

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157452 B



(51) Int.Cl.⁵ C 08 B 37/08

(21) Patentansøgning nr.: 1662/85

(22) Indleveringsdag: 12 apr 1985

(41) Alm. tilgængelig: 13 okt 1986

(44) Fremlagt: 08 jan 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *MATCON RÅDGIVENDE INGENIØRFIRMA A/S; Generatorvej 45; 2730 Herlev, DK

(72) Opfinder: Jon Olavur *Joensen; DK

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) **Fremgangsmåde til udvinding af chitin fra chitinkilder, hvori den findes sammen med eller bundet til proteinstoffer**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1662-85

Chitin og eventuelt astaxanthin udvindes fra chitinkilder, navnlig reje- eller krillskaller, ved demineralisering med en syre og fjernelse af protein under udnyttelse af den enzymatiske aktivitet af fiskeindvolde. Den chitinbrydende enzymatiske aktivitet i fiskeindvolde undertrykkes ved syrebehandling af disse til pH 1,2 - 2,5, fortrinsvis 1,5 - 2,5, før eller under proteinfjernelsen. Udvingen kan ske under tilstedeværelse af en olie, fortrinsvis fra torskelever, som optager astaxanthinen.

DK 157452 B

Chitin er et nitrogenholdigt, polymert carbonhydrat, som forekommer udbredt i naturen, især i det eksterne skelet hos insekter, skaldyr og bløddyr, men også i visse svampe.

5 Chitin samt stoffet chitosan, som kan fremstilles ved deacetylering af chitin med stærke baser, har en række industrielle anvendelsesmuligheder, f.eks. som fortykkelsesmidler, geleringsmidler, filmdannende midler, ionbyttere og flokkulenter samt som tungmetalbin-

10 dende midler, suturmateriale og som sårhelende midler.

I de vigtigste chitinkilder, såsom skaller fra rejer, krill og krabber, forekommer chitin sammen med, og til dels bundet til, proteinstoffer. Derudover indeholder de pågældende skaller en betydelig mængde mineralstof, navnlig calciumcarbonat.

15

Endvidere indeholder mange chitinkilder farvestoffet astaxanthin og derivater deraf, som har stor værdi som følge af dets anvendelighed i foder til laksefisk.

20 Der har været gjort adskillige forsøg på at udvikle metoder til fremstilling af chitin eller chitosan ud fra skaller af marine skaldyr. Sådanne skaller må for nærværende betragtes som den væsentligste chitinkilde, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen beskrives i det

25 følgende i forbindelse med oparbejdning af disse, specielt skaller af rejer og krill, men den er generelt anvendelig til alle chitinkilder, hvorfra der skal fjernes protein.

Følles for de foreslåede metoder er, at skaller-
30 nes kalkindhold fjernes ved behandling med en syre, medens proteinet har været foreslået fjernet ved behandling med stærk natriumhydroxidopløsning eller med enzympræparater (pepsin fra svin eller fisk). Endvidere har det været foreslået at nedbryde proteinen med proteolyt-

35 tiske bakterier.

Proteinfjernelse med natriumhydroxid eller andre stærke baser har den ulempe, at en væsentlig del af

skallernes astaxanthinindhold går tabt og endvidere hydrolyseres en del af chitinen til chitosan, således at der ikke opnås et rent produkt.

Anvendelse af proteolytiske bakterier medfører en
5 kompliceret arbejdsgang, og proteinfjernelse med enzympræparater har ikke ført til en tilstrækkelig effektiv proteinopløsning og har givet et relativt dårligt astaxanthinudbytte.

Et væsentligt bedre astaxanthinudbytte er opnået
10 ved at behandle rejeskaller med en ensilage, fremstillet ved behandling af torskeindvolde uden lever med myresyre og propionsyre til en pH-værdi i blandingen på 4,1 - 4,5, idet pH-værdien ved behandlingen af rejeskallerne blev holdt på 2,5 - 3,0. Denne behandling gav en effektiv
15 proteinopløsning, men samtidig blev en betydelig del af chitinen nedbrudt, hvorfor udbyttet heraf var utilfredsstillende.

For at separere astaxanthinen har man ekstraheret denne med en olie, såsom sojaolie.

20 Det har nu vist sig, at man ved at behandle fiskeindvolde, fortrinsvis findelte, med en syre til opnåelse af en pH-værdi i området fra 1,2 - 2,5, kan påvirke indvoldenes enzymaktivitet således, at den chitin-nedbrydende aktivitet vidtgående undertrykkes samtidig
25 med, at den proteolytiske aktivitet kun svækkes i mindre grad. Det har endvidere vist sig, at denne svækkelse af de chitinnedbrydende enzyms aktivitet i betydelig grad er irreversibel, hvis indvoldene holdes ved den lave pH-værdi i længere tid, således som tilfældet er, når de
30 ensileres. Dette betyder, at man ved anvendelse af en ensilage af fiskeindvolde med en pH-værdi på 1,2 - 2,5 kan tillade en forøgelse af pH-værdien op til 4 under behandlingen af reje- eller krillskallerne og derved få en god proteolyse uden væsentlig nedbrydning af chitinen.
35

I tilfælde af, at der i stedet for ensilage an-

vendes friske fiskeindvolde, eller hvis ensilagen har været fremstillet ved pH-værdien større end 2,5, vil man derimod gennemføre proteolysen ved en pH-værdi på 1,2 - 2,5.

5 Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til udvinding af chitin fra chitinkilder, hvori stoffet foreligger sammen med eller bundet til proteinstoffer og eventuelt sammen med astaxanthin, ved demineralisering med en syre og behandling med midler til fjernelse af
10 protein og den eventuelt foreliggende astaxanthin, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man:

- a) fremstiller en vandig suspension af den eventuelt hakkede chitinkilde og fiskeindvolde eller fiskeindvoldsensilage samt eventuelt en olie eller et
15 olieafgivende materiale, idet der drages omsorg for, at fiskeindvoldene eller ensilagen indvirker på chitinkilden ved en pH-værdi på 1,2 - 2,5, fortrinsvis 1,5 - 2,5, eller at der ved fremstilling af ensilagen er anvendt en sådan pH-værdi, i
20 hvilket tilfælde indvirkningen foretages ved en pH-værdi mellem 1,2 og 4,
- b) opvarmer suspensionen til en temperatur mellem 25 og 50°C i et tidsrum mellem nogle få timer og fire døgn, fortrinsvis ½ - 3 døgn, og
- 25 c) separerer suspensionen til opnåelse af i det mindste (i) en vandig fase, som indeholder proteinhydrolysat i opløst form, og (ii) en fraktion, som indeholder chitinen i det væsentlige fri for proteiner og mineralstoffer, og (iii)
30 eventuelt en oliefraktion, som indeholder astaxanthin.

Fortrinsvis foretager man mellem trin b) og c) en delvis neutralisation og en opvarmning af suspensionen til 80 - 95°C til inaktivering af dennes enzym- og mikroorganismeindhold og for at lette den påfølgende separering.
35

Nævnte separering ved fremgangsmådens trin c) udføres hensigtsmæssigt under anvendelse af en dekantør, kombineret med en centrifugering. Den ved centrifugeringen opnåede slamfraktion, som indeholder chitinen, vaskes gentagne gange og renses og tørres til opnåelse af et holdbart produkt. Ved en efterfølgende operation eller som alternativ til den nævnte tørring kan chitinen viderebehandles, f.eks. ved opvarmning med en stærk base til opnåelse af chitosan.

Hvis den anvendte chitinkilde indeholder astaxanthin, kan denne ekstraheres med en olie, fortrinsvis i forbindelse med den proteolytiske behandling, og man vil i så fald ved separeringen i trin c) foruden en vandig fraktion, som indeholder proteinhydrolysat og en slamfraktion, som indeholder chitinen, opnå en oliefraktion, som indeholder den væsentlige mængde astaxanthin fra udgangsmaterialet. Denne oliefraktion vil sædvanligvis kunne afsættes uden opkoncentrering af den deri værende astaxanthin.

Ved en foretrukken udførelsesform ekstraherer man astaxanthinen med en marin olie, som tilvejebringes ved at anvende fiskelever eller andre olieholdige dele af fisk, hvorfra olien frigøres under indvirkning af den proteolytiske aktivitet af den resterende del af indvoldene, hvilken olie, som nævnt, separeres som en særlig fraktion i trin c).

Alternativt kan der tilføres en olie, som f.eks. sojaolie, men det vil ofte være mere økonomisk fordelagtigt at medtage fiskelever, såsom torskelever, eller andre olieholdige dele af fisk ved fremstilling af den ensilage, som benyttes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen eller at tilføre torskelever eller lignende ved fremstilling af suspensionen i trinnet a). I begge tilfælde vil fiskeindvoldenes proteolytiske enzymer bewirke en sådan nedbrydning af de olieholdige væv, at olien frigøres og senere kan separeres i trinnet c).

Den ved separeringen opnåede vandige fase har et betydeligt indhold af proteinhydrolysat og kan efter eventuel neutralisation anvendes som komponent i husdyrfoder, fortrinsvis efter tørring.

5 Det vil af ovenstående fremgå, at en udførelsesform for fremgangsmåden er ejendommelig ved, at suspensionen i trin a) fremstilles under anvendelse af en af fiskeindvolde og uorganisk syre fremstillet ensilage med en pH-værdi på 1,2 - 2,5, fortrinsvis 1,5 - 2,5, idet
10 suspensionens pH indstilles til højst 4.

Ved en anden udførelsesform for fremgangsmåden fremstilles suspensionen i trin a) under anvendelse af friske fiskeindvolde, og dens pH-værdi indstilles til 1,2 - 2,5, fortrinsvis 1,5 - 2,5.

15 Når der anvendes rejeskaller som chitinkilde, vil disse blive opsamlet i et rejepilleri, hvor de sædvanligvis presses til et tørstofindhold på ca. 50%. Som følge af den dårlige holdbarhed vil man sædvanligvis konservere rejeskallerne ved tilsætning af en stærk,
20 uorganisk syre til en pH-værdi mindre end 3, og herved sker der samtidig en demineralisering af skallerne. Hvor råmaterialet er rå rejeskaller, konserveres det fortrinsvis ved pH 1,2 - 2,5.

Da enzymaktiviteten af fiskeindvolde og ensilage,
25 fremstillet herudaf, varierer meget stærkt, bl.a. afhængigt af fiskens art og fodertilstand samt årstiden og ensilagens opbevaringstid og -temperatur, kan der ikke angives eksakte grænser for hvilke forhold mellem chitinkilde og fiskeindvolde eller ensilage, der skal an-
30 vendes. Med rejeskaller er gode resultater opnået med et vægtforhold på ca. 1:2, idet mængden af rejeskaller er beregnet ud fra et presset materiale med ca. 50%'s tørstof.

Da navnlig astaxanthinen er meget følsom for oxidation,
35 dation, vil man sædvanligvis sørge for, at der er antioxidanter til stede under processen, hvilke antioxi-

ter fortrinsvis indføres på et så tidligt stadi i processen som muligt, dvs. ved den eventuelle forudgående konservering af chitinkilden med syre, og ved den eventuelle forudgående oparbejdning af fiskeindvoldene til
5 ensilage. Ved anvendelse af friske ud-gangsmaterialer tilsættes antioxidanter ved oparbejdning af suspensionen i trin a). Som antioxidanter kan anvendes stoffer, som er sædvanlige til sådanne formål, såsom butylhydroxyanisol.

10 For at opnå en større renhed af den som slamfraktion ved separeringen opnåede chitin, kan det være hensigtsmæssigt ved oparbejdning af suspensionen i trin a) at benytte en fiskeindvoldsensilage, som forud er befriet for slam.

15 Som syre ved de eventuelle forudgående ensileringer eller konserveringer af f.eks. reje- eller krillskallerne samt til opnåelse af den ønskede pH-værdi for suspensionen, benyttes saltsyre eller svovlsyre eller anden stærk syre.

20 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere ved hjælp af nedenstående udførelseseksempel.

E K S E M P E L

25 Seks portioner fiskeindvoldsensilage blev fremstillet ved til hver portion at anvende ca. 500 kg. lever og indvolde fra torsk, 15 l 50 vægt%'s svovlsyre og 5 g butylhydroxyanisol (som antioxidant). Svovlsyren
30 blev tilsat, medens lever og indvolde blev blandet intensivt i et 1000 l kar under anvendelse af et neddykket blandeapparat. Intensivblandingen blev fortsat i 15 minutter, hvorpå blandingen ved pumpning blev overført til en tank, hvori den blev forenet med de øvrige fem
35 portioner, fremstillet på samme måde.

Blandingens pH-værdi var ca. 2,0.

Den således fremstillede ensilage blev opbevaret i tanken i to døgn, medens den intermitterende blev holdt i bevægelse ved ompumpning.

Til fjernelse af partikelformet materiale og slam blev ensilagen passeret gennem en centrifugaldekantør og pumpet til en 5 m³ kugletank.

På dette stadium havde lever- og indvoldsensilagen (ca. 3000 kg) følgende omtrentlige sammensætning:

10	Olie	20 vægt%
	Tørstof, forskelligt	
	fra fedt	11 vægt%
	Protein	8 vægt%
	Aske	2 vægt%.

15

De skaller, som fremkommer som affald fra en rejepillemaskine, har følgende omtrentlige sammensætning (efter afdræning af vand):

20	Tørstof	20 vægt%
	Protein	5 vægt%
	Chitin	5 vægt%
	Fedt	0,5 vægt%
	Aske	6,5 vægt%
25	Astaxanthin	50 ppm.

Portioner på hver 250 kg rejeskaller blev omrørt med 600 l vand i et 1000 l kar, og der blev tilsat 11 l 96%'s svovlsyre og 1 g butylhydroxyanisol. pH-værdien var ca. 2,0.

Efter at en tilstrækkelig mængde rejeskaller var blevet ensileret på denne måde, blev de pumpet til en snækkepresse til frembringelse af 1500 kg pressekage med ca. 40%'s tørstof. Denne pressekage havde følgende sammensætning.

	Tørstof	40	vægt%
	Protein	15	vægt%
	Chitin	15	vægt%
	Fedt	1,5	vægt%
5	Aske	6	vægt%
	Astaxanthin	150	ppm.

En væsentlig del af det calciumsulfat, som blev dannet ved omsætning mellem svovlsyren og calciumcarbo-
 10 nat i skallerne, blev fjernet sammen med pressevand.

Dette pressevand kan anvendes til behandling af en yderligere mængde rejeskaller til formindskelse af forbruget af svovlsyre og for at undgå, at den sure væske skal udledes i milieuet.

15 Den opnåede pressekage af syrebehandlede rejeskaller blev indført i kugletanken med lever- og indvoldsensilagen, hvori skallerne blev opslæmmet. Den resulterende suspension havde en viskositet på 2-3000 mPa's, pH-værdien var ca. 2.

20 Blandingen blev opvarmet til 35°C ved hjælp af en varmespole, gennem hvilken der blev cirkuleret vand ved 45°C. Blandingen blev holdt i bevægelse ved pumpning.

Efter i to døgn at have været opvarmet til 35°C og holdt i bevægelse, blev suspensionen opvarmet til
 25 80°C med damp og derpå pumpet til snækkepressen, hvor olie og en vandig opløsning af hydrolyseret protein blev adskilt fra den rå chitin. Den flydende fase blev behandlet i en dekantørcentrifuge til fjernelse af slam og derpå adskilt ved centrifugering i en oliefraktion og en
 30 fraktion af vandig proteinhydrolysat.

Olien indeholdt ca. 55% af den astaxanthin, som oprindeligt var til stede i rejeskallerne, svarende til ca. 200 ppm astaxanthin i olien. Olien kan anvendes som sådan til fremstilling af foder til laks og beslægtede
 35 fisk, hvis kød ønskes bibragt en rødlig farve.

Proteinhydrolysatet blev inddampet og tørret til

opnåelse af et produkt, som var egnet som tilsætning til foder til kvæg og fjerkræ.

Pressekagen, som omfattede rejeskallernes chitin, blev suspenderet i 2000 l vand ved 80°C, og suspensionen
5 ompumpet i 15 minutter. Suspensionen blev derpå pumpet til pressen, og den herved opnåede væskefase blev ved hjælp af en dekantør og en centrifuge adskilt til udvinding af en yderligere mængde astaxantinholdig olie. Den vandige fase fra denne adskillelse blev kasseret.

10 Chitinpressekagen blev suspenderet en gang yderligere i 2000 l vand ved 80°C, og der blev tilsat 20 kg natriumcarbonat. Suspensionen blev omrørt, og chitinen atter isoleret ved hjælp af snekkepressen.

Chitinen blev skyllet en gang yderligere på lignende måde under anvendelse af vand uden natriumcarbonat, og derpå blev skylningen gentaget under tilsætning af 10 l 30 vægt%'s saltsyre.

Den opnåede chitinkage blev til slut vasket med 2000 l rent vand, ligeledes ved 80°C og atter presset.

20 Den resulterende kage af chitin blev tørret under anvendelse af varm luft til opnåelse af 225 kg chitin med følgende data:

25	Farve:	hvid med en svag rødlig tone
	Protein	<0,5 vægt%
	Olie	<0,1 vægt%
	Aske	<0,5 vægt%.

Hvis der ønskes et produkt med ekstremt lav askeindhold, kan den sidste vaskningsproces udføres med partielt demineraliseret vand.

30

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til udvinding af chitin fra chitinkilder, hvori den findes sammen med eller bundet
5 til proteinstoffer og eventuelt sammen med astaxanthin, ved demineralisering med en syre og behandling med midler til fjernelse af protein og det eventuelt foreliggende astaxanthin, k e n d e t e g n e t ved, at man

a) fremstiller en vandig, suspension af den eventuelt
10 hakkede chitinkilde og fiskeindvolde eller fiskeindvoldsensilage samt eventuelt en olie eller et olieafgivende materiale, idet der drages omsorg for, at fiskeindvoldene eller ensilagen indvirker på chitinkilden ved en pH-værdi på 1,2
15 -2,5, fortrinsvis 1,5-2,5, eller at der ved fremstillingen af ensilagen er anvendt en sådan pH-værdi, i hvilket tilfælde indvirkningen foretages ved en pH-værdi mellem 1,2 og 4,

b) opvarmer suspensionen til en temperatur mellem 25
20 og 50°C i et tidsrum på mellem nogle få timer og fire døgn, fortrinsvis ½ - 3 døgn, og

c) separerer suspensionen til opnåelse af i det mindste (i) en vandig fase, som indeholder proteinhydrolysat i opløst form, og (ii) en fraktion,
25 som indeholder chitinen i det væsentlige fri for proteiner og mineralstoffer, og (iii) eventuelt en oliefraktion, som indeholder astaxanthin.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, ved hvilken der
30 anvendes en chitinkilde, som indeholder astaxanthin, k e n d e t e g n e t ved, at man som olieafgivende materiale anvender fiskelever eller andre olieholdige dele af fisk, hvorfra olien frigøres under indvirkning af den proteolytiske aktivitet af indvoldene og optager astaxanthinen, hvilken olie separeres som astaxanthinholdig
35 oliefraktion i trin c).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n -

d e t e g n e t ved, at suspensionen i trin a) fremstilles under anvendelse af en af fiskeindvolde og uorganisk syre fremstillet ensilage.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n -
5 d e t e g n e t ved, at suspensionen i trin a) fremstilles under anvendelse af friske fiskeindvolde.

5. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at suspensionen tilføres en antioxidant, fortrinsvis tilsat ved
10 en eventuel ensilering af chitinkilden og/eller af fiskeindvoldene.

6. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at man mellem trin b) og trin c) foretager en delvis neutralisation
15 og opvarmning af suspensionen til 80-95°C til inaktivering af dennes enzymindehold og nedsættelse af dens viskositet.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e -
t e g n e t ved, at ensilagen af fiskeindvolde forud er
20 befriet for slam.

8. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at der som chitinkilde anvendes rå rejeskaller, som er konserveret med syre til pH 1,2 - 2,5.

25

30

35