



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 11 374 T3** 2007.05.16

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 904 339 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 11 374.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP97/02510**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 923 916.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/043362**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.05.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.11.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **20.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C11B 3/00** (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61K 7/48 (2000.01)

(30) Unionspriorität:
96201319 **15.05.1996** **EP**

(73) Patentinhaber:
DSM IP Assets B.V., Heerlen, NL

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**BIJL, Louis, Hendrik, NL-3131 ZD Vlaardingen, NL;
WOLF, Hendrik, Johannes, NL-2613 XX Delft, NL;
SCHAAP, Albert, NL-2993 BG Barendrecht, NL**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM EXTRAHIEREN VON STEROL MIT EINEM POLAREN LÖSUNGSMITTEL ZUR HERSTELLUNG EINES MIKROBIELLEN ÖLES MIT NIEDRIGEM STEROLGEHALT**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft gereinigte (wie durch Extraktion) mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) enthaltende (mikrobielle) Öle, insbesondere Öle mit einem Sterolgehalt von weniger als 1,5%.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Es besteht eine wachsende Tendenz, Lipidprodukte, die aus verschiedenen Fermentierungsverfahren stammende, mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, in Nahrungsmittel aufzunehmen. Dies ist bei dem neuerdings entwickelten Wunsch, bestimmte mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Babyfertiernahrung einzubringen, wichtig.

[0003] Verschiedene Verfahren wurden für die fermentative Herstellung von mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthaltenden Lipiden oder Ölen beschrieben. Beispiele sind EP-A-155,420 zur Erzeugung von γ -Linolensäure (GLA) enthaltendem Lipid durch *Mortierella*, EP-A-223,960, EP-A-276,541 und WO-A-92/13086 zur Erzeugung von Arachidonsäure (ARA) enthaltendem Öl durch *Mortierella* und/oder *Pythium*, WO-A-91/07498 und WO-A-91/11918 zur Erzeugung von Docosahexaensäure (DHA) enthaltendem Öl durch *Cryptocodinium cohnii* oder *Thraustochytrium* und WO-A-91/14427 zur Erzeugung von Eicosapentaensäure (EPA) enthaltendem Öl durch *Nitzschia*. Die mikrobielle Spezies, welche das die gewünschte(n) mehrfach ungesättigte(n) Fettsäure(n) enthaltende Lipid erzeugt, wird typischerweise in einem geeigneten Medium kultiviert und die Biomasse vor Erhalt des gewünschten Lipids gesammelt.

[0004] Zum Erhalt eines einen relativ hohen Triglyceridgehalt aufweisenden Lipidkonzentrats wird in dem Extraktionsverfahren typischerweise ein für das Lipid unpolares Lösungsmittel (z.B. Hexan) oder überkritisches CO₂ verwendet. Zum Beispiel beschreibt EP-A-246,324 ein fraktionelles Extraktionsverfahren zur Isolierung von Lipiden aus *Mortierella*, wobei verschiedene Extrakte erhalten werden, die entweder an polaren oder unpolaren (neutralen) Lipiden angereichert sind. Jedoch weist der neutrale Lipidextrakt noch einen relativ niedrigen Triglyceridgehalt (89,3%) und hohen Sterolgehalt (9,4%) auf. Die U.S.-Patentschrift Nr. 4,857,329 beschreibt ein Extraktionsverfahren, welches die Verwendung von überkritischem CO₂ zum selektiven Eluieren von neutralen Lipiden aus der Biomasse von *Mortierella* umfasst. Jedoch ist der Triglyceridgehalt des Lipidextrakts nicht höher als 86%.

[0005] Yamada et al., *Industrial Applications of Single Cell Oils*, Hsg. Kyle und Ratledge, 118–138 (1992) beschreiben ein Arachidonsäure enthaltendes Öl, das aus der Biomasse von *Mortierella alpina* unter Verwendung von Hexan extrahiert wird. Das gereinigte Öl weist einen Triglyceridgehalt von 90% auf.

