

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 934342 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **934342**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 1/36

A23L 1/0562

A23J 3/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **26.03.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.10.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.10.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **26.03.1992** **PCT/SE1992/000192**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

05.04.1991 SE 9100999

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Collagen Casing Einar Sjölander AB, Importgatan 2-4 422 46 Hisings Backa, Sverige, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Sjölander, Einar, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä kollageenin valmistamiseksi: menetelmällä valmistettu kollag eeni ja kollageenin käyttö

Förfarande för framställning av collagen: collagen framställt med förf arandet och användning av collagen

Menetelmä kollageenin valmistamiseksi: menetelmällä valmistettu kollageeni ja kollageenin käyttö. - Förfarande för framställning av collagen: Collagen framställt med förfarandet och användning av collagen.

Kyseessä olevan keksinnön kohteena on parantunut menetelmä kollageenin valmistamiseksi ja menetelmällä valmistettu kollageeni ja kollageenin käyttö eri aloilla.

Kollageeni on kuitumuotoinen aine, jossa on 18 aminohaposta ja se muodostaa pääosan eläimien suolista ja mahasta, mutta sitä on myös muissa osissa eläimen kehoa, esimerkiksi ihon sisäosassa (interial part) nahan muodossa, keuhkoissa ja utareissa jne. Aiemmin kollageenia on etupäässä käytetty sen alkuperäisessä muodossa, enimmäkseen makkarankuorina, jotka tehdään puhdistetuista suolista. Viime vuosina on myös valmistettu kollageenia sen puhtaassa muodossa alkaen edellä mainituista eläimen kehon osista ja käytetty tätä puhdasta kollageenia eri tarkoituksiin kuten keinotekoisesti tehtyinä makkarankuorina, lisäaineina hoitotarvikkeissa, leikkauslangoissa jne. Tunnettu tapa valmistaa kollageenia kuvataan ruotsalaisessa patentissa no. 8003876-3, jossa kuvataan menetelmä, joka käsittää puhdistettujen suolien jne. leikkaamisen nauhoiksi ja paloiksi, jotka syväjäädystetään ja jauhetaan, jonka jälkeen ne saatetaan entsyymin vaikutuksen alaiseksi vesiliuoksessa, jolloin aminohapot, jotka eivät ole osana kollageenia hydrolysoituvat siten, että liukenematon jäljelle jäävä kollageeni voidaan poistaa ja käyttää lisäkäsittelyjen jälkeen. Toinen menetelmä kollageenin valmistamiseksi käsittää kalkin käytön kollageenisäikeiden erottamiseksi. Tämä menetelmä on aikaavievä ja johtaa myös siihen, että vapaat kollageenimolekyylit erotetaan, mikä huonontaa lopputuotteen ominaisuuksia.

On jo kauan haluttu keksiä menetelmä, joka on kahta edellä mainittua menetelmää parempi kollageenin tuottamiseksi. Siten, ensimmäinen edellä mainittu menetelmä käsittää sen että, tämä hajotettu lähtöaines pitää jäädyttää, mikä on seikkaperäistä ja kallista, ja että pitää tehdä hydrolyysi suhteellisen alhaisessa pH:ssa, noin 8, käyttäen suhteellisen heikkoa entsyymiä 2 - 5 tunnin ajan. Tämä prosessi on kallis ja aikaavievä.

Toisessa edellä mainitussa menetelmässä pitää lisätä kalkki, mikä johtaa huonomman laadun lopputuotteeseen, samalla kun laajennettu prosessi tulee välttämättömäksi.

Kyseessä olevassa keksinnössä on ratkaistu edellä mainittuihin menetelmiin liittyvät ongelmat ja kehitetty menetelmä kollageenin valmistamiseksi teurastettujen ja leikattujen eläinten sivutuotteista, kuten suolista, mahasta jne., mille on ominaista seuraavat prosessin vaiheet:

- a) lähtöaineet puhdistetaan ja upotetaan jääveteen, pH säädetään noin 5,5:ksi,
- b) lähtöaineiden ja jääveden seos jauhetaan, minkä jälkeen lisätään vielä vettä siten, että jauhettu seos sisältää suunnilleen yhtä monta paino-osaa lähtöaineita ja vettä,
- c) seos kuumennetaan 40 - 42 °C:een ja pH säädetään enintään 11:ksi, edullisesti 10,5:ksi, minkä jälkeen lisätään proteolyyttistä entsyymiä, esimerkiksi alkalasia (alkalas), määrä joka vastaa 60 Anson-yksikköä kiloa kiinteää ainetta kohden, siten, että tapahtuu muiden proteiinien kuin kollageenin hydrolyysi samalla, kun säilytetään pH-arvo lisäämällä emästä kunnes hydrolyysi on tapahtunut ja emästä ei enää kuluteta,
- d) pH säädetään 5,5:een lisäämällä happoa, minkä jälkeen

e) erottunut kollageeni kerätään.

Keksinnön mukaisesti on edullista, että pH kohdissa a) ja d) säädetään suolahapolla, sitruunahapolla tai maitohapolla.

Hydrolyysi tapahtuu keksinnön mukaisesti $1 \frac{3}{4}$ - $3 \frac{1}{2}$ tuntia samanaikaisesti lisättäessä natriumhydroksidia emäksenä.

Keksinnön mukaisesti erotettu kollageeni voidaan kerätä siivilöimällä, puhdistamalla vedellä 40 °C:ssa ja sentrifugoimalla tai dekantoimalla. Vain yksi pesu vedellä on riittävä.

Keksinnön mukaisesti on lisäksi edullista, että kollageeni homogenisoidaan keräämisen jälkeen pH:ssa n. 3 vuorotellen happoja ja vettä lisäämällä samanaikaisesti mekaanisesti käsitellen, kunnes saadaan haluttu kollageenin loppukonsentraatio.

Keksinnön mukaisesti on edullista kirkkaan läpinäkyvän kalvon saamiseksi lopullisesta kollageenista, että siihen sekoitetaan pelkistäviä aineita, kuten askorbiinihappoa ja natriumsulfiittia, määriä 2 painoprosenttiin asti, ja ristisitovia aineita esimerkiksi glutaraldehydiä, suunnilleen 0,1 painoprosentin määrä, ja 5 - 10 painoprosenttia glyserolia pehmittimenä, kaikki kiinteää kollageenia kohden laskettuina.

Keksintö käsittää myös kollageenin, joka on valmistettu edellä kuvatun menetelmän mukaisesti ja kollageenin käytön sideaineena lihatuotteissa, kalvoina ruokien ja lääkkeiden pakkaamiseen, kantaja-aineena väriaineiden valmistuksessa, keinotekoisena nahkana, haavojen hoitoon tarkoitettuna geelinä, suojuksena puolijohdepaloille (chips) elektroniikan tarkoituksiin ja suojuksena paperiteollisuudessa.

Raaka-aineet, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisessa menetelmässä, ovat etupäässä aineita, joita saadaan eläinten ruuan-

sulatuselimistä kuten pötsistä, neljännestä mahasta, toisesta mahasta, suolista ja keuhkoista ja märehitijöiden utareista. Myös sikojen suuria suolia voidaan käyttää.

Kun käytetään suolta, se on ensimmäiseksi tyhjennettävä laitteella, joka puristaa sisällön ja suolien sisimmän osan, nimeltään limakalvo (mucosa), ulos puristamalla kumitelojen välissä. Ei ole mitään rajoitusta raaka-aineen lajista ja kaikkea, mikä sisältää riittävän määrän kollageenia, voidaan käyttää. Raaka-aineet esikäsitellään edullisesti poistamalla rasva, niin sanottu suolilieve ja muu sellainen.

Sitten puhdistetut lähtöaineet sekoitetaan jääveteen, johon on edullisesti lisätty etikkahappoa siten, että saadaan pH:ksi noin 5,5. Näin suoli jäähtyy nopeasti ja mahdollinen bakteerirevoluutio loppuu. Välttämään jäädyttämästä lähtöaineita, jotka voidaan kuljettaa ja säilyttää tässä tilassa, ennen kuin ne jauhetaan.. Tämä on tärkeää, koska kollageenia valmistetaan vain harvoissa paikoissa ja lähtöaineet pitää kuljettaa teurastamoista kollageenitehtaaseen.

Kollageenitehtaassa lisätään puhdasta vettä siten, että lähtöainetta on noin 50 painoprosenttia seoksesta. Tämä lämmitetään 40 - 42 °C:een sekoittaen ja lisätään natriumhydroksidia niin, että pH nousee 10,5:een ja lämpötila pidetään 40 - 42 °C:ssa. On tärkeää, että lämpötila ei ylitä tätä arvoa, koska silloin kollageenissa tapahtuu kiteisyyden muutoksia ja vielä korkeammissa lämpötiloissa se muuttuu gelatiiniksi. Halutussa lämpötilassa ja pH-arvossa lisätään proteolyyttisiä entsyymejä, jotka edullisesti muodostuvat alkalasista (alkalas). Tässä korkeassa pH:ssa voidaan lisätä vahva entsyymikonsentraatio ja hydrolysoimisaika on siksi lyhyt, 1 3/4 - 3 1/2 tuntia. Hydrolyysin aikana kuluu emästä siten, että alkalia täytyy jatkuvasti lisätä, jotta pH 10,5 säilyisi. Kun hydrolyysi on päättynyt, mikä huomataan siitä, että seoksen pH ei laske enää, kun emästä ei li-

sätä, seoksen pH lasketaan 5,5:een lisäämällä happoa, esimerkiksi suolahappoa, etikkahappoa, sitruunahappoa tai maitohappoa. Mitä hydrolyysin aikana tapahtuu on, että alkalas hydrolysoi proteiinit, jotka eivät ole osa kollageenia.

PH:ssa 5,5 muodostuu kokkareita ja kollageenin kokoon puristumista esiintyy. Tämä johtuu siitä, että kollageenin isoelektrinen piste on noin pH:ssa 5,5, mikä on yleisesti tunnettua. Tässä muodossa on edullista erottaa kollageeni sopivasti siivilöimällä tms.

Lopuksi kollageeni pestään vedessä noin 40 °C:een lämpötilassa ja sentrifugoidaan tai dekantoidaan. Sentrifugoinnissa kollageenin saa tavallisesti noin 22 prosentin kiinteään aineen pitoisuuden ja denkantoinnissa noin 30 prosentin.

Jotta kollageenia voidaan käyttää aiottuun tarkoitukseen on edullista, että se homogenisoidaan, mikä tehdään mekaanisella käsittelyllä vakuumisekoittimessa edullisesti taikinakoukulla tai muulla sellaisella, lisäten happoa, kuten suolahappoa tai maitohappoa, yhdessä veden kanssa siten, että saadaan pH 3 ja haluttu kollageenin konsentraatio. Homogenisoinnin jälkeen kollageeni asetetaan kypsymään matalaan lämpötilaan, yleensä 8 - 10 °C, 24 tunnin ajaksi.

Kun kollageenia käytetään kalvon muodostamiseen, esimerkiksi syötävän makkarankuoren muodossa olevan kalvon, lisätään ristsitovia aineita, esimerkiksi glutaarialdehydiä noin 0,1 painoprosentin määrä, ja pehmentäjää glyserolin muodossa 5 - 10 painoprosentin määrä. Kirkkaan ja läpinäkyvän kalvon saamiseksi pitää lisätä myös antioksidanttia, kuten askorbiinihappoa tai natriumbisulfaattia, määriä 2 painoprosenttiin asti, edullisesti 0,02 - 0,1 painoprosenttia.

Kollageenin valmistuksen sivutuotteena voidaan valmistaa eläinten rehurakeita hydrolysointivedestä kuivattamalla ja lisäämällä vitamiineja, mineraaleja ja makuaineita tai sitä voidaan käyttää märkärehuna, joka siinä tapauksessa täytyy käyttää nopeasti, ettei esiintyisi mädäntymistä.

Käytetty proteolyyttinen entsyymi sisältää edullisesti Novon alkalas 2,6:a, joka sisältää 60 Anson-yksikköä 25 millilitraa kohden. Tämä alkalas on noin 4 kertaa vahvempaa kuin aiemmin tunnetut alkalas-laadut. Yhdessä hydrolyysin aikana olevan korkean pH-arvon kanssa se siksi saa aikaan erittäin nopean hydrolyysireaktion, mikä puolestaan merkitsee taloudellista etua. Tällä menetelmällä myös saadaan tuote, jolla on pieni rasvapiitoisuus, mikä on erittäin tärkeää seuraalle kalvon muodostukselle.

Esimerkki:

6,5 kg puhdistettuja sian suolia upotetaan jääveteen, jonka pH on 5,5. PH-arvoa säädetään etikkahapolla. Suolet ja jäävesi jauhetaan, minkä jälkeen lisätään vettä siten, että veden ja suolien yhteismääräksi tulee 13 kg, eli 6,5 kg vettä ja 6,5 kg puhdistettuja sian suolia.

Seosta sekoitetaan ja kuumennetaan 40 - 41 °C:een lisäten noin 143 ml 4 M NaOH:a kunnes saavutetaan pH 10,5. Sen jälkeen lisättiin proteolyyttistä entsyymiä alkalas 2,6L:n, Novolta, muodossa noin 150 ml:n määrä. PH pidettiin vakiona 10,5:ssä noin 1 3/4 tuntia lisäten 4 M NaOH:a siten, että NaOH:n kokonaismääräksi tuli 253 ml.

Hydrolysoimisen jälkeen pH laskettiin 5,5:een lisäämällä suolahappoa. Kollageenista muodostui kokoonpuristuneita ja muotoutuneita kokkareita.

Kollageeni erotettiin siivilöimällä ja pestiin vedellä 40 °C:een lämpötilassa ja 6 - 7 kg:n vesimäärällä, sekoittaen. Pesuaika oli 20 - 25 minuuttia. Sitten kollageeni kerättiin sentrifugoimalla ja homogenisoitiin vakuumisekoittimessa sopivalla taikinakoukulla. Homogenisoinnin aikana lisättiin vettä ja suolahappoa siten, että saatiin pH 3 ja ja 8 prosentin kiinteän aineen pitoisuus. Homogenisoinnin aikana kollageenin lämpötila ei ollut enempää kuin 15 - 18 °C.

Homogenisoinnin jälkeen kollageenia kypsennettiin 24 tunnin ajan ja 8 - 10 °C:n lämpötilassa, jonka jälkeen se siivilöitiin erityisellä siivilällä paineessa, mahdollisten kokkareiden ja epäpuhtauksien poistamiseksi.

Askorbiinihapon, glutaarialdehydin ja glyserolin lisäämisen jälkeen kollageeni suulakepuristettiin kirkkaaksi kalvoksi.

Kyseisessä keksinnössä on siis kehitetty taloudellinen menetelmä, jonka tuloksena on kollageeni, jolla on hyvin korkea laatu ja jota voidaan käyttää useilla edellä mainituilla uusilla alueilla.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä luontaisen kollageenin valmistamiseksi suolista, mahasta, ihonahasta, t u n n e t t u siitä, että menetelmän vaiheet ovat:

- a) lähtöaineet puhdistetaan ja upotetaan jääveteen, pH säädetään noin 5,5:ksi,
- b) lähtöaineiden ja jääveden seos jauhetaan, minkä jälkeen lisätään vielä vettä siten, että jauhettu seos sisältää suunnilleen yhtä monta paino-osaa lähtöaineita ja vettä,
- c) seos kuumennetaan 40 - 42 °C:een ja pH säädetään enintään 11:ksi, edullisesti 10,5:ksi, minkä jälkeen lisätään proteolyyttistä entsyymiä määrä joka vastaa 60 Anson-yksikköä kilogrammaa kiinteää ainetta kohden, siten, että tapahtuu muiden proteiinien kuin kollageenin hydrolyysi samalla, kun säilytetään pH-arvo lisäämällä emästä kunnes hydrolyysi on tapahtunut ja emästä ei enää kuluteta,
- d) pH säädetään 5,5:een lisäämällä happoa, minkä jälkeen
- e) kollageeni erotetaan ja kerätään.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheissa a) ja d) pH:ta säädetään suolahapolla, sitruunahapolla tai maitohapolla.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi tapahtuu $1 \frac{3}{4}$ - $3 \frac{1}{2}$ tunnin ajan lisäten natriumhydroksidia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kollageeni kerätään siivilöimällä, pesemällä vedellä noin 40 °C:ssa ja sentrifugoimalla tai dekanttoimalla.

5. Patenttivaatimusten 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että kollageeni homogenisoidaan keräämisen jälkeen
pH:ssa noin 3 mekaanisella käsittelyllä.

6. Patenttivaatimusten 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että kirkkaan läpinäkyvän kalvon saamiseksi kolla-
geeniin sekoitetaan pelkistävää ainetta, kuten askorbiinihappoa
tai natriumsulfiittia, määrä 2 painoprosenttiin asti, ja risti-
sitovia aineita esimerkiksi glutaraldehydiä, suunnilleen 0,1
painoprosentin määrä, ja 5 - 10 painoprosenttia glyserolia peh-
mittimenä, kiinteää kollageenia kohden laskettuina.