

Rapport nr. 189

Prosessering av bi- råstoff fra sild til olje og proteinhydrolysat

Laboratorieforsøk med ulike
enzymer og pilotforsøk med
ultraferskt råstoff

RAPPORTTITTEL

Prosessering av biråstoff fra sild til olje og proteinhydrolysat. Laboratorieforsøk med ulike enzymer og pilotforsøk med ultraferskt råstoff.

RAPPORTNUMMER	189	PROSJEKTNUMMER	4414
UTGIVER	RUBIN	DATO	Februar 2011

UTFØRENDE INSTITUSJONER

SINTEF Fiskeri og havbruk Brattørkaia 17 B, 7010 Trondheim
Kontakt: Ivar Storrø (ivar.storroe@sintef.no)

Sjøset Pelagic AS, 8770 Træna
Kontaktperson: Sverre Hyttan (sverre@msfish.no)

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

I 2006-2008 ble det gjennomført et forprosjekt om utnyttelse av biråstoff fra pelagisk industri av Modolv Sjøset Pelagic AS, Fryseriet AS og SINTEF Fiskeri og havbruk. Prosjektet omfattet undersøkelse av råstoffet sammensetning, laboratorieforsøk med hydrolyse for måling av utbytte og kjemisk sammensetning av produktfraksjoner, samt beregning av investerings- og driftskostnader. Hovedkonklusjonen var at enzymatisk hydrolyse og oljeseparasjon kunne være det mest interessante prosessalternativ for verdiskaping av avskjæret (kfr. RUBIN-rapport 164)

Dette har vært utgangspunkt for en videreføring i form av et pilotforsøk hos Sjøset på Træna for uttesting av hydrolyseprosess og oljeseparasjon. Prosjektet er gjennomført i samarbeid med SINTEF Fiskeri og havbruk, som har benyttet sitt mobile anlegg som kan kjøre slike prosesser i stor skala (1000 liters tank). I forkant av pilotforsøket er det gjennomført laboratorieforsøk ved SINTEF med ulike enzymer. Pilotforsøket ble kjørt i oktober 2009. Oljen er testet ut av EPAX, som har gående et prosjekt for å utvikle spesialprodukter av ferskt biråstoff av sild.

Laboratorieforsøkene viste at ulike enzymer ga ulik bitterhet på hydrolysatene, mens kjemiske analyser av hydrolysatene viste liten forskjell. Kinetiske studier viste at enzymer i silda kan bidra sterkt til hydrolysen.

Pilotforsøkene viste at det lot seg gjøre å produsere olje med god kvalitet både ved direkte oppvarming og etter hydrolyse. Selv om det ikke var tatt spesielle hensyn for å beskytte oljen mot oksidasjon, var oksidasjonsstatus etter produksjon lav. Også oksidasjonsstabiliteten var høy. Spesielt var innholdet av frie fettsyrer lavt (0,12% - 0,29%) noe som bekrefter at råstoffet var ferskt og at oljen ikke var nedbrutt. Olje separert før hydrolyse hadde de beste oksidasjonsegenskapene, både mht. totox-verdi (under 5) og oksidasjonsstabilitet.

Proteinhydrolysat ble i pilotskala produsert med en blanding av Papain og Bromelain som i lab-forsøk ga minst bittersmak. Den kjemiske sammensetningen av de ulike fraksjonene produsert i pilotskala ble karakterisert. Teknologisk var håndteringen av sildebein det største problemet, og ved design av prosessutstyr må det tas spesielt hensyn til dette.

**SINTEF Fiskeri og havbruk AS**

Postadresse: 7465 Trondheim
Besøksadresse:
SINTEF Sealab
Brattørkaia 17C

Telefon: 4000 5350
Telefaks: 932 70 701

E-post: fish@sintef.no
Internet: www.sintef.no

Foretaksregisteret: NO 980 478 270 MVA

SINTEF RAPPORT

TITTEL

**Prosessering av biråstoff fra sild til olje og proteinhydrolysat.
Laboratorieforsøk med ulike proteaser og pilotforsøk med
ultraferskt råstoff.**

FORFATTER(E)

Rasa Slizyte, Leif Grimsmo og Ivar Storrø

OPPDRAGSGIVER(E)

Modolv Sjøset Pelagic AS

RAPPORTNR. SFH80 A105063	GRADERING Åpen	OPPDRAGSGIVERS REF. Sverre Hyttan	
GRADER. DENNE SIDE Åpen	ISBN 978-82-14-05104-9	PROSJEKTNR. 850313.01	ANTALL SIDER OG BILAG 47
ELEKTRONISK ARKIVKODE 101108 SINTEF RAPPORT prosessing av sildebiråstoff..docx	PROSJEKTLEDER (NAVN, SIGN.) Ivar Storrø <i>Ivar Storrø</i>	VERIFISERT AV (NAVN, SIGN.) Stein Ove Østvik <i>Soq.</i>	
ARKIVKODE	DATO 2010-11-02	GODKJENT AV (NAVN, STILLING, SIGN.) Marit Aursand <i>Marit Aursand</i>	

SAMMENDRAG

Denne rapporten beskriver produksjon av olje og proteinhydrolysat fra frosset og ferskt biråstoff fra sild. Det er utført laboratorieforsøk med ulike enzymer for produksjon av proteinhydrolysater fra frosset råstoff. Pilotforsøk er utført i 500 L skala for produksjon av proteinhydrolysat og olje fra fersk råstoff ved Modolv Sjøsets anlegg på Træna. Tre ulike prosesskonfigurasjoner ble testet for produksjon av olje og hydrolysat. Både proteinfraksjonene og oljen ble karakterisert. Laboratorieforsøkene med frosset råstoff viste at ulike enzymer ga ulik bitterhet på hydrolysatene, mens kjemiske analyser av hydrolysatene ikke viste stor forskjell. Kinetiske studier viste at enzymer i silda kan bidra sterkt til hydrolysen. Enkelte kommersielle enzymer gjorde jobben raskere enn forventet, slik at oljeutbyttet for enkelte enzymer avtok ved lengre hydrolysetid enn 30 min. Pilotforsøkene viste at det lot seg gjøre å produsere olje med god kvalitet både ved direkte oppvarming og etter hydrolyse. Selv om det ikke var tatt spesielle hensyn for å beskytte oljen mot oksidasjon, var oksidasjonsstatus etter produksjon lav. Også oksidasjonsstabiliteten var høy. Spesielt var innholdet av frie fettsyrer lavt (0,12% - 0,29%) noe som bekrefter at råstoffet var ferskt og at oljen ikke var nedbrutt. Proteinhydrolysat ble i pilotskala produsert med en blanding av Papain og Bromelain som i lab forsøk ga minst bittersmak. Det er også vist at prosessbetingelsene påvirker bitterheten i proteinhydrolysatene. Den kjemiske sammensetningen av de ulike fraksjonene produsert i pilotskala ble også karakterisert. Teknologisk var håndteringen av sildebein det største problemet, og ved design av prosessutstyr må det tas spesielt hensyn til dette. En del av analysene ble utført i større detalj på grunn av samkjøring med prosjektet "Gull fra havets sølv", finansiert av Fiskeri og Kystdepartementet og Utenriksdepartementet.

STIKKORD	NORSK	ENGELSK
GRUPPE 1	Foredlingsteknologi	Processing technology
GRUPPE 2	Biprodukter	By-products
EGENVALGTE	Sild	Herring
	Pilotproduksjon	Pilot production
	Enzymteknologi	Enzyme technology

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Bakgrunn.....	3
2	Prosjektets målsetting	3
2.1	Kommentarer til måloppnåelsen.....	4
3	Screening av ulike hydrolyseenzymers effektivitet i laboratorieskala	5
3.1	Målsetting	5
3.2	Utførelse.....	6
3.2.1	Råstoff.....	6
3.2.2	Hydrolyseforsøk.....	7
3.3	Resultater	11
3.3.1	Utbytter og kinetikk under hydrolysen	12
3.3.2	Kvalitet på forskjellige fraksjoner.....	16
3.3.2.1	Olje	16
3.3.2.2	Hydrolysat og sediment.....	17
3.4	Konklusjoner.....	25
4	Test av ulike prosesskonsepter i pilotanlegg.....	27
4.1	Bruk av mobilt pilotanlegg for produksjon av marine oljer og proteinfraksjoner ved Modolv Sjøset Pelagic.....	27
4.1.1	Beskrivelse av mobilt prosessanlegg	27
4.2	Direkte produksjon av olje.....	29
4.3	Produksjon av hydrolysat og olje ved hydrolyse og etterfølgende separasjon	30
4.4	Produksjon av hydrolysat og olje ved oljeseparering og etterfølgende hydrolyse	31
4.5	Resultater	32
4.5.1	Olje.....	32
4.5.1.1	Kvalitetsanalyser	32
4.5.1.2	Resultater	33
4.5.2	Hydrolysater.....	35
4.5.3	Sedimenter	38
4.6	Konstruksjonsmessige særegenheter hos anlegget for prosessering av biråstoff fra sild.....	40
4.7	Konklusjoner.....	40
5	Oppsummering	41
6	Acknowledgement	42
7	Referanser	43
8	Vedlegg	44

1 Bakgrunn

Den pelagiske industrien produserer store mengder biråstoffer. I 2009 ble det i Norge produsert totalt 291 000 tonn med biråstoff fra pelagisk industri (1). Dette biråstoffet ble tilnærmet fullt utnyttet i fiskeolje- og fiskemelindustrien, eller prosessert via ensilasje til ensilasjemel og ensilasjeolje. Etersom biråstoff fra pelagisk industri kommer fra næringsmiddelgodkjent råstoff og produksjon, er det ønskelig å opprettholde denne kvaliteten også på produkter som kan produseres fra dette biråstoffet. I lakseindustrien er det vist at produkter som produseres fra biråstoff umiddelbart etter sløyning har meget høy kvalitet. Spesielt oljer produsert fra meget ferskt råstoff har en lav grad av oksidasjon og høy stabilitet. Ved bruk av ny teknologi som kontrollert hydrolyse, er det mulig å produsere proteinhydrolysater fra proteinfraksjonen. Disse proteinhydrolysaterne kan ha både funksjonelle-, ernæringsmessige- og bioaktive egenskaper som gjør de interessante i mange markeder.

2 Prosjektets målsetting

Målsettingen med SINTEFs oppdrag var, som angitt i prosjektilbudet:

1. Produsere ren olje fra ferskt sildebiråstoff. Det produseres for EPAX 2 * 30 liter sildeolje fra ferskt sildebiråstoff levert fra Modolv Sjøset. Sildeoljen produseres ved henholdsvis 90 grader og 50 grader. Oljen fylles på kanner som leveres fra EPAX. Denne oljen produseres uten hydrolyse.
2. Produsere sildeolje, flytende hydrolysat og uløselig masse (grakse) fra tradisjonell prosess med hydrolyse av sildebiprodukter utført med kommersielt enzym og påfølgende oljeseparering.
3. Produsere sildolje og flytende hydrolysat fra prosess og grakse, hvor oljen skilles først fra oppvarmet biråstoff. Biråstoffet hydrolyseres og flytende hydrolysat og grakse separeres..
4. Analyser av produserte produkter
5. Rapportering

2.1 Kommentarer til måloppnåelsen.

1. Det ble produsert ren olje fra ferskt biråstoff til EPAX, totalt ble det levert 20 L som ble godkjent av EPAX som tilstrekkelig for deres videre arbeid. Sildeoljen skulle etter forslag fra SINTEF tas ut ved henholdsvis 90 og 50 grader. 90 grader ble valgt for å kunne få en sammenligning med dagens vanlige sildoljeproduksjon, og 50 grader ble valgt for om mulig å produsere en olje som var svært lite varmebehandlet. Den produserte oljen ble separert etter oppvarming av råstoffet til 70 ± 10 grader, grunnet kapasitetsproblemer i kvernen som skyltes den høye beinandelen i råstoffet. EPAX var fornøyd med produksjonstemperaturen idet den representerte olje uttatt fra sild ved lavere varmebelastning enn konvensjonell sildeoljeproduksjon. Det ble ikke forsøkt å produsere olje ved 50 grader.
2. I andre forsøk ble oppvarming, og hydrolyse og inaktivering av enzymet utført som planlagt. Under tømning av hydrolysetank pakket utløpsventilen seg pga beinfraksjonen. Hydrolysatet ble derfor pumpet ut over tanktoppen og til trikanteren. Totalt ble det tatt ut ca 10 liter olje fra hydrolysatet.
3. I siste forsøk ble olje tatt ut etter oppvarming til 80-85 grader og ca 14 liter olje ble tatt ut. Limvannet ble ført til hydrolysetanken. Graksen som ble tatt ut fra trikanteren hadde en konsistens med høyt tørrstoff og stor klebeevne som ikke tillot pumping til hydrolysetanken. Etter hydrolyse og inaktivering av enzymet ble det hydrolyserte limvannet separert i olje og hydrolysat fraksjon. Det var som forventet ingen tørrstoff fraksjon i det hydrolyserte limvannet. Totalt ble det tatt ut 25 L olje fra hydrolysefraksjonen.
4. Det ble tatt prøver fra alle forsøkene som umiddelbart ble kjølt ned i isvann og senere satt på fryserom. Prøvene ble analysert som beskrevet i denne rapporten.

Dette var første gang utstyret ble testet på pelagisk råstoff. Tidligere testinger var utført på lakseslo, og der fungerte utstyret problemfritt. I ettertid etter dette forsøket er kvernen forbedret og eventuelt alternative løsninger er under utvikling. Utløpet av hydrolysetanken er ombygget og en silløsning er satt inn i tanken som hindrer at bein blir et problem under videre prosessering av hydrolysatfraksjonen.

I dette forsøket var fokus på produksjon og kvalitetsbestemmelse av sildeolje produsert fra ultraferskt råstoff. Spesielt viktig var dokumentasjon av variasjonen i kvalitet ved ulike prosesseringsbetingelser. Utbyttet av olje var ikke fokus i dette prosjektet, da praktisk utbytte er avhengig av investert produksjonsutstyr, operasjonen av produksjonsutstyret og hvilke fraksjoner som skal optimaliseres. Alt etter hva som gir best uttelling i markedet kan prosessene fokuseres på maksimering av oljeutbyttet, limvannsutbyttet, hydrolysatutbyttet eller utbyttet av grakse og/eller annet uløselig tørrstoff.

3 Screening av ulike hydrolyseenzymers effektivitet i laboratorieskala

3.1 Målsetting

Målsettingen for laboratorieanalysene var tredelt:

1. **Valg av enzym.** Det er mange kommersielle enzymer tilgjengelig for hydrolyse av biråstoff fra fisk. I hydrolyseforsøket i pilotskala hos Modolv Sjøset var det bare mulig å utprøve ett eller et lite antall enzymer. For å finne et godt enzym som kunne benyttes i pilotforsøket ble flere enzymer og enzymblandinger testet i laboratorieskala. Av praktiske årsaker ble frosset samfengt biråstoff fra sild benyttet som råstoff i disse hydrolyseforsøkene.
2. **Måling av utbytter.** For å få en best mulig oversikt over virkemåten til de ulike enzymene ble utbytte som funksjon av hydrolysetid beregnet for alle fire fraksjoner (olje, emulsjon, hydrolysat og sediment).
3. **Måling av kvalitet.** Kvalitetsparametrene hos de ulike produserte produktene ble til slutt kvantifisert.

3.2 Utførelse

3.2.1 Råstoff

I laboratorieforsøkene ble frosset samfengt biråstoff fra Modolv Sjøset benyttet (Figur 1).



Figur 1. Tint biråstoff fra sild (foto: SINTEF Fiskeri og havbruk).

Restråstoffet var avskjær fra filetproduksjonen og besto av hoder, haler, buklist, ryggbein og innvoller. Magevolum (totalt innvoller) på denne tiden er ca 10 %. Temperatur på råstoffet før filetering var ca 0 °C . Avskjæret ble plukket ut under filetmaskiner mens produksjonen pågikk. Det ble umiddelbart pakket i vakuumposer a ca 10 kg og pakket i 20 kg kartonger (2 stk i hver). Deretter ble det frosset inn i frysetunell ned til ca -20 °C. Råstoffet ble transportert med frysebil fra Træna til Trondheim. Frosset råstoff ble tint over natten (til ca -1°C), kvernet med kjøttkvern (Figur 2) med 8 mm hull og lagret på is før hydrolyse.



Figur 2. Kverning av samfengt tint biråstoff fra sild på laboratoriet (foto SINTEF Fiskeri og havbruk).

3.2.2 Hydrolyseforsøk

Det ble utført åtte hydrolyseforsøk (Tabell 1). Seks forskjellige kommersielle enzymer (Tabell 1), enkeltvis eller i blanding ble benyttet i hydrolyseforsøkene. En kontrollhydrolyse uten tilsetning av kommersielle enzymer ble også utført. Denne hydrolysen inneholdt bare endogene enzymer – dvs. enzymer som opprinnelig er i silda. Betingelsene for forsøkene, som ble utført på fermenteringslaboratoriet ved SINTEF Materialer og kjemi, (Figur 3) er gitt i Tabell 1.

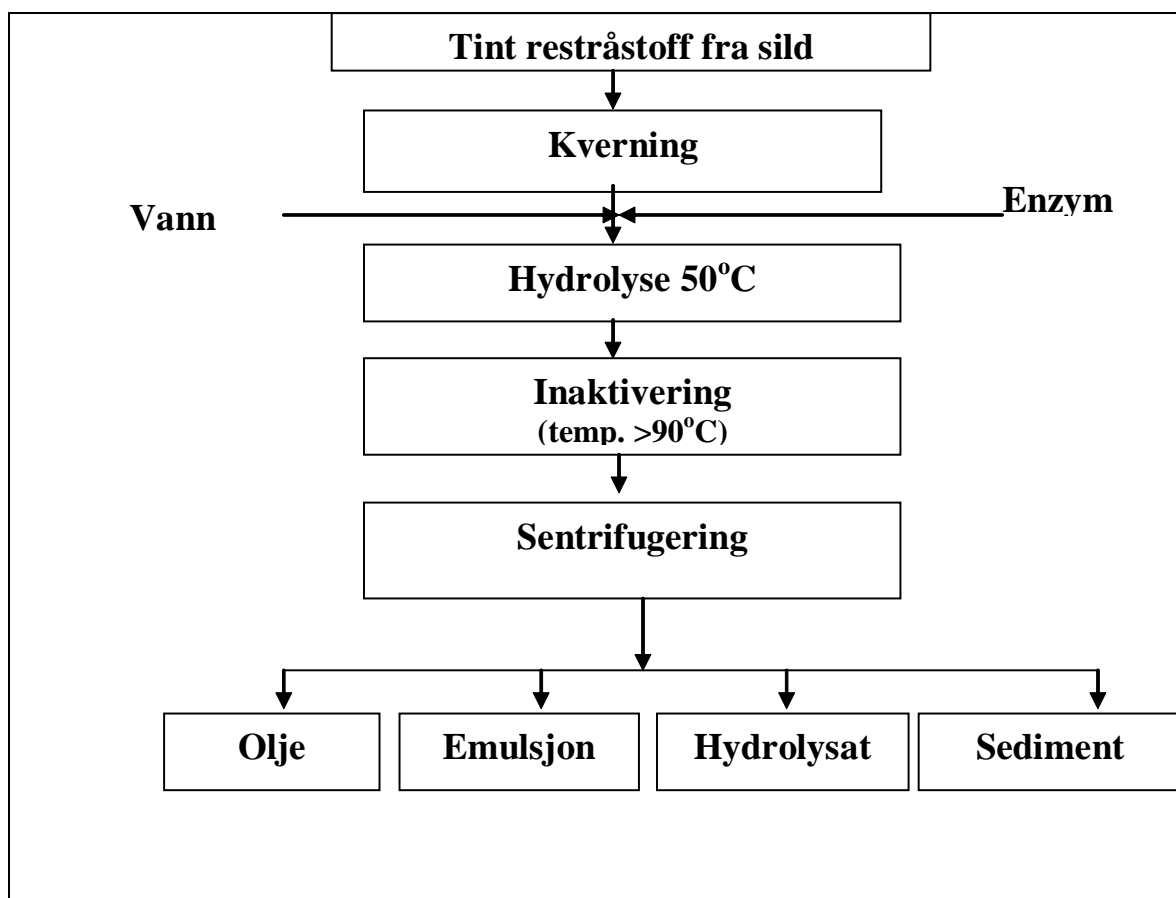


Figur 3. Hydrolyse i fermenteringslaboratoriet ved SINTEF Materialer og kjemi (foto SINTEF Fiskeri og havbruk).