[0006] JP-A-62/179598 beschreibt ein Verfahren, bei welchem Fett (oder Öl) enthaltendes Material in wässrigem Ethanol dispergiert und zerkleinert wird. Das zerkleinerte Material wird von dem Dispersionsmittel abgetrennt. Das abgetrennte Material wird mit n-Hexan extrahiert, um Fett (oder Öl) zu erhalten.

[0007] JP-A-62/065689 betrifft ein raffiniertes Glyceridöl, von welchem ein Gummi, wie Phospholipid, Triglycerid, freie Fettsäure durch Extrahieren einer Rohglyceridölzusammensetzung aus einem Mikroorganismus, Verdünnen der Zusammensetzung mit einem organischen Lösungsmittel und Inkontaktbringen mit einer halbdurchlässigen Membran entfernt wurde.

[0008] Somit war es bisher nicht möglich, ein mikrobielles Triglyceridöl mit hohem Triglyceridgehalt, d.h. 95% oder höher, unter Verwendung von bisheriger Fermentierungs- und Extraktionstechnologie zu erhalten. Es war ebenso nicht möglich, Öle mit einem besonders niedrigen (z.B. weniger als 1,5%) Sterolgehalt herzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren zur Herstellung eines (mikrobiellen) Öls mit hohem Triglyceridgehalt und geringem Gehalt an „unverseifbaren Stoffen“, bei welchem ein aus einer mikrobiellen Biomasse extrahiertes, erhaltenes oder stammendes Öl mit einem polaren Lösungsmittel behandelt wird.

[0010] Die vorliegende Erfindung kann somit ein mikrobielles (oder mikrobiell erhaltenes) Öl mit hohem Triglyceridgehalt, wie >95%, bereitstellen. Jedoch kann das Öl einen Triglyceridgehalt von mindestens 97%, vorzugsweise $\geq 98\%$ und optimal $\geq 99\%$ aufweisen. Das (mikrobielle) Öl weist auch einen niedrigen ($\leq 1,5\%$) Sterolgehalt auf. Vorzugsweise ist der Sterolgehalt $\leq 1\%$, wie $\leq 0,6\%$, optimal $\leq 0,3\%$.

[0011] Das Öl der Erfindung kann in verschiedenen Zubereitungen, wie pharmazeutischen (oder therapeutischen), kosmetischen, Futtermittel- oder Lebensmittelzubereitungen (für den Verbrauch durch Menschen oder Tiere), insbesondere in Babyfertiernahrung oder als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

[0012] Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft deshalb ein Verfahren zum Behandeln eines mikrobiell erhaltenen Öls (ein von einem Mikroorganismus stammendes Öl), wobei das Verfahren (a) das Inkontaktbringen des Öls mit einem polaren Lösungsmittel, um zumindest ein Sterol zu extrahieren, das in dem Lösungsmittel löslich ist, und (b) das Abtrennen zumindest eines Teils des Lösungsmittels, welches das Sterol aus dem (so behandelten) Öl enthält, so dass das resultierende Öl einen Sterolgehalt von weniger als 1,5% aufweist, umfasst.

[0013] Das mikrobiell erhaltene Öl kann aus einem oder mehreren Mikroorganismen extrahiert, erhalten oder hergestellt werden. Oftmals handelt es sich hierbei um die gleiche Mikroorganismusspezies, jedoch wird von der vorliegenden Erfindung ein Gemisch aus zwei oder mehreren verschiedenen Mikroorganismen eingeschlossen. Das Verfahren der Erfindung kann deshalb im Anschluss an die Herstellung des Öls selbst stattfinden. Das Öl kann eines sein, das durch den (die) Mikroorganismen erzeugt wird oder in ihm (ihnen) (z.B. intrazellulär) vorliegt. In einer anderen Ausführungsform kann es aus einer (gewöhnlich wässrigen) Zubereitung erhalten werden, die aus der Fermentierung (der Mikroorganismen) erhalten wird oder resultiert. Diese (wässrige) Zubereitung kann die Mikroorganismen selbst enthalten: In diesem Fall ist es gewöhnlich eine Fermentierungsbrühe. Die Mikroorganismen (oder Biomasse, wie auf dem Fachgebiet bezeichnet) kann (nach der Fermentierung) durch eine Anzahl von Verfahren, z.B. Filtration, Zentrifugation oder Dekantierung, entfernt werden. Das Öl kann aus dieser Biomasse extrahiert oder erhalten werden.

