



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009122716/10, 15.11.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.11.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.11.2006 US 60/859,289(43) Дата публикации заявки: **27.12.2010** Бюл. № 36(45) Опубликовано: **10.08.2012** Бюл. № 22(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **JP 02215351 A, от 28.08.1990. WO 2006106325 A1, от 12.10.2006. JP 60055096 A, от 29.03.1985. RU 2236441 C2, от 20.09.2004. TANAKA Y. et al «Extraction of phospholipids from Salmon Roe with Supercritical Carbon Dioxide and an Entrainer // Journal of Oleo Science №9, 2004, vol.53, p.417-424. YAMAGUCHI K. et al, «Supercritical Carbon (см. прод.)**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **16.06.2009**(86) Заявка РСТ:
NO 2007/000402 (15.11.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/060163 (22.05.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

БРЕЙВИК Харальд (NO)

(73) Патентообладатель(и):

ПРОНОВА БИОФАРМА НОРГЕ АС (NO)**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БОГАТЫХ ОМЕГА-3 ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ МОРСКИХ
ФОСФОЛИПИДОВ ИЗ КРИЛЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к пищевой промышленности, медицине, кормам для животных. Способ экстрагирования по существу полной липидной фракции из свежего криля включает стадии снижения содержания воды в исходном сырье криля путем

промывания этанолом, метанолом, пропанолом или изопропанолом в массовом отношении от 1:0,5 до 1:5 и выделения липидной фракции из спирта. Фракция по существу не содержит окисленных липидов, содержит триглицериды, астаксантин и фосфолипиды. Применение указанной фракции

в качестве лекарственного средства и/или в качестве пищевой добавки. Способ отделения фосфолипидов от других липидов включает экстрагирование полной липидной фракции, полученной способом чистым диоксидом углерода или диоксидом углерода, содержащим менее 5% этанола, метанола, пропанола или изопропанола. Фосфолипиды по существу не содержат окисленные липиды. Способ производства муки криля включает экстрагирование по существу полной липидной фракции и отделение оставшегося исходного

сырья криля. Мука криля по существу не содержит окисленных полиненасыщенных жирных кислот и других липидов. Применяется мука криля в корме для животных, для откорма морских видов рыбы, включая личинок и мальков рыб, для производства высококачественного хитозана. Группа изобретений позволяет получить продукт с небольшим количеством гидролизированных и/или окисленных липидов и меньшим повреждением криля антиоксидантами липидов. 10 н. и 14 з.п. ф-лы, 5 табл., 9 пр., 2 ил.

(56) (продолжение):

Dioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill // Journal Agric. Food Chem., 1986, vol.34, p.904-907.

R U 2 4 5 8 1 1 2 C 2

R U 2 4 5 8 1 1 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C11B 1/10 (2006.01)
A23K 1/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009122716/10, 15.11.2007**

(24) Effective date for property rights:
15.11.2007

Priority:

(30) Convention priority:
16.11.2006 US 60/859,289

(43) Application published: **27.12.2010 Bull. 36**

(45) Date of publication: **10.08.2012 Bull. 22**

(85) Commencement of national phase: **16.06.2009**

(86) PCT application:
NO 2007/000402 (15.11.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/060163 (22.05.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

BREJVIK Kharal'd (NO)

(73) Proprietor(s):

PRONOVA BIOFARMA NORGE AS (NO)

(54) **METHOD OF PRODUCING OMEGA-3 FATTY ACID-RICH SEA KRILL PHOSPHOLIPIDS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.
SUBSTANCE: method of extracting an essentially full lipid fraction from fresh krill involves a step for reducing water content in the krill starting material by washing with ethanol, methanol, propanol or isopropanol in weight ratio from 1:0.5 to 1:5 and separating the lipid fraction from alcohol. The fraction essentially does not contain oxidised lipids and contains triglycerides, astaxanthin and phospholipids. Said fraction can be used as a medicinal agent and/or as a food additive. The method of separating phospholipids from other lipids involves extraction of the full lipid fraction, obtained using pure carbon dioxide or

carbon dioxide containing less than 5% ethanol, methanol, propanol or isopropanol. The phospholipids essentially do not contain oxidised lipids. The method of producing krill flour involves extraction of the essentially full lipid fraction and separating the remaining krill starting material. The krill flour essentially does not contain oxidised polyunsaturated fatty acids and other lipids. The krill flour can be used in animal feed, for feeding sea fish, including larvae and juvenile fish, and for producing high-quality chitosan.