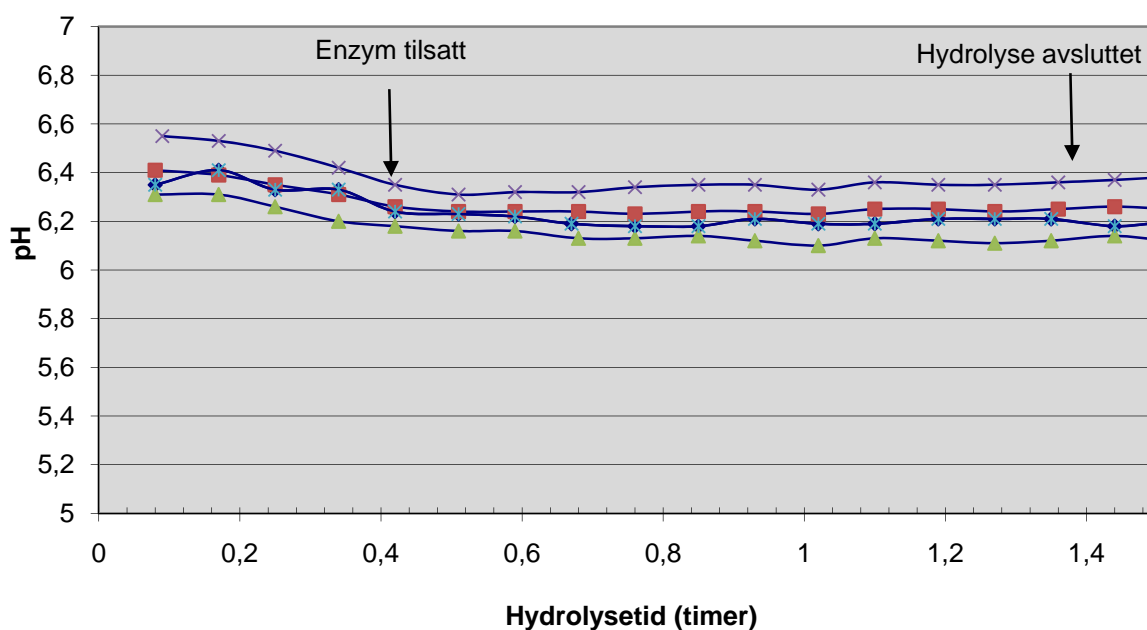
Tabell 1. Oppsett av hydrolyseforsøk.

Enzym	Enzym konsentrasjon (% på råstoffbasis)	Råstoff:Vann	Temperatur	Tid for prøveuttak for alle enzymer
Endogene	0,1	50:50	50°C	15 min
Alcalase				
Bromelain				
Flavorzyme				
Papain				
Papain+Bromelain (50:50)				
Promod 184P				
Protamex	60 min			

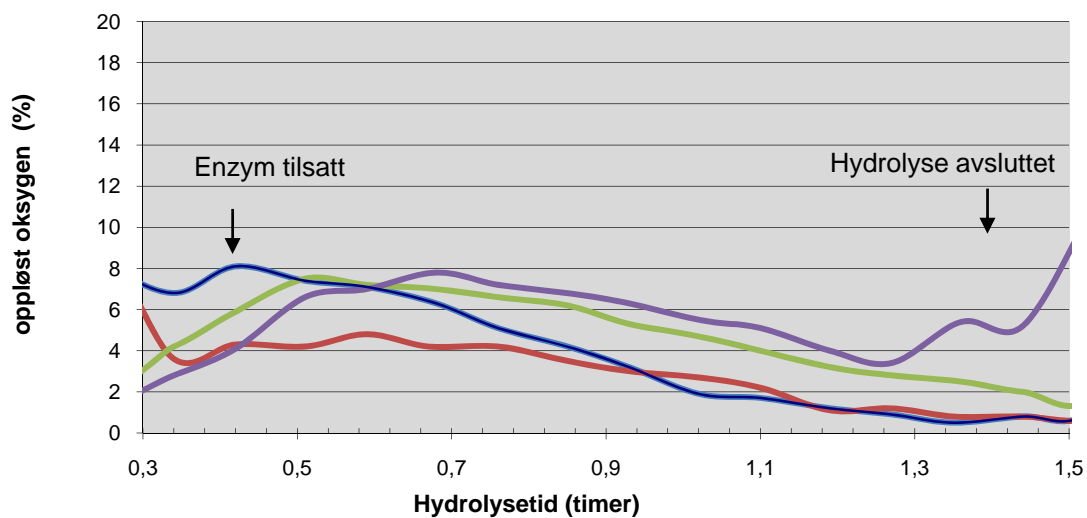
For å utføre hydrolyse (Figur 4) ble 1 liter varmt vann (ca 65 °C) tilsatt til 1 kg kvernet sildmasse. Temperaturen av vann og sildemassee i hydrolysereaktorene (som var utstyrt med en varmekappe) ble økt til prosess temperaturen på 50°C. Enzym (0,1 % av råstoffets våtvekt) ble tilsatt og hydrolysen ble utført under stadig omrøring i 1 time. For å følge hydrolysens kinetikk ble en representative prøver av hvert hydrolysat (100 ml) tatt ut hvert femtende minutt. I den uttatte prøven ble enzymet inaktivert gjennom en temperaturøkning til 90°C grader i en mikrobølgeovn. Inaktiverte hydrolysater ble sentrifugert ved ca 3500*g i 5 minutter for å fremkalle fase separering (Figur 7) og ble deretter fryst inn umiddelbart uten at fase separasjonen ble ødelagt. Løst oksygen og pH ble kontinuerlig logget under hele hydrolyseprosessen (Figur 8). Data er viste i Figur 5, Figur 6 og i vedlegg.



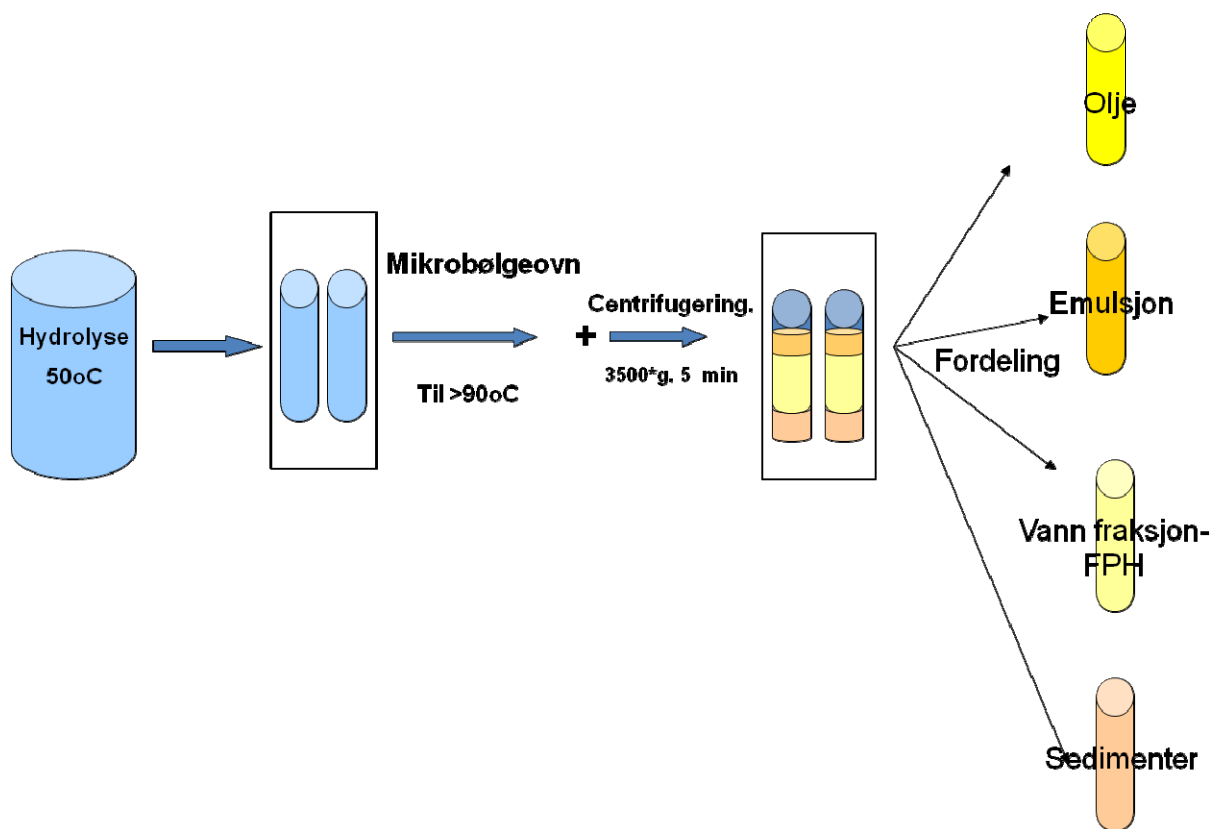
Figur 4. Flytskjema som viser hydrolyse i lab skala.



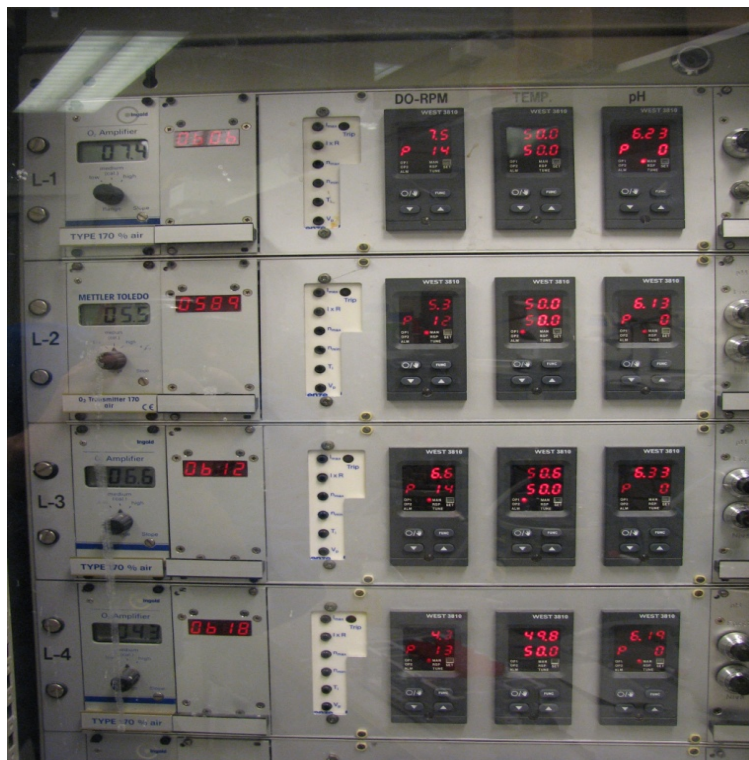
Figur 5. Eksempel på logging av pH under hydrolysen (hydrolyser med følgende enzymer: endogene, Alcalase, Bromelain og Flavourzyme).



Figur 6. Eksempel på logging av oppløst oksygen under hydrolysen (hydrolyser med følgende enzymer: endogene, Alcalase, Bromelain og Flavourzyme).



Figur 7. Oversikt over prøvepreparering av prøver fra hydrolyseforsøket i laboratorieskala.



Figur 8. Utstyr for automatisk logging av temperatur, pH, oksygenmetning og omrøringshastighet i hydrolysereaktorene (foto SINTEF Fiskeri og havbruk).

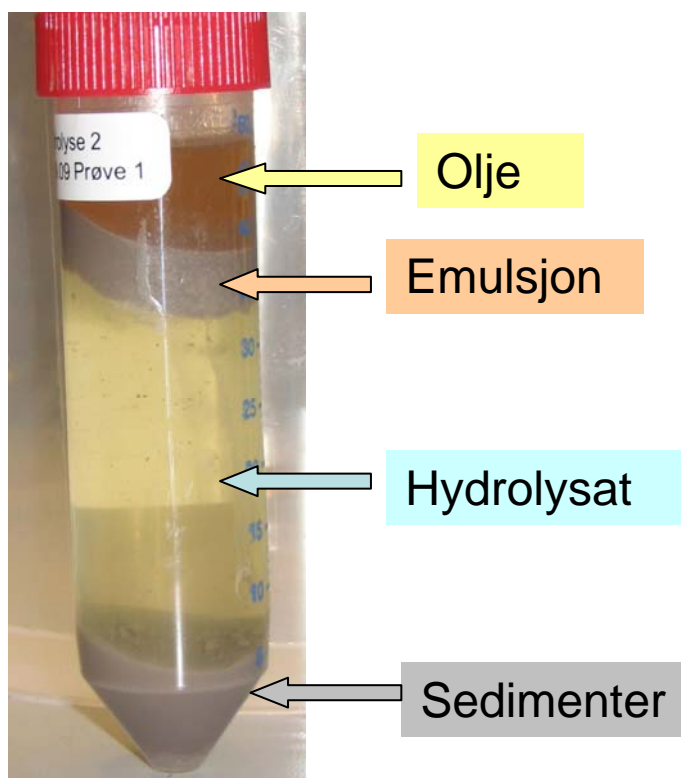
3.3 Resultater

Totalt ble 8 forskjellige hydrolyseforsøk utført. I alle hydrolyseforsøkene ble prøve tatt hvert femtende minutt. Figur 8 viser produktene fra enzymhydrolysen i form av en inaktivert og sentrifugert prøve. Mengdefordeling av fasene vil variere avhengig av sammensetning og kvalitet av råstoff og hydrolyse betingelser (hydrolysetid, temperatur, mengde av tilsatt vann, enzymmengde og enzymtype). Figur 9 viser et vanlig bilde når lipidrikt biråstoff hydrolyseres. Hos de fire fraksjonene er følgende utbytte ønskelig:

- Størst mulig oljefraksjon,
- Minst mulig emulsjonsfraksjon
- Størst mulig hydrolysatfraksjon
- Minst mulig sedimentfraksjon.

I tillegg er følgende kvalitetskriterier viktige for produktene:

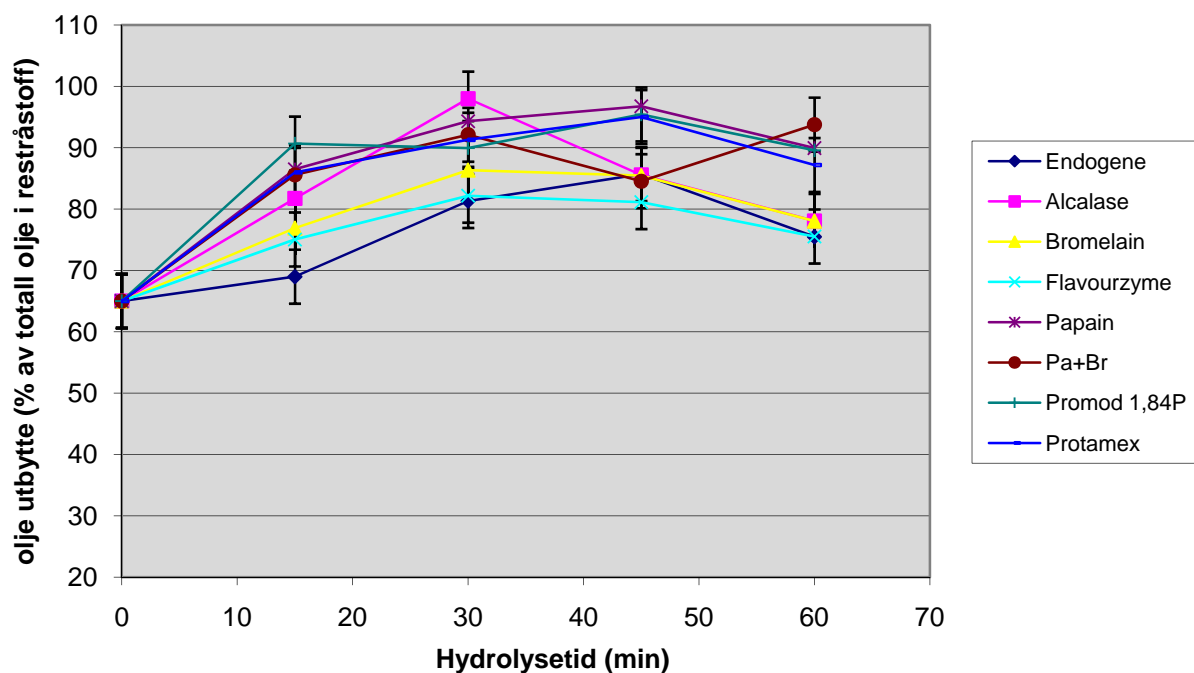
- Olje må ikke være oksidert og den må være oksidativ stabil.
- Hydrolysatet må inneholde minst mulig olje, da lagringsstabiliteten i hydrolysatet ofte begrenses av lipidoksidasjon.
- Lipidmengde bør generelt være mindre en 0,5 % i tørket hydrolysatpulver (2).