[0014] Es ist üblich, dass das mikrobielle Öl durch Extraktion erhalten wird. Dies umfasst vorzugsweise die Extraktion unter Verwendung eines unpolaren oder vorzugsweise mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittels oder zumindest eines Lösungsmittels, das ölige Bestandteile extrahieren kann. Solch ein Lösungsmittel kann ein C₆₋₁₀-Alkan, z.B. Hexan, oder (überkritisches) Kohlendioxid sein.

[0015] Verschiedene Mikroorganismen erzeugen verschiedene Öle. Diese können sich in der Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) sowie durch andere Bestandteile unterscheiden, und tatsächlich können die PUFAs in verschiedenen Formen, z.B. Diglyceride, Triglyceride und/oder Phospholipide, vorliegen. Als solche können sich mikrobiell erhaltene Öle sogar von Ölen, die eine oder mehrere dieser von anderen (z.B. tierischen oder Fisch- oder pflanzlichen) Quellen erhaltenen PUFAs enthalten, bedeutend unterscheiden.

[0016] Die betrachteten Mikroorganismen können breit variieren, sind jedoch vorzugsweise in der Lage, eine oder mehrere PUFAs, z.B. über Fermentierung, zu erzeugen. Bei den Mikroorganismen kann es sich um Bakterien, Algen, Pilze oder Hefen handeln. Geeignete Fermentierungsverfahren, Mikroorganismen und PUFA-haltige Öle sind in der gleichzeitig anhängigen Internationalen Anmeldung Nr. PCT/EP97/01448 (eingereicht am 21. März 1997 im Namen von Gist-Brocades B.V.) beschrieben.

[0017] Bevorzugte Algen sind von der Gattung *Cryptocodinium*, *Porphyridium* oder *Nitzschia*. Bevorzugte Pilze sind von der Gattung *Thraustochytrium*, *Mortierella*, *Pythium*, *Mucorales* oder *Entomophthora*, insbesondere von der Spezies *Mortierella alpina*.

[0018] Bei dem extrahierten Sterol kann es sich um einen alicyclischen Alkohol mit vierkonjugiertem Ringgerüst, drei aromatischen C₆-Ringen und einem Cyclopentanring (z.B. Desmosterol, Cholesterol), einen aliphatischen oder einen Terpen-Alkohol (Tocopherol) handeln. Ein Wachs oder ein Antischäumungsmittel, wie Polypropylynglycol, kann in dem Fermentierungsmedium vorliegen.

[0019] Bevorzugte Sterole schließen Desmosterol, wie 5-Desmosterol, ein. Liegt mehr als ein Sterol vor, dann sind geeigneterweise 70 bis 90%, z.B. 80 bis 85% der Sterole Desmosterol (z.B. bei durch *Mortierella* erzeugtem Öl).

[0020] Das Öl enthält vorzugsweise zumindest eine PUFA. Diese PUFA wird gewöhnlich durch die Mikrobe oder den Mikroorganismus erzeugt.

[0021] Von der Erfindung in Betracht gezogene PUFAs sind mehrfach ungesättigte C20- und C22- ω -3 und C18-, C20- und C22- ω -6-Fettsäuren. Insbesondere können sie γ -Linolensäure (GLA), Dihomo- γ -linolensäure (DLA), Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) einschließen. DHA wird durch Algen oder Pilze, wie Dinoflagellatalgen, z.B. von der Gattung *Cryptocodinium*, oder einen

Pilz, z.B. von der Gattung Thraustochytrium, erzeugt. GLA, DLA oder ARA können durch Pilze, wie von der Gattung Mortierella, Pythium oder Entomophthora, erzeugt werden.