EFFECT: group of inventions enables to obtain a product with low amount of hydrolysed or oxidised lipids and less damage to krill by lipid antioxidants.

24 cl, 5 tbl, 9 ex

RU 2 458 112 C2

RU 2 458 112 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к способу получения по существу полной липидной фракции из свежего криля и способу отделения фосфолипидов от других липидов. Данное изобретение относится также к способу получения муки из криля высокого качества.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фосфолипиды из морских организмов применимы для получения медицинских продуктов, лечебного питания и питания человека, а также корма для рыб и средств для повышения степени выживания личинок и мальков рыб морских видов, подобных треске, палтусу и псетта.

Фосфолипиды из морских организмов содержат омега-3 жирные кислоты. Омега-3 жирные кислоты, связанные с морскими фосфолипидами, как полагают, обладают особенно полезными свойствами.

Такие продукты, как молоки и икра рыб, являются традиционным исходным сырьем для получения морских фосфолипидов. Однако это исходное сырье доступно в ограниченных объемах, и цена указанного сырья достаточно высока.

Криль представляет собой небольших животных, подобных креветкам, и содержит относительно высокие концентрации фосфолипидов. В группе Euphasiids находится более 80 видов, одним из которых является антарктический криль. Наибольший потенциал для коммерческого использования в настоящее время представляет антарктическая *Euphausia superba*. *E. superba* имеет длину 2-6 см. Другим видом антарктического криля является *E. Crystallorhynchus*. *Meganctiphanes norvegica*, *Thysanoessa inermis* и *T. raschii* являются примерами северного криля.

Свежий криль содержит до примерно 10% липидов, из которых примерно 50% фосфолипидов находится в *Euphausia superba*. Фосфолипиды из криля содержат очень высокий уровень содержания омега-3 жирных кислот, из которых содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и докозагексаеновой кислоты (ДГК) составляет 40%. Примерный состав липидов из двух главных видов антарктического криля представлен в таблице 1.

	Сложные парафиновые эфиры	Глицериды	Фосфолипиды	Отношение ЭПК/ДГК
<i>Euphausia superba</i>	1	50(7)	50(40-45)	1,4-1,5
<i>Euphausia crystallorhynchus</i>	40	20(4)	40(30-33)	1,3

Кроме того, антарктический криль имеет более низкий уровень содержания загрязняющих веществ из окружающей среды, чем обычные жиры из рыбы.

Криль имеет пищеварительную систему с ферментами, включая липазы, которые очень активны при около 0°. Липазы остаются активными после того, как криль умирает, гидролизуя часть липидов криля. Нежелательный эффект этого состоит в том, что масло криля обычно содержит несколько процентов свободных жирных кислот. Если криль должен быть порезан на небольшие фрагменты перед обработкой, специалист в данной области сразу же поймет, что это повысит степень гидролиза. Таким образом, желательно найти способ, по которому можно использовать целый свежий криль или целые части организма криля, так как такой процесс обеспечит продукт с улучшенным качеством и низкой степенью гидролиза липидов. Это улучшенное качество будет влиять на все группы липидов криля, включая фосфолипиды, триглицериды и сложные эфиры астаксантина.

Липиды криля в большей степени расположены в головах животных. Способ, по которому можно использовать свежий криль, поэтому также вполне подходит для немедленной переработки отходов производства переработки криля, у которого голову удаляют, продукта, который может быть произведен на борту рыболовного судна.

В патенте США №6800299 Beaudion et al. описан способ экстрагирования всей липидной фракции из криля путем последовательного экстрагирования при низких температурах с использованием органических растворителей, подобных ацетону и этанолу. Этот способ включает экстрагирование большими количествами органических растворителей, что является неблагоприятным.

К. Yamaguchi et al. (J. Agric. Food. Chem. 1986, 34, 904-907) показали, что экстрагирование сверхкритической жидкостью с диоксидом углерода, которая является наиболее обычным растворителем для экстрагирования суперкритическими жидкостями, сублимированного антарктического криля давало в результате продукт, состоящий главным образом из неполярных липидов (главным образом триглицеридов) и фосфолипидов. Yamaguchi et al. сообщили, что масло в муке криля было разрушено окислением или полимеризацией до такой степени, что происходило только ограниченное экстрагирование суперкритической CO₂.