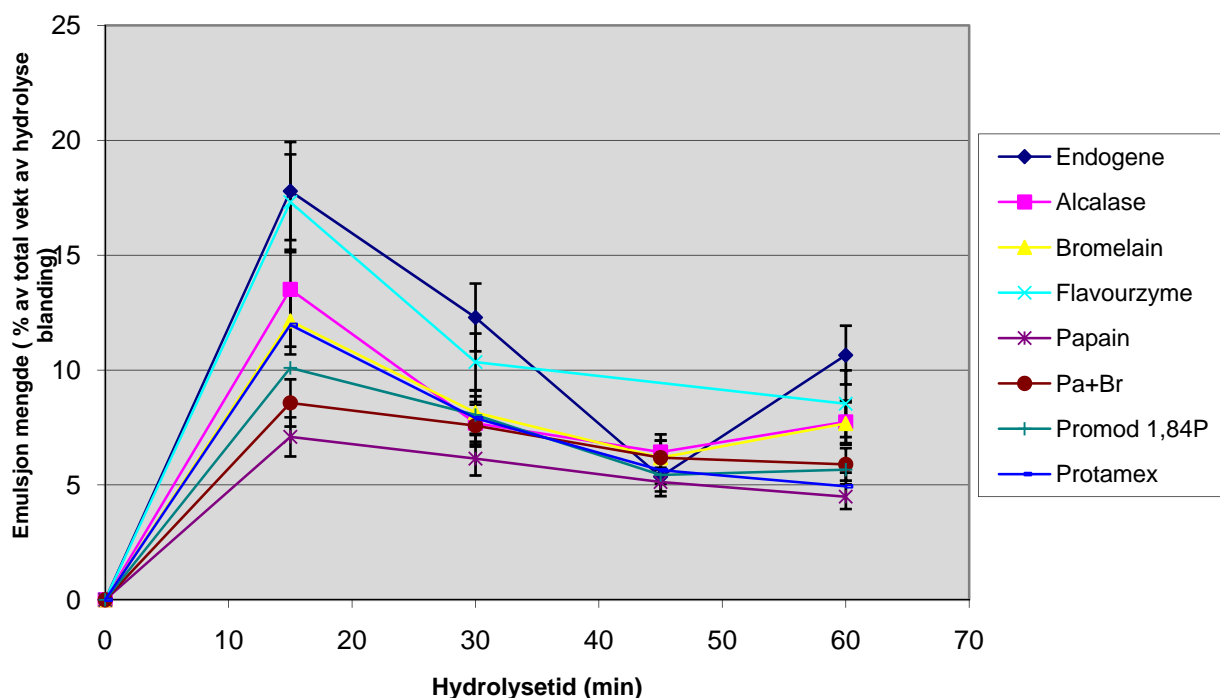
Figur 9. Sentrifugerør som viser de ulike fasene etter enzymbehandling, inaktivering og sentrifugering av sildebiråstoff (foto SINTEF Fiskeri og havbruk).

3.3.1 Utbytter og kinetikk under hydrolysen

Biråstoffet fra sild som ble brukt i laboratorieforsøkene var produsert i september som er en tid hvor NVG (Norsk Vårgytende Sild)-sild inneholder mye fett. Biråstoffet innholdt ca. 25% fett på basis av våtvekt. Ved bruk av forskjellige enzymer man kan separere opp til 95 % av oljen som er i utgangsmaterialet (Figur 10). Kinetikk av oljeutbytte som er vist i Figur 10 indikerer at en hydrolysetid på 30-45 minutter er vinduet hvor en kan skille ut den høyeste mengden av olje. Lengre hydrolysetid kan føre til redusert oljeutbytte. En årsak til dette kan være emulsjonsdannelse ved lengre hydrolysetid. Figur 11 viser at mengde av uønsket emulsjon for de fleste hydrolyser avtar inntil 45 minutter hydrolysetid, men begynner å øke igjen ved lengre hydrolyse. Det kan bety at en del av oljen som først var frigjort ved hydrolyse etter hvert emulgeres og havner i emulsjonsfraksjonen. Resultater fra oljeutbytte og emulsjonsdannelse viser at en blanding av enzymene Papain og Bromelain (50/50) og Protamex er de beste enzymer blant de studerte når det gjelder å frigjøre olje uten kraftig dannelse av uønsket emulsjon.

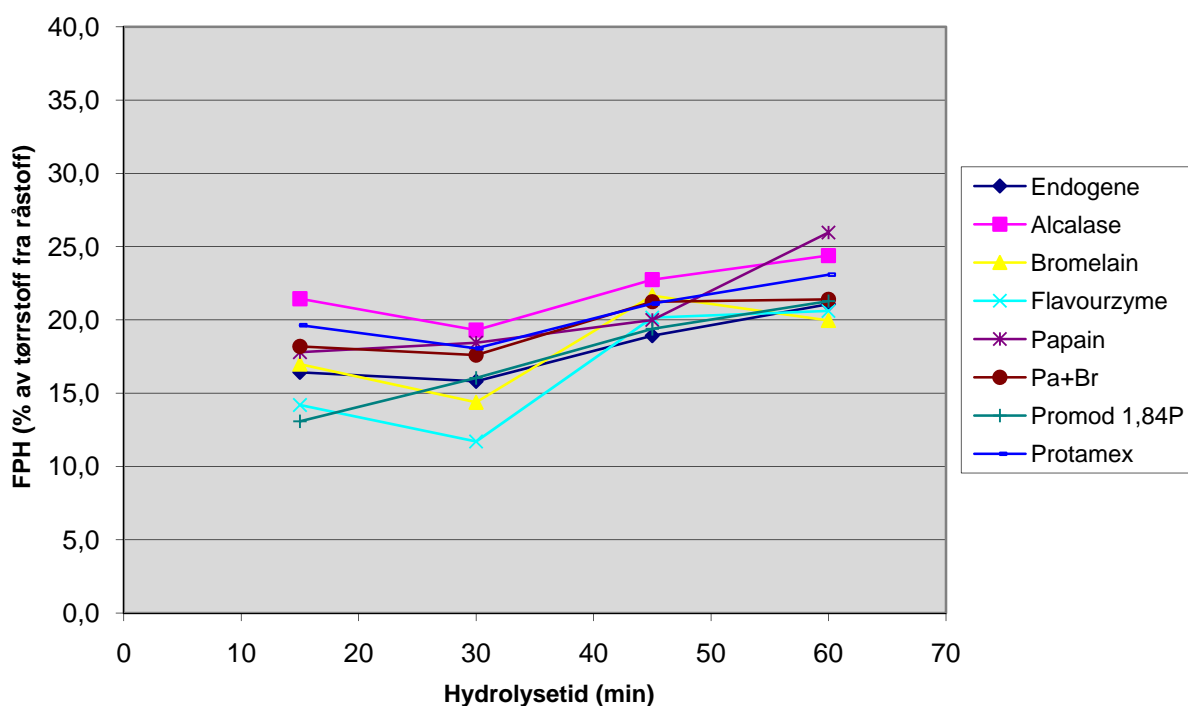


Figur 10. Oljeutbytte som funksjon av ulike enzymer og hydrolysetid. Totalt olje i biråstoff var 25 % av våtvekt bestemt ved Bligh & Dyers metode.

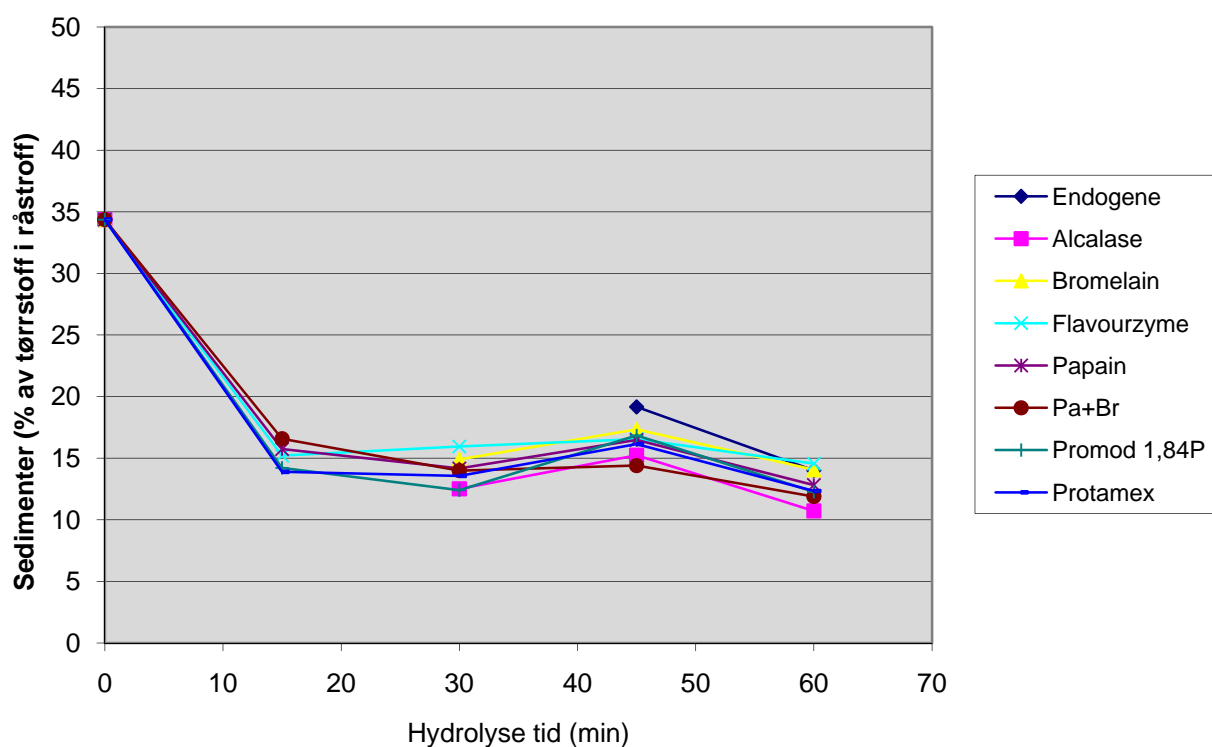


Figur 11. Dannelse av emulsjonsfraksjon som funksjon av forskjellige enzymer og hydrolysetid, oppgitt i % av total vekt av hydrolyseblending (råstoff: vann-50:50).

Figur 12 viser totalt tørrvektinnhold av oppløste stoffer i hydrolysatfraksjonen (vannfraksjonen) som funksjon av totalt tørrstoff i råstoffet. En liten nedgang i tørrvektinnholdet ble observert mellom 15 til 30 min hydrolysetid og dannelse av emulsjon kan være forklaringen til dette. Videre hydrolyse (opp til 60 min) ga økt mengde av tørrvekt i hydrolysatfraksjonen. Alcalase, Papain og Protamex var de enzymer som ga den største mengden av oppløste stoffer i hydrolysatfraksjonen (FPH). En korresponderende motsatt tendens ble observert med totalt tørrvektinnhold i sedimentfraksjonene: det totale tørrvektinnholdet i disse avtok med hydrolysetiden. Alcalase, blanding av Papain og Bromelain (50/50) og Protamex ga den minste sedimentfraksjonen. Dette viser at enzymer under hydrolysen bryter ned proteiner som ellers ville ha havnet i bunnfallet.



Figur 12. Økning av mengde fiskeproteinhydrolysater (FPH) som funksjon av hydrolysetiden for ulike enzymer.



Figur 13. Nedgang i sedimentfraksjonen som funksjon av hydrolysetiden for ulike enzymer.

Ved å sammenligne kinetikkdata og mengden av de forskjellige fraksjonene som dannes under hydrolysen kan de beste enzymer- eller blandinger av enzymer selekteres. De beste enzymer er de som frigjør mest olje, oppløser mest proteiner (størst andel av tørrstoff i hydrolysatet) og danner minst mulig emulsjon. Blant de enzymene som var brukt i studien var blandingen av Papain og Bromelain (50/50) og Protamex de beste.

Kinetikkdataene viser at det er forskjell på optimal hydrolysetid om man ønsker mest mulig olje eller om man ønsker mest mulig av tørrstoffet i hydrolysatet. For optimal oljeseparasjon ser en hydrolysetid på 30 til 45 min være optimal ved 50 °C. Proteinhydrolysen øker med hydrolysetiden også ut over de 60 min som var forsøketts varighet. Det bør påpekes at hydrolysen ble kjørt ved 50 °C, mens en del enzymprodusenter angir at optimaltemperaturen for deres enzym ligger ved 55-60 °C (se vedlegg).

3.3.2 Kvalitet på forskjellige fraksjoner

3.3.2.1 Olje

3.3.2.1.1 Kvalitetsanalyser

Viktige kvalitetsparametre for oljen er:

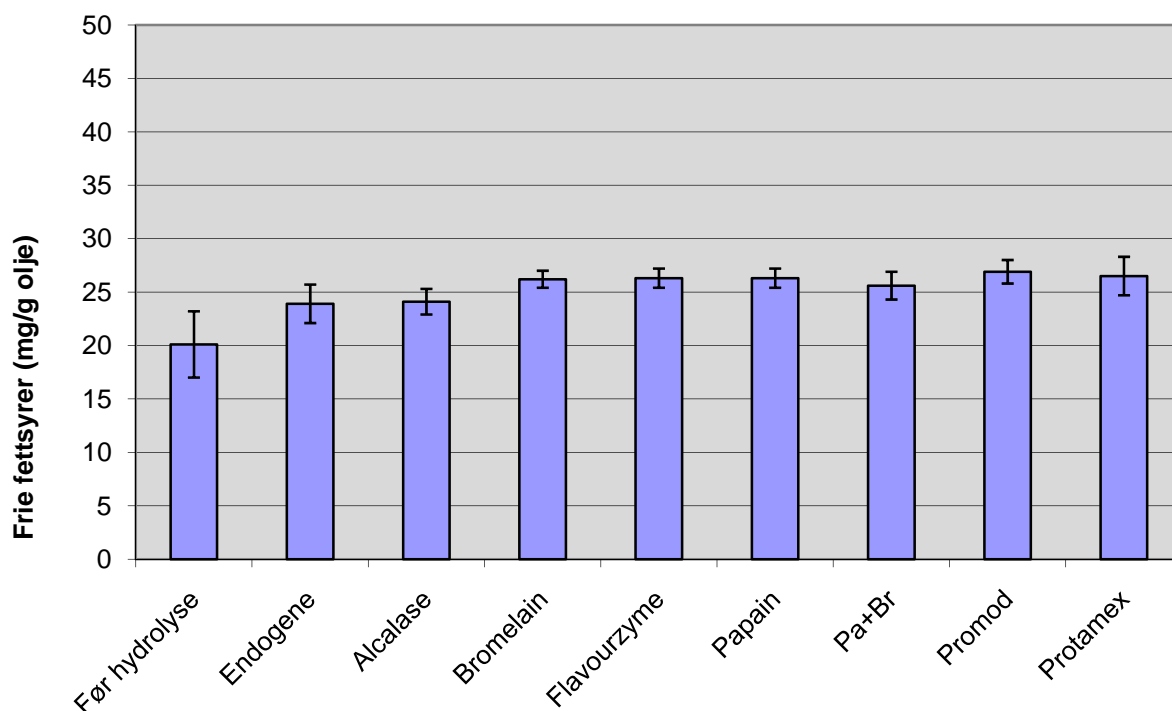
- Kjemisk sammensetning
- Oksidasjonsstatus
- Oksidasjonsstabilitet

Kjemisk sammensetning ble bestemt vha Iatroscan (kvantitativ tynnskikt-kromatografi) hvor de ulike lipidklassene (triglycerider, diglycerider, monoglycerider, frie fettsyrer, fosfolipider, kolesterol og kolesterollestere) kan kvantifiseres (3). Oksidasjonsstatus og oksidasjonsstabilitet ble ikke bestemt i oljer fra disse forsøkene, da dette var forsøk utført i liten skala. Forsøk i liten skala er vanligvis ikke representative for industriell produksjon da innblandingen av oksygen (overflate til volumforhold) ikke er den samme.

3.3.2.1.2 Resultater

Mengden triglycerider i oljen ble bestemt til 97 %. Innholdet av fosfolipider, mono- og diglycerider var mindre enn 2 %. Kvaliteten på oljeen ble bestemt med måling av mengden av frie fettsyrer i oljen med bruk av tynnskikt-kromatografi (3). Figur 14 viser at olje separert fra frosne biproduktene før hydrolyse i liten skala inneholder 20,1 mg frie fettsyrer per g olje (2,1 %), mens olje separert fra ferskt råstoff hos Modolv Sjøset (Tabell 5) inneholdt kun 0,1-0,3% frie fettsyrer. Dette tyder på at en del lipidhydrolyse skjedde i råstoffet til labbhydrolysene under lagring før innfrysning eller under innfrysning.

Mengden av frie fettsyrer i olje separert etter 60 min hydrolyse med ulike enzymer ga ca. 24-26 mg frie fettsyrer per g olje (2,4 – 2,6 %) og indikerer at lipidhydrolyse også foregår i løpet av en times hydrolyse ved 50 °C og øker fettsyrekonsentrasjonen med 0,3-0,5 %. Likevel er økningen i mengden av frie fettsyrer ikke stor, og forskjellen mellom olje separert etter hydrolyse med ulike enzymer er ikke betydelig. Skal man trekke noen konklusjon på grunnlag av disse data, så ser Alcalase ut som det enzymet som er minst kontaminert med lipaser. Alcalase gir minst lipidhydrolyse, da mengden av frie fettsyrer ved bruk av Alcalase ikke har økt mer enn ved hydrolyse med kun endogene enzymer.



Figur 14. Mengde av frie fettsyrer i olje separert etter 60 min hydrolyse med ulike enzymer. Resultatene er presentert som snittverdier med standardavvik.

3.3.2.2 Hydrolysat og sediment

Prøver fra hydrolysereaktorene ble behandlet som vist i Figur 7.

3.3.2.2.1 Kvalitetsanalyser

Viktige kvalitetsparametere for fiskeproteinhydrolysat (FPH) er:

- Kjemisk sammensetning
- Hydrolysegrad
- Molekylvektfordeling av produserte peptider
- Bitterhet

Kjemisk sammensetning. Lipidinnhold ble bestemt med Blich and Dyers metode (4). Bestemmelse av **proteininnhold** ble beregnet ut fra mengde av N i prøven (Costech Instruments ECS 4010 CHNSO Analysator) ved multiplisering med en generell proteinfaktor på 6,25. **Bestemmelse av hydrolysegrad** i hydrolysatene ble utført ved hjelp av formoltitrering (5). **Molekylvektfordeling** på hydrolysater ble bestemt med "Size Exclusion Chromatography" på FPLC (AKTA FPLC Amersham, Bioscience instrument): kromatografert med væskehastighet på 0,5 ml/min og med 50 mM Imidazole Buffer (pH 7) som mobilfase. Kolonnen som ble benyttet ved analysen var Superdex G75 kolonner med aktivt separasjonsområde på 3 000 – 70 000 Da

(mer info i vedlegget). Deteksjon ble foretatt ved adsorpsjonsmåling av eluatet ved 280 nm, som er absorpsjonsområdet for aminosyrene med aromatisk ring (tryptofan, tyrosine og fenylalanin). De følgende standarder ble brukt for å evaluere molekylevektfordeling i prøver: LMW kalibrering kit for SDS elektroforeses (Amersham Bioscience, UK) som inneholder: Phosphorylase (Mw 97 000), albumin (Mw 66 000), ovalbumin (Mw 45 000), Carbonic anhydrase (Mw 30 000), Trypsin inhibitor (Mw 20 100), α -Lactalbumin (Mw 14 400). Som enkl standard ble benyttet Cytochrome C (Mw 12 400).

