0.03	AOCS Ca 2d-25
痕量金属, ppm			POS AS.SOP-103
铅	最大值 0.20	<0.20	
砷	最大值 0.20	<0.20	
铁	最大值 0.20	0.11	
铜	最大值 0.05	<0.05	
汞	最大值 0.20	<0.20	
DHA, FAME 的%	最小值 32.0	42.8	POS AS.SOP-104
DHA, mg/g 油	最小值 300	385.5	POS AS.SOP-104
残余的己烷, ppm	最小值 10	<1.0	AOCS Ca 3b-87

表 3B

	规格	值	方法参考
中性油, %	N/A	99.69	
对茴香胺值	N/A	1.08	AOCS Cd 18-90
颜色, 1.0" Lovibond (PFX 990 AOCS)	N/A	70.0y 6.3R	AutoTintometer Colour
颜色, Gardner 级, (1cm)	N/A	12.0	
β -胡萝卜素(PFX990), ppm, (0.01cm)	N/A	228.0	
注意: not true β -胡萝卜素			
不皂化的成分, %	N/A	2.11	AOCS Ca 6b-53
不溶性杂质, %	N/A	0.01	AOCS Ca 3-46
AOM, 小时	N/A	7.00	AOCS Cd 12-57
Rancimat (80°C), 小时	N/A	19.9	
自旋试验, 按体积计的固体%, 20°C/24 小时	N/A	0.2	
脂肪酸组成(绝对值)	N/A		POS AS.SOP-104
C12		3.9	
C14		90.1	
C14:1		0.8	
C15		3.4	
C16		193.9	
C16:1		6.5	
C18		4.8	
C18:1		8.1	
C18:2		3.6	
C18:3n6		1.7	
C18:4		2.6	
C20		1.5	
C20:4n6		4.9	
C20:4n3 AA		7.7	
C20:5n3 EPA		12.5	
C22		0.8	

C22:5n6+ DPA		129.7	
C22:6n3 DHA		385.5	
C24		1.9	
C24:1		1.6	
其它		34.5	
总计, mg/g		900.0	
DHA, FAME 的%		42.8	
棕榈酸抗坏血酸酯, ppm		222	
生育酚, ppm		1940	

实施例 3

使 Schizochytrium 油的粗提取物进行各种冬化步骤，其中用己烷从生
5 物质中提取脂类组合物。除去己烷而得到含有残余量己烷的粗提取油。然
后按照特定的丙酮/油比用丙酮提取提取的油并在特定温度下冬化指定的
时间期限。残余己烷%、丙酮/油比、冬化温度和冬化时间在不同实验中是
可变的。2 周后，根据过滤时间、油的回收率和混浊度评价方法。具体实验
和结果如下面的表 4 中所示。

10

表 4. 丙酮冬化的 Schizochytrium 油的测试变量和观察结果的水平

实验 序号	己烷 %	丙酮/ 油比	冬化温度 (C)	冬化时间 (H)	过滤@ (秒)	油回收率 (%)	2 周后的混 浊度
1	1	1.5	5	3	67	87.8	澄清
2	2	1	0	2	165	86.4	PPT
3	2	1	0	4	195	87.7	澄清
4	2	1	10	2	178	88.1	PPT
5	2	1	10	4	154	89.8	PPT
6	2	2	0	2	85	84.1	PPT
7	2	2	0	4	75	86.2	澄清
8	2	2	10	2	67	88.9	PPT

9	2	2	10	4	82	86.7	PPT
10	3	0.5	5	3	264	84.3	PPT
11	3	1.5	-5	3	102	83.4	澄清
12	3	1.5	5	1	87	85.5	PPT
13	3	1.5	5	3	109	85.4	澄清
14	3	1.5	5	3	123	86.3	澄清
15	3	1.5	5	3	82	87.5	澄清
16	3	1.5	5	3	110	87.9	澄清
17	3	1.5	5	5	117	86.6	PPT
18	3	1.5	15	3	255	94.8	PPT
19	3	2.5	5	3	73	87.2	PPT
20	4	1	0	2	262	87.5	澄清
21	4	1	0	4	115	91.2	PPT
22	4	1	10	2	245	83.7	PPT
23	4	1	10	4	375	86.7	PPT
24	4	2	0	2	52	88.4	PPT
25	4	2	0	4	80	89.3	PPT
26	4	2	10	2	92	86.8	PPT
27	4	2	10	4	83	88.7	PPT
28	5	1.5	5	3	86	87.1	PPT
对照组					150	90.9	PPT*