Y. Tanaka и T. Ohkubo (J. Oleo. Sci. (2003), 52, 295-301) ссылаются на работу Yamaguchi et al. в связи с их собственной работой по экстрагированию липидов из лососевой икры. В более недавней публикации (Y. Tanaka et al. (2004), J. Oleo. Sci., 53, 417-424) те же авторы пытаются решить эту проблему путем использования смеси этанола и CO₂ для экстрагирования фосфолипидов. При использовании CO₂ с 5% этанола фосфолипиды не удалялись из сублимированной лососевой икры, тогда как при добавлении 10% этанола извлекалось 30% фосфолипидов, а при добавлении такого большого количества этанола, как 30%, извлекалось более 80% фосфолипидов. Сублимирование является дорогостоящим и энергетически затратным процессом и не подходит для обработки очень больших объемов исходного сырья, который будет в наличии при промышленном лове криля.

Y. Tanaka et al. постарались оптимизировать процесс путем изменения температуры экстрагирования и обнаружили, что низкие температуры давали наилучшие результаты. 33°C, температура сразу над критической температурой CO₂, была выбрана, как дающая наилучшие результаты.

В противоположность этим данным неожиданно обнаружен способ экстрагирования по существу полной липидной фракции из свежего криля без необходимости усложненной и дорогостоящей предварительной обработки, подобной сублимационной сушке больших объемов. Липидная фракция содержала триглицериды, астаксантин и фосфолипиды. Не нужно было сушить или обезжиривать исходное сырье перед обработкой. В отличие от Tanaka et al. было обнаружено, что кратковременное нагревание исходного сырья морских организмов было позитивным для выхода при экстрагировании. Показано также, что предварительная обработка криля, такая как кратковременное нагревание до умеренной температуры или контакт с твердым осушивающим средством, таким как молекулярное сито, может сделать промывание одним этанолом эффективным для удаления фосфолипидов из свежего криля.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Главный объект данного изобретения состоит в предоставлении способа получения по существу полной липидной фракции из свежего криля без использования

органических растворителей, подобных ацетону.

Воздействие жидкости под сверхкритическим давлением будет предотвращать окисление, а объединенный диоксид углерода/этанол, как предполагают, дезактивирует ферментативный гидролиз липидов криля. Так как способ по данному изобретению требует минимума манипуляций исходным сырьем, а также пригоден для использования свежего криля, например, на борту рыболовного судна, продукт по данному изобретению, как предполагают, будет содержать существенно менее гидролизованные и/или окисленные липиды, чем липиды, получаемые по общепринятым способам. Это также означает, что ожидается меньшее повреждение криля антиоксидантами липидов, чем при общепринятой обработке. Необязательная предварительная обработка, включающая кратковременное нагревание свежего криля, также будет давать инактивацию ферментативного разложения липидов с обеспечением, таким образом, продукта с очень низкими уровнями свободных жирных кислот.

Другой объект данного изобретения состоит в создании способа для получения по существу полной липидной фракции из других видов морского исходного сырья, таких как половые железы рыб, виды *Calanus* или муки криля высокого качества.

Другой объект данного изобретения состоит в получении по существу полной липидной фракции с высоким содержанием полиненасыщенных омега-3 жирных кислот с длинной цепью.

Эти и другие объекты получают данным способом, и липидной фракции дано определение в прилагаемой формуле изобретения.

В соответствии с данным изобретением представлен способ экстрагирования по существу полной липидной фракции из свежего криля, включающий стадии:

- a) снижения содержания воды в исходном сырье криля; и
- b) выделения липидной фракции.

Необязательно указанный способ включает дополнительную стадию:

a-1) экстрагирования материала криля со сниженным содержанием воды со стадии a) CO₂ при сверхкритическом давлении, содержащим этанол, метанол, пропанол или изопропанол. Эту стадию, a-1), выполняют непосредственно после стадии a).

В предпочтительном воплощении данного изобретения оно представляет способ экстрагирования по существу полной липидной фракции из свежего криля, включающей стадии:

- a) снижения содержания воды в исходном сырье криля;
- a-1) экстрагирования исходного сырья криля со сниженным содержанием воды со стадии a) CO₂, содержащим этанол, причем экстрагирование происходит при сверхкритическом давлении; и
- b) выделения липидной фракции из этанола.