Bitterhet av FPH ble evaluert av et utvalg av dommere som var selektert for å ha høy sensitivitet for bittersmak. Hydrolysatenes bitterhet ble vurdert i en 1 % løsning av frysetørket FPH i rent vann. Forskjellstest med bruk av skala (1 til 8 og 1 til 6: avhengig av mengde av prøver i testen) ble benyttet. Dommere måtte i disse testene plassere en serie prøver i rekkefølge etter intensiteten av bitterhet i hydrolysatløsningen. Den mest bitre prøven fikk høyeste poengsum og minst bitter fikk laveste poengsum.

3.3.2.2.2 Resultater

Lipidinnholdet i fiskeproteinhydrolysaten (FPH) ble bestemt etter frysetørking av vannfraksjonen og resultatene er vist i Tabell 2.

Tabell 2. Lipider i tørket FPH pulver.

	Lipidkonsentrasjon (% av tørrvekt FPH)
Før hydrolyse	2.3±0.3
Etter hydrolyse	
Endogene enzymer	1.0±0.1
Alcalase	1.1±0.1
Protamex	0.7±0.1
Promod 184P	0.7±0.1
Bromelain	1.2±0.1
Papain	1.1±0.1
Pa+Br	0.8±0.1
Flavourzyme	1.3±0.1

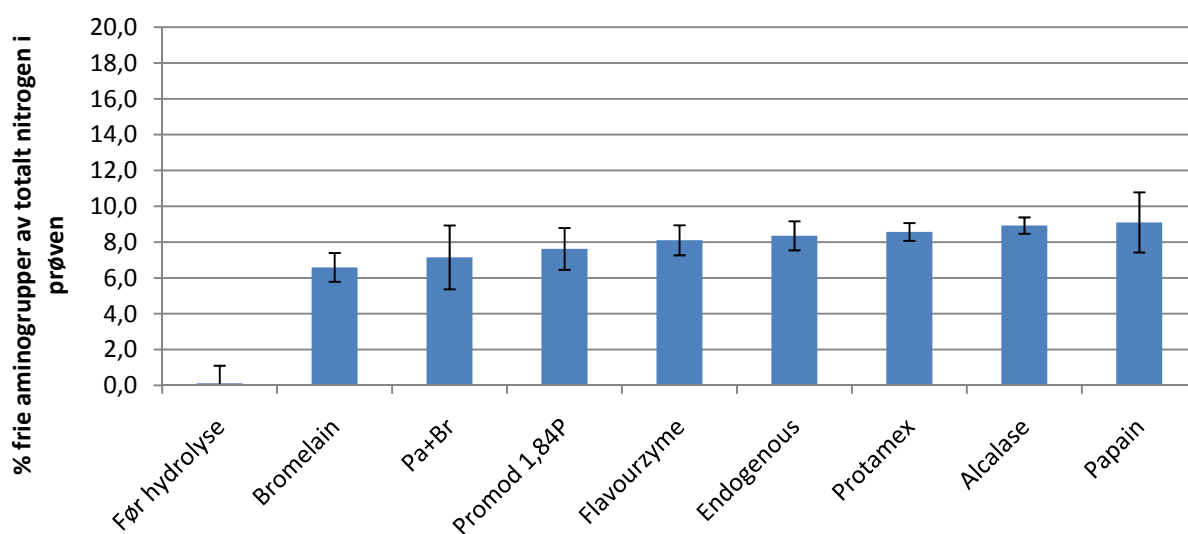
Før tilsats av kommersielle enzymer inneholdt limvannene (separerbar vannfraksjon) 2,3 % lipider og etter hydrolysen hadde mengden av lipider i FPH-pulver sunket til gjennomsnittlig 1,0±0,2 % (Tabell 2), en reduksjon på mer enn 50 %. Men ingen av pulverne inneholdt lipider i konsentrasjoner lavere en 0,5 %, som er oppgitt å være en mulig grense for oksidative stabile produkter ved lagring (2). Det må her bemerkes at lipidkonsentrasjonen kan reduseres ytterligere ved

bedre separasjon mellom fasene og et renere skille mellom emulsjonsfasen og hydrolysafasen. Blant de enzymene som ble benyttet i studien ga en blanding av Papain og Bromelain (50/50) eller Promod eller Protamex et FPH pulver med de laveste konsentrasjoner av lipider (0,7-0,8 %).

Hydrolysegrad

Ved proteolytisk hydrolyse spaltes proteiner og det dannes kortere peptider og frie aminosyrer. Ved spaltning av proteiner øker antall N-terminaler (NH₂) og C-terminaler (COOH) og gjennomsnittelig størrelse på proteinene avtar. Ved bestemmelse av hydrolysegrad er det de frie NH₂ grupper som kvantifiseres og hydrolysegrad beregnes som antall spaltede peptidbindinger av totalt mengde av N i prøven.

Analysen av hydrolysegrad viser at alle hydrolysater produsert med forskjellige enzymer har lik hydrolysegrad som ligger på ca. 36 % (Figur 16). Oppmalt biråstoff, som ble analysert før tilsetning av kommersielle enzymer, hadde allerede høy hydrolysegrad (29 %). Disse verdier viser at formoltreringen ikke bare angir mengden angir frie NH₂ grupper etter hydrolyse, men at verdiene har et betydelig innslag av av interfererende nitrogengrupper. Det er kjent at sild inneholder en lang rekke nitrogenekstraktiver som ikke er av protein- eller peptidnatur (6) og disse kan influere på målemetoden. Hvorvidt det har skjedd en begrenset proteinhydrolyse i råstoffet under nedfrysning, transport og opptining er det ikke mulig å lese ut fra disse data. Hydrolysegrad bestemt for ferskt råstoff analysert hos Modolv Sjøset er funnet til ca 20 % (Figur 27). Denne differansen på 9 % antyder at det er skjedd en hydrolyse før råstoffet kom fram til laboratoriet og før det ble benyttet til de ulike hydrolyseforsøkene. Netto økning i hydrolysegrad etter hydrolyse er gitt i Figur 15 .



Figur 15. Netto økning i frie aminogruupper dannet etter hydrolyse ved 45 min med ulike enzymer.

Det er ingen store forskjeller på hydrolysegraden ved tilsats de ulike enzymene. Man kan ane en større produksjon av alfa aminogrupeer (som angir oppkutting av proteinene) fra eksopeptidasene som Alcalase og Papain, mens de enzymer med et sterkere innslag av exopeptidaseaktivitet som Bromelain og Flavourzyme har litt lavere produksjon. At hydrolysegrader er lavere i noen forsøk tilsatt kommersielle enzymer, sammenlignet med kontrollhydrolysen med kun de endogene enzymene, kan skyldes at de endogene enzymene degraderer de tilsatte kommersielle enzymene.

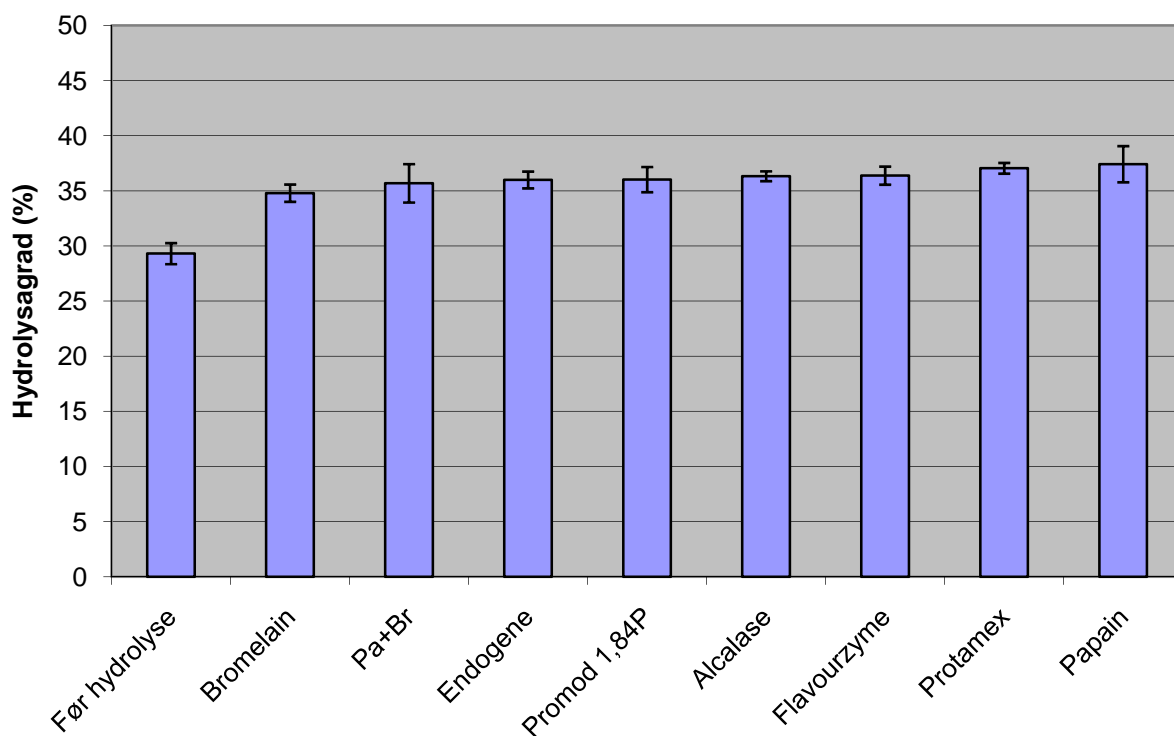
Hydrolysegraden oppnådd med bare endogene enzymer indikerer at bruk av kommersielle enzymer kanskje ikke er nødvendig i de tilfellene råstoffet har meget aktive endogene enzymer. De enzymer som her er kalt endogene enzymer kan ha to opphav. Det kan være sildas egne, hovedsakelig fordøyelses enzymer, og i tillegg enzymer i sildas åteinhold. Hvor stor effekt de ulike enzymene har på hydrolysen er ikke studert i dette arbeidet, Det er for en videre utvikling av hydrolyseprosessen for biprodukter fra sild viktig å få avklart åteinholdets påvirkning av hydrolysen. Varierende enzymaktivitet på grunn av åteinhold vil medføre variasjoner i det produserte hydrolysat både med hensyn på hydrolysegrad og bitterhet. Ønskes det å oppnå et mest mulig stabilt hydrolyseprodukt bør alle endogene enzymer inaktiveres ved oppvarming før hydrolyse. Hydrolysen utføres da kun med kommersielle enzymer. En annen mulighet kan være å utføre hydrolysen på biråstoff som ikke inneholder mage og tarmfraksjonen og således få et råstoff for hydrolyse som er noenlunde stabilt med hensyn på enzymaktivitet.

Molvektsfordeling

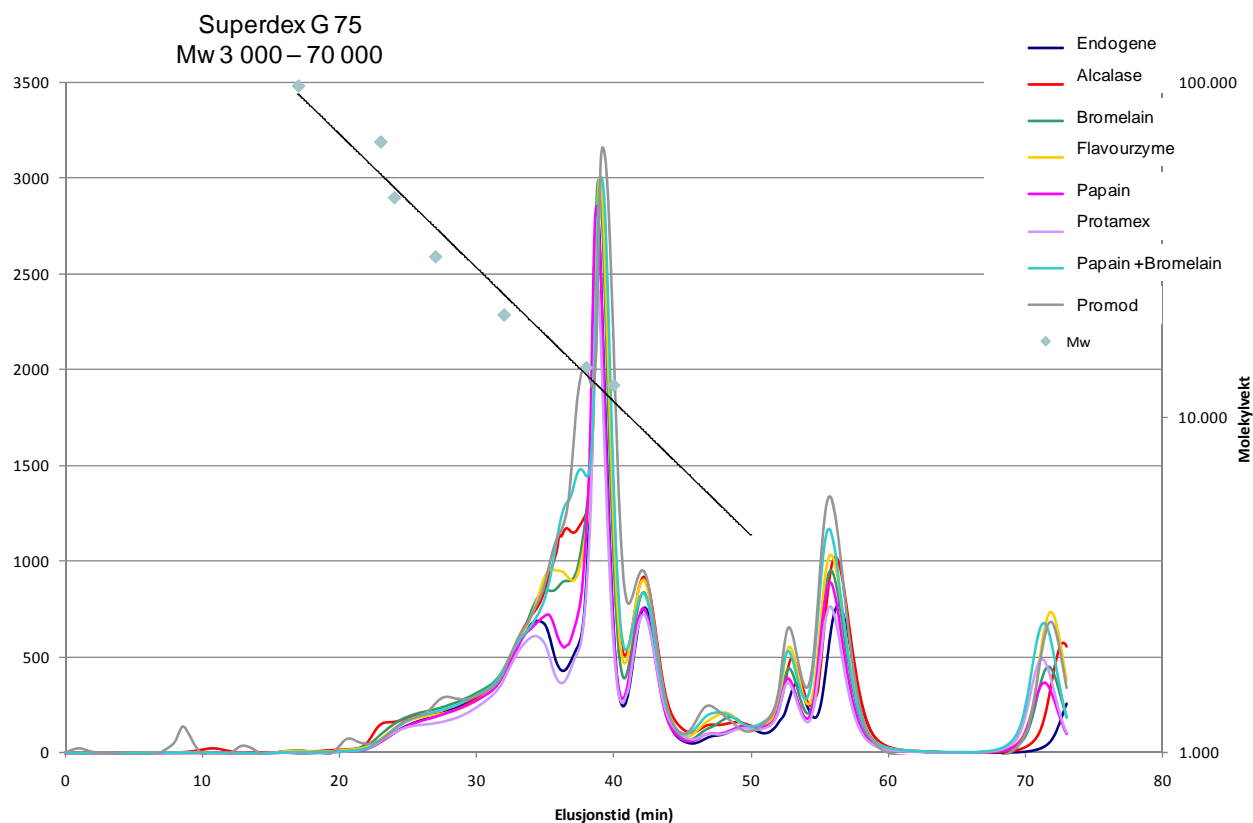
Det er teoretisk mulig å skille de ulike vannløselige hydrolyseproduktene etter deres størrelse ved såkalt Size Exclusion Chromatography (SEC). Men på grunn av interaksjonen mellom ulike forbindelser i prøven og kolonnematerialet, vil SEC alltid ha et innslag av adsorpsjonskromatografi som kan tildels forvrengte bildet av fordelingen av molekylstørrelsen. En annen usikkerhet kan også være prøveopparbeidelsen som kan medføre artefakter i molvektsbildet. Etter en kolonnespesifikk tid (ca 16 min for de benyttede kolonnene) kommer de største molekylene ut først og de mindre følger i tur og orden.

Kromatogrammene av de ulike hydrolysater etter 45 min hydrolyse ble separert med Superdex G75 som er oppgitt å skille peptider i området 70 000 til 3 000 Da. Resultatene er gitt i Figur 17. Resultatene viser at alle prøver har meget lik peptidprofil. Diagrammet antyder at enzymene Protamex, endogene og Papain er mest aktive i å hydrolysere proteiner med molvekter over ca ca. 14 000 Da. Under denne molekylvekten er det vanskelig å si noe om relativ hydrolyseaktivitet. Kromatogrammene støtter resultatene fra analysen av hydrolysegrad som viser at det ikke er signifikant forskjell mellom hydrolyseprøvene etter 45 min hydrolyse, når man

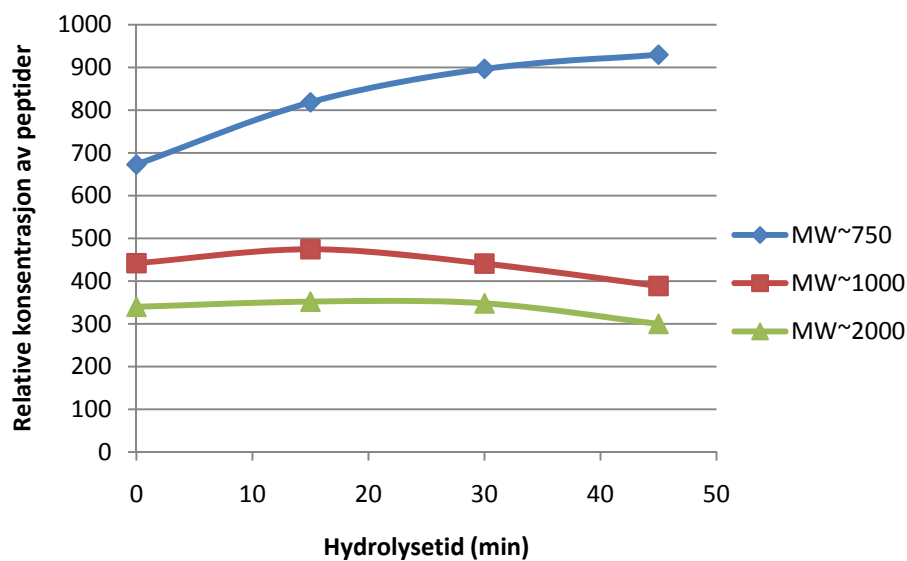
betrakter dem med relativt grove analyseteknikker. Analyse av molvektfordeling utført med en Superdex Peptide kolonne, som er oppgitt til å skille mellom 7000 til 100 Da, viser at en ikke fikk store endringer i peptidprofilen (data ikke vist) ved hydrolyse med de valgte enzymene. En liten økning i relative konsentrasjon av peptider med størrelse ca. 750 Da ble observert samtidig med en reduksjon i relative konsentrasjon av større peptider med molekylvekt ca 1000 - 2000 Da (Figur 18) i løpet av hydrolysen.



Figur 16. Hydrolysegrad (%) av hydrolysater produsert med ulike enzymer.