对照组：在-3℃下己烷冬化(45:55，油:己烷)5小时

PPT-旋转测试后观察到的沉淀

*己烷冬化的样品在过滤后显示 PPT(同一天)，表示结晶不完全。如果使用封闭滤器没有实现对滤饼的彻底干燥，那么在实验室中不可能从植物
5 中得到加倍的回收率。

一般从植物中得到的回收率约为 70-75%。

表 5. 粗油、己烷和丙酮冬化的油的油回收率、过滤时间和分析数据

观察结果/分析	粗油	植物-己烷 冬化的油	实验室-己烷 冬化的油	丙酮-冬化的油 (校验跟踪-1)	丙酮-冬化的油 (校验跟踪-2)
油回收率(%)		70%	90.9		
过滤 @ (秒)		-	150		
颜色(1"池) (1cm 池)	过暗 70Y 11.2R	-	70Y 12.3R	过暗 70Y 12R	过暗 70Y 11.1R
磷(ppm)	474.3	-	474.0	271.6	144.3
游离脂肪酸	0.53	-	0.49	0.52	0.43
PV(meq/kg)	0.00	-	1.82	3.32	4.27
茴香胺值	4.11	-	4.37	3.73	3.66
脂肪酸组成(mg/g)					
C12:0	2.3	-	2.1	2.2	2.1
C14:0	67.2	-	57.8	58.5	58.9
C14:1	0.7	-	0.7	0.8	0.8
C15:0	3.3	-	3.1	3.1	3.2
C16:0	204.9	-	185.2	187.0	188.1
C16:1	3.3	-	3.5	3.6	3.5
C18:0	5.1	-	4.5	4.5	4.7
C18:1	3.9	-	4.0	4.0	4.0
C18:2	2.6	-	2.7	2.7	2.7
C18:3n6	2.3	-	2.5	2.5	2.6
C18:4	3.3	-	3.5	3.6	3.6
C20:0	1.2	-	1.0	1.0	1.0
C20:4n6	9.4	-	9.7	10.2	10.3
C20:4n3	8.0	-	8.3	8.5	8.6
C20:5n3	23.6	-	24.9	25.4	25.6
C22:0	0.6	-	0.6	0.5	0.6
C22:5n6	142.9	-	149.6	152.7	154.0
C22:6n3	351.1	369.0*	369.0	378.6	382.2
C24:0	1.9	-	1.6	1.6	1.6
C24:1	4.0	-	4.1	4.3	4.2
其它	35.2	-	37.5	37.9	38.4
DHA 的回收率		73%	95.6%	93.8%	92.8%

*小规模己烷的 DHA 回收率的估计值 - 冬化油基于上述 Schizo 油法的数据

表 6. 丙酮冬化的蜡的脂肪酸组成

观察结果/分析	丙酮-冬化的蜡 (校验跟踪-1)	丙酮-冬化的蜡 (校验跟踪-2)
蜡回收率(%)	13.1	14.7
脂肪酸组成(mg/g)		
C12:0	2.8	2.6
C14:0	112.4	103.2
C14:1	0.4	0.4
C15:0	3.8	0.6
C16:0	303.4	282.6
C16:1	2.1	2.1
C18:0	8.6	8.7
C18:1	3.3	3.6
C18:2	1.3	1.7
C18:3n6	1.1	1.0
C18:4	1.5	1.4
C20:0	2.2	2.0
C20:4n6	4.9	4.6
C20:4n3	4.1	4.0
C20:5n3	11.9	11.9
C22:0	1.3	1.2
C22:5n6	76.8	75.7
C22:6n3	175.2	170.5
C24:0	3.8	3.5
C24:1	2.1	2.0
其它	16.6	18.1

结论

基于对实施例 2 沉降物的分析,认为絮凝物为主要含有肉豆蔻酸和棕榈酸的甘油三酯类。这一结果基于 TLC、IR 和通过 GLC 对所得 FAME 的分析。

5 包括所述絮凝物的甘油三酯类具有高熔点温度(50.1-51.4°C)。

合并这种级分的甘油三酯脂类组成的分离的白色粉末的高熔点温度表明在标准加工过程中使用的冬化步骤没有从脂类中定量除去"高熔点"级分。因此,推荐使用附加的"磨光"步骤以便实现最终的成品中的澄明度。

为了估计样品 1 中未冬化脂类的固体分布,使用丙酮冬化步骤。经证实分离自样品 1 的产率为 6-7%的固体白色级分为主要含有肉豆蔻酸和棕榈酸类的甘油三酯类(在这种甘油三酯成分中>94%的脂肪酸为饱和脂肪)。棕榈酸与肉豆蔻酸的含量约为 2:1 的比例且这一结果与窄熔点范围组合提示了这种甘油三酯的确定结构。在固体甘油三酯级分中含有极少的 DPA 和 DHA。与起始未冬化脂类中的 37.7%DHA 相比,丙酮冬化后分离的液体级分含有 15 41.0%的 DHA(表示为总脂肪酸甲酯类的百分比)。这种富集了约 8%DHA 的结果与除去了 7%的三饱和脂肪酸甘油酯类的结果一致。

在实验室规模的丙酮冬化法中证实 DHA 损耗极少,表明在冬化过程中可以得到接近定量的 DHA 回收率。

固体或溶剂辅助的冬化(本文所述的丙酮冬化,不过,可以有其它溶剂存在)提供了下面的可能性且可以看作加工步骤的选择。

(1) 确实可以除去高熔点固体物质。

(2) 所述的固体物质主要是含有极少 DHA (2.4%)的三饱和脂肪酸甘油酯(>94%的饱和脂肪酸)。

(3) 作为实例,以 1,000 kg 粗脂类中的 DHA 作为原料计算,在丙酮冬化过程中会遇到约 2kg 的 DHA 损耗($1,000 \times 0.07 \times 0.024$)。这是基于绝对重量的约 0.2%的损耗 DHA 的回收率。

(4) 与起始未冬化的脂类脂肪酸分布相比,冬化后保留下富含 DHA 的澄清液体。

(5) 可以将溶剂辅助的冬化用于进行 DHA 纯化。

30 (6) 由于三饱和脂肪酸甘油酯成分的高熔点温度(>50°C),所以可以不需要传统的低温冷却条件。

本申请引入 2001 年 12 月 12 日提交的美国临时专利申请 60/341,180 作为参考。

尽管已经具体描述了本发明的各种实施方案，但是本领域技术人员显然可以对这些实施方案进行修改和适应性改变。然而，特别应理解这类修改和适应性改变属于如下所列的权利要求的本发明范围。

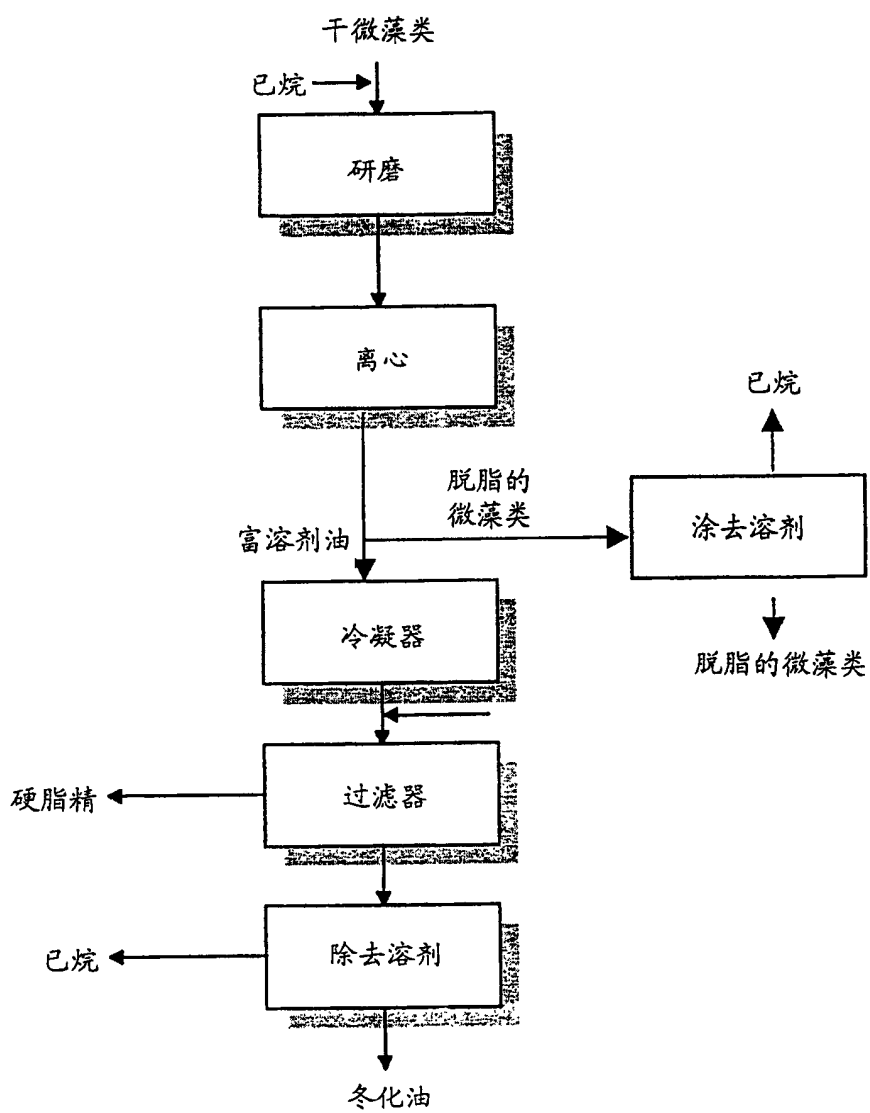


图1 使用己烷的富含DHA脂类提取方法的概述

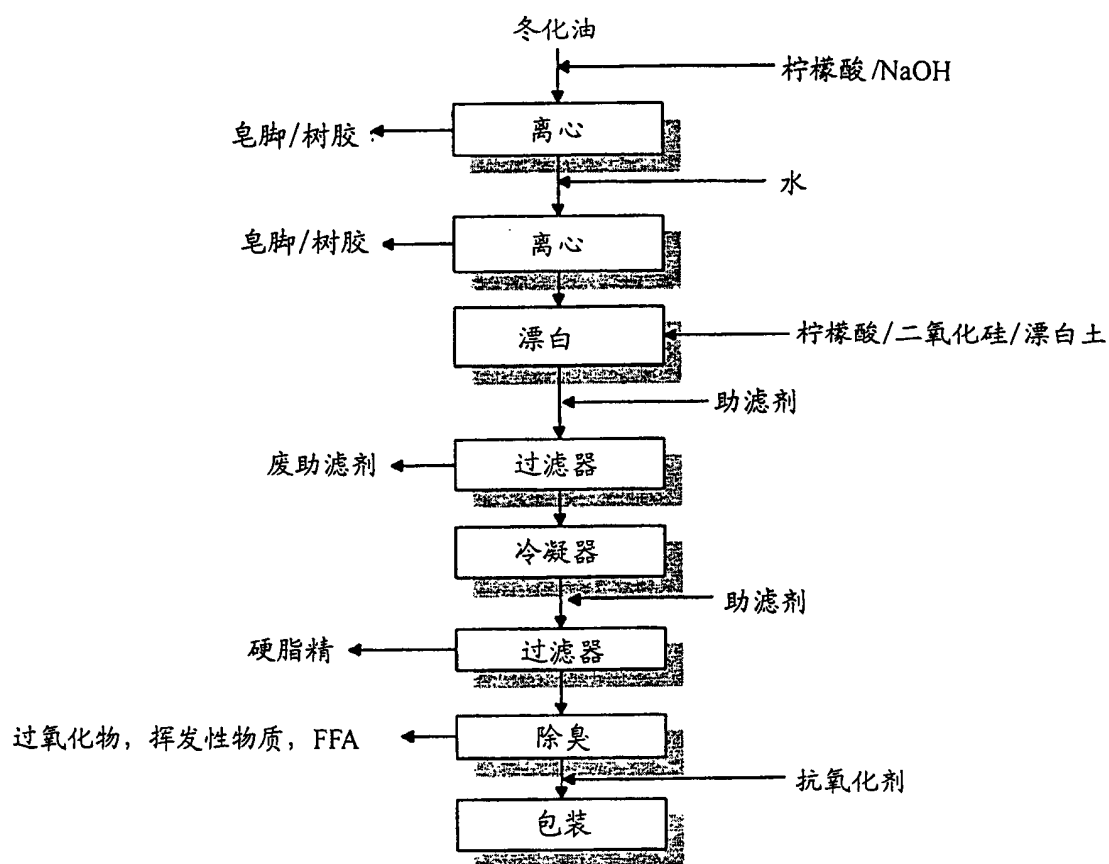


图2 富含DHA的脂类纯化方法的概述

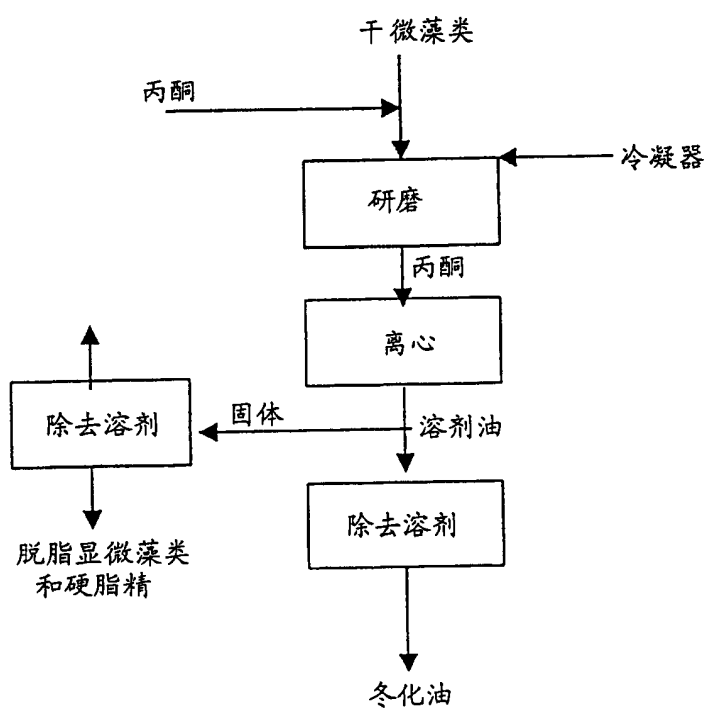


图3 使用丙酮的一步法富含DHA的脂类提取方法的概述

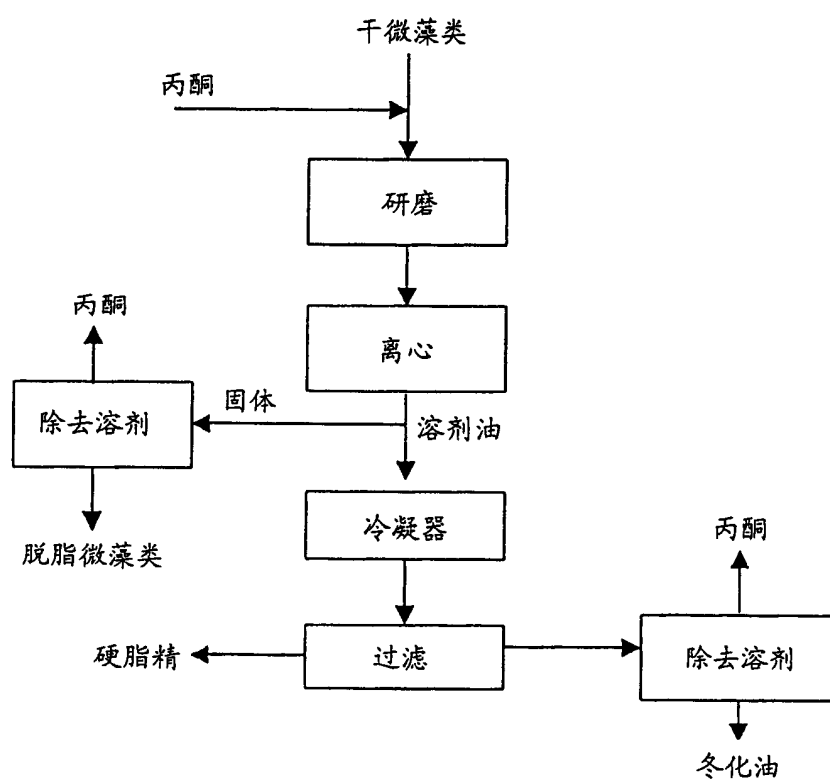


图4 使用丙酮的两步法富含DHA的脂类提取方法的概述

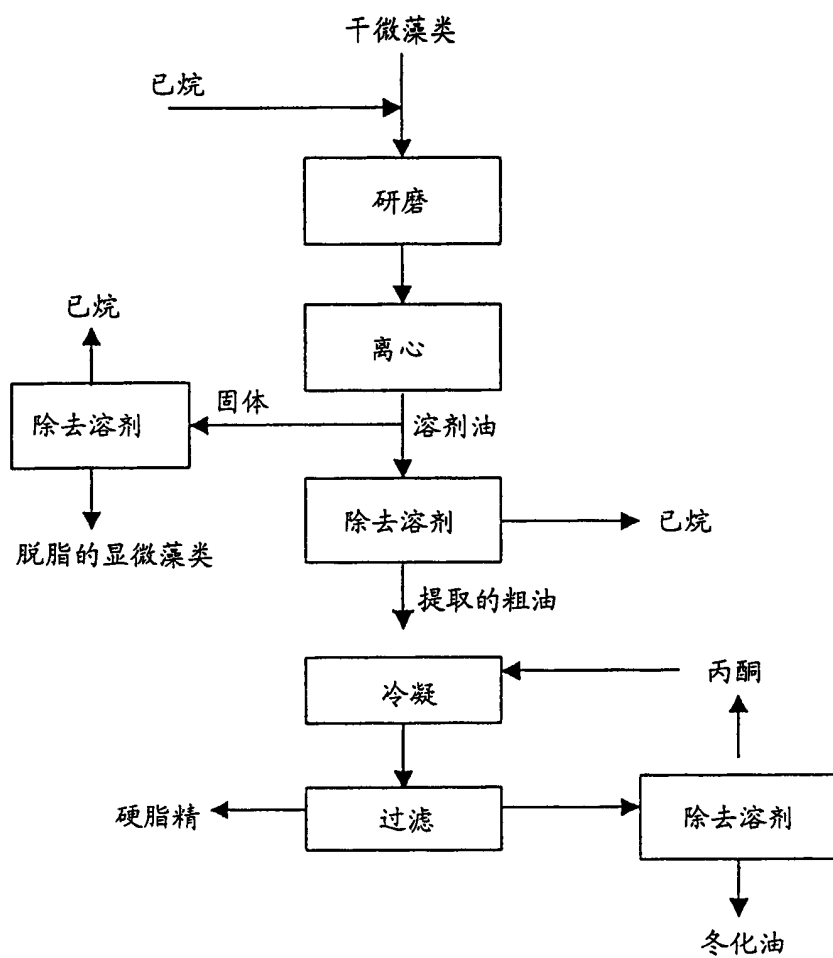


图5 富含DHA的脂类的己烷提取方法和丙酮冬化