В предпочтительном воплощении данного изобретения стадия a) включает промывание исходного сырья криля этанолом, метанолом, пропанолом и/или изопропанолом в массовом отношении от 1:0,5 до 1:5. Предпочтительно, исходное сырье криля нагревают до 60-100°C, более предпочтительно до 70-100°C и, наиболее предпочтительно, до 80-95°C перед промыванием. Кроме того, исходное сырье криля предпочтительно нагревают в течение примерно от 1 до 40 минут, более предпочтительно примерно от 1 до 15 минут и наиболее предпочтительно в течение примерно от 1 до 5 минут перед промыванием.

В другом предпочтительном воплощении данного изобретения стадия a) включает приведение исходного сырья криля в контакт с молекулярным ситом или другой

формой мембраны, такой как абсорбирующая воду мембрана, для удаления воды.

Предпочтительно, количество этанола, метанола, пропанола и/или изопропанола на стадии а-1) составляет 5-20% по массе, более предпочтительно 10-15% по массе.

5 В дополнение к производству продукта, содержащего все липиды криля, данное изобретение также может быть использовано для отделения фосфолипидов от других липидов. Чтобы разделить полную фракцию липидов, полученную путем экстрагирования при сверхкритическом давлении по данному изобретению, на разные группы липидов экстрагированием указанной полной фракции липидов чистым диоксидом углерода, можно отделить неполярные липиды от богатых омега-3 фосфолипидов. Другим возможным вариантом является экстрагирование полной фракции липидов диоксидом углерода, содержащим менее 5% этанола или метанола.

15 Так как фосфолипиды значительно богаче ценными омега-3 жирными кислотами, чем другие группы липидов, это делает данное изобретение пригодным для производства концентратов с высоким содержанием омега-3 жирных кислот. В то время как доступные для приобретения жиры из рыбы содержат 11-33% омега-3 жирных кислот (Hjaltason B. and Haraldsson G.G. (2006) Fish oils and lipids from marine sources, in: Modifying Lipids for Use in Food (FD Gunstone, ed), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp.56-79), фосфолипиды криля содержат значительно более высокие уровни (Ellingsen T.E (1982) Biojemiske studier over antarktisk krill, PhD thesis, Norges tekniske hoyskole, Trondheim. Английский реферат в публикации №52 Norwegian Antarctic Research Expeditions (1967/77 and 1978/79)), смотрите также таблицу 1. Богатые омега-3 фосфолипиды можно использовать сами по себе, с получением различных положительных биологических эффектов, которые приписывают содержащим омега-3 фосфолипидам. Альтернативно, фосфолипиды могут быть трансэтерифицированы или гидролизованы, чтобы получить сложные эфиры (обычно этиловые сложные эфиры) или свободные жирные кислоты или другие производные, которые пригодны для дальнейшего концентрирования омега-3 жирных кислот. В качестве примеров, этиловые сложные эфиры фосфолипидов криля будут ценным промежуточным продуктом для производства концентратов, которые удовлетворяют требованиям монографий Европейской Фармакопеи №1250 (этиловый эфир омега-3-кислоты 90), 2062 (этиловые эфиры омега-3-кислоты 60) и 1352 (триглицериды омега-3-кислоты). В то же время можно использовать остальные липиды (астаксантин, антиоксиданты, триглицериды, парафиновые сложные эфиры), как есть, для различного применения, включая откорм при аквакультуре, или группы липидов могут быть дополнительно разделены.

40 Таким образом, другой объект данного изобретения состоит в предоставлении способа отделения фосфолипидов от других липидов, как описано выше.

Другой объект данного изобретения состоит в получении высококачественной муки криля. Так как липиды удаляют на первоначальной стадии процесса, мука по существу не будет содержать окисленных и полимеризованных липидов. Это сделает муку очень подходящей для способов применения, когда важно избежать окислительного стресса, т.е. для использования при откорме водных животных, особенно начального откорма морских видов рыбы. Мука криля данного изобретения, таким образом, хорошо подходит для кормления личинок и мальков рыб, а также рыбы и ракообразных. Кроме того, муку криля данного изобретения можно использовать в качестве источника для производства высококачественного хитозана.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данный способ может быть осуществлен при широком разнообразии условий переработки, некоторые из которых представлены в примерах ниже.

В следующем далее «свежий» криль означает криль, который обрабатывают сразу же после вылова или через достаточно короткое время после вылова, чтобы избежать ухудшения качества, такого как гидролиз или окисление липидов, или криль, который заморожен сразу же после вылова. Свежий криль может быть целым крилем или побочными продуктами свежего криля (т.е. после очистки). Свежий криль может быть также крилем или побочными продуктами криля, которые были заморожены вскоре после вылова.