[0022] EPA kann durch eine Alge, wie von der Gattung Porphyridium oder Nitzschia, erzeugt werden. Typischerweise enthält das Öl hauptsächlich oder nur eine PUFA(s), obwohl Öle eine oder mehrere PUFAs, z.B. in geringerer Menge, enthalten können.

[0023] In den Verfahren der Erfindung werden nach Zugabe des Lösungsmittels zu dem Öl die zwei Phasen (Öl und Lösungsmittel) gewöhnlich getrennt. Dies erlaubt dann leicht die Entfernung einer Phase von der anderen. Dadurch kann ein Öl mit niedrigem Sterolgehalt von nicht mehr als 1,5% erhalten werden.

[0024] Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft deshalb ein durch ein Verfahren gemäß dem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung behandeltes oder hergestelltes Öl, wie in Anspruch 18 angegeben.

[0025] Ein dritter Aspekt betrifft ein mikrobielles Öl, das zumindest eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA) mit einem Sterolgehalt von nicht mehr als 1,5% umfasst, wie in Anspruch 19 angegeben. Der (Gesamt-)Sterolgehalt kann tatsächlich nicht höher als 1%, z.B. niedriger als 0,6% sein. Unter Verwendung der Verfahren der Erfindung kann ein Sterolgehalt von nicht mehr als 0,3% erzielt werden.

[0026] Es ist erkennbar, dass das Öl des dritten Aspekts unter Verwendung des Verfahrens des ersten Aspekts hergestellt werden kann.

[0027] Die verschiedenen Öle der Erfindung können z.B. unter Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen Temperaturen wie später beschrieben hergestellt werden.

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt deshalb ein Verfahren zur Herstellung eines (z.B. mikrobiellen) Öls bereit, bei welchem das Öl mit einem oder mehreren polaren Lösungsmitteln behandelt wird. Diese Lösungsmittel können deshalb ein oder mehrere in dem Lösungsmittel lösliche Sterole entfernen. Dies kann zur Konzentrierung führen oder 97%, z.B. mindestens 98% und schließlich mindestens 99% geschehen.

[0029] Gleichzeitig mit dem Erhöhen des Triglyceridgehalts kann die Lösungsmittelbehandlung vorteilhaft zur Entfernung von einer oder mehreren Verunreinigungen aus dem Öl führen. Insbesondere kann diese Behandlung zur Verminderung der Menge an „unverseifbaren Stoffen“ führen. Diese unverseifbaren Stoffe, die durch die Lösungsmittelbehandlung entfernt werden können, können die vorstehend beschriebenen Sterole, aliphatischen und Terpen-Alkohole, Wachse und Antischäumungsmittel einschließen.

[0030] Gewöhnlich verändert die Lösungsmittelbehandlung das PUFA-Profil oder das so behandelte Öl nicht.

[0031] Das polare Lösungsmittel umfasst vorzugsweise ein C₁₋₆-Alkanol, z.B. Ethanol. Das Lösungsmittel kann jedoch von wässriger Art sein. Bevorzugte Lösungsmittel umfassen deshalb einen Alkohol (z.B. Ethanol) und Wasser. Jedoch kann das Lösungsmittel andere Flüssigkeiten umfassen, wobei es sich hierbei um Aceton und/oder Isopropanol handeln kann.

[0032] Umfasst das Lösungsmittel Ethanol, kann dieser einen Wassergehalt von 0 bis 20%, wie 1 bis 7% und gegebenenfalls 2 bis 4%, aufweisen. Umfasst das Lösungsmittel Methanol, Aceton und/oder Isopropanol (IPA), dann beträgt der Wassergehalt vorzugsweise 0 bis 2%, 5 bis 50% bzw. 5 bis 15%. Das Lösungsmittel kann deshalb ein Gemisch aus zwei oder mehreren Flüssigkeiten umfassen. Es wurde gefunden, dass eine kleine Menge Wasser enthaltender Ethanol (z.B. 97% Ethanol, 3% Wasser) die Triglyceridausbeute nach der Lösungsmittelbehandlung deutlich verbessern kann. Dies liegt daran, dass Triglyceride in diesem speziellen Lösungsmittel relativ unlöslich sind. Wenn das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 15 bis 30°C, z.B. 20 bis 25°C vorliegt, wird auch die Menge an Triglyceriden die in dem unlöslichen Lösten in diesem bestimmten Lösungsmittel. Wenn das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 15 bis 30°C, z.B. 20 bis 25°C vorliegt, wird auch die Menge an in diesem speziellen Lösungsmittel gelösten Triglyceriden reduziert.