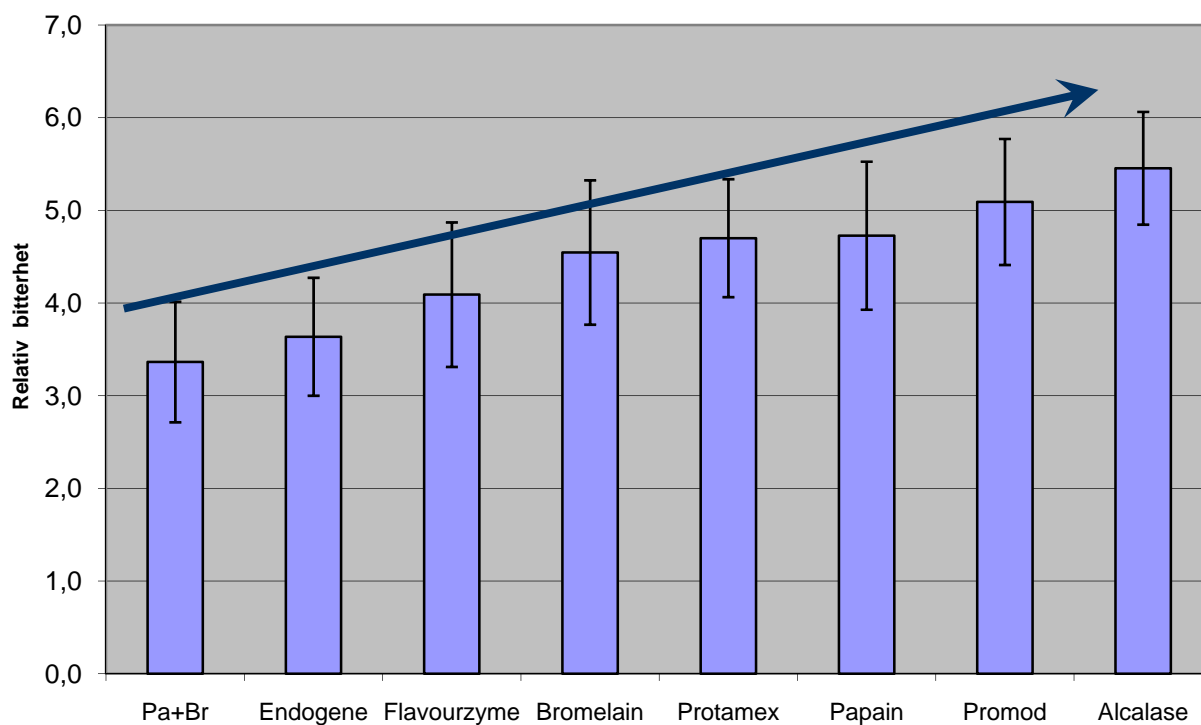
Figur 17. Kromatogrammer av hydrolysater produsert med forskjellige enzymer ved bruk av Superdex G 75 kolonnen, Standarder (Mw): Phosphorylase (Mw 97 000), albumin (Mw 66 000), ovalbumin (Mw 45 000), Carbonic anhydrase (Mw 30 000), Trypsin inhibitor (Mw 20 100), α -Lactalbumin (Mw 14 400) og Cytochrome (Mw 12 400).



Figur 18. Produksjon av små peptider (blå kurve) og spalting av større peptider (rød kurve) ved hydrolyse av restråstoff fra sild med en blanding av Papain og Bromelain.

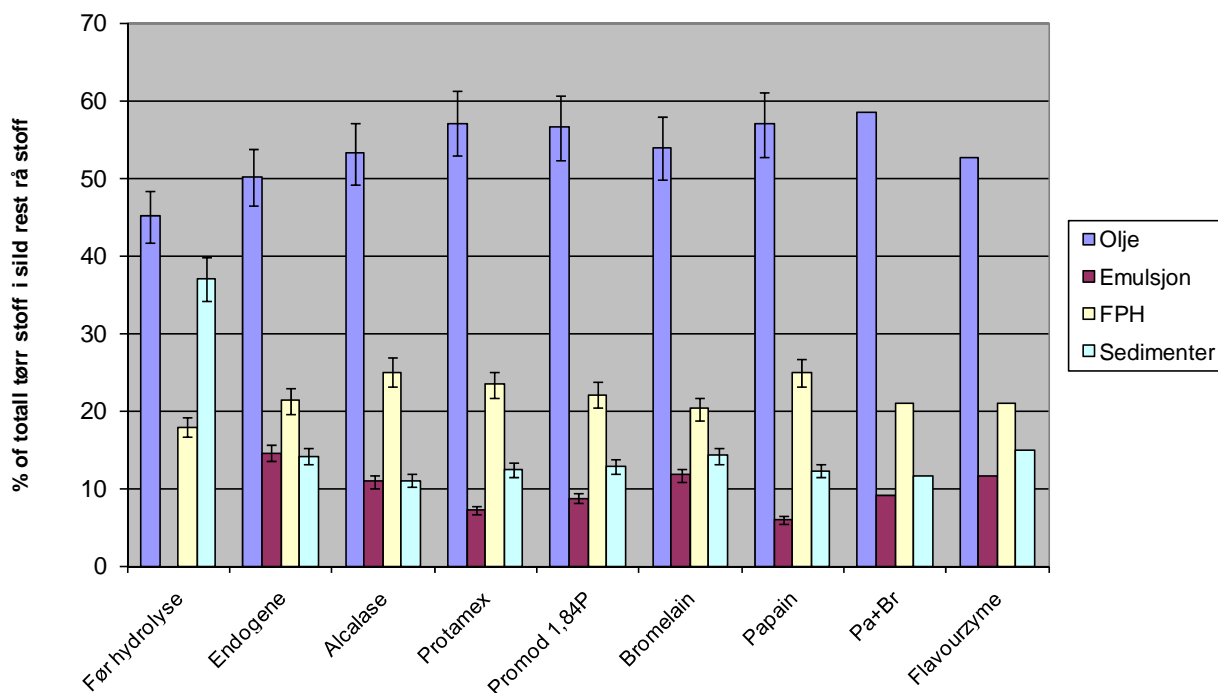
Bitterhet

Selv om det ikke var observert store forskjeller mellom de ulike hydrolysatene når det gjaldt den kjemiske karakteriseringen, viste sensoriske analyser at hydrolysatene hadde store forskjeller. Analysen av bitterhet gir meget tydelig tendens som viser at ulike enzymer gir hydrolysater med ulike bitterhetsnivåer (Figur 19). Ulike enzymer hydrolyserer proteiner på forskjellige måter og gir derfor ulike hydrolyseprodukter. Bitterhet skyldes blant annet dannelse av bitter peptider og dette er særlig små peptider (di- og tri-peptider, som inneholder to eller tre aminosyrer). Det er også kjent at frie aminosyrer gir mindre bitter smak sammenholdt med peptider som inneholder de samme aminosyrene. For å redusere bittersmak brukes ofte eksopeptidaser (enzymer som kutter en og en aminosyre fra peptider, og produserer aminosyrene enkeltvis). Flavourzyme, som har eksopeptidaseaktivitet, ga et av de beste resultatene blant hydrolysatene på bitterhetsmålingen. Mer aktive enzymer som Alcalase og Promod kutter proteinene i større stykker, men har begrenset aktivitet for kutting av tri- og di-peptider og disse enzymene ga som forventet de mest bitre hydrolysatene (Figur 19). Endogene enzymer (enzymer som finnes naturlig i råstoffet) og blanding av Papain og Bromelain (50/50) ga hydrolysater med minst bittersmak.



Figur 19 Relativ bitterhet av FPH produsert med endogene og ulike kommersielle enzymer, Pa+Br - blanding av Papain og Bromelain (50/50).

Utbytter i ulike fraksjoner



Figur 20. Mengdefordeling er angitt i prosent av de ulike fraksjonene før og etter hydrolyse. Mengden er analysert som gram olje i oljefraksjonen og som gram tørrstoffinnhold i de tre fasene emulsjon, fiskeproteinhydrolysat (FPH) og sediment per 100 g tørrvekt.. Data er hentet fra 60 min hydrolystid. Endogene enzymer: uten tilsats av kommersielle enzymer, Pa+Br: blanding av Papain og Bromelain (50/50).

Figur 20 viser at de proteolytiske enzymene hydrolyserer sedimentfraksjonen. Før hydrolyse utgjør sedimentfraksjonen 37 % av tørrstoffet i materialet og etter hydrolyse er sedimentfraksjonen redusert til 10-15 %. Hydrolysen fører til en økning av både oljefraksjonen, tørrstoffet i emulsjonen og tørrstoffet i fiskeproteinhydrolysatet. Massebalansen viser at gjenfunnet materiale etter hydrolysen er innenfor 100 ± 6 %. Økning i tørrstoff under hydrolysen kan skyldes fordamping av vann i løpet hydrolyseforsøket og under inaktivering av enzymene ved 90 grader.

Enzymkostnader

De norske sildekvotene er for tiden rekordhøye og fileteringsandelen er økende. Dette resulterer viser at norsk pelagisk industri produserer store mengder biråstoff (1, 6-7). For 2009 har RUBIN beregnet at biråstoff fra sildeindustrien utgjør 291 000 t (1). I dag leveres størstedelen av biråstoff til mel/olje industrien og ensilasjeindustrien. Produksjon fra ferskt råstoff av sildeolje og hydrolysater som hovedprodukter er et mulig alternativ til dagens produksjon. For å hydrolysere denne mengden av biråstoff fra sild trengs ca 64 mill NOK per år for innkjøp av kommersielle

enzymer, beregnet på grunnlag av en enzymtilsats på 0,1 % av råstoffkvantum og en enzympris på: 220 kr/kg, (se Vedlegg). Om man bruker billigere enzymer (~65 kr/kg: vedlegg) blir den årlige kostnaden kr 19 mill. Enzymkostnadene synker til 0 hvis man bruker bare endogene enzymer.

Om enzymer benyttes for å utvinne olje fra biråstoffet vil enzymkostnadene påvirke produksjonskostnadene for oljen. En enkel kalkulasjon viser at enzymkostnadene kan bli betydelige sett i relasjon til oljens salgspris (Tabell 3).

Tabell 3. Enzymkostnadenes bidrag til produksjonskostnadene for sildeolje ved hydrolyse av biråstoff Enzympris 83 NOK er beregnet for Papain+Bromelain (50/50) og 220 NOK for Alcalase (se Vedlegg).

Olje utbytte (% fra vått biråstoff)	Enzympris (NOK/kg)	Enzymkostnad (NOK) per 1 liter av utvunnet olje
10	83	0,8
	220	2,2
20	83	0,4
	220	1,1

Ettersom kostnadene for kommersielle enzymer utgjør en såpass stor andel av produksjonskostnadene, bør utnyttelsen av enzymene optimaliseres. Dette kan gjøres ved et nærmere studium av nødvendig enzymmengde for å oppnå tilstrekkelig hydrolyse, samt optimalisering av temperatur, vanninnblanding, optimal hydrolysetid sett i forhold til investeringer i hydrolyseutstyrets kapasitet og eventuelt forandring av pH eller regulering av ionebalanser.

3.4 Konklusjoner

De resultater som her er presentert er basert på forsøk utført med frosset råstoff. Ettersom det kan forventes litt variasjon i resultatene ved bruk av ferskt råstoff, ble enkelte av prosjektets konklusjoner etterprøves med ferskt råstoff.

Ved bruk av enzymer man kan utvinne opp til 95% av oljen som er i utgangsmaterialet. Kinetikken av oljeutvinningen indikerer at den høyeste mengden av olje kan man skille etter 30-45 minutter hydrolysetid. Lengre hydrolysetid kan redusere mengden av olje og medføre en økning i mengden av emulsjon. Endogene enzymer frigjør like mye olje som flere av de kommersielle enzymene. Derfor bør tilsetning av kommersielle enzymer for hydrolyse vurderes opp mot bruk av kun endogene enzymer.

Resultatene fra oljeutbytte og emulsjonsdannelse viser at blandingen av Papain og Bromelain (50/50) og Protamex er de beste enzymer blant de studerte. Dette fordi de frigjør olje uten dannelse av store mengder av uønsket emulsjon.

Blant de enzymene som ble benyttet i studien ga blandingen av Papain og Bromelain (50/50), Promod og Protamex et FPH pulver med lavest konsentrasjon av lipider.

Alcalase, blanding av Papain og Bromelain (50/50) og Protamex ga den laveste mengden av sedimenter.

For å produsere hydrolysater med lav bitter smak er bruk av endogene enzymer og/eller en blanding av Papain og Bromelain (50/50) best av de studerte enzymer.

Evaluering av alle lab-hydrolyseforsøk indikerer at blandingen av Papain og Bromelain (50/50) gir gode resultater på de fleste kvalitetsegenskaper som er undersøkt i dette prosjektet. Blanding av Papain og Bromelain ble derfor valgt som hydrolysesystem for pilotforsøkene hos Modolv Sjøset.

Enzymkostnadene ved hydrolyseprosessen utgjør et vesentlig bidrag til produksjonskostnadene Tabell 3. Disse kostnadene bør derfor reduseres sett i relasjon til investering og drift. En total prosessvurderinger med utnyttelse av restråstoff fra lakseindustrien er tidligere utført (8).

4 Test av ulike prosesskonsepter i pilotanlegg

Andre del av hydrolyseprosjektet ble utført i pilotskala ved bruk av SINTEFs mobile prosessanlegg hos Modolv Sjøset Pelagic (Træna) hvor fersk sildebiråstoff ble prosessert.

Målsettingen var firedeelt:

- Produsere ren olje fra ferskt sildebiråstoff. Det produseres for EPAX 2 * 30 liter sildeolje fra ferskt sildebiråstoff levert fra Modolv Sjøset. Sildeoljen produseres ved henholdsvis 90 grader og 50 grader. Oljen fylles på kanner som leveres fra EPAX. Denne oljen produseres uten hydrolyse.
- Produsere sildeolje, flytende hydrolysat og uløselig masse (grakse) fra tradisjonell prosess med hydrolyse av sildebiprodukter utført med kommersielt enzym og påfølgende oljeseparering.
- Produsere sildolje og flytende hydrolysat fra prosess og grakse, hvor oljen skilles først fra oppvarmet biråstoff. Biråstoffet hydrolyseres og flytende hydrolysat og grakse separeres..
- Analyser av produserte produkter

Det var ikke fokus under disse forsøkene på utbytter på ulike fraksjoner så utbytter ble ikke målt. Potensielle utbytter er dokumentert fra lab-skala forsøk.

4.1 Bruk av mobilt pilotanlegg for produksjon av marine oljer og proteinfraksjoner ved Modolv Sjøset Pelagic.

4.1.1 Beskrivelse av mobilt prosessanlegg

Med SINTEF Fiskeri og havbruks mobile ”fabrikk” kan olje- og proteinrikt fiskebiråstoff fra slakterier og pelagisk industri utnyttes til produkter med nye egenskaper. Anlegget er bygd slik at ulike produksjonsprosesser kan testes for optimalisering av prosessdesign tilpasset ønskede produkter (Figur 21).

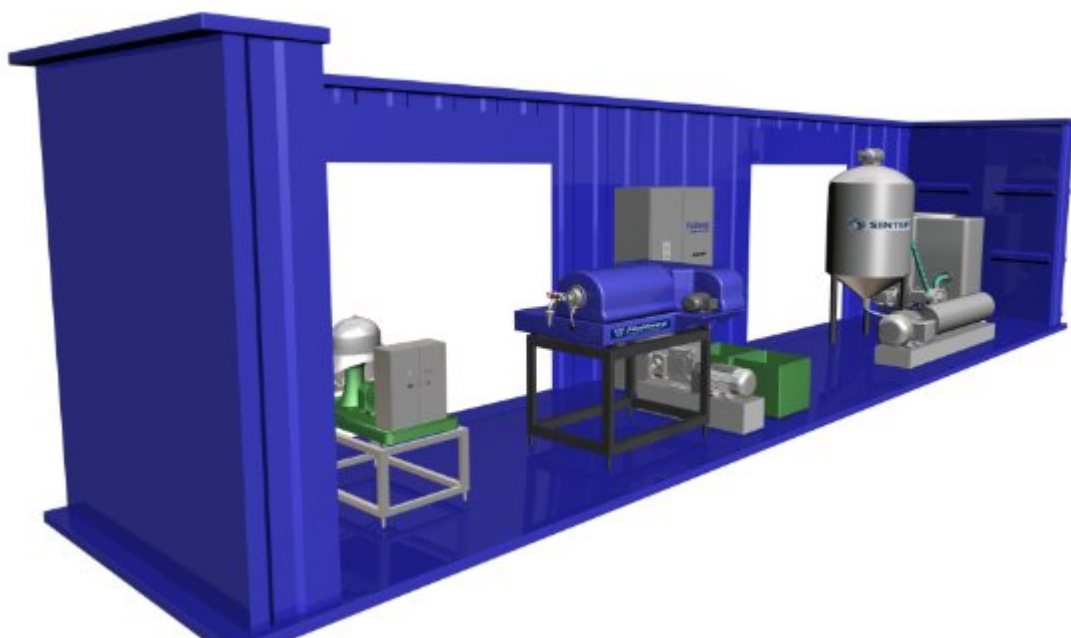
Prosesscontaineren inneholder en liten, men komplett ”fabrikk” for å utvinne fiskeolje og proteinrike fraksjoner av restråstoffene fra fiskeindustrien (Figur 21). Disse råstoffene, som

ryggbein, slo og avskjær fra filetproduksjon, går i dag hovedsaklig som råstoff til fiskemelfabrikker.

For å ivareta råstoffets potensialer er viktig at råstoffet er ”blodferskt” når det skal videreføres, og det er bakgrunnen for at prosesscontaineren er mobil. Containeren kan sendes ut til de anleggene som ikke har videreføring i dag, men som vil ha testet ut om deres restråstoffer egner seg til det. Fiskeindustri som har etablert egen prosessering av fiskeolje og/eller proteinprodukter kan benytte prosesscontaineren til å gjøre eksperimenter og finne en optimalisering av prosessen. Anlegget holder næringsmiddelstandard.

Ved hjelp av enkle grep kan anlegget settes opp for ulike typer prosesser og prøveproduksjoner. På den måten kan effekt av ulike prosesstrinn analyseres og ulike vareprøver produseres. Fiskeoljer av ulik kvalitet, ulike flytende proteinfraksjoner og faste fraksjoner, som for eksempel fiskebein, kan produseres i pilotskala. Ved behov videreføres disse fraksjonene (tørkes, ekstraheres, membranfiltreres, molekylærdestilleres etc.) ved SINTEF Sealab i Trondheim eller for eksempel hos leverandører av egnet industrielt prosessutstyr.

Det mobile prosessanlegget for oljeproduksjon og hydrolyse (Figur 22) ble brukt til forsøket med fersk sildebiråstoff. Det mobile prosessanlegget ble sent til Træna og monterte opp i umiddelbar nærhet til Modolv Sjøset sine lokaler (Figur 22).



Figur 21. Skisse av det mobile prosessanlegget for oljeproduksjon og hydrolyse (grafikk: SINTEF Fiskeri og havbruk).



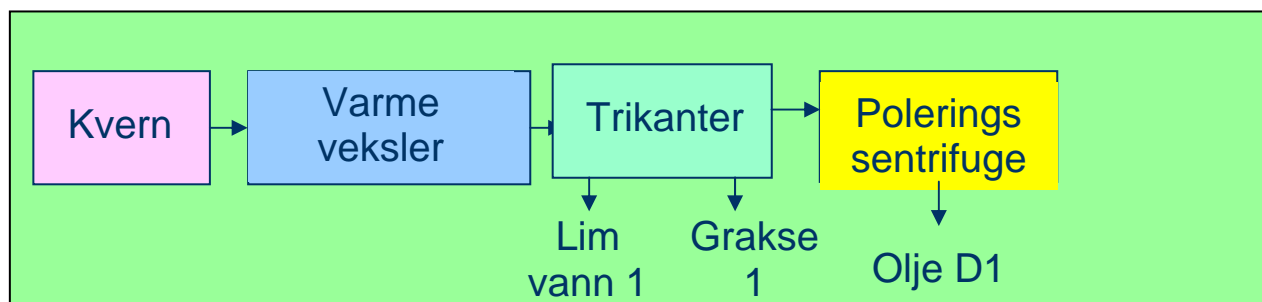
Figur 22. Transportering av containeren (øverste bilde) og produksjon ved Modolv Sjøset (nederste bilde) (foto: SINTEF Fiskeri og havbruk).

