



(12) Translation of new European
patent specification
After opposition procedure

(11) NO/EP 2438819 B2

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.

A23D 9/02 (2006.01)
C11C 1/02 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2013.09.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2013.04.24
(45)	Decision of the opposition in EPO	2018.02.14
	Decision of the opposition in NIPO	2018.06.11
(86)	European Application Nr.	10732258.8
(86)	European Filing Date	2010.06.01
(87)	The European Application's Publication Date	2012.04.11
(30)	Priority	2009.06.02, CL, 13432009
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Golden Omega S.A., Av. El Golf N° 150 Piso 15 Las Condes, Santiago, CL-Chile
(72)	Inventor	HÄRTING GLADE, TOMÁS FRANCIS, El Quisco 3140Las Condes, Santiago, CL- Chile DIAZ FUENZALIDA, Miguel Ángel, El Quisco 3140Las Condes, Santiago, CL-Chile MARKOVITS ROJAS, Alejandro, El Quisco 3140Las Condes, Santiago, CL-Chile
(74)	Agent or Attorney	HÄMSØ PATENTBYRÅ AS, Postboks 171, 4301 SANDNES, Norge

(54) Title **METHOD FOR PRODUCING A CONCENTRATE OF EICOSAPENTAENOIC AND
DOCOSAHEXAENOIC ACID ESTERS**

(56) References
Cited: US-A- 3 932 531, Anlage D62, opinion on translation, filed by the opponent on 07.03.2017, WO-
A1-02/06430, WO-A1-2007/091070, WO-A1-99/64547, WO-A1-2004/007654, WO-A1-
2010/139085, US-A1- 2007 082 111, Amtsblatt der Europäischen Union, Die Europäische
Kommission; Verordnung (EU) Nr. 252/2012 der Kommission vom 21 März 2012, Amtsblatt der
Europäischen Union; Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften; Verordnung (EG) Nr.
1881/2006 der Kommission; 20 December 2006, EPAX 5500 EE Specification No. 05500-20;
EPAX AS; Specification vom 02 March 2006, EPAX AS Setting the Highest Purity Standards April
2008, BAYS H.: 'Clinical Overview of Omacor: A concentrated formulation of Omega-3
polyunsaturated fatty acids' THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY vol. 98, no. 4A, 21

August 2006, pages 71I - 76I, UIC GmbH; Short Path Distillation in the fish oil industry; 01 September 2006, Amtsblatt der Europäischen Union; die Kommission der Europäischen Gemeinschaften; Verordnung (EG) Nr. 1883/2006 der Kommission; 20 December 2006, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Expert Working Group, ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), 27 October 1994, K85EE; Article No. 08503; Specification No. 08503 11; Pronova Biocare AS; Certificate of analysis; 2 November 2007, Encl. to measuring report: O-5675; NILU; Results of PCDD/PCDF and nonortho-PCB analysis; 18 November 2008, Invoice no. 0008027; Pronova Biocare AS; Invoice; 12 May 2005, Non-negotiable waybill for combined transport shipment pr port to port shipment; P&O Nedlloyd; Waybill; 13 May 2005, Encl. to measuring report: O-3276; NILU; Results of PCDD/PCDF and nonortho-PCB analysis; 14 March 2005, Encl. to measuring report: O-3266; NILU; Results, PCB; 11 March 2005, Order confirmation Omegal Health Supplements Ltd.; Pronova Biocare AS; Order confirmation; 22 July 2005, Invoice no. 8265; Pronova Biocare AS; Invoice; 02 August 2005, Telefax Omegal Health Supplements; Pronova Biocare AS; Telefax; 01 August 2005, Document list provided by the opponent on 02.02.2016, Opinion on translation filed by the opponent on 24.02.2016, translation of the application filed by the patentee on 02.05.2016, translation of the application filed by the patentee on 03.03.2017, Anlage D52 (translation of the patentee dated 02.05.2016 with annotation of the opponent dated 09.01.2017), Anlage D53 filed by the opponent on 09.01.2017, Anlage D54 WO 2010/139085 A1 (=D49 highlighted) provided by the opponent on 09.01.2017, Anlage D55, summary of submissions, filed by the opponent on 28.02.2017, Anlage D56, opinion on the translation, filed by the opponent on 28.02.2017, Anlage D56, "Rancimate-Methode", filed by the opponent on 28.02.2017, "trans isomer of EPA and DHA in refining and concentration of fish oils", L. Dalheim, May 2015, filed by the patentee on 09.01.2017, Anlage D60, certified translation dated 03.03.2017 and patent specification comparison file by the opponent on 07.03.2017, Anlage D61, patent specification and certified translation dated 03.03.2017 comparison, filed by the opponent on 07.03.2017, US-A1- 2009 011 012

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here:

FREMANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET KONSENTRAT AV EIKOSAPENTAEN- OG DOKOSAHEKSAENSYREESTERE

Oppfinnelsens område

Oppfinnelsen angår en prosess for å oppnå et konsentrat av estere av eikosapentaen-
5 og dokosaheksaensyrer fra marine oljer.

Oppfinnelsens bakgrunn

Viktigheten av langkjedede, polyumettede fettsyrer av ω -3 typen, syrene (alle *cis*)- 5, 8, 11, 14, 17-eikosapentaen, heretter EPA, og (alle *cis*)-4, 7, 10, 13, 16, 19-dokosaheksaen, heretter DHA, som en base for ingredienser i næringsmidler eller farmasøytiske produkter, er nå velkjent og dokumentert på grunn av deres nytte, blant annet, for å forhindre arteriosklerose og kardiovaskulære sykdommer, å lindre
10 inflammatoriske tilstander og å forsinke veksten av tumorer. Følgelig anbefaler eksperter et daglig inntak av nevnte fettsyrer i doser i området mellom 0,5 og 10 g.

Én av de rikeste kildene for EPA og DHA er oljer av marin opprinnelse, så som fiskeoljer av forskjellig opprinnelse, så som sardiner, taggmakrell (jack mackerel), ansjos, laks, torskefisk og andre. Vanligvis er det kombinerte innholdet av EPA og DHA i nevnte oljer mellom 10 til 35 vekt-%. Følgelig var de første forsøkene på å tilveiebringe supplement i form av næringsmidler og farmasøytiske produkter rike på EPA og DHA basert på fiskeoljer som var raffinert for å fjerne deres karakteristiske, ubehagelige lukt og smak, for formål å utvikle en type ingrediens i næringsmidler eller farmasøytisk produkt tilpasset for humant forbruk. Disse raffineringssprosessene benyttet
20 hovedsakelig de klassiske prosessene for å raffinere vegetabiliske oljer og spesifikke tilpasninger av nevnte prosesser til det angjeldende råstoffet (Lindsay, USP 4 915 876; Chang, USP 4 874 629; Marschner, USP 4 804 555; Stage, USP 4 599 143; Merck, USP 4 838 997).
25

Ikke desto mindre har de rådende forsøkene på å tilveiebringe EPA- og DHA-baserte næringsmidler og farmasøytiske produkter fra raffinerte oljer av marin opprinnelse

ikke vært vellykket når det gjelder å tilveiebringe et produkt hvis organoleptiske egenskaper var akseptable, og som i tillegg var frie for typiske bivirkninger så som gastrisk refluks, mage- og hudirritasjon og luftplager, blant andre. Disse egenskapene forsterkes når EPA og DHA konsumeres i mengder over 1 g, det vil si at doser ekvivalent med rundt 5 g fiskeolje, gir de nevnte bivirkningene hos forbrukeren.

Følgelig har forsøkene på å tilveiebringe EPA og DHA vært rettet mot fremstillingen av konsentrater av disse syrene fra marine oljer. Disse konsentratene kan inneholde mellom 40 og 95 vekt-% EPA og DHA, enten i form av frie syrer, eller i form av estere, vanligvis etylestere eller mono-, di- eller triglyserider. Hovedformålet med disse prosessene er å tilveiebringe konsentrater av EPA og DHA som har bedre organoleptiske egenskaper når det gjelder smak, lukt og farge, som kan anvendes direkte i produkter for terapeutisk anvendelse hos mennesker, som en aktiv, farmasøytisk ingrediens, eller som næringsingredienser generelt. Ikke desto mindre tilveiebringer den kjente teknikken ingen prosesser som er i stand til å tilveiebringe produkter som oppfyller deres ønskelige organoleptiske egenskaper over tid, det vil si, produkter der ikke-ønskelig reversjon i tid av de organoleptiske egenskapene, hovedsakelig lukt og smak, ikke forekommer, og som mangler de vanlige bivirkningene av de marine oljene og deres derivater, så som blant annet gastrisk refluks, flatulens og allergi. Dette er tydelig fra det faktum at ingen av konsentratene av EPA og DHA som i dag er kommersielt tilgjengelige anvendes intensivt som en næringsingrediens, men deres anvendelse er begrenset til formen av siruper der smaken er kamuflert, eller i form av drageer eller i mikroinnkapslet form, alt for å skjule eller minimalisere den uønskede smaken og lukten som med tiden utvikles i nevnte produkter. I tillegg er disse konsentratene heller ikke egnet for terapeutiske anvendelser som vanligvis krever relativt høye doser av EPA eller DHA, så som flere gram per dag, fordi de uønskede bivirkningene av konsentratene blir enda mer aksentuert ved disse dosene.

En annen tilnærming for å tilveiebringe EPA eller DHA for humant forbruk, avledet fra marine oljer, har vært utviklingen av prosesser for å oppnå ren EPA eller DHA, som offentliggjort i US patent 6 846 942. Ikke desto mindre betyr oppnåelse av ren EPA eller DHA først å gå gjennom produksjonen av en blanding av EPA og DHA; kommersielt synes det ikke å være noen fordel ved denne tilnærmingen, og slik det kan ses fra dokumentene i tabell 1 dreier de fleste av de offentliggjorte prosessene seg om fremstillingen av konsentrater som inneholder EPA og DHA, enten i form av frie syrer eller i form av estere.

Tallrike prosesser offentliggjort i den kjente teknikken, og som gjelder oppnåelse av konsentrater av ω -3-fettsyrer fra olje, er vist i tabell 1.

Europapatent nr. 0 409 903 offentliggjør en prosess for fremstilling av blandinger som inneholder EPA og DHA fra animalske eller vegetabilske oljer. Prosessen omfatter trin-
 5 nene forsåpning av råstoffet, den animalske eller vegetabilske oljen, umiddelbar sur-
 gjøring av den forsåpede blandingen og deretter ekstrahering av syrene som dannes
 med petroleter inntil uttømming. Ekstraktene vaskes deretter med vann, løsningsmid-
 let fjernes og resten utsettes for ett eller flere trinn med molekyllær destillasjon ved et
 trykk på 0,133 Pa og en temperatur mellom 110 - 120 °C. Det oppnås et destillat som
 10 inneholder mellom 35 og 90 % EPA og DHA.

Tabell 1: Internasjonale patenter og patentsøknader relatert til produksjonen av DHA og EPA

Dokument	Tittel
20030027865	Fremgangsmåte for isolering av høyt rensede fettsyrer ved bruk av krystallisering.
20040022923	Marine oljer med reduserte nivåer av forurensede stoffer
20040236128	Fremgangsmåte for fremstilling av ren EPA og ren DHA
20050201997	Promotor for diokseleliminering
20050256326	Fremgangsmåte for å redusere forurensede stoffer fra omgivelse- sene i en olje eller et fett, et fluid for å redusere flyktige foruren- sede stoffer fra miljøet, et næringssupplement
20080268117	Fremgangsmåte for rensing av oljer som inneholder EPA og DHA
3682993	Rensing av oljer
4554107	Raffinerte fiskeoljer og fremgangsmåten for fremstilling derav
4599143	Fremgangsmåte for deodorisering og/eller fysisk raffinering av spi- selige organiske oljer, fett, og estere med et høyt kokepunkt.
4623488	Raffinerte fiskeoljer og fremgangsmåten for fremstilling derav
4675132	Polyumettede fettsyrer fra fiskeoljer
4692280	Rensing av fiskeoljer
4792418	Fremgangsmåte for ekstrahering og rensing av polyumettede fett- syrer som stammer fra naturlige kilder.
4838997	Fremgangsmåte for deodorisering av triglyseridoljer
4855154	Fremgangsmåte for deodorisering av marine oljer
4874629	Rensing av fiskeolje
4915876	Fremgangsmåte for deodorisering og stabilisering av polyumettede oljer
4966734	Deodorisering av blandinger av fettstere

Dokument	Tittel
5006281	Fremgangsmåte for fremstilling av animalske oljer
5023100	Fiskeolje
5130061	Fremgangsmåte for ekstrahering av polyumettede fettsyreestere fra fiskeoljer
5679809	Konsentrat av polyumettede fettsyreestylestere
5693835	Fiskeolje med redusert fiskelukt samt fremgangsmåte for fremstilling av det samme
5945318	Raffinering av oljesammensetninger
6190715	Fremgangsmåte for fremstilling av raffinert, spiselig fiskeolje fra sild, og annen tilsvarende fisk som inneholder langkjedede omega-3-fettsyrer.
6204401	Rensing av polyumettede fettsyreglyserider
6214396	Fremgangsmåte og anlegg for ekstrahering av fiskeolje og resulterende produkter
6261608	Fremgangsmåte for fremstilling av raffinert fiskeolje
6528669	Gjenvinning av polyumettede fettsyrer fra ureaaddukter
6537787	Enzymatiske fremgangsmåter for anrikning med polyumettet fettsyre
6664405	Fremgangsmåte for isolering av høytrensede, umettede fettsyrer ved bruk av krystallisering
6846942	Fremgangsmåte for fremstilling av ren EPA og ren DHA
EP0409903B1	Fremgangsmåte for fremstilling av polyumettede fettsyrer
EP0749468B1	Raffinering av oljesammensetninger
EP0968264B1	Rensing av glyserider fra polyumettede fettsyrer
EP1153114B1	Lipasekatalysert forestring av marin olje
EP1178103A1	Rensing av ubehandlede PUFA-oljer
EP1202950B1	Gjenvinning av polyumettede fettsyrer fra ureaaddukter
EP1996686A1	Omega 3
JP2007138181	Fremgangsmåte for fremstilling av materiale med et høyt innhold av langkjedede polyumettede fettsyrer

US patent 5 130 061 offentliggjør en prosess for fremstilling av en blanding av etylestere som har en høy konsentrasjon av EPA og DHA fra fiskeoljer av ulike opprinnelse. Den offentliggjorte prosessen omfatter trinnene transforestring av fiskeolje med etylalkohol, etterfulgt av ekstrahering av det transforestrede produktet med heksan og silikagelkromatografi av det ekstraherte produktet. Deretter utsettes produktet, etter

kromatografisk behandling, for ett eller flere trinn med molekylær destillasjon ved et trykk på rundt 0,001 mmHg og en temperatur mellom 65 og 70 °C. Før destilleringen kan eventuelt produktet fra kromatografien krystalliseres fra aceton ved -40 °C og deretter utsettes for destillasjon.

- 5 Mange av de offentliggjorte prosessene kan gi produkter med akseptable, organoleptiske egenskaper, men i alle opptrer de ovenfor beskrevne bivirkningene samt reversering til fiskelukt og -smak med tiden, til forskjell fra det produktet som oppnås ved hjelp av prosessen som presenteres i den foreliggende oppfinnelsen som beholder sine nøytrale, organoleptiske egenskaper under lagringsbetingelser ved romtemperatur i et
- 10 tidsrom på minst tre måneder og som ikke forårsaker signifikante bivirkninger. Med nøytrale, organoleptiske egenskaper menes et produkt med akseptable, organoleptiske egenskaper i fravær av additiver for å maskere smak eller lukt, mens akseptable, organoleptiske egenskaper er ment å referere til et produkt organoleptisk og sensorisk evaluert av et sensorisk panel opplært i evaluering av spiselige oljer, som består av
- 15 minst 9 medlemmer som evaluerer produktegenskaper så som utseende, aroma og smak, med en kvalifisering for hver parameter lik eller større enn 60 % av den maksimale verdien av parameteren, og harskhets egenskapen, med en kvalifisering lik eller større enn 80 % av den maksimale verdien av parameteren.

- Stabile organoleptiske egenskaper betyr et produkt evaluert både organoleptisk og
- 20 sensorisk etter 24 ukers lagring av produktet ved lagringsbetingelser ved romtemperatur av et opplært sensorisk panel som består av minst 9 medlemmer som evaluerer produktegenskaper så som utseende, aroma og smak, med en kvalifisering for hver parameter lik eller større enn 60 % av den maksimale verdien av parameteren, og harskhets egenskapen, med en kvalifisering lik eller større enn 80 % av den maksimale
- 25 verdien av parameteren.

- I tillegg til kravene for akseptable, organoleptiske egenskaper og stabilitet under langtidslagring, må konsentratene av EPA og DHA også tilfredsstillende en rekke regulatoriske normer med henblikk på deres innhold av forurensende, organiske forbindelser kjent som persistente organisk forurensende stoffer (POP), som er kjemiske stoffer som eksisterer i omgivelsen, bioakkumulerer i næringskjeden, og medfører en risiko for å forårsake bivirkninger på human helse og på miljøet. Blant disse forurensede stoffene, som i dag inkluderer 17 stoffer anerkjent under den tredje konferansen av medlemmene av Stockholm-konvensjonen i mai 2007, er derivater av dioksiner, furaner, polyklorerte produkter, bifenyler, polysykliske aromatiske hydrokarboner osv., hvis konsentrasjon i fiskeoljer har økt med tiden, som krever at det rettes innsats mot
- 30
- 35

utviklingsprosesser spesifikt utformet for å fjerne disse forurensede stoffene fra fiskeoljer. Blant deltagerne i Stockholm Convention er det i dag strenge regler med henblikk på de maksimale, tillatelige grensene for POP-ene i produkter for humant bruk, noe som også inkluderer fiskeolje og produkter avledet fra fiskeoljer. Prosesser som spesifikt gjelder fjerning av POP-ene finnes blant annet i de prosessene som er offentliggjort i patentsøknadene US 2005/0256326 og US 2004/0022923 samt den internasjonale søknaden WO 02/06430. En annen gruppe regulerte forurensende stoffer er tungmetaller så som arsen, kvikksølv, kadmium og bly, blant andre.

Prosessene for fremstilling av konsentrater av EPA og DHA som beskrevet i Europapatent nr. 0 409 903 og i US patent US 5 130 061 henviser ikke til problemet med nærværet av POP. For derfor å sammenligne effektiviteten for fjerning av forurensede stoffer i de offentliggjorte prosessene med effektiviteten for prosessen ifølge denne oppfinnelsen, ble de nevnte prosessene reproduisert med råstoffer med en kjent konsentrasjon av POP og de oppnådde produktene ble sammenlignet med de oppnådde produktene fra prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen, som vist i eksemplene. US patent 6 846 946 relaterer bare til problemet med polyklorerte bifenyler (PCB-er), men det gir ingen kvantitativ informasjon.

Det er overraskende funnet at prosessen ifølge oppfinnelsen, til forskjell fra prosessene i den kjente teknikken for å produsere konsentrat av EPA og DHA, er i stand til å tilveiebringe et produkt med akseptable, organoleptiske egenskaper, uten å gi noen reversering av ubehagelig lukt og smak under et lagringstidsrom ved rombetingelser på minst tre måneder, og som også til forskjell fra prosessene ifølge den kjente teknikken for å produsere konsentrater av EPA og DHA, er den også i stand til effektivt å redusere eller å fjerne POP-ene og tungmetallene. I tillegg fremmer ikke den offentliggjorte prosessen ingen *cis-trans*-isomerisering av EPA og DHA, isomerer med ukjente, metabolske egenskaper, men, tvert imot og ganske overraskende, reduserer den *trans*-isomerinnholdet når disse blir funnet i råstoffene.

Pronova BioPharma (www.pronova.com) offentliggjør en prosess kjent innen teknikken for fremstilling av konsentrater av etylestere av EPA og DHA for deres anvendelse som en aktiv, farmasøytisk ingrediens.

I nevnte prosess blir råfiskolje først avsyret for å oppnå raffinert olje og denne raffinerte oljen utsettes for en strippeprosess rettet spesifikt mot fjerning av forurensede stoffer ved hjelp av prosessen offentliggjort i US-søknad 2005/0256326. Det oppnådde produktet blir deretter transforestret med etylalkohol. Det transforestrede produktet utsettes for flere trinn med molekylær destillasjon. Destillatet behandles med urea,

blekes deretter og redestilleres molekylært, og man oppnår et sluttprodukt med opptil 90 % langkjedede ω -3-fettsyrer mellom EPA og DHA. Blant ulempene med produktet kan det nevnes at prosessen med å fjerne forurensede stoffer i et trinn med «stripping» av triglyserider med et arbeidsfluid (etylestere) ved temperaturer over 180 °C kan fremme dannelsen av *trans*-isomerer. Det kommersielle produktet reverterer til fiskelukt og -smak og alle de tidligere nevnte bivirkningene kan observeres.

Proessen utviklet av Napro Pharma (www.napro-pharma.no/production) for fremstilling av et konsentrat av etylestere av EPA og DHA tilsvarer prosessen til Pronova BioPharma, men uten strippettrinnet og trinnet med ureabehandling, men produktet har dårlige organoleptiske egenskaper, det reverterer til fiskelukt og -smak og alle de tidligere nevnte bivirkningene kan observeres.

Til sammenligning med konsentratene av EPA og DHA som oppnås av prosessen ifølge den kjente teknikken, har konsentratene som oppnås av den oppfunne prosessen overraskende og uventede fordeler i forhold til den kjente teknikken, slik det vil fremgå av den detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen. Blant disse fordelene er først og fremst egenskapene til et organoleptisk nøytralt og stabilt produkt, ettersom det ikke reverterer til lukter og smaker som er vanlige for marine oljer og er fri for bivirkninger, og har et nivå for persistente organiske forurensende stoffer som tilfredsstiller internasjonale, regulatoriske standarder. Videre fremmer ikke prosessen dannelsen av *cis-trans*-isomerer, men motsatt, på overraskende og uventet måte, reduserer det konsentrasjonen av *trans*-isomerene når disse er til stede i råstoffet. Som et resultat av alle disse kombinerte egenskapene, er produktet som oppnås av prosessen ifølge denne oppfinnelsen spesielt egnet for anvendelse i terapier som krever høye doser av EPA og DHA, og som en næringsingrediens.

WO-A-02/06430 angår marine oljer som inneholder polyumettede fettsyrer, så som DHA og EPA og reduserte nivåer av forurensede stoffer.

US-A-2006/0011012 angår fettsyresammensetninger som omfatter EPA og DHA.

WO-A-2009/009040 er rettet mot en fettsyresammensetning som omfatter EPA og DHA.

WO-A-2007/091070 er rettet mot en prosess for fremstilling av vannløselige, umettede fettsyresalter, f.eks. fra EPA og DHA.

Oppsummering av oppfinnelsen

Et formål med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe en ny prosess for fremstilling av et konsentrat av estere av EPA og DHA fra oljer av marin opprinnelse, som er organoleptisk nøytrale og stabile og har et innhold av persistente, organiske forurensede stoffer under de tillatte grensene og som følgelig er egnet for massivt og regulært humant forbruk, enten som et farmasøytikum eller som en næringsingrediens. Nevnte formål oppnås av en prosess for oppnåelse av et konsentrat av estere av EPA og DHA fra ubehandlede eller raffinerte marine oljer, karakterisert ved den omfatter de følgende trinn:

- a) å bringe en ubehandlet eller raffinert marin olje i kontakt med ett eller flere alkaliske midler og vann ved en temperatur ikke over 100 °C inntil det er oppnådd en blanding som omfatter forsåpet, marin olje;
- b) å bringe den forsåpede blandingen i kontakt med ett eller flere organiske løsningsmidler for å danne en ekstrahert fase og en raffinert fase som omfatter alkaliskaltene av fettsyrer;
- c) å separere ekstraktfasen fra den raffinerte fasen;
- d) å blande den raffinerte fasen med en vandig raffinert løsning av en syre for å danne en vandig fase og en ikke-vandig fase som omfatter fettsyrer;
- e) å separere den vandige fasen fra den ikke-vandige fasen;
- f) å blande den separerte, ikke-vandige fasen med en alkohol og en forestringskatalysator ved en temperatur ikke over 150 °C inntil det oppnås en forestret blanding som omfatter estere av fettsyrer;
- g) å fjerne katalysatoren fra den forestrede blandingen for å oppnå en katalysatorfri, forestret blanding;
- h) å fjerne løsningsmidlet fra den katalysatorfrie, forestrede blandingen for å oppnå estere av fettsyrer; og
- i) å destillere esterene i en kortveis destillasjonskolonne ved en temperatur på høyst 180 °C og et trykk på mindre enn 1 mbar for å oppnå et konsentrat som omfatter estere av EPA og DHA.

Prosesstrinnene konvergeres synergistisk mot oppfinnelsens formål på koordinert måte. Ingen av trinnene alene eller i kombinasjon med mindre enn de totale trinnene er i stand til å oppnå formålet med oppfinnelsen som vist i eksemplene.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen.**Råstoff.**

Egnede råstoffer for oppfinnelsen omfatter oljer fra marine dyr, så som oljer av sardin, ansjos, taggmakrell, stillehavsmakrell, tunfisk, torsk, laks, krill og mollusk samt blandinger av nevnte oljer, oljer av under-produkter av prosesseringen av marine dyr så som innvoller av marine dyr, og også oljer av mikroalger så som for eksempel *Nannochloropsis sp* og plankton. I den foreliggende oppfinnelsen inkluderer ordet "olje" også fett eller voks som inneholder EPA eller DHA og deres biprodukter, så som glyserider og fettsyrer.

Selv om anvendelsen av et råstoff med en Totox-verdi under 30 er foretrukket, kan prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen også utføres med råstoffer med en høyere Totox-verdi som vist i eksemplene.

For å gjennomføre prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen blir den ubehandlet eller raffinerte marine oljen forsåpet ved bruk av et alkali for å hydrolysere glyseridene eller andre estere av fettsyrer som er til stede i ubehandlet eller raffinert marin olje for å oppnå en forsåpet blanding som omfatter alkalisaltene av de forsåpbare forbindelsene av den ubehandlede eller raffinerte marine oljen og ikke-forsåpbare stoffer. For dette formålet bringes ubehandlet eller raffinert marin olje i kontakt med vann og ett eller flere egnede alkaliske stoffer og, eventuelt, ett eller flere løsningsmidler så som alkoholer og hydrokarboner, eller med én eller flere egnede antioksidanter. Egnede alkaliske stoffer for forsåpningsprosessen inkluderer natrium-, kalium-, litium- og magnesiumhydroksider og blandinger av nevnte hydroksider. Mengden alkali er fra 5 til 40 gram alkali per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje, selv om det foretrukne forholdet mellom alkali og ubehandlet eller raffinert marin olje er rundt 15 gram alkali per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje. Mengden vann som anvendes er fra 10 til 500 g vann per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje, selv om det foretrukne forholdet mellom vann og ubehandlet eller raffinert marin olje er fra 50 til 200 g vann per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje. Når alkoholer så som etanol anvendes, kan mengden alkohol ligge fra 10 til 500 g alkohol per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje, selv om det foretrukne forholdet mellom alkohol og ubehandlet eller raffinert marin olje er fra 50 til 200 g alkohol per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje. Når hydrokarboner så som heksan eller andre løsningsmidler anvendes, er mengden løsningsmiddel fra 10 til 500 g løsningsmiddel per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje, fortrinnsvis fra 50 til 200 g løsningsmiddel per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje. Når de egnede antioksidantene anvendes, så som for eksempel BHT, tokoferoler eller askorbinsyre og deres derivater, er den anvendte

mengden antioksidant fortrinnsvis ikke større enn 1 g per 100 g ubehandlet eller raffinert marin olje. Kontakten mellom ubehandlet eller raffinert marin olje, vann, ett eller flere alkaliske stoffer og eventuelt ett eller flere løsningsmidler, kan gjennomføres enten kontinuerlig eller satsvis i en omrørt beholder ved en temperatur mellom 10 og 100 °C, fortrinnsvis ved temperaturer mellom 40 og 85 °C og ved trykk mellom 0,1 og 5 bar, fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk. Dette trinnet for prosessen er et forsåpningstrinn siden det fører til dannelsen av alkaliske salter av fettsyrene fra esterne og de hydrolyserte fettsyrene av ubehandlede eller raffinerte marine oljen.

Reaksjonstiden for å oppnå en blanding som omfatter forsåpet ubehandlet eller raffinert marin olje når det gjelder satsvis drift eller oppholdstiden når det gjelder kontinuerlig drift, er fra 10 til 400 minutter, fortrinnsvis fra 30 til 120 minutter.

Blandingen som omfatter forsåpet marin olje bringes i kontakt med ett eller flere organiske løsningsmidler inntil det dannes en ekstraktfase som omfatter organisk løsningsmiddel og materiale oppløst i nevnte fase og en raffinert fase som ikke er blandbar med ekstraktfasen som omfatter alkalisaltene av fettsyrene. Nevnte faser separeres enten ved avsetning eller sentrifugering. Kontakten mellom blandingen som omfatter forsåpet, ubehandlet eller raffinert marin olje og de organiske løsningsmidlene kan gjennomføres enten satsvis eller kontinuerlig ved temperaturer mellom 10 og 100 °C, fortrinnsvis mellom 20 og 80 °C, og ved trykk mellom 0,1 og 5 bar, fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk. Løsningsmidler eller blandinger av organiske løsningsmidler som er egnet for ekstraheringen kan velges fra gruppen som består av petroleter, pentan, heksan, heptaner, oktan, sykloheksan, metylsykloheksan, aceton, toluen, xylen, metylxylen, etylbenzen, diklormetan, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, trikloretan, perkloretylen, dimetylsulfoksid og tetrahydrofuran. Ikke desto mindre omfatter de foretrukne løsningsmidlene alifatiske hydrokarboner så som petroleter, pentan, heksan, heptan, oktan eller blanding av disse løsningsmidlene. Forholdet mellom løsningsmiddel eller løsningsmidler i forhold til blandingen som omfatter forsåpet marin olje kan ligge mellom 50 til 1 000 g per 100 g blanding, fortrinnsvis fra 100 til 500 g per 100 g blanding. Når først den raffinerte fasen er separert fra ekstraktfasen, kan den hvis ønskelig bringes i ny kontakt med ett eller flere løsningsmidler under de betingelsene som er offentliggjort for å danne en andre ekstraktfase og en andre raffinert fase. Produksjonen av flere faser og raffinerte faser gjennom den beskrevne prosessen kan gjentas hvis ønskelig.

I surgjøringstrinnet bringes den raffinerte fasen i kontakt med en løsning av en syre så som svovelsyre, saltsyre, fosforsyre, eddiksyre, trikloredediksyre eller karbonsyre

inntil det dannes en vandig fase og en ikke-vandig fase som omfatter fettsyrer. Mengden syre som anvendes i surgjøringstrinnet kan være opptil 1,5 ganger den støkiometriske mengden alkali som anvendes i forsåpningstrinnet, fortrinnsvis 1,05 ganger den støkiometriske mengden av alkali som kreves for total nøytralisering av den raffinerte fasen. Mengden syre som kreves for å surgjøre den raffinerte fasen kan bestemmes ved å måle den totale alkaliniteten for den raffinerte fasen. Blandingen av den raffinerte fasen og syreløsningen kan gjennomføres enten satsvis eller på kontinuerlig måte i en omrørt beholder ved temperaturer mellom 10 og 100 °C, fortrinnsvis mellom 20 og 60 °C, og ved trykk mellom 0,1 og 5 bar, fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk, og med en omsetning eller oppholdstid, når det gjelder kontinuerlig drift, i området fra 1 til 120 minutter, fortrinnsvis fra 5 til 60 minutter. Eventuelt kan blandingen også inkludere en antioksidant eller en blanding av antioksidanter så som BHT, tokoferoler eller askorbinsyre og dens derivater. Deretter blir den ikke-vandige fasen separert fra den vandige fasen ved avsetning eller sentrifugering. Den separerte, ikke-vandige fasen vaskes med en vaskeblending som omfatter vann, en monohydroksyalkohol, aceton eller blandinger derav, eller en vandig løsning av natriumsulfat eller natriumklorid, ved temperaturer mellom 10 og 100 °C, fortrinnsvis mellom 20 og 60 °C og ved trykk mellom 0,1 og 5 bar, fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk. Den vaskede, ikke-vandige fasen kan eventuelt filtreres for å eliminere uløselige faststoffer. Uttrykket ikke-vandig fase som anvendes nedenfor angir både den vaskede, ikke-vandige fasen så vel som den vaskede og filtrerte ikke-vandige fasen, oppnådd etter surgjøringstrinnet som beskrevet tidligere.