[0033] Unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel kann die Menge an extrahiertem Sterol (oder tatsächlich PUFA) variiert werden. Wie vorstehend erörtert wurde, kann ein Gemisch aus Ethanol und Wasser eine hohe Triglyceridausbeute bereitstellen, da, obwohl dieses Lösungsmittel Sterole löst, Triglyceride trotzdem relativ unlöslich in ihm sind.

[0034] Die PUFA liegt im allgemeinen in verschiedenen Formen, wie Triglyceriden und Diglyceriden, vor. Die-

se Verbindungen sind tatsächlich ein Glycerolmolekül mit einer oder mehreren (jedoch gewöhnlich einer) an diesem Gerüst gebundenen PUFA(s). Vorzugsweise dominiert die Triglyceridform. In dem Öl des dritten Aspekts (z.B. aus dem Verfahren des ersten Aspekts) beträgt die vorliegende Diglyceridmenge vorzugsweise nicht mehr als 2,2% und vorzugsweise nicht weniger als 1%. Das hier verwendete Lösungsmittel liegt bei einer Temperatur von 10 bis 40°C, z.B. 20 bis 30°C vor.

[0035] Die Menge an zu extrahierendem Sterol oder der Triglyceridgehalt können durch Variieren von verschiedenen Verfahrensparametern eingestellt werden. Zum Beispiel kann man das Verhältnis des Lösungsmittels zu dem Öl, die Temperatur während der Extraktion einstellen und/oder eine Einstellung durch Wiederholen des Extraktionsverfahrens vornehmen. Soll mehr als eine Extraktion durchgeführt werden, wird ein gegenläufiges Extraktionsverfahren bevorzugt, welches die Triglyceridverluste minimieren kann.

[0036] Gewöhnlich ist das Öl ein Rohprodukt, das nach der Extraktion aus einer (z.B. getrockneten) mikrobiellen Biomasse mit einem geeigneten Lösungsmittel, gefolgt von Einengen dieses (mit Wasser nicht mischbaren) Lösungsmittels, erhalten wird. Das Öl kann einem oder mehreren Raffinierungsschritten vor dem Verfahren der Erfindung unterzogen werden.

[0037] Das Öl der Erfindung oder eines, das aus einem Verfahren des ersten Aspekts resultiert, kann ohne weitere Verarbeitung für verschiedene Zwecke verwendet oder zusätzlich einem oder mehreren Raffinierungsschritten unterzogen werden. Das Öl kann als Zusatzstoff oder Ergänzung z.B. in Lebensmitteln, wie Babyfertiernahrung, verwendet werden. Es kann jedoch auch in kosmetischen oder pharmazeutischen Zubereitungen verwendet werden. Die Erfindung betrifft deshalb in einem weiteren Aspekt eine Zubereitung, wie ein Futtermittel, Nahrungsmittel oder eine pharmazeutische oder kosmetische Zubereitung, welche ein Öl der Erfindung umfassen oder welchen dieses zugesetzt wurde. Bevorzugte Mittel sind Lebensmittel, wie Babyfertiernahrung, oder ein Nahrungsergänzungsmittel.