Кроме того, «криль» включает также муку криля.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показан вид *E.superba*, используемой в качестве исходного сырья для экстрагирования.

На фиг.2 показан материал после экстрагирования, который описан в примере 7, ниже.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Переработка замороженного высушенного криля

Сублимированный криль экстрагировали CO_2 при сверхкритическом давлении. Это давало продукт с выходом 90 г/кг. Анализ показал, что экстракт содержал в сумме только 5,4% ЭПК плюс ДГК, показывая, что он не содержит значительного количества богатых омега-3 фосфолипидов. Второе экстрагирование CO_2 , содержащим 10% этанола, давало в результате экстракт с выходом 100 г/кг (в расчете на исходный вес образца). ^{31}P ЯМР показал, что продукт содержал фосфолипиды. Данный экстракт содержал в сумме 33,5% ЭПК плюс ДГК.

На обеих стадиях условия экстрагирования представляли 300 бар, 50°C.

Таким образом, по существу, возможно отделить богатые омега-3 фосфолипиды от менее богатых омега-3 компонентов липидов криля.

Во втором эксперименте сублимированный криль дважды экстрагировали при тех же давлении и температуре, что и выше, сначала со 167 частями (массовыми) чистого CO_2 , а затем со 167 частями (массовыми) CO_2 , содержащими 10% этанола.

Объединенный экстракт (280 г/кг исходного сырья) анализировали с помощью ^{13}C и ^{31}P ЯМР. Анализы показали, что продукт содержал триглицериды и фосфолипиды в качестве главных компонентов. Подобно предыдущим экстрактам темно-красный цвет показал, что экстракт содержал астаксантин.

Не было известно, что способ по примеру 1 применен в отношении сублимированного криля. Можно было бы поспорить, что это можно было бы предвидеть из Y. Tanaka et al. (2004) J. Oleo Sci. 53, 417-424. Однако в этом прототипе применение CO_2 с 10% этанола давало в результате только 30% фосфолипидов из тех, которые могли бы быть экстрагированы. 20% этанола нужно было использовать, чтобы экстрагировать 80% фосфолипидов.

ПРИМЕРЫ ПО ДАННОМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Пример 2

Свежие *E. superba* (200 г) промывали этанолом (1:1, 200 г) при примерно 0°C.

Этанольный экстракт (1,5%) содержал неорганические соли (главным образом NaCl) и некоторые органические вещества.

Промытый этанолом криль экстрагировали CO_2 , содержащим 10% этанола. Это давало экстракт 12 г (6% от исходного криля). Анализ (ТСХ и ЯМР) показал, что

экстракт содержал фосфолипиды, триглицериды и астаксантин.

Специалист в данной области поймет, что диоксид углерода при сверхкритическом давлении может действовать как растворитель для этанола. Таким образом, альтернативная процедура для модификации силы растворителя CO₂ состоит в использовании условий давления/температуры, так что этанол непосредственно растворяется из содержащего этанол исходного сырья криля без необходимости добавления путем предварительной обработки CO₂. Это применяется также для примеров, представленных ниже.

Пример 3

Свежие E.superba (200 г) промывали этанолом (1:3, 600 г) при примерно 0°C. Этанольный экстракт (7,2%) содержал фосфолипиды, триглицериды и астаксантин и некоторые неорганические соли. Экстракт содержал 26,3% (ЭПК + ДГК), и это показывает, что относительное содержание фосфолипидов было высоким.

Промытый этанолом криль экстрагировали CO₂, содержащим 10% этанола. Это дает экстракт 2,2% от исходного криля. Анализ (ТСХ и ЯМР) показал, что экстракт содержал фосфолипиды, триглицериды и астаксантин. Однако так как экстракт содержал только 8,1% (ЭПК + ДГК), сделано заключение, что содержание фосфолипидов было низким.

Пример 4

Свежие E.superba обрабатывали таким же двухстадийным способом, что и представленный выше, за исключением того, что количество этанола на стадии промывания было повышено до 4:1. Этанольный экстракт был 7,2% по сравнению с исходным материалом, тогда как экстракт в сверхкритической жидкости был 2,6%.

Пример 5

Свежие E.superba (200 г) приводили в контакт с молекулярным ситом (A3, 280 г), чтобы удалить воду из исходного сырья криля. Экстрагирование CO₂, содержащим 10% этанола, дает экстракт 5,2% при расчете на исходный вес криля. Анализы показали, что экстракт содержал триглицериды, фосфолипиды и астаксантин. Экстрагированный целый криль был полностью белым, за исключением черных глаз.

В примере 5 показан эффект удаления воды. Молекулярное сито было выбрано в качестве альтернативы этанолу. Эти примеры не предназначены для ограничения в отношении средств для удаления воды. Молекулярное сито и другие осушивающие средства могут быть умеренными и эффективными по стоимости альтернативами сублимированию.

Пример 6

Свежие E. superba (200 г) промывали этанолом (1:1), как и в примере 2, но с той разницей, что исходное сырье было **предварительно обработано** при 80°C в течение 5 минут. Это давало этанольный экстракт 7,3%. Экстрагирование суперкритической жидкостью с CO₂, содержащей 10% этанола, давало дополнительный экстракт 2,6% в расчете на свежее исходное сырье. Весь экстракт составил 9,9%, и анализы (ТСХ, ЯМР) показали, что экстракт был богат фосфолипидами и содержал также триглицериды и астаксантин. Оставшийся целый криль был полностью белым, за исключением черных глаз.

Пример 7

Свежие E.superba (12 кг) нагревали до 80°C в течение нескольких минут, а затем экстрагировали этанолом (26 кг). Это давало этанольный экстракт 0,82 кг (7%). Анализ липидных групп (ВЭЖХ; колонка: Allima HP двуокись кремния 3 мкм;

детектор: DEDL Sedere; растворители: хлороформ/метанол) показал содержание 58% фосфолипидов. Анализ ГХ (% площади) показал содержание 24,0% ЭПК и 11,4% ДГК, сумма ЭПК+ДГК=35,4%.

5 Оставшийся криль экстрагировали при 280 бар и 50°C CO₂ (156 кг), содержащим этанол (15 кг). Это давало экстракт 0,24 кг (2%). Оставшийся криль был белым, за исключением черных глаз. Анализ липидных групп показал содержание 19% фосфолипидов. Экстракт содержал 8,9% ЭПК и 4,8% ДГК (сумма 13,7%).
10 Экстрагирование оставшегося материала криля (метод Фолша) показало содержание только 0,08 кг липидов (0,7% по сравнению с первоначальным весом криля). Это означает, что по существу все липиды были экстрагированы.

Пример 8

15 Свежие E.superba (12 кг) экстрагировали этанолом (33 кг) без тепловой обработки. Это давало экстракт 0,29 кг (2,4%). Анализ липидных групп, как указано выше, показал содержание 28,5% фосфолипидов.

Результаты показывают, что тепловая обработка дает повышенный выход липидов по сравнению с такой же обработкой без нагревания. После тепловой обработки исходного сырья одна часть (массовая) этанола давала тот же результат, что и четыре
20 части этанола без тепловой обработки. А также нагревание давало этанольный экстракт, который был более богат фосфолипидами и омега-3 жирными кислотами, чем в том случае, когда выполняли обработку этанолом без нагревания.

Время нагревания в примерах не должно ограничиваться для данного изобретения. Специалист в данной области поймет, что точное время нагревания трудно
25 регулировать для больших объемов биологического материала. Таким образом, время нагревания может меняться в зависимости от количества криля, которое нужно переработать за конкретный срок. А также температура, применяемая для предварительного нагревания, не ограничивается температурой, представленной в
30 примерах. Эксперименты показали, что предварительное нагревание до 95° давало тенденцию повышения выхода липидов на стадии а) даже более высокого, чем при предварительном нагревании до 80°C. А также для больших объемов криля может быть трудно получить одинаковую температуру во всем материале криля.

35 Тепловая обработка дает в качестве дополнительного результата то, что высокоактивные пищеварительные ферменты криля инактивируются со снижением потенциального гидролиза липидов.

Пример 9

40 На фигуре 1 показан вид E.Superba, используемой в качестве исходного сырья для экстрагирования. На фигуре 2 показан материал после экстрагирования, который описан в примере 7. Другие примеры давали очень похожий материал после экстрагирования. Экстрагированный криль был сухим, и из него легко можно было сделать порошок даже вручную путем сжимания между пальцами. Обезжиренный порошок содержит белки, а также хитозан и другие нелипидные компоненты из криля.
45 Порошки пахнут, как сухая треска. Так как этот порошок по существу не содержит липидов, он даст муку по существу без окисленных полиненасыщенных жирных кислот. Эта мука очень отличается от муки криля, получаемой по традиционным способам, когда по существу вся фосфолипидная фракция будет оставаться в муке, являясь источником окисленных и полимеризованных веществ. Мука криля,
50 получаемая по настоящему способу, таким образом, даст значительно сниженный окислительный стресс по сравнению с традиционной мукой криля или рыбной мукой при использовании для откорма при аквакультуре. Мука криля также очень подойдет

для кормления ракообразных, включая лобстеров, и для откорма пойманных камчатских крабов (*Paralithodes camtschatica*), чтобы повысить качество и объем мяса краба. Так как мука по существу не содержит полимеризованных липидов, она будет также благотворна для продукции высококачественного хитозана и для других

5

продуктов переработки, когда необходима высококачественная мука. Так как липиды криля окисляются очень быстро и становятся менее растворимыми в обычных растворителях, специалист в данной области поймет, что подобная высококачественная мука криля не могла бы быть получена путем обезжиривания

10

традиционной муки криля, например, путем использования органических растворителей. Специалист в данной области поймет, что способы, описанные выше, можно также использовать для другого исходного сырья, кроме криля, например, для выделения

15

богатых омега-3 фосфолипидов из половых желез рыб или из видов *Calanus*. Некоторые виды криля богаты парафиновыми сложными эфирами (например, *E. Crystallorhphas*), и то же самое будет встречаться в случае видов *Calanus*. Специалист поймет, что при переработке, которая описана выше, сложные эфиры воска будут концентрироваться во фракциях неполярных липидов.

20

Кроме того, специалист в данной области поймет, что комбинация стадий процесса, которая представлена выше, может использоваться для разделения полярных (т.е. фосфолипидов) и неполярных липидов криля. Также будет возможно получить экстракт всех липидов криля в соответствии с одним из примеров, представленных выше, а затем провести второе экстрагирование этого промежуточного продукта,

25

чтобы разделить группы липидов. Например, экстрагирование чистым диоксидом углерода удалило бы неполярные липиды из богатых омега-3 фосфолипидов. В другом воплощении способ по данному изобретению используют для экстрагирования муки криля при условии, что мука криля была произведена

30

достаточно мягким способом, чтобы избежать повреждения липидов криля. Специалист поймет также, что способ, описанный выше, можно использовать для экстрагирования другого исходного сырья из морских организмов, таких как половые железы рыб и виды *Calanus*.

35

Липидная фракция или липидный продукт, полученный по способу в соответствии с данным изобретением, могут обладать некоторыми дополнительными преимуществами в отношении качества по сравнению с известными продуктами масла криля (производимыми по общепринятым способам), такими как, например, масло криля от Neptune Biotechnologies & Bioresources, экстрагированные из японского криля, как сырьевого источника (виды не указаны), со следующим составом:

40

Фосфолипиды в целом	≥ 40,0%
Эстерифицированный астаксантин	≥ 1,0 мг/г
Витамин А	≥ 1,0 МЕ/г
Витамин Е	≥ 0,005 МЕ/г
Витамин D	≥ 0,1 МЕ/г
Омега-3 в целом	≥ 30,0%
ЭПК	≥ 15,0%
ДГК	≥ 9,0%

45

Липидный продукт или фракция по данному изобретению, как ожидается, будет содержать:

50

- содержат по существу **менее гидролизованные и/или окисленные липиды**, чем липид, продуцируемый при общепринятых способах,

- имеет менее поврежденные липидные антиоксиданты криля, чем при общепринятой переработке,

- содержат **очень низкие уровни свободных жирных кислот**, и/или

- по существу **не содержат следов органических растворителей**.

Под «окисленными» липидами подразумеваются как первичные продукты окисления (обычно оцениваемые как перекисное число), вторичные продукты окисления (обычно карбонильные продукты, часто анализируемые как анизидиновое число) и третичные продукты окисления (олигомеры и полимеры).

Таким образом, данное изобретение включает промышленные липидные продукты или масло криля, производимые по одному из способов по данному изобретению.

Продукты, подобные, например, пищевой добавке Superba™ (Alker BioMarine, Norway), можно было бы получать по способу в соответствии с данным изобретением.

Специалист в данной области поймет, что качество продукта, производимого по способу данного изобретения, будет улучшенным по сравнению с продуктом, производимым путем традиционного экстрагирования муки криля.

Кроме того, примеры липидных композиций, получаемых по способу в соответствии с данным изобретением, представлены в таблицах ниже и также включены сюда.

Таблица 2	
Липидный состав	
Фосфолипиды	> 30-40% по массе
ЭПК	> 5-15% по массе
ДГК	> 5-15% по массе

В соответствии с данным изобретением экстракт можно концентрировать в отношении содержания фосфолипидов. Некоторые липидные композиции показаны в таблицах 3-5 и включены сюда:

Таблица 3	
Липидный состав	
Фосфолипиды	≥ 50% по массе
ЭПК	≥ 15%
ДГК	≥ 10%

Как можно видеть из примера 7, липидный состав, который описан в таблице 3, можно получить только при применении экстрагирования в соответствии со стадией а) данного изобретения.

Таблица 4	
Липидный состав	
Фосфолипиды	≥ 80% по массе
ЭПК	≥ 20%
ДГК	≥ 13%

Таблица 5	
Липидный состав	
Фосфолипиды	≥ 90% по массе
ЭПК	≥ 23%
ДГК	≥ 15%

Данное изобретение не должно ограничиваться представленными воплощениями и

примерами.

Формула изобретения

1. Способ экстрагирования, по существу, полной липидной фракции из свежего криля, включающий стадии:
 - а) снижения содержания воды в исходном сырье криля путем промывания этанолом, метанолом, пропанолом или изопропанолом в массовом отношении от 1:0,5 до 1:5, и
 - б) выделения липидной фракции из спирта.
2. Способ по п.1, в котором стадия а) включает промывание исходного сырья криля этанолом, а стадия б) включает выделение липидной фракции из этанола.
3. Способ по любому из пп.1 и 2, включающий дополнительную стадию а-1) экстрагирования сырья криля со сниженным содержанием воды со стадии а) СО₂ при сверхкритическом давлении, содержащим этанол, метанол, пропанол или изопропанол.
4. Способ по п.1, в котором исходное сырье криля нагревают до 60-100°С перед промыванием.
5. Способ по п.4, в котором исходное сырье криля нагревают до 70-100°С перед промыванием.
6. Способ по п.4, в котором исходное сырье криля нагревают до 80-95° перед промыванием.
7. Способ по п.4, в котором исходное сырье криля перед промыванием нагревают в течение примерно от 1 мин до 40 мин.
8. Способ по п.7, в котором исходное сырье криля нагревают в течение примерно от 1 до 15 мин перед промыванием.
9. Способ по п.7, в котором исходное сырье криля нагревают в течение примерно от 1 до 5 мин перед промыванием.
10. Способ по п.1, в котором количество этанола, метанола, пропанола или изопропанола на стадии а-1) составляет 5-20% по массе.
11. Способ по п.10, в котором количество этанола, метанола, пропанола или изопропанола на стадии а-1) составляет 10-15% по массе.
12. По существу, полная липидная фракция, которая, по существу, не содержит окисленных липидов, содержащая триглицериды, астаксантин и фосфолипиды, полученная способом по пп.1-11.
13. По существу, полная липидная фракция по п.12 для применения в качестве лекарственного средства и/или в качестве пищевой добавки.
14. Способ отделения фосфолипидов от других липидов, включающий экстрагирование полной липидной фракции, полученной способом по пп.1-11 чистым диоксидом углерода или диоксидом углерода, содержащим менее 5% этанола, метанола, пропанола или изопропанола.
15. Фосфолипиды, по существу, не содержащие окисленных липидов, полученные способом по п.14.
16. Фосфолипиды по п.15, которые дополнительно трансэстерифицированы или гидролизованы.
17. Фосфолипиды по п.16, в которых концентрация омега-3 жирных кислот составляет, по меньшей мере, 40% по массе.
18. Способ производства муки криля, включающий экстрагирование, по существу,

полной липидной фракции способом по пп.1-11 и отделение оставшегося исходного сырья криля.

19. Мука криля, полученная способом по п.18, которая, по существу, не содержит окисленных полиненасыщенных жирных кислот и других липидов.

5

20. Применение муки криля по п.19 в корме для животных.

21. Применение муки криля по п.19 в корме при разведении водных животных.

22. Применение муки криля по п.21 для откорма ракообразных.

10

23. Применение муки криля по п.19 для откорма морских видов рыбы, включая личинок и мальков рыб.

24. Применение муки криля по п.19 для производства высококачественного хитозана.

15

20

25

30

35

40

45

50



ФИГ. 1



ФИГ. 2