Eventuelt desolvatiseres enhver av de ikke-vandige fasene delvis eller fullstendig, fortrinnsvis under redusert trykk og ved temperaturer under 150 °C, for å oppnå det som angis som en partielt eller delvis desolvatisert, ikke-vandig fase.

Eventuelt kan enhver av den ikke-vandige eller delvis eller totalt desolvatiserte ikke-vandige faser utsettes for et krystalliseringstrinn. For dette formålet blir fasen blandet med et løsningsmiddel eller en blanding av løsningsmidler valgt fra gruppen som består av petroleter, pentan, heksan, heptan, oktan, sykloheksan, metylsykloheksan, toluen, xylen, metylxylen, etylbenzen, diklormetan, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, trikloretan, perkloretylen, dimetylsulfoksid, dimetylformamid og tetrahydrofuran, metanol, etanol, aceton og metyletylketon, diacetonalkohol eller blandinger derav. Foretrukne løsningsmidler for dette trinnet er heksan, etanol, aceton eller blandinger av disse. Mengden løsningsmiddel som anvendes i dette trinnet er i området mellom 50 og 1 000 g per 100 g av fasen som krystalliseres, fortrinnsvis mellom 100 og 500 g per 100 g av fasen som krystalliseres. Den dannede blandingen

avkjøles deretter til en temperatur i området fra 0 til -50 °C, fortrinnsvis fra -20 til -40 °C inntil dannelsen av en fast, krystallisert fase og en flytende fase. Krystalliseringsoperasjonen kan gjennomføres satsvis eller kontinuerlig og fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk. Den krystalliserte, faste fasen og den flytende fasen separeres deretter ved filtrering eller sentrifugering, fortrinnsvis ved den samme sluttemperaturen som krystalliseringen. Deretter fjernes løsningsmidlene i den flytende fasen, helt eller delvis, ved fordamping av løsningsmidlet for å oppnå det som så angis som en første, delvis eller totalt desolvatisert fase som fremstilles i krystalliseringstrinnet som omfatter EPA og DHA i høyere konsentrasjon enn den i den benyttede ubehandlede eller raffinerte marine oljen.

Eventuelt kan enhver av de ikke-vandige fasene eller enhver av de ikke-vandige, delvis eller totalt desolvatiserte fasene eller den første delvis eller totalt desolvatiserte fasen som fremstilles i krystalliseringstrinnet, behandles med urea eller en annen forbindelse som danner komplekser eller addukter med fettsyrer eller deres derivater gjennom metoder for å danne komplekser eller addukter med fettsyrer eller deres derivater gjennom metoder for å danne komplekser eller addukter med fettsyrer med urea for fraksjonering av fettsyrer fra vegetabiliske og animalske oljer. For dette formålet dannes det en løsning ved en temperatur mellom 50 og 100 °C der løsningen består av mellom 5 og 40 g av fasen som utsettes for ureabehandling per 100 g av en løsning av forbindelsen som danner komplekser eller addukter i et organisk løsningsmiddel, fortrinnsvis urea i etanol, som inneholder, ved løsningstemperaturen, rundt 30 g urea per 100 g etanol. Deretter avkjøles denne løsningen ned til romtemperatur eller mindre og danner en fast fase som omfatter komplekser eller addukter og en faststofffri, flytende fase. Kompleksene eller adduktene og den faststoffrie flytende fasen separeres ved kjente metoder så som filtrering eller sentrifugering, og den faststoffrie, flytende fasen vaskes med vann eller en sur løsning inntil ekstraheringen av den gjenværende forbindelsen som danner komplekser eller addukter løst i denne fasen. Deretter fjernes løsningsmidlene fra den faststoffrie flytende fasen, enten helt eller delvis, for å oppnå det som angis som en andre helt eller delvis desolvatisert fase fremstilt i det kompleksdannende trinnet, og som omfatter EPA og DHA i en konsentrasjon høyere enn den i råstoffet.

Deretter blir en hvilken som helst av de ikke-vandige fasene eller en hvilken som helst av de ikke-vandige helt eller delvis desolvatiserte fasene eller den første helt eller delvis desolvatiserte fasen fremstilt i krystalliseringstrinnet eller den andre helt eller delvis desolvatiserte fasen fremstilt ved kompleksdannelsen utsettes for et forestrings-
trinn. For dette formålet blir fasene blandet med et monohydroksyalkohol, så som

metanol eller etanol eller med polyhydroksyalkohol, så som glyserol i en andel som kan være opptil 500 g alkohol per 100 g av fasen, fortrinnsvis fra 20 til 200 g alkohol for 100 g av fasen, og med en katalysator så som svovel-, p-toluensulfon-, metansulfon- eller etansulfonsyre eller med en harpiks så som amberlitt, i et forhold på 0,05 til 10 g katalysator per 100 g fase. Forestringstrinnet kan utføres enten satsvis eller kontinuerlig i en omrørt reaktor, ved en temperatur mellom 10 og 150 °C, fortrinnsvis mellom 30 og 80 °C og ved et trykk mellom 0,1 og 5 bar, fortrinnsvis ved atmosfærisk trykk. Tiden for forestringen når det gjelder satsvis drift eller oppholdstid når det gjelder kontinuerlig drift er i området mellom 30 og 600 minutter, fortrinnsvis mellom 60 og 240 minutter. Ved slutten av forestringstrinnet oppnås det en forestret blanding som omfatter estere av fettsyrer.

Katalysatoren som anvendes fjernes fra den forestrede blandingen av prosesser kjent innen teknikken, så som filtrering eller ved nøytralisering og vaskinger med vandige løsninger for å danne en katalysatorfri forestret blanding. Den katalysatorfrie, forestrede blandingen desolvatiseres ved fordamping, fortrinnsvis under redusert trykk og ved temperaturer under 150 °C, for å oppnå en desolvatisert blanding som omfatter estere av fettsyrer.

Deretter blir blandingen av estere av desolvatiserte fettsyrer destillert i en kortveis destillasjonskolonne for å oppnå et destillat og en rest. Deretter kan destillatet eller resten utsettes for en ny fase av destillasjon for å oppnå et andre destillat og en andre rest. Prosessen kan gjentas inntil det oppnås et destillat eller en rest som sluttprodukt som inneholder den ønskede konsentrasjonen av estere av EPA og DHA eller et konsentrat av EPA og DHA. Destillasjonene kan gjennomføres ved en temperatur under 180 °C, fortrinnsvis under 150 °C og ved et trykk under 1 mbar, fortrinnsvis under 0,1 mbar. På denne måten kan det oppnås esterkonsentrater av EPA og DHA med et innhold blant begge esterne på mellom 40 og 95 vekt-% av konsentratet.

Konsentratet av EPA og DHA eller enhver esterstrøm kan utsettes for ett eller flere trinn av rensing så som fraksjonering ved hjelp av avkjøling ved en temperatur under -5 °C og separering av faststoffene ved filtrering eller sentrifugering, deodorisering i pakkede kolonner eller traukolonner under redusert trykk og temperaturer under 200 °C, fortrinnsvis lavere enn 150 °C, ved bruk av enten nitrogen eller damp for deodorisering, adsorpsjon ved hjelp av anvendelsen av infusoriejord, aktiv kull, zeolitter og molekylsikker, blant andre.

På samme måte, hvis det er ønskelig, kan eventuelt konsentratene av EPA og DHA transforestres med glyserin for å danne konsentrerte glyserider av EPA og DHA

gjennom prosesser kjent innen kjent teknikk for å oppnå et nytt endelig produkt av EPA- og DHA-glyserolestere.

Én eller flere egnede antioksidanter kan tilsettes til konsentratet av EPA og DHA, så som tokoferol, estere av tokoferol, askorbinsyre og deres derivater derav, ekstrakt av rosmarin, ekstrakt av boldo, boldin og andre. Fortrinnsvis er antioksidantmengden mindre enn 1 vekt-%, fortrinnsvis mindre enn 0,5%.

Konsentratene av EPA og DHA oppnådd gjennom den offentliggjorte prosessen har overlegne egenskaper, ettersom de eliminerer eller vesentlig reduserer de uønskede bivirkningene assosiert med forbruket av derivater av fiskeolje, så som gastrisk refluks, mage- og hudirritasjon og meteorisme, blant andre. I tillegg og overraskende viser konsentratene av EPA og DHA oppnådd av prosessen ifølge foreliggende oppfinnelse ikke organoleptisk reversjon for marine oljer, noe som tillater deres anvendelse som ingredienser i næringsprodukter eller farmasøytiske produkter, uten å måtte ty til lukt- og smaksmaskører, innkapslinger og mikroinnkapsling, blant andre. Videre reduserer den offentliggjorte prosessen signifikant innholdet av persistente organiske forurensede stoffer og tungmetaller som er under de maksimale nivåene som tillates internasjonalt.

Beskrivelse av figuren.

Under henvisning til figur 1 blir ubehandlet fiskeolje matet inn gjennom rørledning (1) til en forsåpningsreaktor (4), til hvilken en strøm av natriumhydroksidløsning også mates via rørledning (2) i et forhold lik forsåpningsindeksen for oljen eller i et overskudd opptil 20 %, og via rørledning (3) mates en strøm av vandig ved 50 % etanol til reaktoren. Reaktoren (4) arbeider ved en temperatur mellom 40 og 85 °C med omrøring ved et trykk mellom 1 og 2 bar og med en oppholdstid på 45 minutter for å generere en forsåpet blanding. Denne forsåpede blandingen mates via rørledning (7) til en motstrømsekstraksjonskolonne (8) som arbeider ved et trykk på mellom 2 til 5 bar, og ved en temperatur mellom 20 og 60 °C. Ekstraksjonskolonnen (8) mates med en blanding av alifatiske hydrokarboner via rørledning (9) hvis kokepunkt er i området fra 60 til 80 °C for via rørledning (10) å gjenvinne en ekstraktfase som omfatter en blanding av alifatiske hydrokarboner og materiale som er ekstrahert i nevnte fase og for via rørledning (11) å gjenvinne en raffinert fase som omfatter alkalialter av fettsyrer. Den raffinerte fasen mates via rørledning (11) til en surgjøringsreaktor (12) hvortil det mates en strøm av saltsyre så vel som, via rørledning (13) i et forhold lik den totale alkaliniteten for den raffinerte fasen eller i et overskudd opptil 10 %. Reaktoren (12) arbeider ved en temperatur mellom 20 og 70 °C under omrøring, et trykk på 1 til 2

bar og en oppholdstid opptil 30 minutter, for å generere en surgjort blanding. Den surgjorte blandingen mates til avsetningsbeholderen (15) via rørledning (14) for å separere den ikke-vandige fasen fra den vandige fasen fra surgjøringen. Avsetningsbeholderen (15) arbeider ved en temperatur mellom 20 og 70 °C, ved et trykk mellom 1 og 2 bar og en oppholdstid mellom 5 og 60 minutter. Den vandige fasen fjernes via rørledning (16) for etterfølgende behandling, for å gjenvinne løsningsmidler og glyserin. Via rørledning (17) blir den ikke-vandige fasen som er separert i surgjøringen [drift] i avsetningsbeholderen (15) matet til en vaskereaktor (18), der den under omrøring bringes i kontakt ved en temperatur mellom 20 og 70 °C, ved et trykk på 1 til 2 bar og en oppholdstid mellom 1 og 30 minutter med strømmen (19) som omfatter en løsning av etanol ved 50 % i vann, for å fremstille en vaskeblending. Vaskeblendingen i reaktoren (18) mates til en avsetningsbeholder (21) via rørledningen (20) for å separere den lette fasen fra den tunge fasen i vaskeblendingen. Avsetningsbeholderen (21) arbeider ved en temperatur mellom 20 og 70 °C, ved et trykk mellom 1 og 2 bar og en oppholdstid mellom 5 og 60 minutter. Den tunge fasen fjernes via rørledning (22) for etterfølgende behandling for å gjenvinne løsningsmidler eller for å resirkulere den helt eller delvis til vaskereaktoren (18). Via rørledning (23) blir den lette fasen separert i avsetningsbeholderen (21) matet til en forestringsreaktor (24) også matet via rørledning (25) med en strøm av en løsning av p-toluensulfonsyre oppløst i etanol. Reaktoren (24) arbeider ved en temperatur mellom 40 og 85 °C under omrøring, ved et trykk mellom 0,5 og 2 bar og ved en oppholdstid på 180 minutter for å gi en forestret blanding. Den forestrede blandingen mates via rørledning (26) til vaske- og nøytraliseringsreaktoren (27) der den under omrøring bringes i kontakt, ved en temperatur mellom 20 og 70 °C, ved et trykk på 1 og 2 bar og med oppholdstid på mellom 1 og 30 minutter, med strømmen (28) som omfatter en løsning av natriumkarbonat ved 5 % i vann, for å danne en nøytralisert vaskeblending. Den nøytraliserte vaskeblendingen fra vaskereaktoren (27) mates til en avsetningsbeholder (31) via rørledning (30) for å separere en blanding av estere av fettsyrer fra en vandig fase. Avsetningsbeholderen (31) arbeider ved en temperatur mellom 20 og 70 °C, ved et trykk mellom 1 og 2 bar og en oppholdstid mellom 5 og 60 minutter. Den vandige fasen fjernes via rørledning (32) for etterfølgende behandling for å gjenvinne løsningsmidler. Via rørledning (33) mates blandingen av estere av fettsyrer separert i avsetningsbeholderen (31) til en fallfilmfordamper (34) som arbeider ved en temperatur mellom 50 og 180 °C, ved et trykk mellom 1 og 100 mbar og med en oppholdstid ikke over 30 minutter, for å oppnå en destillatstrøm og en desolvatisert strøm som omfatter estere av fettsyrer. Via rørledning (35) blir destillatet pumpet til en ikke-vist lagertank. De desolvatiserte fettsyreesterne mates via rørledning (36) til en kortveisfordamper (37) som arbeider

ved en temperatur mellom 50 og 180 °C, ved et trykk mellom 0,001 og 1 mbar. Via rørledning (38) fjernes destillatet fra kortveisfordamperen (37) og via rørledning (39) fjernes resten fra destillasjonen fra kortveisfordamperen (37) og mates til en kortveisfordamper (40). Kortveisfordamperen (40) arbeider ved en temperatur mellom 50 og 180 °C, ved et trykk mellom 0,001 og 1 mbar. Via rørledning (41) fjernes resten fra destillasjonen av kortveisfordamperen (40) og via rørledning (42) fjernes destillatet av kortveisfordamperen (40), som omfatter en konsentrert blanding av organoleptisk nøytrale og stabile estere av EPA og DHA fjernes som ikke har noen reversjon for lukter og smaker som er vanlige for fiskeolje, er fri for bivirkninger, med et nivå av vedvarende organiske forurensede stoffer og tungmetaller som samsvarer med internasjonale reguleringsstandarder.

Eksempler

De følgende eksemplene illustrerer måter denne oppfinnelsen kan gjennomføres på, så vel som de fremragende egenskapene til produktet til prosessen ifølge oppfinnelsen.

Sammenligningseksempel 1 (EP 0 409 903).

300 g lakseolje (prøve M1) hvis egenskaper er vist i tabell 2, ble plassert i en 2000 ml Erlenmeyerkolbe, 150 g etanol og 150 g av en 28 % løsning av natriumhydroksid i destillert vann ble tilsatt. Deretter med omrøring under en nitrogenatmosfære ble blandingen refluksert i én time, som gir full forsåpning av lakseoljen. Umiddelbart etterpå ble 160 g av en vandig løsning av saltsyre ved 26 % tilsatt og blandingen ristet kraftig i 5 minutter. Deretter ble 450 ml petroleter tilsatt og det hele ristet igjen. Blanding ble plassert i en 2 000 ml skilletrakt og tillatt separering. Den satte øvre fasen ble fjernet og den vandige fasen ble ekstrahert to ganger med 450 ml petroleter. Ekstraktene av petroleter ble samlet i en 2000 ml trakt og vasket med vann til nøytral pH. Det vaskede ekstraktet ble fordampet i en rotasjonsfordamper som arbeidet ved 10 mbar og 60 °C. Deretter ble spor av petroleter fjernet ved å mate fordampingsresten fra rotasjonsfordamperen til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, i en strømningshastighet på 1250 ml/time, en kappetemperatur på 90 °C, en kondensatortemperatur på -4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 4 mbar. Det ble oppnådd en blanding av fettsyrer av lakseolje med 30,1 % langkjede ω -3-fettsyrer (prøve M2).

Blanding av fettsyrer av laks ble matet til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 100 ml/time, en kappetemperatur på 65 °C, en kondensatortemperatur på 4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 0,005 mbar, og det ble oppnådd et første destillat og en første rest. Den

første resten ble utsatt for et andre kortveis destillasjonstrinn, ved en temperatur på 85 °C og det ble oppnådd et andre destillat og en andre rest. Det andre destillatet inneholdt 52,2 % langkjedede ω -3-fettsyrer (prøve M3).

Resultatene av analysen av prøvene fra sammenligningseksempel 1 er vist i tabell 2.

5

Tabell 2: Resultater fra sammenligningseksempel 1

	Lakseolje Prøve M1	Fettsyreprøve M2	Andre destillat-prøve M3
EPA, vekt-%	10,3	11,4	16,6
DHA, vekt-%	15,1	16,8	30,7
Total ω -3, vekt-%	28,2	30,1	52,2
PCB, ppb	148,6	133,2	96,7
PCB som dioksiner, ppt	4,6	4,5	4,1
Dioksin+furaner, ppt	2,7	2,4	2,1
Peroksider, meq/kg	7,2	1,3	1,1
Anisidin	6,1	2,4	1,9
Totox	20,3	8,7	4,1
Tungmetaller			
Arsenikk, ppb	1200	538	359

Sammenligningseksempel 2 (US 5 130 061).

300 g lakseolje anvendt i sammenligningseksempel 1 og 200 g av en løsning av 5 % svovelsyre i absolutt etanol ble plassert i en 2 000 ml Erlenmeyerkolbe. Blandingen ble refluksert under omrøring og spylt med nitrogen i 8 timer. Overskytende etanol ble fjernet ved destillasjon under redusert trykk mens reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur.

Destillasjonsresten ble fortynnet med 400 ml heksan og ble vasket med 500 ml vann. Den heterogene blandingen ble omrørt kraftig. Den vandige fasen ble separert fra heksanfasen i en skilletrakt og heksanfasen ble vasket gjentatte ganger med vann inntil pH-verdien i den vandige fasen var nøytral. Det vaskede heksanekstraktet ble rensset ved føring gjennom en silikagelkolonne. Deretter ble det rensede

heksanekstraktet fordampet i en rotasjonsfordamper opptil 10 mbar og 60 °C. Spor av løsningsmiddel ble fjernet ved å mate resten fra fordampingstrinnet utført i rotasjonsfordamperen inn i en kortveis destillasjonskolonne opptil KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 1250 ml/time, en kappetemperatur på 90 °C, en kondensatortemperatur på -4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 4 mbar. Det ble oppnådd en blanding av etylestere som inneholdt 27,9 % av langkjedede (forestrede) ω -3-fettsyrer (prøve M4).

Blandingen av etylestere ble matet til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 100 ml/time, en kappetemperatur på 65 °C, en kondensatortemperatur på 4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 0,005 mbar ved anvendelse av en diffusjonspumpe og et første destillat og en første rest ble oppnådd. Den første resten ble utsatt for et andre kortveis destillasjonstrinn ved en temperatur på 85 °C for å oppnå et andre destillat og en andre rest. Det andre destillatet inneholdt 51,6 % langkjedede ω -fettsyrer (prøve M5).

Resultatene av analysen av prøvene i sammenligningseksempel 2 er vist i tabell 3.

Tabell 3: Resultater av sammenligningseksempel 2

	Lakseolje Prøve M1	Etylestere Prøve M4	Andre destillat Prøve M5
EPA, vekt-%	10,3	9,9	17,1
DHA, vekt-%	15,1	14,8	29,7
Total ω -3, vekt-%	28,2	27,9	51,6
PCB, ppb	148,6	136,4	103,7
PCB som dioksiner, ppt	4,6	4,5	3,9
Dioksin + furaner, ppt	2,7	2,5	2,3
Peroksider, meq/kg	7,2	7,5	3,9
Anisidin	6,1	6,0	2,4
Totox	20,3	21,0	10,2
Tungmetaller			
Arsenikk, ppb	1200	945	450

Eksempel 1.

300 g lakseolje anvendt i sammenligningseksempel 1, 150 g etanol og 150 g natriumhydroksidløsning i destillert vann ved 28 % ble plassert i en 2000 ml Erlenmeyerkolbe. Blandingen ble deretter refluksert under omrøring og nitrogenatmosfære i

5 en time, noe som ga full forsåpning av lakseoljen.

Den forsåpede blandingen ble plassert i en 3000 ml skilletrakt og 150 g etanol, 150 g destillert vann og 900 g heksan ble tilsatt til trakten. Den resulterende blandingen ble omrørt kraftig og satt hen for avsetning. Den øvre heksanfasen ble separert ut og den vandige fasen ble ekstrahert tre ganger til med 700 ml heksan. Heksanekstraktene ble

10 desolvatisert i en rotasjonsfordamper under redusert trykk.

Den ekstragerte vandige fasen ble surgjort ved tilsetning av 200 g av en vandig salt-syreløsning ved 20 %. Det resulterende organiske materialet ble vasket med deler av en vandig etanolløsning på 50 % inntil man nådde en pH-verdi på 4-5 og deretter ble den fordampet i en rotasjonsfordamper ved 10 mbar og 60 °C. En blanding av lakse-

15 fettsyrer ble oppnådd, som inneholdt 29,6 % langkjedede ω -fettsyrer (prøve M6).

Laksefettsyrene ble blandet med 100 g av en løsning av 1,0 % svovelsyre i vannfri etanol og ble refluksert i 2 timer. Reaksjonen ble ansett ferdig, som bestemt ved titrering, når blandingen nådde et konstant syretall. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert med 40 g av en 10 % natriumkarbonatløsning i destillert vann etterfulgt av vasking

20 med porsjoner på 40 g destillert vann. Deretter ble blandingen fordampet i en rotasjonsfordamper ved 10 mbar og 60 °C. Spor av løsningsmiddel ble fjernet ved mating av fordampingsresten til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 1250 ml/time, en kappetemperatur på 90 °C, en kondensatortemperatur på -4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 4

25 mbar. Det ble oppnådd en blanding av etylestere som innholdet 30,9 % langkjedede ω -3-fettsyrer (prøve M7).

Blandingen av etylestere ble matet til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC ved en strømningshastighet på 100 ml/time, en kappetemperatur på 65 °C, en kondensatortemperatur på 4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk

30 på 0,005 mbar ved å anvende en diffusjonspumpe og man oppnådde et første destillat og en første rest. Den første resten ble nok en gang destillert i kortveis destillasjonskolonnen ved en temperatur på 85 °C og det ble oppnådd et andre destillat og en andre rest. Det andre destillatet inneholdt 52,3 % langkjedede ω -3-fettsyrer (prøve M8).

Resultatene av analysen av prøvene fra eksempel 1 ifølge foreliggende oppfinnelse er vist i tabell 4.

Som man kan se i de ovennevnte eksemplene, var bare prosessen ifølge foreliggende oppfinnelse i stand til å oppnå et konsentrat av EPA og DHA i henhold til spesifikasjonene ifølge de internasjonalt foreslåtte reguleringene.

Tabell 4: Resultater av eksempel 1 med lakseolje

	Lakseolje Prøve M1	Fettsyrer Prøve M6	Etylestere Prøve M7	Andre destillat Prøve M8
EPA, vekt-%	10,3	10,1	10,3	20,4
DHA, vekt-%	15,1	17,2	17,4	29,8
Total ω -3, vekt-%	28,2	29,6	30,9	52,3
PCB, ppb	148,6	46,3	44,9	26,7
PCB som dioksiner, ppt	4,6	0,8	1,0	1,2
Dioksin + furaner, ppt	2,7	0,6	0,6	0,8
Peroksider, meq/kg	7,2	1,1	1,2	0,1
Anisidin	6,1	0,9	1,1	0,3
Totox	20,3	3,1	3,5	0,5
Tungmetaller				
Arsenikk, ppb	1200	200	205	< 100

Eksempel 2.

Testen i eksempel 1 ble gjentatt ved bruk av sardinolje som råstoff, med en Totox-verdi på 45. Resultatene av eksempelet er vist i tabell 5.

Tabell 5: Resultater av eksempel 2 med sardinolje

	Sardinolje	Fettsyrer	Etylestere	Andre destillat
EPA	16,1	16,3	16	30,1
DHA	6,2	6,1	6,2	15,4
Total ω -3	24,1	24,2	23,4	48,2
PCB, ppb	104,6	41,6	44,1	18,5
PCB som dioksiner, ppt	3,2	0,3	0,4	0,6
Dioksin + furaner, ppt	2,1	0,3	0,3	0,4

	Sardinolje	Fettsyrer	Etylestere	Andre destillat
Peroksider, meq/kg	10,7	3,5	3,6	0,1
Anisidin	23,6	1,9	1,8	0,1
Totox	45	8,9	9,0	0,2
Tungmetaller				
Arsenikk, ppb	980	345	330	< 100

Eksempel 3.

Testen i eksempel 1 ble gjentatt ved bruk av en taggmakrellolje som et råstoff som har en Totox-verdi på 33. Resultatene fra eksempelet er vist i tabell 6:

5

Tabell 6: Resultat fra eksempel 3 med taggmakrellolje

	Taggmakrell- olje	Fettsyrer	Etylestere	Andre destillat
EPA	5,4	5,4	5,1	15,7
DHA	16,8	16,9	16,3	32,2
Total ω -3	24,4	24,6	22,6	50,1
PCB, ppb	91	26	27	18
PCB som dioksiner, ppt	3,7	0,9	1,0	1,1
Dioksin + furaner, ppt	3,1	0,5	0,5	0,4
Peroksider, meq/kg	9,2	4,1	3,8	0,3
Anisidin	14,6	1,1	1,1	0,2
Totox	33	9,3	8,7	0,8
Tungmetaller				
Arsenikk, ppb	890	210	196	< 100

Eksempel 4.

En 200 liter baflet dampmantlet, vannavkjølt turbinomrørt rustfri ståltrektor med en rustfri stålkondensator ble fylt med 15 kg etanol, 15 kg av en vandig 18,7 % natriumhydroksidløsning og 15 kg sardinolje (prøve M10) hvis egenskaper er vist i tabell 7. Blandingen ble varmet opptil 55 °C i én time og ble deretter avkjølt til 45 °C. Deretter

10

ble 45 kg heksan tilsatt og det hele omrørt i 10 minutter. Blandingen ble satt hen for avsetning i 15 minutter og den organiske fasen ble separert fra den vandige fasen. Den vandige fasen ble ekstrahert to ganger til ved anvendelse av den samme prosedyren. Heksanekstraktene ble samlet og desolvatisert under redusert trykk, og genererte dermed en heksanrest. Den vandige eller raffinerte fasen ble surgjort ved en temperatur på 25 °C med 28 kg 10 % saltsyreløsning og det hele omrørt i 5 minutter. Den surgjorte blandingen ble satt hen for avsetning i 15 minutter for å separere den vandige fasen. Den organiske fasen ble vasket med 10 kg av en 50 % vandig etanolløsning til pH 5. Den vaskede, organiske fasen ble filtrert for å separere suspenderte faststoffer. Den organiske fasen, vasket og filtrert, ble fortynnet med heksan opptil 20 vekt-% og overført til en andre reaktor på 150 liter, tilveiebrakt med et mekanisk røreverk, et rørverk av ankertype og med kjølekappe, og ble avkjølt til -25 °C. Den avkjølte blandingen ble ved -25 °C filtrert i et posefilter ved anvendelse av et polyesternettt på 10 mikron som filtreringsmiddel. Filtratet fra filtreringstrinnet ble fylt i 200 liters reaktoren og ble varmet opp til 55 °C under et trykk på 200 mbar. Blandingen av desolvatiserte fettsyrer ble brakt i kontakt med en løsning på 20 kg urea oppløst i 55 kg etanol ved 80 °C. Blandingen ble omrørt for å danne komplekset med urea og det ble deretter avkjølt til 15 °C. De utfelte faststoffene ble separert ved filtrering og det ble oppnådd et faststoffritt filtrat. Det faststoffrie filtratet ble avkjølt til 1 °C og filtrert for å oppnå et andre faststoffritt filtrat. Det andre faststoffrie filtratet ble blandet med 3 kg saltsyre oppløst i 50 kg vann og 20 kg heksan, omrørt og satt hen for avsetning. Den sure, vandige fasen ble separert og den organiske fasen vasket med 5 kg vann inntil pH-verdien var nøytral. Den organiske fasen ble desolvatisert ved 80 °C og 50 mbar. Det ble oppnådd 2,3 kg av en blanding av fettsyrer som inneholder 77,2 % ω -3 fettsyrer (prøve M-11).

Deretter ble 40 g svovelsyre, oppløst i 10 kg etanol innført og oppvarmet ved å kontrollere temperaturen i reaktoren gjennom destillasjon inntil man nådde 80 °C. Deretter ble reaktoren avkjølt til 40 °C og fortynnet med 10 kg heksan. Deretter ble 70 g natriumkarbonat oppløst i 5 kg vann tilsatt til den fortynnede blandingen og den ble omrørt i 10 minutter. Den vandige fasen ble separert. Den organiske fasen ble vasket med 5 kg vann og deretter desolvatisert ved 80 °C og 50 mbar. 2,5 kg av en blanding av etylestere av fettsyrer ble oppnådd, som inneholdt 70,9 % ω -3-fettsyrer (prøve M-12).

Spor av løsningsmiddel fra etylesterner ble fjernet ved å mate blandingen til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 1250 ml/time, en kappetemperatur på 80 °C, kondensatortemperatur på -5 °C, en rullehastighet på 350

omdreininger per minutt og et trykk på 4 mbar. Blandingen av etylestere fra den foregående destillasjonen ble matet til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, i en strømningshastighet på 90 ml/time, en kappetemperatur på 85 °C, en kondensator-temperatur på 4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 0,005 mbar ved anvendelse av en diffusjonspumpe, og det ble oppnådd et første destillat og en første rest.

Den første resten ble blandet med et forhold av 1 % Tonsil ved 70 °C og ved redusert trykk i 30 minutter og ble filtrert og det ble oppnådd et rensert filtrat som ble utsatt for et andre kortveis destillasjonstrinn ved en temperatur på 98 °C for å oppnå et andre destillat og en andre rest. Det andre destillatet inneholdt 86,2 % langkjedede ω -3-fettsyrer. Det andre destillatet ble avkjølt til -25 °C i 12 timer og så filtrert. Det resulterende filtratet ble matet til en deodoriseringskolonne ved en temperatur på 100 °C ved bruk av nitrogen ved 130 °C og ved trykket på 15 mbar for deodoriseringen. Et deodorisert konsentrat av etylestere av langkjedede ω -3-fettsyrer (prøve M13) ble oppnådd og til dette ble det tilsatt en blanding av estere av tokoferol, askorbylpalmitat og ekstrakt av rosmarin i en konsentrasjon på 2550 ppm.

Resultatene av analysen i prøvene i eksempel 4 er vist i tabell 7.

Tabell 7: Resultat av eksempel 4

	Sardinolje Prøve M10	Fettsyrer Prøve M11	Etylestere Prøve M12	Andre destillat Prøve M13
EPA	10,3	29,9	27,1	29,1
DHA	15,1	44,3	40,5	56,2
Total ω -3	26,1	77,2	70,9	86,3
PCB, ppb	98	44	46	17
PCB som dioksiner, ppt	3,8	1,8	1,7	1,2
Dioksiner+furaner, ppt	4,1	0,4	0,5	0,3
Peroksider, meq/kg	5,1	0,9	1,3	0,1
Anisidin	8,9	0,8	0,8	0,1
Totox	19,1	2,6	3,4	0,3
Tungmetaller				
Arsenikk, ppb	1090	304	321	< 100

Eksempel 5.

En 200 liter baflet, dampmantlet, vannavkjølt turbinomrørt rustfri stålreaktor med en rustfri stålkondensator ble fylt med 15 kg etanol, 15 kg av en vandig 17,4 % natriumhydroksidløsning og 15 kg taggmakrellolje ifølge eksempel 3 og hvis egenskaper er vist i tabell 8. Blandingen ble varmet opp til 75 °C i en time og deretter avkjølt til 45 °C. Deretter ble 45 kg heksan tilsatt og omrørt i ti minutter. Blandingen ble satt hen for avsetning i 15 minutter og den organiske fasen ble separert fra den vandige fasen. Den vandige fasen ble ekstrahert to ganger ved den samme prosedyren. Den vandige fasen eller den raffinerte fasen ble surgjort ved en temperatur på 25 °C med 26 kg av en 10 % saltsyreløsning og omrørt i 5 minutter. Den surgjorte blandingen ble satt hen for avsetning i 15 minutter og deretter ble den vandige fasen separert ut. Den organiske fasen ble vasket med 10 kg 50 % vandig etanolløsning inntil man nådde pH 5. Den vaskede, organiske fasen ble blandet med 100 g svovelsyre oppløst i 10 kg etanol og ble oppvarmet mens man kontrollerte temperaturen i reaktoren som destillerte en blanding av løsningsmiddel inntil man nådde en temperatur på 80 °C. Deretter ble reaktoren avkjølt til 40 °C, 350 g natriumkarbonat oppløst i 5 g vann ble tilsatt og omrørt i 10 minutter. Den vandige fasen ble separert. Den organiske fasen ble vasket med 5 kg vann og desolvatisert ved 80 °C og 50 mbar. Det ble oppnådd 14,6 kg av en blanding av etylestere av fettsyrer som inneholdt 24,7 % ω -3 fettsyrer. (prøve M-14).

Spor av løsningsmiddel av etylesterner ble fjernet ved å mate blandingen til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, i en strømningshastighet på 1250 ml/time, en kappetemperatur på 80 °C, en kondensatortemperatur på -5 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt og et trykk på 4 mbar. Blandingen av etylestere fra den foregående destillasjonen ble matet til en kortveis destillasjonskolonne KDL5 UIC, ved en strømningshastighet på 90 ml/time, en kappetemperatur på 85 °C, en kondensatortemperatur på 4 °C, en rullehastighet på 350 omdreininger per minutt, et trykk på 0,005 mbar ved hjelp av diffusjonspumpe, og man oppnådde et første destillat og en første rest. Deretter ble den første resten utsatt for en andre kortveis destillasjon ved en temperatur på 96 °C og det ble oppnådd et andre destillat og en andre rest. Det andre destillatet inneholdt 51,2 % langkjedede ω -3 fettsyrer (prøve M15). Til slutt ble 2000 ppm tokoferolacetat (Grindox Toco 70, Danisco) blandet med det andre destillatet.

Resultatet av analysen av prøvene fra eksempel 5 er vist i tabell 8.

Tabell 8: Resultat fra eksempel 5

	Taggmakrellolje	Etylester- prøve M14	Andre destillat- prøve M15
EPA	5,4	5,8	12,9
DHA	16,8	16,1	35,7
Total ω -3	24,4	24,7	51,2
PCB, ppb	91	31	15
PCB som dioksiner, ppt	3,7	1,4	1,0
Dioksin + furaner, ppt	3,1	0,7	0,4
Peroksider, meq/kg	9,2	3,4	0,1
Anisidin	14,6	0,9	0,3
Totox	33	7,7	0,5
Tungmetaller			
Arsenikk, ppb	890	269	< 100

Eksempel 6.

For studiet av dannelsen av trans-isomerer av ω -3-fettsyrer av marine oljer ble

5 *Cis/trans*-isomerien av EPA fra eksemplene 2 og 3 evaluert.

Ett gram av det andre destillatet fra eksempel 2 ble forsåpet med en løsning av kaliumhydroksid i vandig metanol ved 10 °C i 24 timer. Deretter ble den forsåpede blandingen surgjort med en fortynnet løsning av saltsyre ved 1 %, ved 10 °C. Den surgjorte blandingen ble ekstrahert med petroleter tre ganger. Petroleterekstraktene ble
 10 samlet, vasket med en 20 % vandig metanolløsning og det vaskede ekstraktet ble desolvatisert i en rotasjonsfordamper ved 20 °C og 5 mbar. Resten ble metylert ved bruk av bortrifluorid. 870 mg metylestere av langkjedede ω -3-fettsyrer ble oppnådd. En prøve av metylestere av langkjedede ω -3-fettsyrer fra det andre destillatet fra eksempel 3 ble fremstilt på en tilsvarende måte.

15 På samme måte ble metylestere av fettsyrer fra sardinolje i eksempel 2 og taggmakrelloljen fra eksempel 3 fremstilt ved bruk av den beskrevne metoden.

En standard for metylester av fullstendig *cis* (5, 8, 11, 14, 17)-eikosapentaensyre ble injisert i en gasskromatografserie 7890A tilveiebrakt med en selektiv massedetektor 5975Cinert, fra Agilent Technologies, ved anvendelse av en 100-meter SP 2560-kolonne med en indre diameter på 0,25 mm og en filmtykkelse på 0,20 mikroner. Det
 20

kromatografiske programmet var: innledende temperatur 140 °C i 5 minutter; temperaturøkning med 2 °C/min opptil 240 °C og opprettholdt ved 240 °C i 30 minutter. Injektor- og detektortemperaturen var 250 °C. Det ble anvendt ekstra ren helium som bærer. Massespektra for standarden ble lagret i databiblioteket.

- 5 Deretter ble prøvene av metylesterne fremstilt fra prøvene av det andre destillatet fra eksempel 2 og 3 og av metylesterne oppnådd fra de opprinnelige oljene i eksemplene 2 og 3 injisert i kromatografen. Programmet Chemstation ble anvendt for å oppnå en «sammenlikningskvalitet» (eng.: "Match Quality") på 99 % for hver av de metylerte prøvene. I tillegg ble kromatogrammene og spektrogrammene for alle metylesterne
10 som var kromatografert sammenlignet og det ble ikke detektert noen nye topper som kunne forbindes med isomerisering av EPA.

- I tillegg ble innholdet av transisomerer av fettsyrer av 16 til 22 karbonatomer bestemt i henhold til metodologien beskrevet i prosessen AOCS Ce 1h-05. Resultatene er vist i tabell 9. Slik man kan se ble det i testene fra eksemplene 2 og 3 ikke generert noen
15 transisomerer og det var uventet en reduksjon av nevnte isomerer via prosessen ifølge foreliggende oppfinnelse.

Tabell 9: Analyse av transfettsyrer i eksemplene 2 og 3

% pp metylester fettsyrer trans	Sardinolje	Andre destillat	Taggmakrellolje	Andre destillat
	Eksempel 2	Eksempel 2	Eksempel 3	Eksempel 3
C16:1 T	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C18:1 T	2,02 %	1,18 %	0,37 %	0,28 %
C18:2 T	0,22 %	0,05 %	0,15 %	0,13 %
C18:3 T	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C20:1 T	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
C22:1 T	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

20 **Eksempel 7.**

Sensorisk evaluering av kvaliteten og bestemmelse av stabiliteten for prøvene av etylestere av fettsyrer.

- Organoleptiske egenskaper og stabiliteten ble evaluert av et trenet panel på 12 deltakere. Prøver for evaluering ble gitt til hver paneldeltaker i små glass kodet med 3 tilfeldige siffer og inneholdt 15 ml prøver per paneldeltaker. Evalueringen ble gjennomført i et sensorisk evalueringslaboratorium rundt klokken 11:00 om morgenen.
25

For å bedømme den sensoriske kvaliteten for produktet ble følgende parametre vurdert: utseende, aroma, smak, harskhets og nærvær av spesielle smaker og lukter. Måleskalaen for evaluering av parametrene hadde et 9-punktsområde, der 9 indikerte at parameteren som ble evaluert var optimal for produktet og 1 indikerte at den var veldig dårlig. For eksempel, står 9 for; når det gjelder smak, for "utmerket, typisk, ek-

sepsjonelt godtakbar" og 1 står for "fremmed, ubehagelig, rått". Når det gjelder harskhets, hadde måleskalaen et område på 5 poeng der 5 betød "uten harskhets" og 1 betyr "ekstremt harsk".

Tabell 10 viser de gjennomsnittlige resultatene som ble oppnådd i den organoleptiske bedømmelsen av den nye prøven av etylestere av fettsyrer M15 i eksempel 5 (A) og den samme prøven etter 29 ukers lagring ved romtemperatur (B). Ingen smaks-, lukt- eller utseendemaskerende midler ble tilsatt til prøvene.

Tabell 10: Resultater fra organoleptisk bedømmelse og stabilitet

Prøve	Utseende	Aroma	Smak	Harskhets
M15 eksempel 5 (A)	7,5	7,6	7,1	4,7
M15 eksempel 5 (B)	7,9	7,4	7,2	4,6

Utseende: Denne egenskapen oppnådde en bedømmelse på 7,5, det vil si at utseendet er "godt".

Aroma: Den oppnådde bedømmelsen var 7,6, noe som anses som "godt".

Smak: Hva smak angår, fikk prøven bedømmelse 7,1, noe som betyr "god" på skalaen.

Harskhets: Prøvene fikk en bedømmelse på 4,6, noe som betyr "lav harskhets".

Slik man kan se har konsentratet av EPA og DHA generert av foreliggende oppfinnelse akseptabel organoleptisk kvalitet og stabilitet.

Eksempel 8.

For å sammenligne bivirkningene som forårsakes av konsentrater av EPA og DHA oppnådd fra fiskeolje, ble 10 frivillige delt i to grupper, A og B, med 5 individer hver.

900 g yoghurt ble blandet med 100 gram kommersielle 32:22 EPA:DHA-etylestere av fettsyrer, for å generere en prøve på yoghurt 1. Parallelt ble 100 g etylestere fra eksempel 5, prøve M15, blandet med separat 900 g yoghurt separat, for å generere en prøve av yoghurt 2. Hvert medlem av gruppe A spiste 150 g av yoghurtblanding fra prøve 1 og hvert medlem av gruppe B spiste 150 g yoghurtblanding fra prøve 2. Tre timer senere ble de frivillige testpersonene stilt spørsmål om nærvær eller fravær av gastrisk refluks. I gruppe A ble det detektert 4 positive tilfeller, mens i gruppe B ble det detektert 1 positivt tilfelle.

En uke senere ble testen gjentatt med de samme individene i gruppe A og B. Denne gangen spiste hvert medlem i gruppe A 150 g av en ny yoghurtblanding 2 og hvert medlem i gruppe B spiste en ny yoghurtblanding 1. Tre timer senere ble de frivillige testpersonene stilt spørsmål om nærvær eller fravær av gastrisk refluks. I gruppe A ble det ikke detektert noen positive tilfeller, mens det i gruppe B ble detektert 5 positive tilfeller. Testgruppen viser at konsentratene av EPA og DHA oppnådd av prosessen ifølge foreliggende oppfinnelse ikke viser de karakteristiske bivirkningene av marine derivater, så som gastrisk refluks, sannsynligvis som følge av den virksomme fjerningen av allergener opprinnelig til stede i råstoffet.

Eksempel 9.

En Petri-skål med diameter 15 cm med 20 g prøve M15 fra eksempel 5 ble holdt i en ovn med tvungen konveksjon ved 45 °C i 6 timer. Deretter ble prøven fjernet fra ovnen og tillatt avkjøling.

Prøven ble evaluert av et panel på 5 personer. Det ble ikke detektert noen fiskeaktig lukt.

Testen ble gjentatt med prøve M3 fra sammenligningseksempel 1. En karakteristisk harsk fiskelukt ble bemerket.

Testen ble gjentatt med prøve M5 fra sammenligningseksempel 2. Nok en gang ble en karakteristisk harsk fiskelukt bemerket.

Testen ble gjentatt med prøven av etylesterne av fettsyrer 33:22 EPA:DHA som anvendt i eksempel 8. En karakteristisk harsk fiskelukt ble bemerket.

Eksempel 10.

Oksidasjonsstabiliteten for en del av prøve M15 fra eksempel 5 ble målt ved hjelp av Rancimat-testmetoden. Induksjonstiden ved 80 °C var $28,11 \pm 0,97$ timer. Parallelt ble Rancimat-testene gjennomført på prøven av etylestere 33:22 som anvendt i eksempel 8. Induksjonstiden ved 80 °C var $1,67 \pm 0,10$ timer.

Eksempel 11.

En prøve av heksanresten fra eksempel 4 ble bestemt ved GC-MS i en HP7890 kromatograf koplet til en 5975Cinert massedetektor. Den kromatografiske rapporten antydte nærværet i prøven av over 50 forbindelser i en konsentrasjon over 1000 ppm slik det fremgår av tabell 11.

Tabell 11: GC-MS-analyse av heksanresten fra eksempel 4

Nr.	Forbindelsens navn	Overensstemmelse, %	CAS #
1	β -pinen	93	000127-91-3
2	1,2-benzendikarboksytsyre, mono-(2-etylheksyl)ester	50	004376-20-9
3	1,4-butandiamin, N-(3-aminopropyl)	47	000124-20-9
4	1,6-oktadien-3-ol, 3,7-dimetyl	30	000078-70-6
5	1-anliinoisoquinolin	41	013797-20-1
6	1-nonadecen	94	018435-45-5
7	1R- α -pinen	96	007785-70-8
8	2(1H)-naftalenon, 3,4,4a,5,6,7-heksahydro-4a-[(metylamino)metyl]	43	1000197-08-7
9	2,3-dihydro-4-metyl-8-nitro-1H-1,5-benzodiazepin-2-on	52	037546-88-6
10	2-dekanon	55	000693-54-9
11	3,5-di-tert-butyl-4-hydroksybenzaldehyd	64	001620-98-0
12	3,5-di-tert-butyl-4-hydroksybenzylalkohol	93	000088-26-6
13	3-karen	95	013466-78-9
14	3-sykloheksen-1-ol, 4-metyl-1-(1-m-etyl-etyl)	93	000562-74-3
15	3-fluor-2,2,3,4,4,5,5,6,6,7,7-undekametyl-[1,2,3,4,5,6,7]oksaheksasilepan	49	1000311-73-1
16	4,4'-etylenbis(2,6-di-tert-butylfenol)	94	001516-94-5
17	4,7,10,13,16,19-dokosaheksaensyre, metylester, (alle Z)	38	002566-90-7
18	4-[4-metylamino-1-metylburylamino]-7-klorquinolin	27	031510-53-9
19	5-(2-aminopropyl)-2-metylfenol	38	021618-99-5

Nr.	Forbindelsens navn	Overensstemmelse, %	CAS #
20	5,8,11,14,17-eikosapentaensyre, metylester, (alle Z)	86	002734-47
21	5-androsten-17- α -etynyl-3. β .,17. β .-diol	70	1000126-90-5
22	2,2,2-triklor, acetamid	53	000594-65-0
23	1-metyl-2-(1-metyletyl), benzen	97	000527-84-4
24	Benzo[h]quinolin, 2,4-dimetyl	46	000605-67-4
25	benzosyre, 3,5-bis(1,1-dimetyletyl)-4-hydroksy, metylester	60	002511-22-0
26	benzylalkohol, α -(1-aminoetyl)- m -hydroksy	25	000054-49-9
27	Butanamid, 3-metyl	38	000541-46-8
28	Butylert hydroksytoluen	89	000128-37-0
29	Kolest-5-en-3-ol (3. β .)	99	000057-88-5
30	Citronellyisobutytrat	64	000097-89-2
31	Sykloheksan, 1,2,4-trietenyl	45	002855-27-8
32	Syklopropanmetanol, 2-metyl-2-(4-metyl-3-pentenyl)	38	000541-05-9
33	Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentametyl	46	039170-97-3
34	di-alanyl-1-fenylalanin	43	108740-86-9
35	Dodekan	58	000112-40-3
36	Dodekan, 4-metyl	58	006117-97-1
37	Eukalyptol	98	000470-82-6
38	Heptanamid, N-fenyl	38	056051-98-0
39	Heksadekan	95	000544-76-3
40	Heksadekansyre, etylester	98	000628-97-7
41	Metyl-(Z)-5,11,14,17-eikosatetraenoat	50	059149-01-8
42	Pentadekan	96	000629-62-9
43	Pentadekan, 2,6,10,14-tetrametyl	91	001921-70-6
44	Fenyletylamin, p , a .-dimetyl	43	000064-11-9
45	Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetyletyletyletyl)	50	004130-42-1
46	Fenol, 3-(1,1-dimetyletyl)-4-metoksy	60	000088-32-4
47	Ftalsyre, butylheksylester	59	1000308-99-5
48	Pterin-6-karboksyisyre	22	000948-60-7
49	Skvalen	99	007683-64-9

Nr.	Forbindelsens navn	Overensstem- melse, %	CAS #
50	Tetradekan	92	000629-59-4
51	Tiocyansyre, 5. α .-kolestan-3. β .-yl ester	38	020997-50-6
52	Tiocyansyre, 5. α .-kolestan-3. β .-yl ester	52	020997-50-6
53	Tiofen,2,5-dibutyl	59	006911-45-1
54	Tridekan	92	000629-50-5
55	Undekansyre, etylester	70	000627-90-7

Slik man kan slutte fra de dataene som er vist i tabell 11 er prosessen ifølge forelig-
gende oppfinnelse i stand til å fjerne en stor familie av forbindelser til stede i råstoffet,
som ikke er ω -3-fettsyrer og som kunne være ansvarlige for bivirkninger og uønskede
5 reverseringer av smak og lukt.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for å oppnå et konsentrat av estere av EPA og DHA fra rå eller raffinerte marine oljer, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende trinn:
 - a). å bringe rå eller raffinert marin olje i kontakt med én eller flere alkalier og vann ved en temperatur på høyst 100 °C inntil det oppnås en blanding som omfatter forsåpet marin olje;
 - b). å bringe den forsåpede blandingen i kontakt med ett eller flere organiske løsningsmidler for å tildanne en raffinert fase som omfatter alkaliske salter av fettsyrer og en ekstrahert fase;
 - c). å separere den ekstraherte fasen fra den raffinerte fasen;
 - d). å blande den raffinerte fasen med en vandig løsning av en syre for å tildanne en ikke-vandig fase som omfatter fettsyrer og en vandig fase;
 - e). å separere den vandige fasen fra den ikke-vandige fasen;
 - f). å blande den separerte ikke-vandige fasen med en alkohol og en forestringskatalysator ved en temperatur på høyst 150 °C inntil det oppnås en forestret blanding som omfatter estere av fettsyrer;
 - g). å fjerne katalysatoren fra den forestrede blandingen for å oppnå den katalysatorfrie, forestrede blandingen;
 - h). å løse opp den katalysatorfrie, forestrede blandingen for å oppnå estere av fettsyrene, og
 - i). å destillere esterene av fettsyrer i en destillasjonskolonne med kort bane ved en temperatur på høyst 180 °C og et trykk på mindre enn 1 mbar for å oppnå et konsentrat som omfatter estere av EPA og DHA.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at alkaliet i trinn (a) er valgt fra gruppen som består av natriumhydroksid, kaliumhydroksid, litiumhydroksid, magnesiumhydroksid og deres blandinger, og vektforholdet mellom alkali og rå eller raffinert olje er ca. 0,15:1 og vektforholdet mellom vann og rå eller raffinert olje er mellom 0,5:1 og 2:1.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen i trinn (a) omfatter etanol og vektforholdet mellom etanol og rå eller raffinert olje er mellom 0,5:1 og 2:1.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen i trinn (a) omfatter heksan og vektforholdet mellom heksan og rå eller raffinert olje er mellom 0,5:1 og 2:1.
5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen i trinn (a) omfatter én eller flere antioksidanter og vektforholdet mellom antioksidanten og rå eller raffinert olje er mindre enn 1:100.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen i trinn (a) opprettholdes ved et trykk på ca. 1 bar og ved en temperatur på ikke mer enn 100 °C i løpet av en tidsperiode på mellom 30 og 120 minutter for å oppnå forsåpet marin olje.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at i trinn (d) er syren valgt fra gruppen som består av svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, maursyre, tri-kloreddiksyre og karbonsyre, temperaturen er mellom 20 og 70 °C, trykket er ca. 1 bar og det støkiometriske forholdet mellom syren og alkaliet i trinn (a) er ca. 1,05:1.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at alkoholen i trinn (f) er valgt fra gruppen som består av metanol, etanol og glyserol, temperaturen er mellom 30 og 80 °C, trykket er ca. 1 bar og forestringsblandingen opprettholdes ved en temperatur mellom 30 og 80 °C i løpet av en periode på mellom 60 og 240 minutter for å tildanne den forestrede blandingen.
9. Fremgangsmåte ifølge ett av de foregående kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at esterne av fettsyrer destillerer ved et trykk lavere enn 0,1 mbar og en temperatur lavere enn 150 °C.

EP 2 438 819 B9

Figure 1