4.2 Direkte produksjon av olje

Hensikt med dette forsøket var å produsere olje med lav oksidasjonsgrad og hydrolysegrad fra meget ferskt silderåstoff. Denne oljen gikk til analyse og videre opprensning ved EPAX. Samfengt sildebiråstoff (slo, rogn, melke, avskjær, hode og rygger) ble produsert av Modolv Sjøset og overført direkte til kvernen i prosessanlegget. Biråstoffet ble kvernet og pumpet via en skarpevarmeveksler (temperatur 75 – 90 °C) direkte videre til en tricanter hvor råoljefraksjon,

vannfraksjon (limvann) og uløselig grakse ble separert. Prøver fra graksen ble tatt og vannfraksjonen ble kastet. Råoljen ble samlet opp i en beholder og ble pumpet uten nevneverdig opphold til poleringsentrifuge hvor rester av vann, dispergert organisk materiale og luft ble fjernet (

Figur 23). Den polerte oljen ble fylt direkte i aluminiumskanner under nitrogenatmosfære (Olje D1).

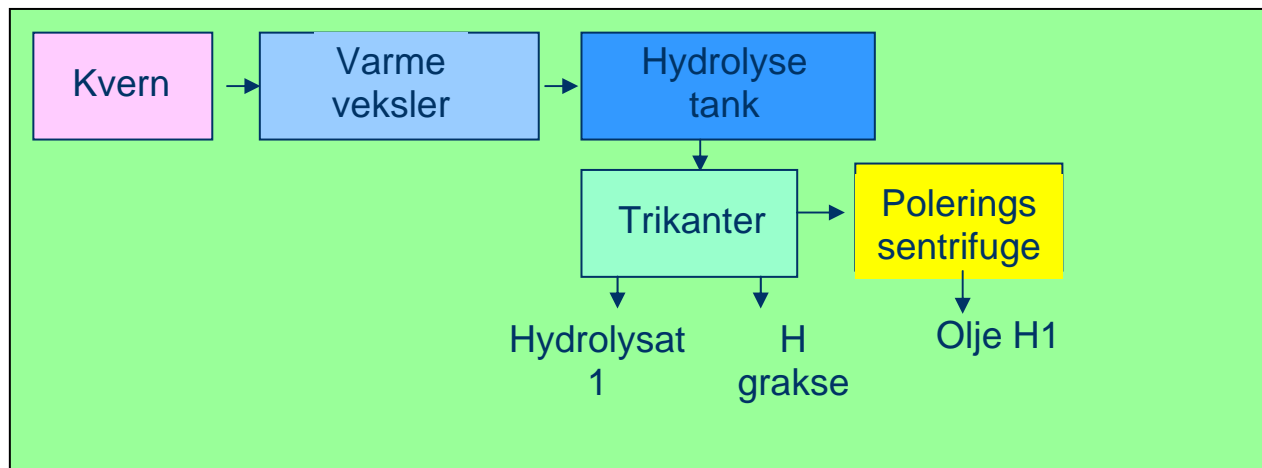


Figur 23. Skjematisk framstilling av produksjonen av ren olje fra ferskt sildebiråstoff.

4.3 Produksjon av hydrolysat og olje ved hydrolyse og etterfølgende separasjon

Hensikt med dette forsøket var å produsere prøver for analyse av hydrolysat, grakse og olje. I dette forsøket ble biråstoffet hydrolysert med etterfølgende separering i olje, hydrolysat og grakse.

Samfengt sildebiråstoff (slo, rogn, melke, avskjær, hode og rygger) ble produsert av Modolv Sjøset og overført til kvernen i prosessanlegget. Biråstoffet ble kvernet og pumpet via en skarpevarmeveksler hvor temperaturen ble øket til 50-60 °C og direkte videre til hydrolysetanken. I hydrolysetanken ble vann tilsatt (50/50) pluss en blanding av Papain og Bromelain (50/50) i en konsentrasjon på 0,1% av sildebiråstoffets våtvekt. Blandingen av Papain og Bromelain (50/50) var brukt i dette forsøket etter at hydrolyseforsøk i lab skala indikerte at denne blandingen gir gode resultater på de fleste kvalitetsegenskaper som er undersøkt i dette prosjektet. Etter avsluttet hydrolyse (ca 1 time) ble hydrolysetankens innhold varmet opp til 90 grader for å inaktivere enzymene. Innholdet ble videre pumpet over til trikanteren hvor råoljefraksjon, hydrolysatfraksjonen (Hydrolysat 1) og hydrolysat (H) grakse ble separert (Figur 24). Prøver av hydrolysat ble tatt. Råoljen ble samlet opp i en beholder og pumpet uten nevneverdig opphold til poleringsentrifugen hvor rester av vann, dispergert organisk materiale og luft ble fjernet. Den polerte oljen ble fylt direkte i aluminiumskanner under nitrogenatmosfære (Olje H1).



Figur 24. Produksjon av hydrolysat og olje ved hydrolyse og separering.

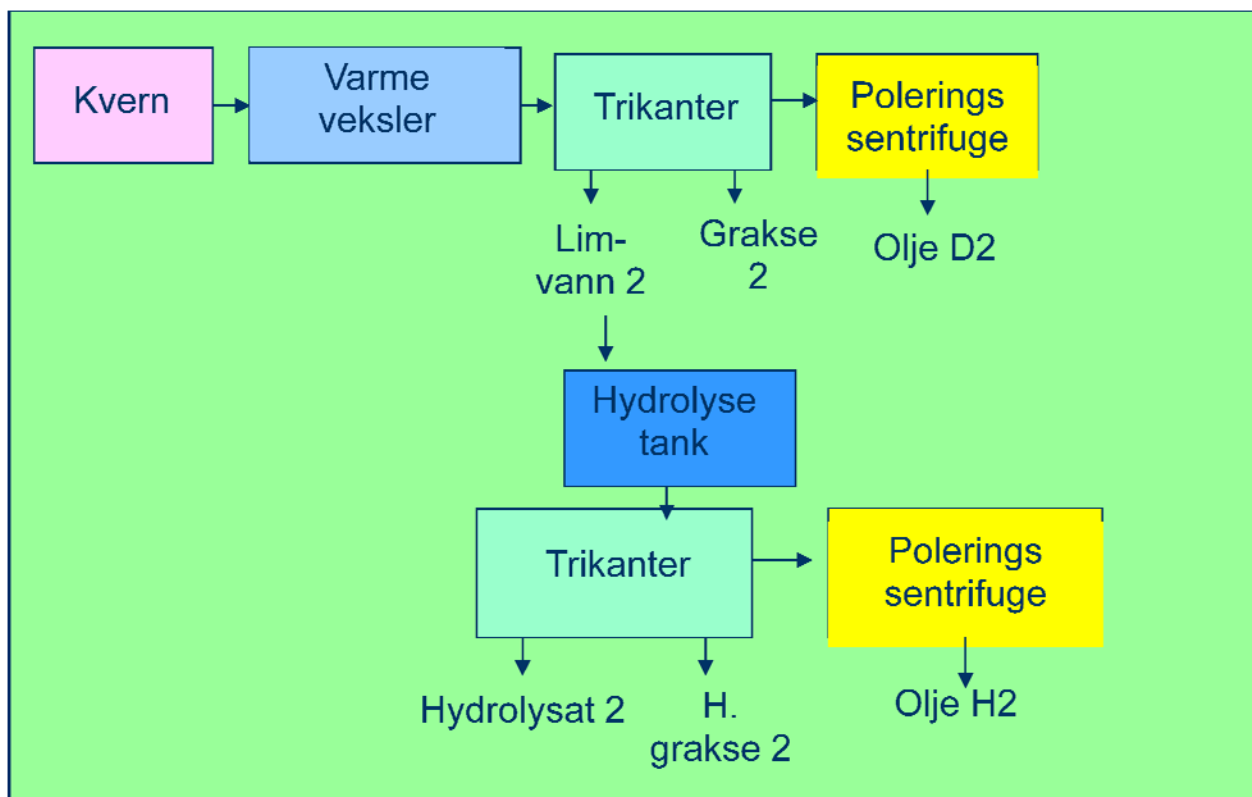
4.4 Produksjon av hydrolysat og olje ved oljeseparering og etterfølgende hydrolyse

Hensikt med dette forsøket var å produsere opp prøver for analyse av olje, limvann og hydrolysert limvann. I dette forsøket ble oljen separert før hydrolyse og vannfraksjonen etter oljefraskillelsen ble enzymatisk hydrolysert. Etter hydrolysen ble hydrolysatet separert i en ny olje- og graksefraksjon. Denne konfigurasjonen ga olje med god kvalitet (olje 1), men lavt hydrolysatutbytte og en sekundær oljefraksjon (olje 2) av noe redusert kvalitet.

Sildebiråstoff (slo, rogn, melke, avskjær, hode og rygger) ble produsert av M. Sjøset og overført til kvernen i prosessanlegget. Biråstoffet ble kvernet og pumpet via en skarpevarmeveksler hvor temperaturen ble øket til 90 °C og oppvarmet biråstoff ble ført videre til trikanter hvor råoljefraksjon, limvann og grakse ble separert. Råoljen ble samlet opp i en beholder og pumpet uten nevneverdig opphold til poleringscentrifugen hvor rester av vann, dispergert organisk materiale og luft ble fjernet. Den polerte oljen ble fylt direkte i aluminiumskanner under nitrogenatmosfære (Olje D2).

Limvannet ble pumpet til hydrolysetanken og temperaturen ble redusert til 50 grader. En blanding av enzymene Papain og Bromelain (50/50) ble tilsatt (0,1% enzymer av vekt limvann) og limvannet ble hydrolysert i en time. Etter avsluttet hydrolyse ble tankinnholdet varmet opp til 90 grader og pumpet over til trikanter hvor råoljefraksjon (olje 2), hydrolysatfraksjonen (vannfraksjon) og grakse ble separert (Figur 25). Prøver av hydrolysert limvann ble tatt (Hydrolysat 2). Råoljen ble samlet opp i en beholder og pumpet uten nevneverdig opphold til poleringscentrifugen hvor rester av vann, dispergert organisk materiale og luft ble fjernet. Den polerte oljen ble fylt direkte i aluminiumskanner under nitrogenatmosfære. (Olje H2).

Alle prøver som ble tatt ble kjølt ned i isvann, frosset i frysetunell og oppbevart ved -20 °C. fram til analysene ved laboratoriet ble foretatt.



Figur 25. Produksjon av hydrolysat og olje ved oljeseparering og etterfølgende hydrolyse.

4.5 Resultater

4.5.1 Olje

4.5.1.1 Kvalitetsanalyser

Kjemisk sammensetning ble bestemt vha Iatroscan (kvantitativ tynnskiktskromatografi) hvor de ulike fettclassene (triglycerider, diglycerider, monoglycerider, frie fettsyrer, fosfolipider, kolesterol og kolesterolistere) kan kvantifiseres (3). Den totale fettsyresammensetningen ble bestemt ved analyse av metylerte fettsyrer. Frie fettsyrer ble også bestemt ved titrering etter metoden til AOCS (Official Method Ca 5a-40: Free Fatty Acids) (9).

Oksidasjonsstatus ble bestemt ved peroksid verdi (PV) og anisidinverdi (AV).

Oksidasjonsstabilitet ble bestemt ved Oxidative Stability Index (OSI) ved 70 °C.

4.5.1.2 Resultater

Lipidklasser i alle produserte oljer var veldig like og uavhengig av utvinningsmetoder. Det var $99,3 \pm 0,2$ % triglycerider, $0,4 \pm 0,2$ % kolesterol and $0,3 \pm 0,1$ % fosfolipider. Analyser av lipidklasser er utført vha Iatroscan som har begrenset mulighet for å måle lave konsentrasjoner av frie fettsyrer. For å kvantifisere disse ble en alternativ måte benyttet for analyse lave konsentrasjoner av frie fettsyrer (Official Method Ca 5a-40: Free Fatty Acids, AOCS).

Den totale fettsyresammensetningen er vist i samlet i Tabell 4.

Tabell 4. Metningsgrad av olje etter ulike prosesssteg. Nomenklatur for oljene gitt i Figurene 25, 26 og 27.

Fettsyrer	Olje D1(direkte)	Olje H1(hydrolyse)	Olje H2 (hydrolyse)
	mg/g	mg/g	mg/g
Mettet	216,5	211,3	202,6
Monoumettet	422,0	424,5	429,8
Diumettet	12,2	12,9	12,8
Polyumettet	171,8	172,9	172,2
Omega3	161,1	164,5	163,5
Omega6/Omega3 forhold	0,1	0,1	0,1

Som forventet har ikke prosessutformingene noe å si for oljens totale sammensetning av fettsyrer. Det er kjent at sildolje har et meget høyt innhold av monoenfettsyren C20:1, som utgjør 24 % av de monoumettede fettsyrene i oljen.

Frie fettsyrer

Mengden av frie fettsyrer i oljen er et viktig kvalitetsmål. Konsentrasjonen av frie fettsyrer er en indikasjon på hvor ferskt råstoffet var når oljen ble produsert. De frie fettsyrene dannes fra triglycerider ved hydrolyse med lipaser som finnes i råstoffet (endogene lipaser). I kommersielle sildeoljer ligger mengden frie fettsyrer mellom 3-5 %, og i fiskeolje fra ensilert råstoff er konsentrasjon mellom 8-10 %. Årsaken til den lave konsentrasjonen av frie fettsyrer i oljen produsert direkte på sildemottaket er den eksepsjonelle ferskheten på biråstoffet (Tabell 5). Olje separert ved oppvarming til 80-90 °C (Olje D1) hadde en konsentrasjon av frie fettsyrer på 0,12 %. Gjennomgår oljen en hydrolyseprosess sammen med resten av biråstoffet på 1 time ved 50 °C øker mengden frie fettsyrer til 0,29 %. Inaktiveres de endogene lipasene ved oppvarming (80-90 °C) før hydrolysen og olje er med i hydrolyseprosessen (50 °C, en time) hvor kommersielle proteaser tilsettes, vil denne prosessutformingene ikke gi noen signifikant økning i frie fettsyrer i oljen (Olje H2).

Oksidasjonsstatus

PV (peroksid verdi) indikerer konsentrasjonen av primære oksidasjonsprodukter i oljen, mens anisidinverdi viser nivå på sekundære oksidasjonsprodukter. Den direkte produserte oljen (Olje D1 og Olje D2) har den laveste oksidasjonsstatusen både målt med PV-verdi og anisidinverdi på henholdsvis 1,9-2,3 og 0,3-0,8. Hydrolyseprosessen ved 50 °C vil medføre lipidoksidasjon og PV vil øke: Den videre oppvarming til 90 °C vil spalte peroksidene og anisidinverdien vil øke. Dette ser vi ved at anisidinverdien har økt fra ca 0,8 før hydrolyseprosessen til 5 og 7 i oljen etter hydrolyseprosessene.

Peroksider kan spaltes til aldehyder som reagerer med anisidin og gir opphav til økning i anisidinverdien. Det er videre antatt at en peroksid spaltes til to aldehyder og ved å summere to ganger peroksidverdien og en anisidinverdi får man et uttrykk for den totale oksidasjon. Denne summen benevnes Totox. Denne beregningen viser at direkteprodusert olje har bedre oksidasjonsstatus enn oljen etter hydrolysetrinnet. For vanlig sildolje og fiskeolje fra ensilert råstoff ligger Totox verdiene i henholdsvis områdene 15-25 og 20-25, altså betydelig høyere enn våre verdier for oljer produsert fra ferskt biråstoff som ligger i området 4,6 til 11,5 (Tabell 5).

Alle produserte og analyserte oljer var av høy kvalitet. Anisidinverdi og PV-verdier var betydelig lavere (bedre) enn verdier som er anbefalt av European Pharmacopoeia for oljer til humant konsum fra oppdrett laks og torskellever (anisidinverdi: maks 10 og PV: maks 5 (10-11)).

At det ikke er samsvar mellom konsentrasjonen av frie fettsyrer og oksidasjonstatus, skyldes at dannelsen av frie fettsyrer er en enzymatisk prosess og oksidasjon er en ren kjemisk prosess.

Produksjon av oljer ble gjort uten noe form for nitrogenbeskyttelse. De angitte verdier er analysert på oljer som hadde gått gjennom en enkel polering. Denne poleringen reduserte peroksid- og anisidinverdi, hovedsakelig ved fjerning av vann og suspendert materiale. Man kan anta at en vask med oksygenfritt vann vil redusere PV og anisidinverdien ytterligere.

Oksidasjonsstabilitet.

Oksidasjonsstabilitet kan måles med oksidasjonsstabilitetsindeks (OSI). Målemetoden måler hvor lang tid det tar før oljen er oksidert til et visst nivå. Analysen utføres ved relativ høy temperatur som er tilpasset oljen, og for fiskeoljer har vi valgt å benytte 70 °C. Luft blåses gjennom oljen og mengden oksidasjonsprodukter måles. Lang OSI-tid er da indikasjon på stabil olje. Tabell 5 viser at råoljene (Olje D1 og Olje D2) var mest stabile (målt til 15 og 18 timer), mens olje etter hydrolyse (Olje H1 og H2) viste målbar oksidasjon etter 9-11 timer.

Tabell 5. Olje kvalitet presentert med verdier av frie fettsyrer, anisidin verdi, PV, Totox og OSI. Nomenklatur for oljene gitt i Figurene 25, 26 og 27.

	Frie fettsyrer, %	Anisidinverdi	PV	Totox	OSI, timer
Olje D1 (direkte)	0,12±0,01	0,8±0,3	1,9±0,0	4,6	14,8±0,2
Olje H1 (hydrolyse)	0,29±0,01	4,9±0,1	3,3±0,4	11,5	11,4±0,3
Olje D2 (direkte)	0,12±0,01	0,3±0,1	2,3±0,3	4,9	17,9±0,5
Olje H2 (hydrolyse)	0,13±0,01	6,5±0,9	2,4±0,2	11,3	9,1±0,3

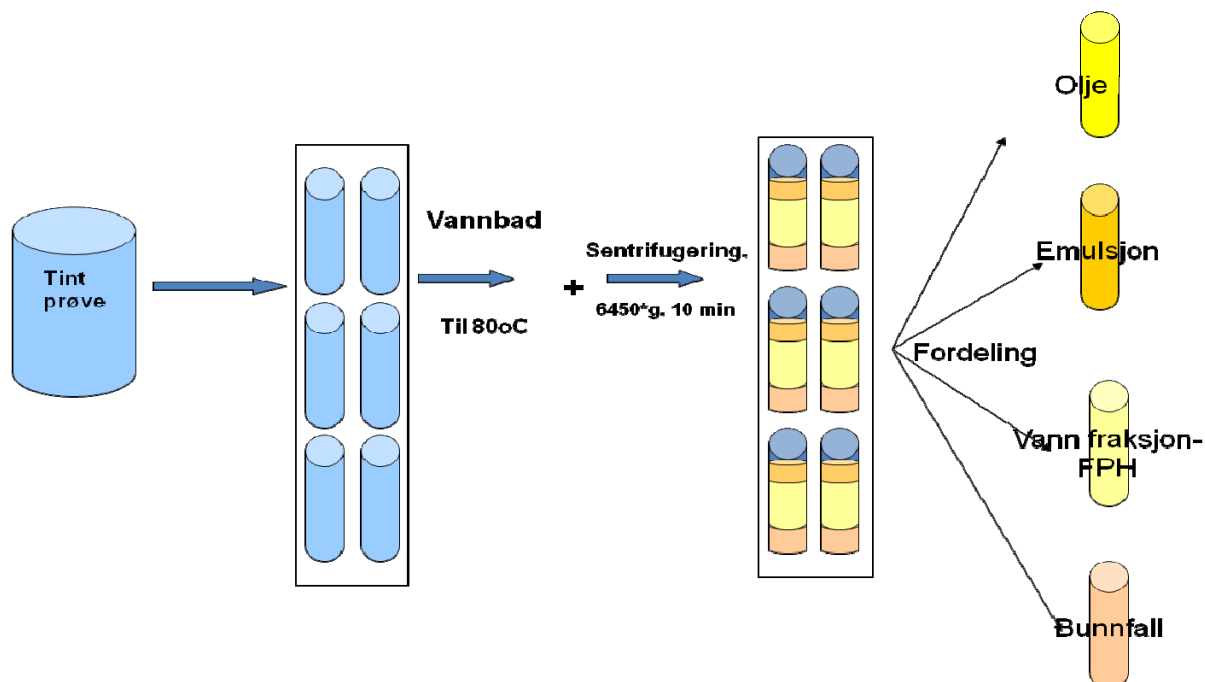
4.5.2 Hydrolysater

Prøvene fra Træna ble tint i kjølerom og fordelt i 50 ml sentrifugerør og behandlet som beskrevet i Figur 26. Proteinholdige fraksjoner ble frysetørket før videre analyser.

4.5.2.1.1 Kvalitetsanalyser

Kvalitet på fiskeprotein-hydrolysater (FPH) ble vurdert etter følgende kriterier:

- Kjemisk sammensetning som beskrevet for laboratorieprøvene.
- Hydrolysegrad som beskrevet for laboratorieprøvene
- Molekylvektfordeling av produserte peptider som beskrevet for laboratorieprøvene
- Bitterhet som beskrevet for laboratorieprøvene.



Figur 26. Separasjon av industrielle prøver i laboratoriet.

Proteinholdige prøver (limvannsprøver, hydrolysat og grakser) fra pilotforsøket ble fraksjonert som vist i **Figur 26**. Kjemisk sammensetning av de ulike fraksjonene er vist i Tabell 6.

Tabell 6. Kjemisk sammensetning gitt i % av proteinholdige prøver etter fraksjonering og frysetørking. Nomenklatur for grakse, hydrolysat og limvann gitt i **Figur 23**, **Figur 24** og **Figur 25**.

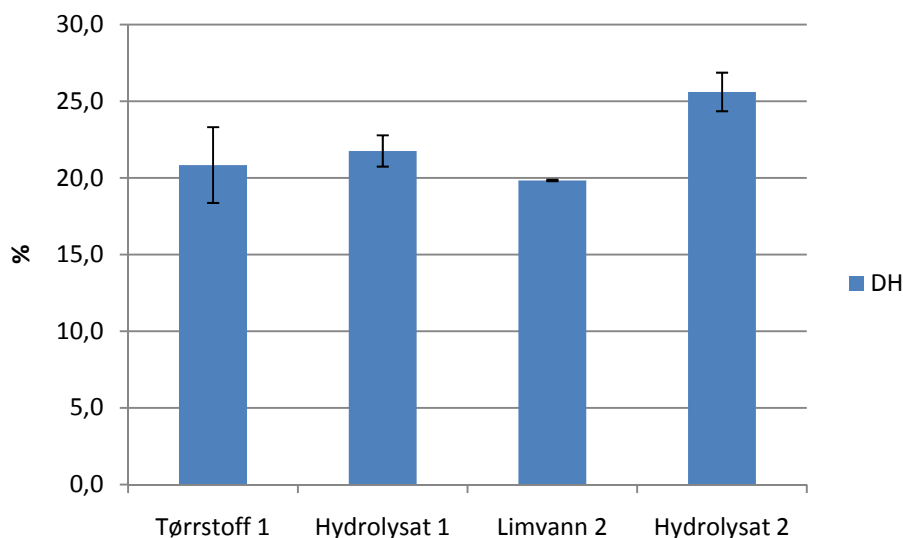
	Lipider		Proteiner		Aske	
	Vannfrak.	Bunnfall	Vannfrak.	Bunnfall	Vannfrak.	Bunnfall
Grakse 1	13,9±0,5	15,7±0,5	63,5±1,3	76,7±0,7	22,7±0,3	10,5±2,8
Hydrolysat 1	2,1±0,6	44,6±4,1	76,4±6,7	51,9±7,0	20,0±0,5	5,4±1,4
Limvann 2	13,1±0,2	45,6±0,7	64,0±2,2	50,1±0,9	21,7±0,3	5,1±0,2
Hydrolysat 2	7,2±1,5	32,4±1,2	85,0±1,3	60,4±0,3	11,2±0,4	5,3±0,3

Hydrolysegrad

Analysen for hydrolysegrad (DH) viser at alle vannfraksjoner fra grakse 1, limvann 2, har en hydrolysegrad som varierer fra 20 til 21 % (Figur 27). En så høy hydrolysegrad er ikke vanlig å observere i ferskt unedbrutt råstoff. Dette kan skyldes at en hydrolyse forgikk i prøven fra den ble tatt til den ble inaktivert ved frysing. Derimot viser grakse 1, at dette ikke er tilfellet, da grakse 1 ble hentet fra Prosses 1 hvor råstoffet ble direkte oppvarmet til 90 grader, noe som sikrer inaktivering av proteasene. Det samme resonnement kan benyttes for Limvann 2. Denne prøven viser en hydrolysegrad på 20 % som ikke er signifikant forskjellig fra grakse 1. Dette viser altså at nedkjølingen av prøvene var tilstrekkelig rask til å hindre proteolyse etter prøvetaking. En annen forklaring kan ligge i at pelagisk fisk inneholder lavmolekylære nitrogenforbindelser som kan gi en høy bakgrunn ved bestemmelse av hydrolysegrad (12). En tredje mulighet er at silda hadde et mageinnhold hvor proteinet var sterkt nedbrutt eventuelt at det skjedde en sterk proteolyse fra filetering til biråstoffet ble behandlet i prosesscontaineren.

Hydrolysegraden i vannfraksjonen fra ferskt råstoff (20 %, maks 4 timer etter filetering) var lavere enn hydrolysegraden i frosset råstoff som ble benyttet i laboratorieforsøkene (29 %). Dette forsterker antagelsen om at lab-råstoffet hadde vært utsatt for en delvis hydrolyse før ankomst. En viktig konklusjon er at forsøk med ferskt råstoff direkte på bedriften kan gi andre resultater enn forsøk utført på et fryst og tint råstoff ved et eksternt laboratorium.

Ved hydrolyse med kommersielle enzymer i pilotskala ble det oppnådd en målt hydrolysegrad på 22-26 %. Disse verdiene var signifikant lavere for hydrolysater etter hydrolyse av fryst - tint biråstoff, hvor hydrolysegraden ble målt til 35-38 % (Figur 16). Økningen i hydrolysegrad under den kontrollerte hydrolysen ser derimot ut til å være tilnærmet lik, $\Delta = 6\%$ for pilot og $\Delta = 6-9\%$ for hydrolyse i lab-skala og pilotskala. Det tyder på at hydrolysedataene fra lab skala- forsøkene kan ekstrapoleres til pilotskalaen, men under en viss forsiktighet.



Figur 27. Hydrolysegrad av: grakse 1, limvann 2, hydrolysater 1 og 2. Hydrolysegrad (DH) er angitt som antall frie aminogrupeer i prosent av prøvens totale nitrogen innhold. Nomenklatur for grakse, limvann og hydrolysater er gitt i **Figur 23**, **Figur 24** og **Figur 25**.

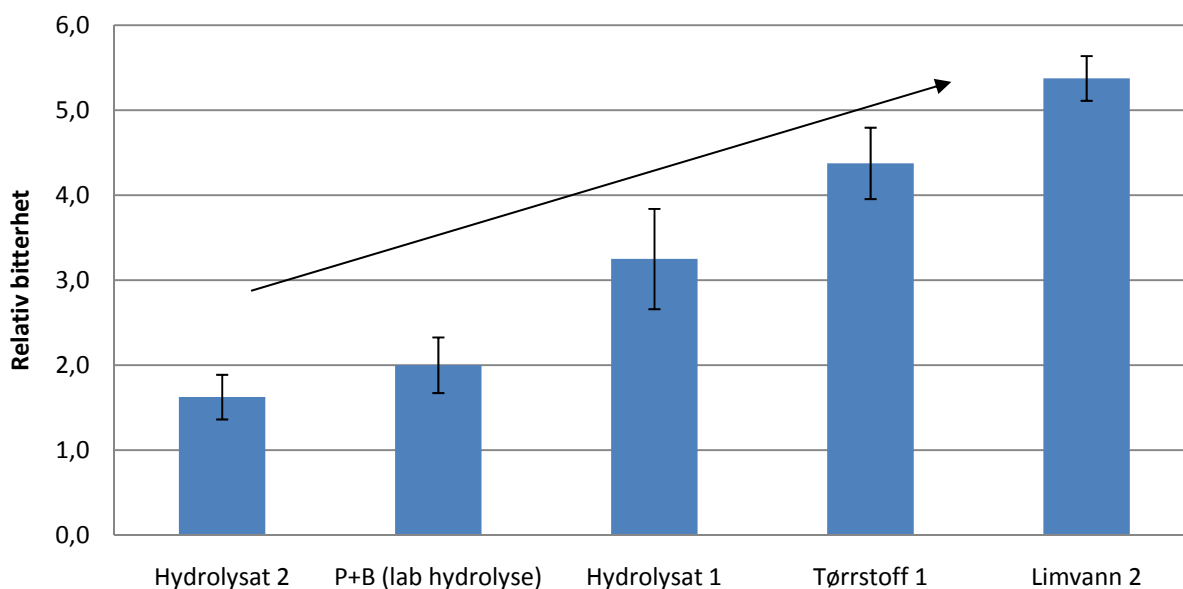
Lipidklasser ble analysert i den gjenværende oljen isolert fra de proteinholdige prøvene (limvannsprøver, hydrolysat og grakser) fra pilotforsøket (se **Figur 26**) Analysen av oljen som ble ekstrahert fra bunnfallfraksjonene Limvann 2, Hydrolysat 1 og 2, viser at fosfolipider og triacylglycerider er de to største lipidklassene (**Tabell 7**). Også i vannfraksjonen var fosfolipider og triglycerider dominerende. Hydrolysat 1 inneholder høyeste konsentrasjon av fosfolipid målt som prosentandel i oljen, mens Limvann 2 og Hydrolysat 2 hadde lavere fosfolipidkonsentrasjon.

Tabell 7. Lipidklasser i oljer ekstrahert fra vannfraksjon og bunnfraksjon etter separasjon av proteinholdige prøver fra pilotforsøk. Konsentrasjonen er angitt som arealprosent.

Lipidklasser (% av totalt lipid)	Hydrolysat 1		Limvann 2		Hydrolysat 2	
	Vannfraksjon	Bunnfall	Vannfraksjon	Bunnfall	Vannfraksjon	Bunnfall
Kolesterolester	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Triglycerid	21,8±2,4	53,0±7,2	72,6±0,7	71,6±1,6	87,4±0,3	52,9±1,8
Frie fettsyrer	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,1	0,9±0,2
Kolesterol	0,0±0,0	1,1±0,7	1,5±0,3	1,8±0,4	0,4±0,1	4,2±0,2
Ukjent, muligens mono- og diglycerider	24,4±5,4	3,8±1,9	-	0,8±0,5	0,2±0,1	2,1±1,5
Fosfolipider	53,8±6,3	42,0±8,2	25,9±0,5	25,7±1,1	11,6±0,3	40,0±3,2

Bitterhet

Bitterhet i hydrolysater er en vesentlig ulempe om hydrolysater skal benyttes til menneskelig konsum. Hvorvidt dette også gjelder for dyrefor er usikkert, men smak er utvilsomt viktig også for denne anvendelsen. Som for hydrolysatene produsert i labbskala ble tørrstoffene produsert i pilotskala analysert for bitterhet. Det viste seg at prosesseringsbetingelsene hadde meget stor innvirkning på målt bitterhet. Dette er vist i Figur 28. Alle hydrolysene er utført med en blanding av Papain og Bromelain, og for sammenligningens skyld er en av prøvene fra labbhydrolysen (P+B) analysert sammen med prøvene fra pilotforsøkene. Interessant er her å legge merke til nedgangen i bitterhet når Limvann 2 hydrolyseres til Hydrolysat 2, en nedgang i bitterhet på ca 70 %.



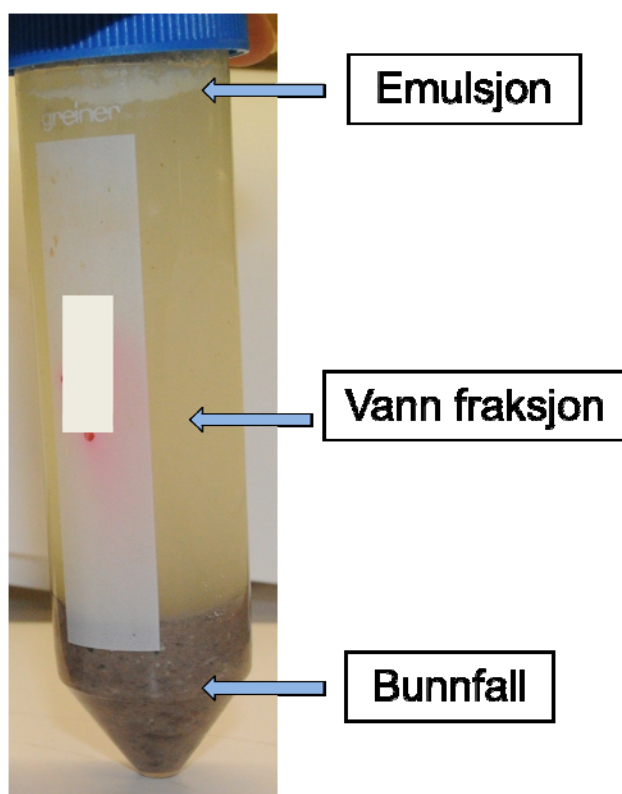
Figur 28. Relativ bitterhet av limvann og hydrolyserte prøver fra industriell forsøk. P+B - blanding av Papain og Bromelain (50/50).

4.5.3 Sedimenter

Innhold og sammensetning

Grakse-fraksjon etter direkte produksjon av olje (Figur 23) ble separert i fraksjoner som det er vist på Figur 26 og Figur 29. Den tørkede vannfraksjonen inneholdt 13,9 % lipider og 63,5% proteiner, mens tørket bunnfall inneholdt 15,7% lipider og 76,7% proteiner (Tabell 6). Både lipider fra vannfraksjonen og fra bunnfall inneholdt en stor andel fosfolipider: lipider ekstraherte fra vannfraksjon inneholdt ca. 35 % fosfolipider, mens lipider fra bunnfraksjoner

inneholdt ca. 44% fosfolipider. Disse tallene viser at graksefraksjon etter termisk oljeutvinning gir mye fosfolipider. Derfor vil denne fraksjonen kunne brukes som en proteinkilde som inneholdende mye fosfolipider eller som råstoff for fosfolipidekstraksjon. (Årsaken til at graksefraksjonen inneholdt så mye vann var at under forsøket måtte ekstra vann tilsettes grakse som kom ut av trikanteren for å gjøre grakse pumpbart).



Figur 29. Sentrifugerør som viser de ulike fasene etter sentrifugering (separasjon) av grakse fraksjon etter direkte produksjon av olje (foto: SINTEF Fiskeri og havbruk).

Tabell 8. Lipidklasser i olje ekstrahert fra vannfraksjon og bunnfraksjon, %.

Lipidklasser (% av totalt lipid)	Grakse 1	
	Vannfraksjon	Bunnfall
Kolesterolester	0,0±0,1	0,0±0,0
Triglycerid	52,3±2,4	43,5±0,3
Frie fettsyrer	0,0±0,0	0,2±0,3
Kolesterol	7,8±1,2	6,8±0,8
Topper mellom koles. og fosfolipid.	4,6±0,6	6,0±0,7
Fosfolipider	35,3±3,9	43,6±1,5

4.6 Konstruksjonsmessige særegenheter hos anlegget for prosessering av biråstoff fra sild.

Det mobile prosessanlegget (Figur 22) ble brukt til forsøket med fersk sildebiråstoff. Erfaring med utstyret ved bruk av dette anlegget var at man bør ta spesiell hensyn til beinfraksjonen i sild. Beina er tunge og etter hydrolyse sedimenterer de lett fra hydrolysatet. Røreverk i tanker må dimensjoneres slik at beinfraksjonen holdes godt suspendert og flow hastigheter i rør må dimensjoneres slik at beinfraksjonen ikke sedimenterer. Beinfraksjonen har en meget porøs struktur med god gjennomstrømning av hydrolysat og lar seg lett separeres fra hydrolysatet ved bruk av egnet sil. Separert beinfraksjon fra hydrolysat kan tørkes til eget produkt (marint beinmel). En fordel med å ta ut beinfraksjonen er at askeinnholdet i det produserte graksemelet blir lavere.

4.7 Konklusjoner

Det er mulig å produsere olje fra biråstoff fra sild med god kvalitet både når det gjelder innhold av frie fettsyrer og oksidasjonsstabilitet målt ved Oxidation Stability Index og oksidasjonsstatus målt med anisidin- og peroksidverdi. Alle disse kvalitetsparametrene ligger godt under tilsvarende verdier for tradisjonell fiskeolje eller fiskeolje eller produsert fra ensilert råstoff.

Det er mulig å produsere hydrolysater fra proteinfraksjonen. Da det benyttes biprodukter fra sild til konsum og dersom behandlingen av biproduktene skjer i henhold til EUs hygienedirektivet, kan hydrolysatet benyttes til humant konsum.

Bitterheten for de produserte hydrolysatene er vist å være sterkt avhengig av prosessbetingelsene som proteinfraksjonen utsettes for.

De produserte hydrolysatfraksjonene, inneholdt 2 til 14 % lipider, men det må her bemerkes at det ikke ble gjort forsøk på å minimalisere lipidinnholdet ved separasjon av lipidfraksjonen og vannfraksjonen i trikanteren.

Lipidinnholdet i sentrifugert bunnfall fra de ulike fraksjonene hadde et lipidinnhold på 15 til 45 %. Andelen fosfolipid i disse lipidfraksjonene var fra 11 til 45 %, og analysene viser at fosfolipidinnholdet i de ulike fraksjonene påvirkes i stor grad av prosesseringsbetingelsene. graksefraksjonen inneholdt ca 14 % lipider og av dette var ca 40 % fosfolipider.

Denne rapporten viser at ulike enzymer gir ulike proteinhydrolysater ved hydrolyse av ferske biprodukter fra sild. Avhengig av hvilke produkter man ønsker må man designe prosessene slik at disse produkter dannes. Rapporten presenterer også kinetiske data for hydrolyseprosesser med ulike enzymer.

Det er likeledes vist at det er mulig å produsere høykvalitets sildeolje fra ferskt biråstoff fra sild med meget gode egenskaper.

Når det gjelder bitterhet til hydrolysatene er det mulig å påvirke denne både ved valg av enzym og valg av prosessbetingelser.

Det var under pilotanlegg forsøkene ikke fokus på utbytter så utbytter ble ikke målt. Mulige potensielle utbytter er dokumentert fra lab-skala forsøk. Fra lab-skala er det for oljer funnet maksimalverdier og relevante verdier for proteinhydrolysater. Selv om det er mulig å oppnå høye utbytter, er det likevel et økonomisk optimalt punkt for utbyttet, da det koster progressivt mere å ta ut den siste resten.

Hvilke prosesser som egner seg for produksjon av sildolje og og andre produkter fra ferske biprodukter fra sild, vil avhenge av produktstrategi. Spørsmålet som er viktig å stille er hvilken prosess er riktig å velge ut fra hvilket produkt som skal produseres. Hovedstrategi for produsent burde være å la markedet bestemme produktet, og produktet bestemmer igjen prosess og råstoff. Som det er vist i denne rapporten ved karakterisering av produktene ved de ulike prosesskonfigurasjonene, er produktene avhengig av både prosess og prosessbetingelser.

5 Oppsummering

De viktigste resultatene fra prosjektet er som følger:

- Det er mulig å produsere sildeolje av biråstoff enkelt ved oppvarming av råstoffet og separasjon med di/trikanter.
- Oljen har meget god stabilitet og lav oksidasjonsstatus.
- Oljen har et meget lavt innhold av frie fettsyrer som også indikerer et lavt innhold av mono- og diacyl-glycerider.
- Biprodukter fra feit sild inneholder høyere konsentrasjon av lipider enn selve filéen.
- Ulike enzymer for hydrolyse gir tilnærmet identisk kjemisk bilde etter hydrolysen.
- Ulike enzymer gir opphav til svært ulik bittersmak på hydrolysatet.
- Naturlige enzymer i silda kan være tilstrekkelig for hydrolyse, men gir en noe ufutsigbar prosess.
- Kostnadene ved bruk av kommersielle enzymer kan ikke forsvares ved kun produksjon av oljer.

Viktige saker å få avklart:

- Årstidsvariasjonen mhp lipidinnhold og sammensetning.

- Årstidsvariasjon av endogen enzymaktivitet.
- På virkning av åteinhold på hydrolyseprosessen
- Oljesammensetning av de ulike deler hos restråstoff fra sild mhp årstidsvariasjoner.
- Utbytte av olje som funksjon av årstid, temperatur og hydrolysebetingelser.
- Metode for å vurdere enzymatisk aktivitet i råstoffet
- Valg av prosessutstyr.
- Men det viktigste er markedet. Hvilke produkter etterspørres og hvilke karakteristika skal produktene ha, og hvilken pris oppnår man for disse produktene. Det vil være basis for beregning av økonomi i prosessen for bedre utnyttelse av biprodukter.

6 Acknowledgement

Takk til RUBIN og prosjektet "Gull fra havets sølv" for finansiering av forsøkene, samt NTNU for hjelp med kjøring av FPLC-analyser. Også takk til ansatte ved Modolv Sjøset Pelagic for god hjelp under containerforsøkene. En del av analysene ble utført i større detalj på grunn av samkjøring med prosjektet "Gull fra havets sølv" som var finansiert av Fiskeri og kystdepartementet og Utenriksdepartementet.

7 Referanser

1. RUBIN. (2010) Varestrømanalyse 2009.
2. Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. (2000) Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, *Crit Rev Food Sci Nutr* 40, 43-81.
3. Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., and Jorgensen, L. (1992) Comparative-Study on the Fatty-Acid and Lipid-Composition of 4 Marine Fish Larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 103, 21-26.
4. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
5. Taylor, W. H. (1957) Formol titration: An evaluation of its various modifications, *The Analyst* 82, 488-498.
6. RUBIN. (2009) Varestrømanalyse 2008.
7. RUBIN. (2009) Biråstoff fra filetering av sild. Kartlegging og analyse av råstoff og utnyttelsesmuligheter.
8. EPCON, and SINTEF. (April 2005) Kompaktanlegg for enzymatisk prosessering av ferske marine biprodukter (RUBIN, Ed.).
9. AOCS. Official Method Ca 5a-40: Free Fatty Acids.
10. Pharmacopoeia, E. (2005) Salmon oil, farmed, European Pharmacopoeia, 01/2005:1910.
11. Pharmacopoeia, E. (2009) Cod-liver oil, farmed, European Pharmacopoeia, 01/2009:2398.
12. Kjosbakken, J. (1970) Nitrogenekstraktiver i sild, lodde og makrell, In *Institutt for teknisk biokjemi*, NTH, Trondheim.

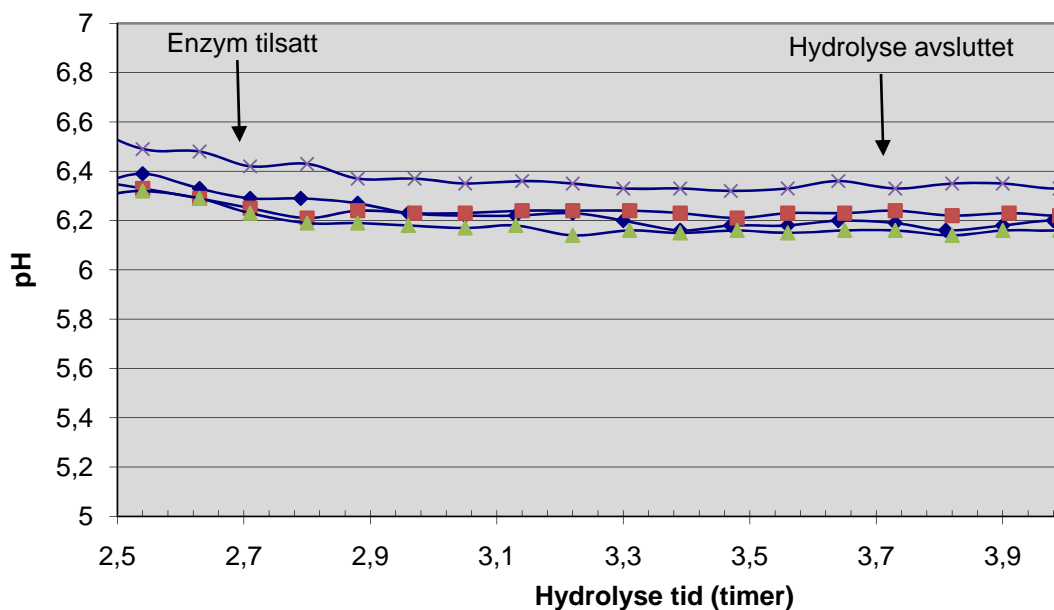
8 Vedlegg

Enzymer

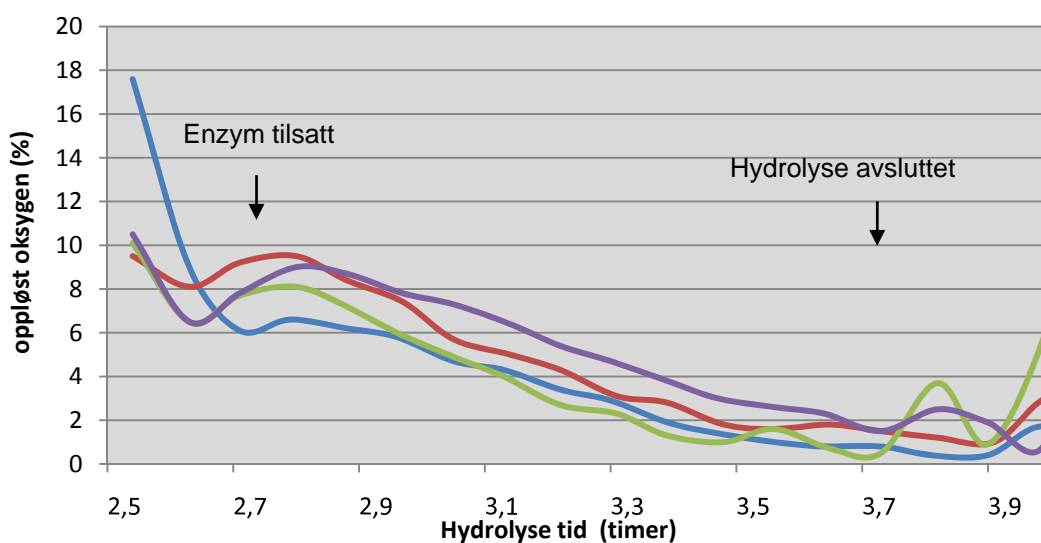
1. **Alcalase® 2.4 L FG**, (Novozymes A/S). Alcalase er proteolytisk enzym produsert fra *Bacillus licheniformis* og er tilpasset hydrolyse av alle typer protein. Hovedkomponenten i enzymet er subtilisin (3.4.21.62) som er en basisk serin endoproteinase (dvs det kutter proteinet i større peptider).
2. **Protamex®**, (Novozymes A/S). Protamex® er en protease produsert fra *Bacillus* og selektert for hydrolyse av matproteiner. Protamex består av to enzymer subtilisin og bacillolysin som er en nøytral protease.
3. **Flavourzyme®**, (Novozymes A/S) produseres fra soppen *Aspergillus oryzae* og er en exopeptidase, leucyl aminopeptidase som spalter aminosyrekjeden fra den N-terminale enden. I følge Novozymes skal flavourzyme også inneholde endopeptidaser.
4. **Promod™ 184P** (Biocatalysts). Promod™ er protease fremstilt fra *Anas comosus* som løser animalsk vev og delvis hydrolyserer kollagen.
5. **Papain** (Enzybel). Papain er sammensatt av fire proteaser (Papain, Chymopapain, Caricain og Glycyl endopeptidase) som kan brukes for proteolytisk degradering. Opprinnelse av Papain er lateks fra papaya frukt.
6. **Bromelain** (Enzybel). Bromelain er består av tre cysteine endopeptidaser (Stem Bromelain, Ananain, Comosain) som effektivt hydrolyserer proteiner. Opprinnelse er ananas fra *Ananas comosus*.

Hydrolysebetingelser

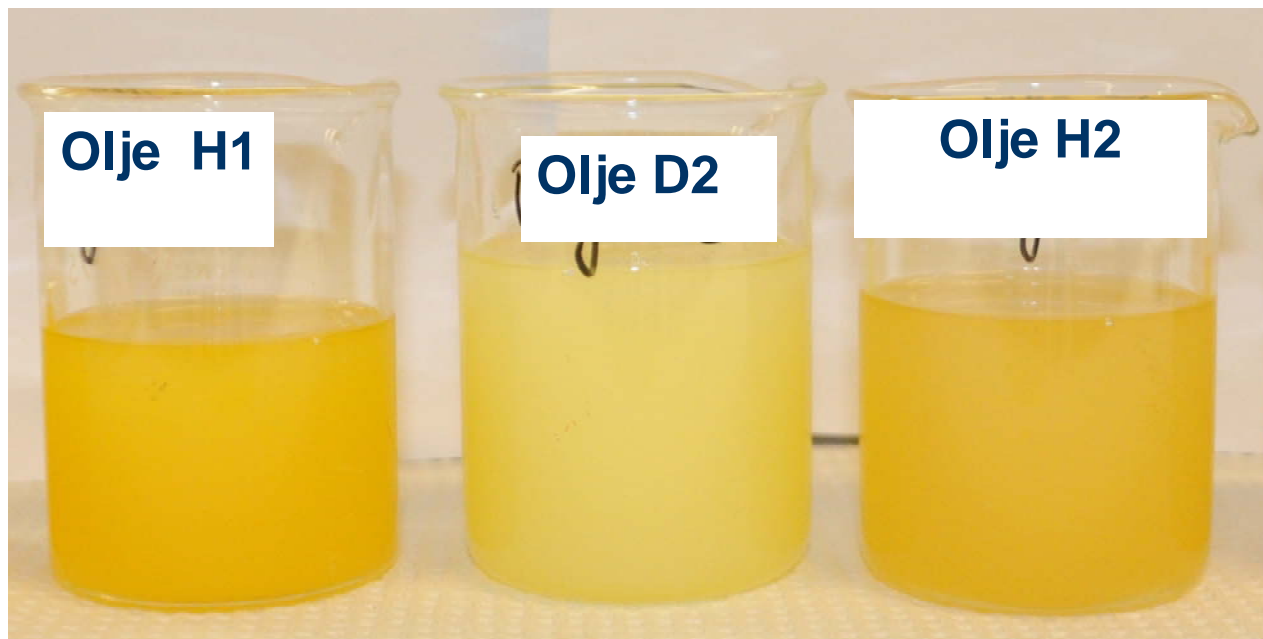
Enzym	Optimal temperatur °C	Optimal, pH
Alcalase FG	55-70	6-9,5
Protamex	35-60	5,5-7,5
Flavourzyme	35-55	6,5-8
Promod™ 184P	45-55	5,0-7,0
Papain	25-70	5-9
Bromelain	50-60	5-9



Figur 30. Automatisk pH registrering løpet av hele hydrolyse prosessen (hydrolyser med følgende enzymer: Papain, Papain + Bromelain, Promod 1,84 P og Protamex).



Figur 31. Automatisk registrering av oppløst oksygen i løpet av hele hydrolyse prosessen (hydrolyser med følgende enzymer: Papain, Papain + Bromelain, Promod 1,84 P og Protamex).



Figur 32. Olje etter forskjellige behandlinger – industriell forsøk.

Figur 33. Industrielle prøver etter sentrifugering.

Tabell 9. Standarder beregning FPLC for kalibrering.

Superdex G-75.	Mw	Ve, ml	Ve/Vo	Log10 Mw
Phosphorylase b	97000	8,5	1,1	5,0
Albumin	66000	11,5	1,4	4,8
Ovalbumin	45000	12	1,5	4,7
Carbonic anhydrase	30000	13,5	1,7	4,5
Trypsin inhibitor	20100	16	2,0	4,3
a-Lactalbumin	14000	19	2,4	4,1
Cytochrome	12400	20	2,5	3,8

Tabell 10. Egenskaper til FPLC kolone.

	Superdex G-75
Matrix:	Composite of cross-linked agarose and dextran
Bed dimension	10*300-310 nm
Bed Volume	Approx. 24 ml
Void volume	8 ml
Average particle size	13 μ m
Optimum separation range M_r	3000-70 000
pH stability	3-12
Flow rate	1.5 ml/min

Tabell 11. Fettsyre profil av produserte oljer, mg/g olje.

	Olje H1 (hydrolyse)	Olje D2 (direkte)	Olje H2 (hydrolyse)
Fett syrer	mg/g	mg/g	mg/g
C14:0	80,0±3,8	82,9±1,7	76,6±1,5
c14:1n9	0,5±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0
C16:0	124,3±4,0	126,8±1,4	119,0±2,5
C16:1n7	51,8±0,1	51,7±0,8	50,6±0,2
C18:0	6,2±0,3	6,0±0,8	6,3±0,2
C18:1n9	89,4±1,3	84,6±0,5	85,3±0,5
C18:1n7	13,4±0,2	13,1±0,1	12,7±0,2
c18.1	2,3±0,1	1,9±0,4	2,3±0,0
C18:2n6	11,5±0,4	11,0±0,5	11,4±0,1
c18:3n6	0,8±0,1	0,7±0,2	0,8±0,0
C18:3n3	9,3±0,2	8,7±0,5	9,2±0,1
c18:4n3	25,4±0,5	25,9±0,1	26,0±0,2
C20:0	0,9±0,1	0,9±0,1	0,8±0,0
C20:1n9	97,4±2,4	98,7±1,5	100,8±0,0
c20:1n7	2,3±0,1	3,0±0,8	1,7±0,3
C20:2	1,4±0,0	1,2±0,2	1,4±0,1
C20:3n3	0,4±0,1	0,6±0,5	0,5±0,1
C20:4n6	3,4±1,6	5,8±3,2	3,0±0,6
c20:4n3	4,2±0,3	4,2±0,5	4,8±0,1
C20:5n3	61,6±1,6	60,1±0,4	60,9±0,3
c22:1n11	155,3±5,9	154,6±4,7	164,3±3,5
C22:1n9	10,5±1,8	11,4±1,9	9,5±0,4
c22:1n7	1,7±0,7	2,4±0,8	1,8±0,1
c22:3	1,9±0,1	1,9±0,4	1,8±0,0
c22:5n3	3,9±0,2	3,8±0,4	3,6±0,2
C22:6n3	61,9±2,9	60,1±0,8	61,6±0,2

Pris tilbud: enzymer:

Pristilbud er gitt ut fra at bedriften kjøper 1 500 kg av følgende enzymer (April 2010):

Tilbud 1: Novozymes A/S

Please use these prices in your calculations:

Alcalase 2,4L: 203 DKK/kg (27,40 EUR/kg) (220NOK)

Flavourzyme: 400 DKK/kg (53,70 EUR/kg) (436 NOK)

Protamex: 245 DKK/kg (32,90 EUR/kg) (267 NOK)

Tilbud 2: Enzybel International s.a

Product: Refined papain powder GSM80

Activity: > 80 TU/mg

Quantity: 750 kg

Packaging size : 25 kg/drum

Price : 7.8 €/kg ex works Villers-le-Bouillet. (63 NOK)

Payment : 30 days net

Leading time : usually 3 weeks

Validity of the offer: 3 months

Product: Refined bromelain powder Br400

Activity: > 400 GDU/g

Quantity: 750 kg

Packaging size : 25 kg/drum

Price : 12.26 €/kg ex works Villers-le-Bouillet. (100NOK)

Payment : 30 days net

Leading time : usually 3 weeks

Validity of the offer: 3 months