[0038] Das Öl der Erfindung kann deshalb einen niedrigen Sterolgehalt und gegebenenfalls einen geringen Diglyceridgehalt aufweisen. Gegebenenfalls kann es auch einen hohen Triglyceridgehalt aufweisen. Dadurch wird das Öl besonders für Nahrungszwecke geeignet, und es kann als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Das Öl kann als Öl bereitgestellt werden oder z.B. in eine Gelatine kapsel eingekapselt werden. Das Öl kann somit in für den Verbrauch durch Menschen oder Tiere geeignete Lebensmittel, Nahrungsmittel oder Futtermittel eingebracht werden. Geeignete Beispiele sind Gesundheitsgetränke und Brot. Besonders in Betracht gezogen wird die Verwendung in Babyfertiernahrung oder in kosmetischen Zubereitungen.

[0039] Die bevorzugten Merkmale und Eigenschaften eines Aspekts der Erfindung sind gleichermaßen mutatis mutandis auf einen anderen Aspekt anwendbar.

[0040] Die Erfindung wird nun beispielhaft unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben, die nur zur Veranschaulichung bereitgestellt sind und die Erfindung nicht begrenzen sollen.

VERGLEICHBSBEISPIEL 1

Gewinnung eines rohen ARA-Öls aus der Biomasse von *M. alpina*

[0041] 500 l nach der Fermentierung von *Mortierella alpina* erhaltene Brühe wurden in einer Membranfilterpresse (gewebeartig: Propex 46K2) filtriert. Die Brühe wurde mit einem Druckunterschied von 0,2 bar filtriert. Innerhalb von 21 Minuten wurden 500 l Brühe über einer GesamtfILTERfläche von 6,3 m² filtriert, woraus ein mittlerer Fluss von etwa 230 l/m²h resultierte. Der Filterkuchen wurde 30 Minuten mit 10 Kuchenvolumen Leitungswasser bei einer mittleren Fließgeschwindigkeit von 320 l/m²h gewaschen.

[0042] Der Kuchen wurde bei 5,5 bar 30 Minuten unter Verwendung eines Einzelschneckenextruders mit einer Fassontrommel und einer Universalschnecke gepresst. Die für die Extrusion verwendete Düsenplatte wies Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm auf.

[0043] Das Trocknen des Extrudats wurde in einem Flüssigbettrockner mit Luft (8000 Nm³/m²h) durchgeführt. Der Sollwert der Betttemperatur betrug 80°C. Der Durchmesser der getrockneten, extrudierten Biomasse betrug 2 mm und deren Trockenstoffgehalt nach dem Trocknen etwa 96%.

[0044] Ein rohes Arachidonsäure enthaltendes Öl (ARA-Öl) wurde dann aus dem Extrudat unter Verwendung von Hexan als Lösungsmittel extrahiert.

BEISPIELE 2 UND 3

Behandlung von mikrobiellem ARA-Öl mit 100%igem Ethanol

[0045] 5 ml rohes ARA-Öl wurden aus dem Extrudat von Beispiel 1 mit einem Volumen 100%igem Ethanol 1 Minute durch Schütteln per Hand extrahiert. Anschließend wurden die Boden- und Überschichten durch Zentrifugation 5 Minuten bei 5000 UpM getrennt. Die Proben wurden mittels NMR (600 MHz) (auf Tri- und Diglyceride, Sterole (nur der Desmosterolgehalt wurde gemessen) und Antischäumungsmittel) analysiert.

[0046] Die Extraktion von rohem ARA-Öl mit 9 Volumen 100%igem Ethanol bei zwei verschiedenen Temperaturen führte zu einem Öl mit vermindertem Gehalt an Sterol und Diglycerid (DG) und zu einem erhöhten Gehalt an Triglycerid (TG, siehe Tabelle 1). Die TG-Ausbeute ist der Prozentgehalt von in dem Öl nach der Lösungsmittelextraktion verbliebenem Triglycerid. Ebenso wurde das Antischäumungsmittel entfernt und nach der Extraktion in dem Ethanol gefunden. Jedoch war die Triglyceridausbeute aufgrund der Tatsache gering, dass sich etwas TG in dem Ethanol löste (und somit dadurch entfernt wurde).

Tabelle 1

Extraktion von rohem ARA-Öl mit 100%igem Ethanol (Daten für behandeltes Öl)						
Bsp.	Lösungsmittel	Temp.	% TG	% DG	% Sterol	Ausbeute TG
-	Kontrolle	---	96,2	2,2	1,6	100
2	EtOH, 100%ig	Umgebung	98,2	0,7	1,1	73,8
3	EtOH, 100%ig	60°C	98,5	0,7	0,8	43,2

Schlüssel:

TG: Triglyceride

DG: Diglyceride

Sterol: Als Desmosterol

BEISPIELE 4 BIS 6 8 UND 9 UND VERGLEICHBSBEISPIEL 7

Behandlung von mikrobiellem ARA-Öl mit 97%igem Ethanol

[0047] Beispiele 2 und 3 wurden mit Ausnahme der Verwendung von 97%igem Ethanol mit variierenden Volumen, bezogen auf das Öl, wiederholt.

[0048] Die Extraktion von rohem ARA-Öl mit 1, 3 und 9 Volumen 97%igem Ethanol führte zu einem Öl mit vermindertem Sterol- und Diglyceridgehalt und zu einem erhöhten Triglyceridgehalt (siehe Tabelle 2).

[0049] Die Triglyceridausbeute betrug aufgrund der Tatsache, dass sich nicht viel Öl in 97%igem Ethanol löste, etwa 92%. Bei Umgebungstemperatur (etwa 20°C) wurde eine höhere Triglyceridausbeute und eine bessere Entfernung von Diglyceriden und Sterolen beobachtet. Bemerkenswerterweise wurde kein Ethanol in dem behandelten Öl gefunden.

Tabelle 2

Extraktion von rohem ARA-Öl mit 97%igem Ethanol (Daten für behandeltes Öl)							
Bsp.	Lösungsmittel	Temp.	Vol. EtOH	% TG	% DG	% Sterol	Ausbeute TG
-	Kontrolle	---	0	96,2	2,2	1,6	100
4	EtOH, 97%ig	Umgebung	1	96,7	1,8	1,4	92,9
5	EtOH, 97%ig	Umgebung	3	97,8	1,1	1,1	95,0
6	EtOH, 97%ig	Umgebung	9	98,9	0,4	0,7	96,2
7	EtOH, 97%ig	60°C	1	96,4	2,0	1,6	99,7*
8	EtOH, 97%ig	60°C	3	97,7	1,1	1,2	92,4
9	EtOH, 97%ig	60°C	9	98,3	0,6	1,1	93,7

Schlüssel:

TG: Triglyceride

DG: Diglyceride

Sterol: Als Desmosterol

* Aufgrund der Erhöhung der unteren Phase (Öl) aufgrund dessen, dass sich das Ethanol teilweise in dem Öl löste und die Phasentrennung somit schwieriger war.

[0050] Die Ethanolphase wurde ebenso nach der Extraktion analysiert, und es wurde eine deutliche Erhöhung an Sterolen beobachtet. Ebenso wurde das Antischäumungsmittel (Polypropylenglycol) extrahiert und in der Ethanolphase gefunden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Extraktion von rohem ARA-Öl mit 97%igem Ethanol (Daten für Ethanolphase)							
Bsp.	Lösungsmittel	Temp.	Vol. EtOH	% TG	% DG	% Antischäumungsmittel	% Sterol
4	EtOH, 97%ig	Umgebung	1	60,9	20,8	4,1	14,2
5	EtOH, 97%ig	Umgebung	3	73,1	15,3	1,3	10,2
6	EtOH, 97%ig	Umgebung	9	83,0	10,0	0,7	6,3
7	EtOH, 97%ig	60°C	1	66,1	18,3	3,7	11,9
8	EtOH, 97%ig	60°C	3	78,6	12,5	1,1	7,8
9	EtOH, 97%ig	60°C	9	87,9	7,1	0,4	4,5

Schlüssel:

TG: Triglyceride

DG: Diglyceride

Sterol: Als Desmosterol

Patentansprüche

- Verfahren zur Behandlung eines Öls, erhalten aus einem Mikroorganismus, das Verfahren umfassend:
 - Inkontaktbringen des Öls mit einem polaren Lösungsmittel, um zumindest ein Sterol zu extrahieren, das in dem Lösungsmittel löslich ist; und
 - Abtrennen zumindest eines Teiles des Lösungsmittels, das das Sterol aus dem Öl enthält, so daß das re-

sultierende Öl einen Sterolgehalt von weniger als 1,5% aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wenn das Öl erhalten oder extrahiert wird aus einer Zusammensetzung, die aus einer Fermentierung, gegebenenfalls einer Fermentationsbrühe resultiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, in dem das Öl gewonnen, erhalten oder extrahiert wird aus Mikroorganismen, die in der Zusammensetzung vorliegen.

4. Verfahren nach Anspruch 2, in dem die Mikroorganismen zuerst aus der Zusammensetzung entfernt werden, gegebenenfalls durch Filtrieren der Zusammensetzungen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, in dem die Mikroorganismen getrocknet werden, bevor das Öl erhalten wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, in dem das Öl unter Verwendung eines Lösungsmittels für Triglyceride extrahiert wurde.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wenn das Lösungsmittel Hexan, überkritisches Kohlendioxid oder Isopropanol ist.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das Öl durch Bakterien, Pilz, Hefe oder Algen erzeugt wird oder der Mikroorganismus Bakterien, Pilz, Hefe oder Algen darstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wenn der Mikroorganismus zur Gattung *Cryptocodium*, *Macorales*, *Thraustochytrium*, *Mortierella*, *Pythium*, *Entomophthora*, *Porphyridium* oder *Nitzschia* gehört.

10. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Öl von *Mortierella alpina* erhalten wird oder in dem das Sterol durch den Mikroorganismus erzeugt wird oder in diesem intrazellulär vorliegt.

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das Sterol Desmosterol ist.

12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wenn das Öl zumindest eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA) umfaßt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, in dem die PUFA eine mehrfach ungesättigte C18-, C20- oder C22- ω -3- oder - ω -6-Fettsäure ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, in dem die PUFA GLA, DLA, ARA, EPA oder DHA ist.

15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das polare Lösungsmittel ein C₁-C₆-Alkohol oder Aceton umfaßt.

16. Verfahren nach einem der 13 bis 15, in dem das Lösungsmittel Ethanol oder Isopropanol oder Ethanol und 1 bis 5% Wasser ist.

17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem die Menge des in der Extraktion verwendeten Lösungsmittels das 1- bis 9-fache des Volumens des zu behandelnden Öls darstellt.

18. Öl, behandelt oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Öl einen Triglyceridgehalt von mindestens 95% aufweist und/oder eine C20- oder C22- ω -3 oder - ω -6-PUFA umfaßt.

19. Mikrobielles Öl, umfassend zumindest eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA) und einen Sterolgehalt von nicht mehr als 1,5% aufweisend, wobei das Öl einen Triglyceridgehalt von mindestens 95% aufweist und/oder die PUFA eine C20- oder C22- ω -3 oder - ω -6-PUFA ist.

20. Öl nach Anspruch 18 oder 19, einen Sterolgehalt von nicht mehr als 1% aufweisend.

21. Verwendung eines Öls nach einem der Ansprüche 18 bis 20 in einer pharmazeutischen, kosmetischen, Futtermittel- oder Lebensmittelzubereitung (für den Verbrauch durch Menschen oder Tiere).

22. Zubereitung, umfassend ein Öl nach einem der Ansprüche 18 bis 20 oder der ein Öl nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zugegeben wurde.

23. Zubereitung nach Anspruch 22, die eine Lebensmittel-, Futtermittel- oder pharmazeutische Zubereitung oder ein Nahrungsergänzungsmittel für den Verbrauch durch Menschen oder Tiere darstellt.

24. Zubereitung nach Anspruch 22 oder 23, die eine Kindernahrung oder eine kosmetische Zubereitung darstellt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen