

# Karakterisering av avfallsstrømmer i matindustri

**Irene Tangen**

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: juni 2016

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Medveileder: Alexander Dikiy, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi



# Forord

Denne masteroppgaven har vært en del av den integrerte mastergradsutdanningen i bioteknologi (MBIOT5) ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU). Arbeidet med oppgaven har foregått ved Institutt for bioteknologi ved NTNU, og har vært en del av forskningsprosjektet BioSuck. Dette er et forskningsprosjekt som koordineres av Fraunhofer Institute for Environmental, Safety, and Energy Technology (UMISICHT) i Tyskland, der institutt for bioteknologi ved NTNU er en av partene.

I forbindelse med denne oppgaven vil rette en stor takk til min hovedveileder professor Turid Rustad for god veiledning i forbindelse med masterarbeidet. Hennes verdifulle tilbakemeldinger, og ekspertise på fagområdet har vært til stor hjelp og jeg er svært takknemlig. Videre vil jeg rette en takk til min medveileder professor Alexander Dikiy for NMR-relatert teori, og støtte gjennom prosessen. En stor takk vil jeg også rette til forsker Elena Shumilina for analyse av NMR-spektrene og for verdifull veiledning og hjelp. Jeg vil også takke tidligere prosjektleder Egidijus Dauksas, for opplæring og informasjon om prosjektet, og inntredende prosjektleder Trude Johansen for veiledning og gode råd.

Ellers vil jeg benytte anledningen til å takke alle mine nære venner, familien og kjæresten min, for all støtten omtanken, og for at dere har heiet meg fram. Jeg håper dere selv vet hvem dere er, og at jeg evig takknemlig.

Trondheim, juni 2016

Irene Tangen

# Sammendrag

I næringsmiddelindustrien, som er en av verdens største industrier, generes store mengder biråstoffer og prosessvann under produksjon og flyten av avfallsstrømmene er svært stor. Det er flere betydelige miljøutfordringer knyttet til avfallet næringsmiddelindustrien, og næringsmiddelprodusenter er under stort press fra forbrukere og myndigheter. Prosessavløpsvann er i dag den største avfallsstrømmen, og sammen med biråstoffene som generes under prosessering, er dette de to hovedtypene av avfall som genereres. Ved å redusere vannforbruket og å utnytte biråstoffene til blant annet energi eller i nye produkter, kan avfallsstrømmene fra næringsmiddelindustrien reduseres betraktelig.

Denne oppgaven er skrevet som en del av prosjektet BioSuck, som har som mål å samle inn informasjon til et beslutningsverktøy for å vedta hvor og når det vil være fordelaktig å installere vakuulinjer i næringsmiddelindustrien. Ved installeringen av slike vakuulinjer, reduseres vannforbruket betraktelig, og oppkonsentrerte forbindelser fra prosessvannet kan utnyttes til energi til bedriften. Målet med denne oppgaven var å analysere prosessvann fra næringsmiddelindustrien, se på hvilke effekter reduksjoner av vannmengde har på konsentrasjoner av ulike forurensningsparametere, samt å kartlegge innholdet i ulike prosessvann. Analysene i oppgaven har blitt gjennomført på prosessvann fra lakselakteriet SalMar, fra to bryggeprosjekter gjennomført ved NTNU, i tillegg til analyser av prosessvann fra et utarbeidet modellsystem.

Prosessvannet fra lakselakteriet ble analysert for forurensningsparameterne totalt organisk karbon (TOC) og totalt nitrogen (TN). Konsentrasjonene av TOC lå mellom 57-418 mg/L, og konsentrasjonene av TN lå mellom 30-65 mg/L. Resultatet viste at konsentrasjonen av TOC var høyere ved filetering enn ved slakting, mens det var ingen sammenheng mellom konsentrasjonene av TN og de ulike prosesseringsstegene. Maltvann fra bryggeprosjektene ble analysert for forurensningsparameterne kjemisk oksygenforbruk (COD), TOC og TN. COD-verdiene lå på 202000-320000 mg/L, TOC-verdiene på 52000-123000 g/L og TN-verdiene på 290-370 mg/L.

For å forenkle analysene på prosessvannprøvene fra modellsystemet, ble det gjennomført et fryseforsøk. Fryste ekstrakter fra prosessvannprøver ble analysert for COD, TOC og TN, samt

totalt fosfor (TP). Resultatet av frysingen var svært varierende, og frysing ble utelukket som konserveringsmetode for filtrat beregnet til analyse av forurensningsparameterne COD, TOC, TN og TP. Ved frakting av prøve fra fiskeprosesseringsanlegg til laboratoriet, fryses ofte prøvene. Det kan derfor være lurt å undersøke effekten av frysing ytterligere, og nye måter for transportert av prosessvann fra industrien til laboratoriet bør vurderes.

I modellsystemet ble modell-prosessvann generert fra biråstoffprøver av fisk, malt og humle. Prøvene ble analysert for forurensningsparameterne COD, TOC og TN med forholdene mellom biråstoff og vann: 1:1, 10:4 og 10:3. Det viste seg at vannmengden brukt i forhold til biråstoff var lavere enn det som er mulig å oppnå med vakuulinjer i dag, og ved videre utvikling av modellsystemet vil det være nyttig å bruke større mengder vann i forhold til biråstoff prøve. Det ble også kun brukt en parallell fra hver måling, og for å kunne bestemme usikkerheten på forsøket og for å se på signifikante forskjeller, bør det gjennomføres analyse av modell-prosessvann ved senere anledninger brukes flere paralleller.

NMR-analyse gjør det mulig å bestemme ulike forbindelser i prosessvann. Ved analyse av både modell-prosessvann fra fiskeprøvene, modell-prosessvann fra bryggeprøvene og prosessvann fra lakseslakteriet ble det funnet varierende mengder av ulike aminosyrer. Prosessvannet fra fiskeprøvene og fra lakseslakteriet inneholdt i tillegg taurin, en essensiell forbindelse som mennesker ikke syntetiserer selv, men som er viktige for en rekke fysiologiske prosesser i kroppen. I begge prøvene var mengden av taurin større enn mengden av de enkelte aminosyrene.

# Abstract

The food industry is one of the largest industries in the world, and every year a huge amount of waste is generated during processing and production of food. There are several significant environmental challenges related to food waste, and food manufacturers are under great pressure from consumers and governments. There are two main types of waste generated during food processing: waste water and rest raw materials. By reducing water consumption and utilizing rest raw materials in new product and in energy production, waste streams from the food industry can be significantly reduced.

This paper is written as a contribution to the BioSuck project, which aims to collect information for a decision support system for adopting where and when it will be advantageous to install vacuum lines in the food industry. Upon installation of such vacuum lines, water consumption can be considerably reduced, and concentrated compounds from the process water can be utilized for energy. The aim of this study was to analyze waste water from the food industry, to evaluate which effect water reductions has on the concentration of various pollution parameters, and to map the contents of various samples of waste water. The analyses in the study has been conducted on process water from salmon slaughterhouse SalMar, two brew projects conducted at NTNU, as well as on process water from a prepared model system.

Process water from salmon slaughterhouse was analyzed for the contamination parameters total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN). Concentrations of TOC was between 57-418 mg/L, and the concentrations of TN between 30-65 mg/L. The results showed that the concentration of TOC was higher at filleting than by slaughtering, while there was no correlation between the concentrations of TN and the different processing steps. Malt water from the brewing projects were analyzed for the contamination parameters chemical oxygen demand (COD), TOC and TN. The result was COD values of 202000-320000 mg/L, TOC values of 52000-123000 g/L, and TN values of 290-370 mg/L.

To simplify the analyzes in process water samples taken from the system, a freezing experiment was conducted. Frozen extracts from the process water samples were analyzed for COD, TOC and TN, as well as total phosphorus (TP). The result of the freezing was highly variable, and freezing was therefore excluded as a preservation method for filtrate intended for analysis of

the pollution parameters COD, TOC, TN and TP. To easily transport samples of waste waters from the fish processing plants to the lab, will the samples normally be freeze-dried. It may therefore be wise to further investigate the effect of freezing, and investigate new ways for transport of process water from industry to the laboratory.

In the model system, model process water was generated from rest raw material of fish, malt and hops. Samples were analyzed for the contamination parameters COD, TOC and TN, with ratios of raw materials to water of 1:1, 10:4, and 10:3. It turned out that the amount of water utilized in relation to the rest raw materials was lower than what is possible to achieve with vacuum lines. In the further development of the model system it will be useful to use larger amounts of water relative to the rest raw material samples. Furthermore, only one parallel was used for each measurement. To determine the uncertainty of the experiment and to see the significant differences, further analyses of the model process water should include several parallels. The degree of grinding of the sample should also be considered.

NMR analysis makes it possible to determine different substances in process water. There were found varying amounts of various amino acids by NMR analysis of waste water from fish samples, waste water from brewing samples and waste water from salmon. Waste water from fish samples and from salmon slaughterhouse-samples did additionally contain taurine, an essential compound which are important for a variety of physiological processes in the body. In both samples, the amount of taurine were larger than the amount of the individual amino acids.

# Innhold

Forord .....	iii
Sammendrag.....	iv
Abstract .....	vi
Innhold .....	<b>Feil! Bokmerke er ikke definert.</b>
Forkortelser .....	x
1 Innledning .....	1
1.1 Bakgrunn .....	1
1.1.1 Avfallsstrømmer i matindustrien.....	1
1.1.2 Prosessavløpsvann.....	2
1.2 Formål.....	3
2 Teori .....	5
2.1 Hovednæringsstoffer i fisk .....	5
2.2 Biråstoff og prosessvann i norsk fiskenæring.....	8
2.3 Ølbrygging.....	11
2.4 Forurensningsparametere.....	13
2.4.1 Kjemisk oksygenforbruk .....	13
2.4.2 Biokjemisk oksygenforbruk .....	15
2.4.3 Totalt organisk karbon .....	16
2.4.4 Sammenligning av COD, BOD og TOC .....	17
2.4.5 Totalt nitrogen .....	20
2.4.6 Totalt fosfor.....	20
2.5 Målemetoder .....	21
2.5.1 CN analyse .....	21
2.5.2 Fra nitrogen til protein.....	21
2.5.3 NMR.....	22
3 Materialer og metoder .....	24
3.1 Materialer.....	24
3.1.1 Fiskeprøver.....	24
3.1.2 Bryggeprøver.....	26
3.1.3 Faste råmaterialer og vannprøver .....	27
3.2 Metoder.....	28
3.2.1 Arbeidsflyt.....	28



3.2.2	Analyse av råmaterialer.....	29
3.2.3	Analyse av prosessvann .....	30
3.2.4	NMR.....	32
4	Resultater og diskusjon .....	33
4.1	Analyse av råmaterialer .....	33
4.1.1	Fiskeprøver.....	33
4.1.2	Bryggeprøver.....	37
4.2	Forurensningsparametere i avløpsvann .....	38
4.2.1	Produksjonsvann .....	38
4.2.2	Maltvannprøver .....	39
4.3	Modellprosess: generering av prosessvann .....	41
4.3.1	Frysing av filtrat .....	42
4.3.2	Trender i modellsystemet .....	44
4.3.3	Vurdering av modellsystemet.....	47
4.4	NMR.....	49
5	Konklusjon .....	55
6	Bibliografi .....	57

# Forkortelser

ATP	Adenosin-5'-trifosfat
BSA	Bovin serum albumin
BOD	Biokjemisk oksygenforbruk
COD	Kjemisk oksygenforbruk
Hx	Hypoxantin
Ino	Inosin
NTNU	Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet
TP	Totalt fosfor
TC	Totalt karbon
TIC	Totalt uorganisk karbon
TN	Totalt nitrogen
TOC	Totalt organisk karbon

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Gjennom verdikjeden for produksjon av mat, genereres store mengder avfall. I EU er det estimert at 222 tonn matavfall blir generert årlig (1), og av disse er det estimert at ca. 7% er tilknyttet produksjon (2). Tallene er kun estimater, og det må tas i betraktning at det er variasjoner mellom steder og ulike seksjoner av næringsmiddelindustrien. Tidligere var fortjenesten på matproduktet så stor at produsentene ikke la ressurser i å begrense generering av avfall eller å utnytte biråstoffer til sin fordel, og det ble derfor generert unødvendig store mengder avfall ved prosessering av mat (1). Det er flere store miljøutfordringer knyttet til håndtering av avfallet. Blant annet kan avfall fra næringsmiddelindustrien føre til utslipp av klimagassen metan, stram lukt, næringsalter gjennom sigevann, samt føre til økende bestander av rotter og fugler (3). For å minske miljøbelastningen har myndighetene i flere land, de senere årene strammet inn og fastsatt nye lover og forskrifter på dette området. Forskriftene legger begrensninger for hvordan avfallet skal håndteres, og det er vedtatt høye avgifter for kompostering og andre tilsvarende metoder for å håndtere avfall. Engasjementet for miljøet har også økt blant forbrukerne, og de stiller derfor høyere krav til produsentene. Presset fra forbrukerne og avgiftene har tvunget produsentene til å finne nye innovative metoder for produksjon og håndtering av biråstoffer og avløpsvann, men det er fremdeles store muligheter for å effektivisere produksjonen ytterligere (1).

### 1.1.1 Avfallsstrømmer i matindustrien

Avfallsstrømmer er strømmer av spesifikt avfall; fra forbruker eller produsent, som går videre til gjenvinning, resirkulering eller kasting som sluttavfall (4). I denne oppgaven vil også prosessavløpsvann fra mekanisk slakting og foredling av næringsmidler inkluderes som en avfallsstrøm.

Matproduksjon generer i hovedsak to typer avfall: restråstoffer/biprodukter og prosessavløpsvann. Restråstoffer er rester av råstoff fra foredling og prosessering, og kan utnyttes videre i næringsmiddelproduksjon. Biprodukter er deler av råmaterialet som ikke kan benyttes som næringsmidler til mennesker, men i stedet kan brukes som dyrefôr eller til tekniske formål som produksjon av bioenergi og kjemikalier til farmasi- eller kosmetikkindustrien (5). I denne oppgaven vil begrepet biråstoff bli brukt som en samlebetegnelse på restråstoffer og biprodukter. Biråstoffer inkluderer avskjær og uønskede rester etter forbehandling, rester generert som en integrert del av prosesseringen, avfall fra ineffektiv produksjon og slam etter rensing av avløpsvann (6). Eksempler på marine biråstoff fra fiskeforedling er utdypet senere i avsnitt 2.2.

### 1.1.2 Prosessavløpsvann

Prosessavløpsvann er den største avfallsstrømmen fra matprosesseringsanlegg, og omfatter vann som brukes til spyling, rengjøring og transport av næringsmidler og utstyr, samt blodvann, slaktevann eller vann som har vært i kontakt med råstoff, produkt eller avfall (7). Som en forenkling vil ordet prosessavløpsvann i denne oppgaven være omtalt som prosessvann.

For mange produsenter er forbruket av vann høyere enn forbruket av ingredienser og råmaterialer, og i prosessvannet varierer fra produksjon til produksjon (6, 8). Generelt sett har prosessvann et betydelig innhold av næringssalter og organiske materialer. Utslipp av næringssalter og organisk materiale til ferskvann og fjordområder kan ha store konsekvenser. Organisk materiale kan føre til overgjødning, og overskudd av nitrogen og fosfor kan føre til masseoppblomstring av alger og at vannet blir uklart og udelikat. Blir oppblomstringene store kan algene forbruke alt oksygenet på bunnen, og i verste fall vil dette resultere i fiskedød (9, 10).

I Norge renses flere bedrifter avløpsvannet via egne rensesanlegg, og mange bedrifter er knyttet til kommunale rensesanlegg. For å begrense faren for uønsket utslipp er det viktig med gode og representative målinger av vannmengde, fettinnhold og andre forurensningsparametere. Bedriftene er derfor pålagt å vite størrelse og variasjon på bedriftens faktiske utslipp (10). Som et mål på den organiske belastningen avløpsvannet har på de lokale omgivelsene brukes forurensningsparameterne biokjemisk oksygenforbruk (BOD), kjemisk oksygenforbruk (COD) og totalt organisk karbon (TOC) (11). En utdypning av hva disse parameterne er og hvordan de

måles er beskrevet i avsnitt 2.4. I forurensningsforskriften kapittel 37, norsk lovdata (7), er den tillatte konsentrasjonen av BOD, COD og TOC i avløpsvann for norske bedrifter oppgitt, vist i Tabell 1.1. Ved påvist sammenheng mellom BOD og TOC, kan TOC erstatte BOD som måleparameter. Avløpsvannet skal også testes for totalt nitrogen- (TN) innhold, totalt fosfor- (TP) innhold, suspendert stoff (SS) og oljeinnhold (7). Informasjon om TN og TP er utdypet i avsnitt 2.4, og den tillatte konsentrasjonen av disse parameterne er vist i Tabell 1.1.

**Tabell 1.1: Tillatte norske konsentrasjonsverdier på forurensningsparametere i prosessavløpsvann**

Parametere	Konsentrasjon
Biokjemisk oksygenforbruk (BOD), 20°C	25 mg/l O <sub>2</sub>
Kjemisk oksygenforbruk (COD)	125 mg/l O <sub>2</sub>
Totalt nitrogen (TP)	2 mg/l P (mellom 10.000 og 100.000 pe*)
	1 mg/l P (over 100.000 pe*)
Totalt fosfor (TN)	15 mg/l N <sub>3</sub> (mellom 10.000 og 100.000 pe*)
	10 mg/l N <sub>3</sub> (over 100.000 pe*)

\* Personekvivalent, pe: Den mengde organisk stoff som brytes ned biologisk med et biokjemisk oksygenforbruk målt over fem døgn, BOD<sub>5</sub>, på 60 g oksygen per døgn

I følge forurensningsforskriften skal forurensningsparameterne bestemmes etter norske standarder. For enklere, og ofte mer miljøvennlig, bestemmelse av de overnevnte forurensningsparameterne er det mulig å bruke enkle ferdigproduserte kyvettetester fra en produsent. Dette er ofte brukt i industrien i andre land, og kyvettetester for COD er satt som standard i den internasjonale standardiseringsorganisasjon (ISO) (12).

## 1.2 Formål

Institutt for bioteknologi (IBT) ved NTNU er en partner i prosjektet BioSuck, og denne masteroppgaven er skrevet som et ledd i dette prosjektet. BioSuck konsortiet består av tre vitenskapelige og to industrielle partnere, med koordinatoren Fraunhofer Institute for Environmental, Safety and Energy Technology (UMSICHT) i Tyskland.

Hovedmålet for BioSuck-prosjektet er å utvikle et beslutningsstøtteverktøy (DSS). Beslutningsverktøyet vil inneholde data om ulike scenarier for hvor avfall dannes og oppsamles, samt en kartlegging av sammensetning i avfallsstrømmer fra prosessering av næringsmidler. Prosjektet vil fokusere på prosessering av næringsmidler som meieriprodukter, sjømat, øl, kjøtt og bakverk. På bakgrunn av informasjonen samlet i DSS, vil det bli bestemt hvor og når det vil være fordelaktig å installere vakuumlinjjer i næringsmiddelindustrien, slik at vakuumlinjen effektivt kan samle opp avfall. Det konsentrerte avfallet vil bli prosessert videre, og blir brukt til produksjon av bioenergi eller for resirkulering av næringsstoffer. Den mest bærekraftige løsningen skal defineres av DSS. Implementeringen av resultatene av DSS i næringsmiddelindustrien vil ha følgende fordeler:

- Spare signifikante mengder vann
- Redusere kostnader for behandling av prosessvann
- Vakuumlinjene vil gi fleksibilitet mhp avfallsbehandling ved produksjonsendringer
- Vil gi verdifulle sidestrømmer bestående av 1) næringsstoffer og 2) bioenergi (biokull, biogass, bioetanol)
- Være mer ressurseffektiv og mer uavhengig fra eksterne tilførsler
- Redusere totalt karbonavtrykk
- Redusere totalt vannavtrykk.

NTNUs bidrag til prosjektet er i første omgang karakterisering av avfallsstrømmer. Parametere som skal analyseres er COD, BOD, TOC, TN, TP og tørrstoff. Forurensningsparameterne skal analyseres med industrielle metoder, og det vil derfor bli brukt kyvettetester fra kjemisk utsyr- og kjemikaliedistributør Hach. Vannmengden vil bli redusert 50-80 % i det nye designet. På bakgrunn av dette vil det bli utarbeidet et modellsystem der konsentrasjonen av vann i forhold til produkt, er mye lavere enn det er under prosessering i dag. Forholdstallene mellom organisk materiale og vann vil ligge mellom 1:1 og 10:4. Hensikten med modellsystemet er å kartlegge hvorvidt ulike vannkonsentrasjoner påvirker forurensningsparameterne under de nevnte forholdene. For å se på metabolittene i avløpsvannet fra modellsystemet vil disse bli kartlagt ved bruk av kjernemagnetisk resonans (NMR).

Masteroppgaven vil fokusere på avløpsvann fra fiskeindustrien og avfall fra to bryggeprosjekter gjennomført ved NTNU.

## 2 Teori

### 2.1 Hovednæringsstoffer i fisk

Næringsinnholdet innen en fiskeart varierer med hvilken del av fisken som sammenlignes, samt faktorer som tilgang på føde, fôr til oppdrettsfisk, gyteperioder og sesongvariasjoner. Det er derfor vanskelig å sette opp en standardtabell for mengden lipider, proteiner og karbohydrater i en art. En måte å dele inn fisker på er etter prosentvis mengde fett. Fisk med fettinnhold lavere enn 2 % kategoriseres som mager, fettinnhold mellom 2 og 8 % som halvfet, og fettinnhold høyere enn 8 % som fet (13). Eksempler på ulike arter innenfor de forskjellige kategoriene er vist i Tabell 2.1. Det er også variasjoner i proteininnholdet i ulike fiskeslag, men de fleste fiskeslagene ligger mellom 15 og 20 % protein i musklene (filetene). Mengden karbohydrater er generelt lavt, og av den total fiskevekten utgjør ofte glykogen mindre enn 0,3 %. Mengden karbohydrater blir derfor ofte sett bort ifra ved beregninger av næringsinnhold i fisk (14).

**Tabell 2.1: Ulike fisker innen kategoriene mager, halvfet og fet fisk (14)**

Kategori	Fisk
Mager fisk	Torsk
	Sei
	Uer
Halvfet fisk	Kveite
	Regnbueørret
Fet fisk	Laks
	Makrell

Filet er det vanligste matproduktet fra fisk (15), og næringsinnholdet i fisken angis ofte som innholdet i fileten. Tabell 2.2 viser næringsinnholdet i fileter fra laks, lange, torsk, sei og makrell, bestemt av Nasjonalt institutt for ernæring og sjømatforskning (NIFES)(16). Næringsinnholdet i fileter fra uer, er hentet fra DTU Fødevareinstituttet (17).

**Tabell 2.2: Næringsinnhold i filet fra utvalgte fisker (16, 17)**

Fisk	Lipider (g/100g)	Protein (g/100g)	Aske (g/100g)	Vann (g/100g)
Antarktisk laks ( <i>Salmo salar</i> )	13,2	19,2	1,2	56
Uer	0,9	18,9	1,0	79
Lange ( <i>Molva molva</i> )	1,1	19,9	1,1	80
Atlantisk torsk ( <i>Gadus morhua</i> )	1,1	16,3	1,0	82
Sei ( <i>Pollachius virens</i> )	1,2	18,6	1,2	79
Makrell ( <i>Scomber scombrus</i> )	32,0	16,9	0,9	51

For å utarbeide mulige nye anvendelser av biråstoffer fra fisk, er det også gjennomført enkelte undersøkelser på dette. Restråstoff fra fiskeindustri omfatter fiskeavskjær, innmat, hoder, rygg og slo fra fisk, som i alle ledd er håndtert etter næringsmiddelregelverket (18). Marine biprodukter har ikke en enkelt definisjon, men i Norge defineres biprodukter som deler av fisken som ikke kan benyttes som næringsmidler til mennesker, men som kan resirkuleres og utnyttes etter videre behandling (19). Tabell 2.3 viser næringsinnhold i utvalgte biråstoffer fra laks (20), og Tabell 2.4 viser næringsinnhold i fiskebein fra fisk fanget i Norge.

**Tabell 2.3: Næringsinnhold i utvalgte biprodukter fra laks (20, 21)**

Biprodukt	Lipider (%)	Protein (%)	Aske (%)	Vann (%)	Totalt (%)
Rygg	18,6	16,2	3,9	61,2	99,9
Hode	59,8	15,4	3,6	59,8	99,8
Lever	4,4	19,0	1,5	74,6	99,5
Slo	15,9	13,2	1,3	70,0	100,4



**Tabell 2.4: Næringsinnhold i fiskebein fra fisk fanget i Norge (22)**

	<b>Lipider</b> <b>(g/kg)</b>	<b>Proteiner</b> <b>(g/kg)</b>	<b>Aske</b> <b>(g/kg)</b>	<b>Vann</b> <b>(g/kg)</b>
Laks (n = 6)	282,8 ±37,9	292,0 ±31,6	263,7 ±20,4	49,6 ±3,3
Torsk (n = 2)	23,1 ±0,4	357,8 ±1,6	526,4 ±0,4	77,7 ±0,4
Sei, liten (n = 4)	24,8 ±8,0	369,7 ±2,2	538,2 ±7,4	61,9 ±2,4
Sei, stor (n = 2)	23,0 ±0,6	335,9 ±1,0	565 ±1,1	52,1 ±0,1
Makrell (n = 2)	509,5 ±5,3	261,3 ±1,1	212,4 ±0,8	44,2 ±0,4

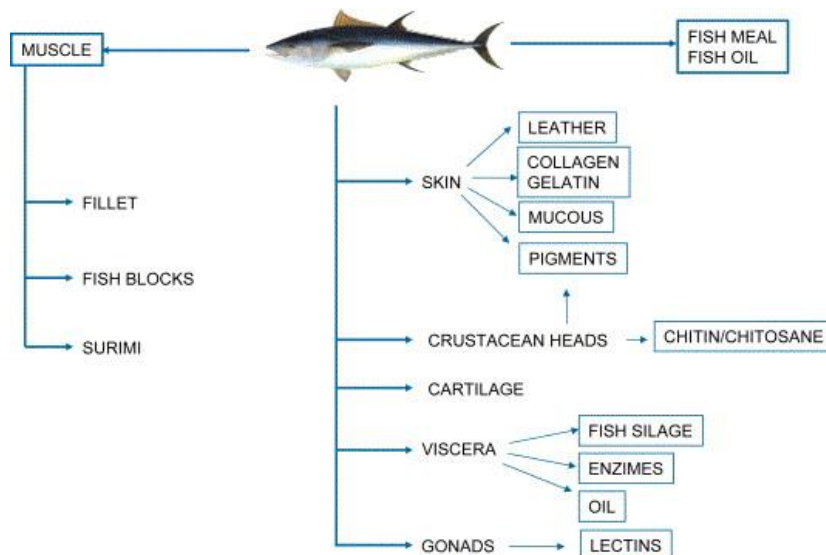
## 2.2 Biråstoff og prosessvann i norsk fiskeenæring

Norge er den største fiskeprodusenten av de nordiske landene (23), og i 2011 ble det generert rundt 289 000 tonn biråstoff av torskefisk, 238 000 tonn biråstoff fra sildefisk og 275 000 tonn biråstoff fra oppdrettsfisk. Av disse ble 37% av biråstoffet fra torsk, 97% av sild, og tilnærmet 100% av biråstoffet fra oppdrettsfisk utnyttet, mens resterende andel ble dumpet. Hvilke deler av biråstoffene fra torskefiskene som ble utnyttet, og mengden av disse, er vist i Tabell 2.5a. Mengden av de ulike biråstoffene fra oppdrettsfiskene er vist i Tabell 2.5b (18).

**Tabell 2.5: Mengdefordeling av ulike typer biråstoff generert i 2011 a) av torskefisk b) av oppdrettsfisk (inkludert oppdrettstorsk) (18)**

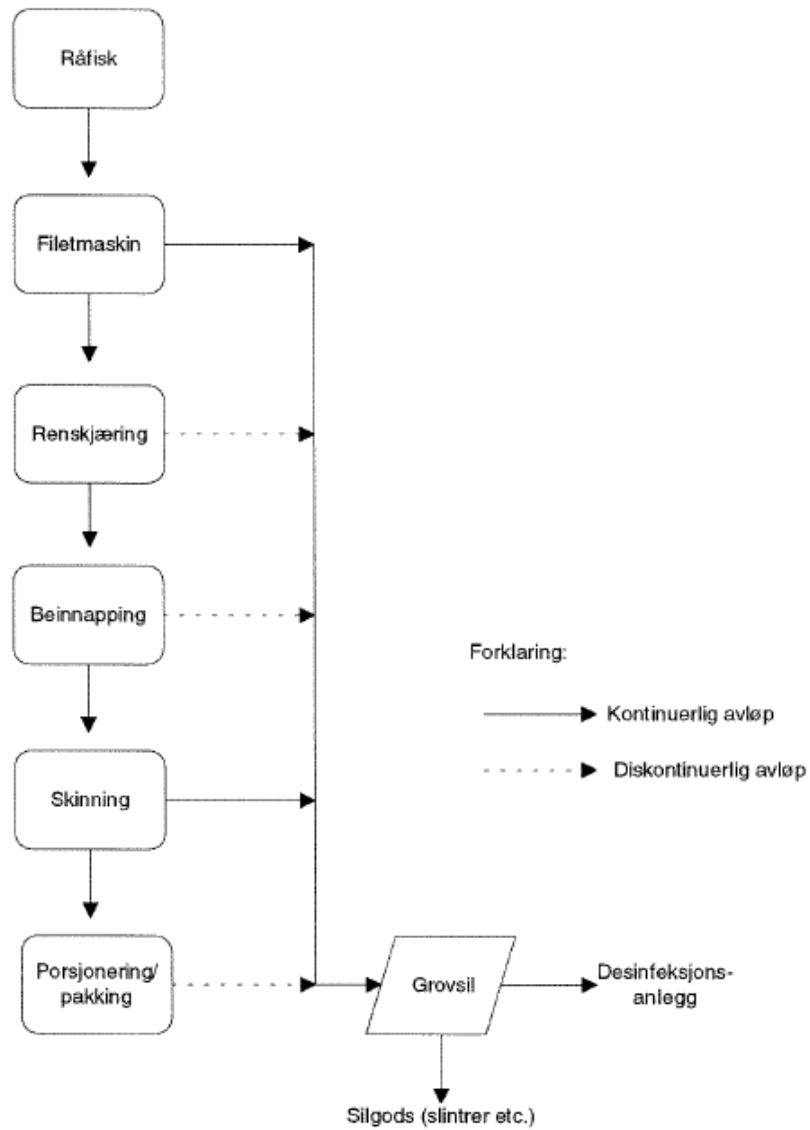
a)		b)	
Biråstoff	Mengde (tonn/år)	Biråstoff	Mengde (tonn/år)
Rygg/Avskjær	62 000	Slo/avskjær	165 000
Hoder	116 000	Hoder	28 000
Lever	53 000	Utkast	53 000
Slo	58 000	Dødfisk	62 000
<b>Sum</b>	<b>289 000</b>	<b>Sum</b>	<b>275 000</b>

I 2014 ble 69 % av restråstoffet fra norsk fiskeforedling utnyttet. I hovedsak ble restråstoffer utnyttet som ingredienser (oljer, proteiner og tilskudd/premikser) i diverse dyrefôr, eller utnyttet til sjømatprodukter, tran, ekstrakter eller andre produkter for humant konsum (24). Biråstoffer fra fisk er rike på verdifulle lipider og proteiner, og inneholder i tillegg mange andre forbindelser, som nukleinsyrer, kalsium, fosfor og andre bioaktive forbindelser. De marine oljene inneholder omega-3-fettsyrer, fosfolipider, squalen, fettløselige vitaminer og kolesterol, mens proteinene kan brytes ned og brukes til hydrolysater, surimi, forskjellige peptider og aminosyrer, samt gelatin og collagen (25-27). Det er mange muligheter til å utnytte biråstoffene fra fisk, og det optimale er å lage høyverdige produkter og selge dem til ulike markeder. Biråstoffer fra fisk blir blant annet brukt til fiskeolje, fiskemel, surimi, fiskefarse og fiskeensilasje (19). Figur 2.1 viser eksempler på hvilke produkter som kan lages fra ulike biråstoffer (28).



**Figur 2.1: Eksempler på bruk av biråstoffer fra fiskeindustri (28)**

I Norge er den industrielle behandlingen av fisk i hovedsak mekanisert, og store deler av biråstoffene genereres under sløyning og prosessering av fisken. I tillegg er de fleste mekaniske prosesseringsinstallasjoner som brukes under forbehandling avhengig av å bruke store mengder vann for å fungere optimalt. Ofte blir ikke vannmengden kontrollert, og vannforbruket vil for mange fiskeslakterier stige langt over minimumsgrensen for optimal drift (15, 29). Eksempler på prosessering der avløpsvann genereres er tining, vasking, hodekapping, filetering, fjerning av skinn, hermetisering og prosessering av fiskemat. Et eksempel på strømningsdiagram av avløpsvann fra en filetmaskin er vist i Figur 2.2. Under prosesseringstrinnene er vannet i kontakt med fisken og fiskeproduktene, og tar opp store mengder organiske stoffer som fett, vannløselige proteiner, eddiksyre og karbohydrater. Avløpsvannet vil også inneholde signifikante mengder nitrogen, fosfor og rester fra vaskeprosesser (15).



**Figur 2.2: Flytskjema for maskinell filetering med avløpsstrømmer (30).**

## 2.3 Ølbrygging

Øl brygges i hovedsak av fire ingredienser: malt, vann, humle (*Humulus lupulus*) og gjær (*Saccharomyces cerevisiae*). Mye av basissmaken i øl blir satt av maltet, og hovedsakelig er det valg av malt bestemmer hvilken øltype som brygges. Den vanligste formen for malt er ulike former for byggmalt (*Hordeum vulgare*), og det mest brukte alternativet er hvetemalt (*Triticum aestivum*). Det finnes forskjellige typer byggmalt (for eksempel Pale malt, Pilsner malt, Crystal/Caramel malt) og forskjellen mellom de ligger i hvordan malten behandles. Næringsinnholdet i korn fra bygg og hvete er vist i Tabell 2.6 (31).

**Tabell 2.6: Representative tilnærminger av næringsinnholdet (g/100g) i grynkorn til bygg og hvete. Typisk vanninnhold for korn er 10-15 % (31).**

Kornstype	Fett	Protein	Aske	Fiber	karbohydrater
Bygg	1,8	11,8	3,1	5,3	78,1
Hvete	1,8 - 2,9	10,5 - 16,0	1,8 - 2,0	2,5 - 3,0	74,1 - 78,4

For å brygge øl blandes først malt og vann, og blandingen varmes opp i en prosess kalt mesking. Etter meskingen skilles væsken fra maltet. Væsken som er igjen etter at maltet er fjernet blir kalt vørter. Vørteren varmes opp til kokepunktet, og under vørterkokingen tilsettes humle. Vørteren avkjøles til romtemperatur, før gjær tilsettes og sukker fermenteres til alkohol, karbondioksid og eventuelle andre smaksstoffer.

I løpet av året 2015 ble det brygget øl ved NTNU: Trulsøl og Saison Krabbiade<sup>15</sup>. I disse bryggeprosjektene ble det brukt Braumeister ølbryggeoppsett fra Speidel, se Figur 2.3. Braumeister ølbryggeoppsett fungerer slik at malt og vann blir varmet opp i et maltrør på innsiden av bryggekjelen. Maltet blir fjernet fra væsken ved å løfte opp maltrøret og la væsken renne igjennom et filter på bunnen. Vørteren i bryggekjelen blir så varmet opp igjen, og humle tilsettes. I bunnen av bryggekjelen er det plassert et humlegitter som blir fjernet før vørteren avkjøles. Gjær tilsettes og fermenteringen starter.



**Figur 2.3: Braumeister ølbryggingsoppsett fra Speidel.** Til venstre vises bryggekjelen med maltrøret plassert på innsiden. Etter mesking tas maltrøret ut, slik bildet i midten viser, og vørteren siles gjennom et filter og ned i bryggekjelen. Vørteren varmes så opp videre i bryggekjelen slik det er vist i bildet til høyre. Oppsettet ble brukt under bryggeprosjekter ved NTNU (32).

## 2.4 Forurensningsparametere

### 2.4.1 Kjemisk oksygenforbruk

Kjemisk oksygenforbruk (COD) angir den mengden oksygen som forbrukes ved kjemisk oksidasjon av organiske materialer (11). Målemetoden bestemmer totaleffekten av oksidasjon av organiske forbindelser i vann, uten at de organiske forbindelsene spesifiseres, og COD er et vanlig brukt mål på mengden forurensning i avløpsvann. Fordelene med COD er at oksidasjonen skjer kjemisk, og resultatet påvirkes dermed ikke av giftig innhold i prøven, slik oksidasjon av mikroorganismer vil gjøre, se avsnitt 2.4.2. I tillegg er metoden relativt rask å gjennomføre (33).

COD bestemmes ved å koke prøven (2t) i en løsning av svovelsyre ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), med tilsats av oksidasjonsmiddelet kaliumdikromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). De fleste organiske forbindelser brytes fullstendig ned (95-100%) med  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  i sur løsning, men fettsyrer med lav molekylmasse og enkelte andre organiske forbindelser oksideres ikke uten tilsats av katalysator. Til løsningen tilsettes det derfor sølvsulfat ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ), slik at sølvet katalyserer reaksjonen. I tillegg tilsettes kvikksølv salt, for eksempel kvikksølv sulfat ( $\text{Hg}_2\text{SO}_4$ ), for å binde opp klorid (se under) (11, 34). Etter endt oksidasjon bestemmes mengden  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  brukt i prosessen, enten ved å bestemme overskuddet av ubrukt dikromat ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) eller å bestemme mengden trivalent krom ( $\text{Cr}^{3+}$ ) dannet under reaksjonen. Titrimeri og kolometri er vanlige metoder brukt til slik bestemmelse (33).

Parametere som reaksjonstemperatur, oksidasjonstid, dikromatmengde eller svovelsyrekonsentrasjon kan variere blant ulike målemetoder for COD. Tidligere, ble kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) brukt som oksidasjonsmiddel, og dette brukes fremdeles i enkelte land (33, 34). I Norge defineres betingelsene for kjemisk oksygenforbruk av Norsk Standard NS 4748, mens det i EU brukes standardisert metode fra den internasjonale standardiseringsorganisasjon (ISO), ISO 6060 (35, 36). ISO har også etablert testkit metoden ST-COD ISO 15705 som internasjonal standard (12). Endringer i parametere vil normalt føre til systematiske forskjeller, men det er vist at testkittene har god overenstemmelse med både standard NS 4748 og ISO 6060 (12, 35).

Hvor god metoden er til å bestemme graden av oksidasjon sammenlignet med teoretiske verdier, avhenger i stor grad av mengden tungt og lett oksiderbare stoffer i prøvevannet. Vann med betydelige mengder oksiderbare uorganiske forbindelser gir systematisk høyere COD-verdier sammenlignet med teoretiske verdier. Eksempler på slike uorganiske forbindelser er jodid, bromidioner, enkelte svovelforbindelser, nitritt-ioner og enkelte metallforbindelser. I tillegg bidrar klorid ( $\text{Cl}^-$ ) blant annet til oksidasjon av ammonium, og selv om kvikksølv tilsettes for å binde opp  $\text{Cl}^-$  ionene kan ikke kloridkonsentrasjonen overstige 1000 mg/l (36). Bidraget til oksygenforbruket for noen av disse uorganiske forbindelsene er vist i Tabell 2.7. For vann med en høy mengde tungt nedbrytbare organiske forbindelser vil også den målte COD-verdien avvike fra teoretisk verdi. Eksempelvis oksideres ikke enkelte aromatiske hydrokarboner, pyridin, og kvarternære nitrogenforbindelser fullstendig av kaliumkromat. Vann med store mengder av disse forbindelsene får dermed systematisk for lave COD-verdier (35). Siden prøven kokes under reaksjonen vil også enkelte flyktige organiske forbindelser fordampe før oksidasjonen og bidra til for lave COD-verdier. På bakgrunn av de nevnte faktorene har metoden noen begrensinger. For eksempel er metoden mindre egnet til å måle mengden nedbrytbart organisk materiale i avløpsvann som inneholder store mengder tungt oksiderbare forbindelser. Samtidig gir den et godt tilnærmet mål på organisk nedbrytbart materiale ved analysere naturlige vannprøver eller kommunalt avløpsvann. Ved videre bruk av COD-verdier er det derfor viktig å ta disse faktorene i betraktning, og se på hvilke typer vann forsøket er gjennomført på.

**Tabell 2.7: Oksygenforbruket til utvalgte uorganiske forbindelser**

Forbindelse (1 mg/l)	Krever oksygen (mg/l)
$\text{Fe}^{2+}$	0,14
$\text{Cl}^-$	0,23
$\text{NO}_2^-$	0,35
$\text{SO}_2^-$	0,25
$\text{H}_2\text{S}$	1,55



## 2.4.2 Biokjemisk oksygenforbruk

Biokjemisk oksygenforbruk (BOD) angir den mengden oksygen som forbrukes av mikroorganismer ved respirasjon, under mikrobiell vekst basert på organiske materialer i en vannprøve. Metoden er en av de mest utbredte metodene brukt til å bestemme vannkvalitet. Under riktige betingelser er BOD den beste modellen på naturlig nedbryting av organisk materiale i marine økosystem (33, 37).

BOD er tradisjonelt blitt bestemt ved å tilsette vannprøver i spesifikke flasker, tilføre luft og tilsette mikrober. Flaskene blir så forseglet for å forhindre at mer luft tilføres flasken, og den plasseres til inkubering på et mørkt sted ved 20°C. Etter n antall dager tas flaskene ut, og det resterende løste oksygenet måles. I følge ISO standardene ISO 5813:1989 og ISO 5814:1990 skal mengden løst oksygen bestemmes med «den Jodometriske metoden» (Winkler's method) eller den elektrokjemiske prøvemethoden (37).

Reaksjonshastigheten for mikrobiell nedbryting av organisk materiale avhenger av substrattilgjengelighet, temperatur, sammensetning av mikroorganismer og mikroorganismenes delingshastighet. Under forsøket er det viktig at mikroorganismene har tilgang på tilstrekkelig med oksygen. Oksygen har begrenset løselighet i vann (ca. 9 mg/l ved 20°C), og for at prøven skal tilpasses dette, må konsentrerte prøver fortynnes før forsøket. I tillegg er det viktig at prøven inneholder tilstrekkelige mengder nødvendige næringsstoffer, som nitrogen, fosfor og visse sporelementer. For å ha en artsrik blanding av mikroorganismer, slik at alle organiske materialer kan brytes ned, tilsettes ofte prøvene kommunalt avløpsvann som podevann. Fryste prøver tilsettes også podevann for å tilføre mikroorganismer, og får dermed en raskere start på nedbrytningen (11).

I utgangspunktet tar en fullstendig biologisk oksidasjon av en viss mengde organisk stoff relativt lang tid. Definisjonen av et lett oksiderbart materiale er satt til å være materiale der 70% av karbonet oksideres til karbondioksid innen 28 dager. For rutinemessige sanntidsmålinger er i midlertid 28 dager for lang tid, og antall dager (n) prøven inkuberes er derfor redusert ved BOD-målinger (11, 38). Historisk sett var inkuberingstiden satt til 5 dager, men på grunn av 5-dagers arbeidsuker har enkelte land satt inkuberingstiden til 7 dager, slik at prøvene ikke trenger å testes i helgene, og at prøver kan bli analysert alle arbeidsdagene. Land som følger ISO-standardene for BOD bruker inkuberingstid på 5 dager (denotes BOD<sub>5</sub>), mens i Norge og flere nordiske land er inkuberingstiden på 7 dager (BOD<sub>7</sub>) (39).

Som for COD avhenger nøyaktigheten til BOD av innholdet i prøvevannet, og BOD-verdiene kan bli for høye hvis uorganiske forbindelser, som jern og ammonium (ved tilstedeværelse av klor), oksideres (11). Et mer vanlig problem er at vannet inneholder tungmetaller, cyanider og andre giftige forbindelser, som hemmer mikroorganismene og hindrer dem i å bryte ned organiske materialer. BOD-verdiene blir dermed systematisk for lave, og metoden er uegnet til å bestemme mengde organisk forurensing. Spesielt ved analyse av enkelte industriavløpsvann er det viktig å være oppmerksom på hvilken påvirkning prøveinnholdet har på mikroorganismene (33).

### 2.4.3 Totalt organisk karbon

Totalt organisk karbon (TOC) er et mål på mengden organisk karbon i en vannprøve. I motsetning til COD og BOD, er TOC uavhengig av oksidasjonstilstandene til de ulike forbindelsene i det organiske materialet. Blant disse tre er dermed TOC den mest egnede metoden for å angi totalinnholdet av organisk karbon (40).

TOC bestemmes ved å oksidere organiske forbindelser til karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ) og vann ( $\text{H}_2\text{O}$ ), og videre bestemme mengden  $\text{CO}_2$  som dannes. Blant flere ulike fremgangsmåter for å bestemme TOC, er de mest anvendte metodene pyrolyse, våtkjemisk og fotokjemisk oksidasjon, eller kombinasjoner av disse. Pyrolyse/forbrenningsmetoden er den mest effektive metoden. Den kan imidlertid kun brukes på små mengder prøve, og er derfor uegnet for metoder med lavt innhold av organisk karbon. De våtkjemiske metodene baserer seg på oksidasjon av organisk materiale ved bruk av peroksoedisulfat i surt miljø. For å sikre en tilnærmet fullstendig oksidasjon kombineres ofte metodene med UV-stråling eller oppvarming. Metodene har en relativt høy følsomhet, og er derfor godt egnet til bestemmelse av organisk karbon i lave konsentrasjoner. Til bestemmelse av  $\text{CO}_2$  er den vanligste metoden i bruk non-dispersiv infrarød spektrometri (NDIR), men for vannprøver er ikke signalet lineært i det aktuelle konsentrasjonsområdet. Det er dermed mulig å redusere  $\text{CO}_2$  til metan ( $\text{CH}_4$ ) i en etterfølgende katalytisk reaksjon i nærvær av hydrogen, der  $\text{CH}_4$  kan måles med flammeionisasjonsdetektor (FID) (35).

Det det finnes også instrumenter som måler TOC kontinuerlig. Blant kontinuerlige målemetoder er metoder basert på målinger av absorpsjon. Organisk materiale belyses med gitte bølgelengder av UV-lys, og absorpsjonen måles før og etter oksidasjon. Ved analyse av avløpsvann med denne metoden, er det viktig å være oppmerksom på at partikulært materiale kan sette begrensninger for målingene (35).

#### 2.4.4 Sammenligning av COD, BOD og TOC

Både COD, BOD og TOC er som nevnt mål på organisk forurensing. COD skal primært angi den totale mengden organisk karbon som kan oksideres, BOD gir mengden organisk karbon som kan brytes ned av mikroorganismer i naturen, mens TOC angir den totale mengden organisk karbon uavhengig av oksidasjonstilstanden til karbonet. COD, BOD og TOC varierer dermed i hvilke egenskaper de bestemmer for avløpsvannet, samt at metodene varierer i oksidasjonsmiddel, analysetid, nøyaktighet og presisjon, blant de ulike metodene. I Tabell 2.8 vises en oversikt og en oppsummering av de overnevnte faktorer.

**Tabell 2.8: Sammenligning av COD, BOD og TOC analyser. Modifisert etter tabell hentet fra (33)**

Parameter	COD	BOD	TOC
<b>Oksidasjonsmiddel</b>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Mn <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Mikroorganismer	- O <sub>2</sub> - K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> - Varme Kombinasjon av disse
<b>Mest egnet bruk</b>	Er godt egnet til rask og hyppig testing av effektivitet og vannkvalitet ved anlegg	Modellere renseanleggprosesser, og effekten organiske forbindelser har på innholdet av løst oksygen i resipienten	Måle den totale mengden organisk karbon i prøven
<b>Gjennomføringstid</b>	1,5 - 3 timer	5 dager (for standard BOD test)	Mellom et par minutter til flere timer
<b>Nøyaktighet og presisjon</b>	Relativ standardavvik på 5-10%. Kan være høyere for prøver med suspendert stoff, og homogenisering kan være viktig	Ikke vurdert til å være svært nøyaktig, med standardavvik på 15%	Relativ standardavvik på 5 – 10%. Kan være høyere for prøver med suspendert stoff, og homogenisering kan være viktig
<b>Fordeler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Korrelerer med BOD for avfall med konstant sammensetning</li> <li>- Giftige forbindelser påvirker ikke oksidasjonsmidlene</li> <li>- Endringer i COD verdier på innløpsvann og utløpsvann, kan korrelere med tilsvarende BOD målinger</li> <li>- Kort analysetid</li> </ul>	Nærest til naturlig nedbrytning, når metoden utføres med egnede betingelser	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Korrelerer med BOD for avfall med konstant sammensetning, men ikke i like stor grad som COD.</li> <li>- Kort analysetid</li> </ul>
<b>Ulemper</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interfererer med kloridioner</li> <li>- Enkelte organiske stoffer oksideres ikke fullstendig</li> <li>- Mulighet for at enkelte ikkeorganiske stoffer oksideres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Giftige stoffer dreper mikroorganismene</li> <li>- Mikroorganismer oksiderer ikke alt organisk materiale</li> <li>- Unøyaktig ved bruk under uegnede betingelser</li> <li>- Lang analysetid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kan kreve dyre instrument</li> <li>- Enkelte organiske stoffer oksiderer ikke fullstendig</li> <li>- Måler totalt organisk karbon og ikke oksygenforbruk</li> </ul>

Det er ikke mulig å sette opp et allmenngyldig forholdstall mellom COD, BOD og TOC for alle typer avløpsvann, men det er mulig å etablere et omtrentlig forholdstall for hvert enkelt utslipp. I NIVA-rapporten «Bestemmelse av organisk stoff i avløpsvann» fra 1990 har Håvard Hovind beregnet forholdstall mellom COD, BOD og TOC for enkelte avløpsvann fra biologiske renseanlegg; et slakteri og et meieri. De ulike forholdstallene er listet opp i Tabell 2.9. Forholdene (a) er beregnet til å ha lineær korrelasjon på formen  $y = ax$  der kurven alltid passerer gjennom origo. Dette er ikke alltid tilfelle og i tillegg er innholdet i prøvene forskjellig ved ulike anlegg. Forholdstallene er derfor ikke universale, men kan brukes som en veiledning (11).

**Tabell 2.9: Beregnede forholdstall mellom de ulike forurensingsparameterne COD, BOD og TOC for spesifikke avløpsvann.** Forholdstallene er kun veiledende for andre avløpsvann, men kan brukes som en retningslinje. Forholdstallet a er beregnet til å være lineære etter limingen  $y = ax$

Forhold	Biologisk renseanlegg	Slakteri	Meieri
Ufiltrerte prøver			
COD/TOC	4,1	3,9	4,1
BOD/TOC	0,7	2,1	2,3
COD/BOD	5,9	1,9	1,8
Filtrerte prøver			
COD/TOC	3,2	3,8	3,1
BOD/TOC	0,6	2,0	1,7
COD/BOD	4,9	1,9	1,8

## 2.4.5 Totalt nitrogen

Totalt nitrogen (TN) er et mål på den totale mengden nitrogen i en vannprøve. I nylig forurenset avløpsvann forekommer nitrogen i hovedsak som organisk nitrogen og ammonium/ammoniakk ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ). Over tid vil det organiske nitrogenet brytes ned til  $\text{NH}_4^+$  i naturlige biokjemiske prosesser.  $\text{NH}_4^+$  er den enkleste formen av nitrogen for mikroorganismer å utnytte, og nitrifiserende bakterier vil under aerobe betingelser, oksidere  $\text{NH}_4^+$  til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ). Videre vil *Nitrobacter*-bakterier oksidere  $\text{NO}_2^-$  til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), og med tiden vil tilnærmet alt av nitrogen forekomme som  $\text{NO}_3^-$  (41). Avløpsvann inneholder i hovedsak de fire nevnte nitrogenforbindelsene, i tillegg til løst nitrogengass ( $\text{N}_2$ ). Det er utviklet mange metoder til bestemmelse av nitrogen i organiske forbindelser,  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$  og  $\text{NO}_3^-$ . Generell analyse av TN kan derfor kalkuleres ved å summere mengden av hver enkelt nitrogenform (42).

Ved analyse av TN direkte, må prøven brytes ned slik at det organiske nitrogenet blir tilgjengelig før videre analyse. En måte å gjøre nitrogen tilgjengelig på er ved omdannelse til  $\text{NH}_4^+$  med Kjeldahlsdestillasjon, eller ved å oksidere alle nitrogenforbindelser til  $\text{NO}_3^-$  med persulfat nedbrytningsmetode (43). Med LATON analysesett, oksideres både de uorganiske forbindelsene ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) og de organiske forbindelsene til  $\text{NO}_3^-$  med peroksoedisulfat. I en løsning av svovel- og fosforsyre, tilsettes 2,6-dimetylphenol som reagerer med  $\text{NO}_3^-$ -ionene og danner nitrofenol. Mengden  $\text{NO}_3^-$  bestemmes så indirekte med UV-spektroskopi ved 205-335 nm (44, 45).

## 2.4.6 Totalt fosfor

Totalt fosfor (TP) er et mål på alle formene for fosfor i avløpsvann, både oppløst fosfat og uløselig fosfat i utfelt form eller som føres med avløpsvannet gjennom mikroorganismer. Fosfor kan forekomme i oppløst form (orthofosfat), i uorganiske forbindelser og i organiske forbindelser. Til bestemmelse av TP med analysesett reagerer fosfationer med molybdat og antimonioner i sur løsning, og danner antimonyl fosfomolybdatkompleks. Komplekset reduseres videre til fosfomolybdenum blå.

## 2.5 Målemetoder

### 2.5.1 CN analyse

CHNS element analysatorer brukes som en effektiv metode til bestemmelse av karbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N) og svovel (S). Grunnstoffene kan bestemmes alene, med unntak av for hydrogen, eller i kombinasjonene CN, CHN eller CNS, avhengig av hvilke detektorer og katalysatorer/absorbenter som blir brukt til bestemmelsen. I denne oppgaven er det brukt CN analyse. Metoden er godt egnet til mange ulike typer prøver, inkludert faste stoffer, væsker og viskøse prøver, og det er en etablert metode innen næringsmiddelkjemi (46).

CN analyse baserer seg på forbrenning av prøver med oksygen tilstede. Tørkede prøver veies ut i tinnkapsler, og føres inn i et forbrenningskammer med en temperatur på ca. 1000°C. Tinnkapselen forbrennes i en kraftig reaksjon med tilførsel av oksygen tilstede, enten i et bestemt volum, eller med konstant strøm i et bestemt tidsrom. Under forbrenningsprosessen konverteres karbon til karbondioksid (CO<sub>2</sub>), hydrogen til vann, og nitrogen til nitrogengass (NH<sub>2</sub>) og nitrogenoksider (NO<sub>x</sub>). Reaksjonsproduktene føres videre med bæregass, først gjennom en oksidasjonskatalysator i forbrenningskammeret, og deretter over rent, oppvarmet (650°C) kobber i enden av forbrenningskammeret eller plassert i en separat reduksjonsreaktor. Kobberet reduserer NO<sub>x</sub>-forbindelsene til N<sub>2</sub>-gass og fjerner overflødig oksygen. Gassene føres så igjennom et rør der uønskede partikler og vann absorberes. CO<sub>2</sub> og N<sub>2</sub>-gassen separeres med gaskromatografi eller infrarøde celler, og konsentrasjonen av C og N bestemmes med en termisk konduktivitetsdetektor. En kjent standard analyseres under samme betingelser, og brukes til å kalibrere instrumentet og for å kvantifisere mengden C og N (46, 47).

### 2.5.2 Fra nitrogen til protein

Proteininnholdet i prøven kan estimeres ut ifra mengden nitrogen prøven inneholder. Den mest brukte formelen er

$$\text{proteininnhold} = \text{totalt Kjeldahl nitrogen} \times 6,25$$

der totalt Kjeldahl nitrogen er nitrogen bestemt ved Kjeldahl-metoden eller andre tilsvarende metoder, og 6,25 er en faktor basert på at nitrogeninnholdet i proteiner er tilnærmet 16%

( $100/16 = 6,25$ ). CHN elementanalysator kan brukes i stedet for Kjeldahl-metoden til å bestemme totalt nitrogen (48, 49).

Det er diskutert hvorvidt 6,25 er en korrekt faktor ettersom 1) mengden nitrogen i proteiner avhenger av hvilke aminosyrer proteinene er bygget opp av, og 2) mengden ikke proteintilknyttede nitrogenforbindelser vil gi systematisk for høyt proteininnhold (48, 49). Det brukes i dag også andre faktorer til beregning av mengde protein fra nitrogen. Eksempler på slike faktorer er Jones-faktoren (50),  $k_P$  og  $k_A$  (51), men disse faktorene har også sine begrensninger. 6,25 er en mye brukt og etablert faktor, og den er fremdeles i bruk som definisjon på protein i EUs lov om matinformasjon til forbrukeren forskrift No 1169/2011 (protein = totalt Kjeldahl nitrogen x 6,25) (52). I denne oppgaven blir derfor proteininnholdet beregnet med faktor 6,25, med forbehold om at verdiene kan være noe unøyaktige.

### 2.5.3 NMR

Kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi er blant de mest brukte analyseverktøyene for karakterisering av strukturen til organiske molekyler. Interessen for bruk av NMR til analyse av mat har økt betraktelig de siste årene, og innenfor metabolomikk er NMR kjent som en av de beste metodene for et fullstendig overblikk av næringsmiddelmetabolitter (53).

NMR baserer seg på atomkjernes respons på et sterkt magnetisk felt. Atomkjerner med roterende ladning vil spinne rundt sin egen akse og skape et magnetisk felt eller dipolmoment. Ved NMR-analyse utsettes disse atomkjernene for et sterkt ytre magnetisk felt, og atomkjernene inntar en posisjon med (+1/2) eller mot (-1/2) det ytre magnetfeltet (54). Atomkjernene bestråles så med en rekke små pulser på spesifikke frekvenser med kraftig radiostråling. Tilsvarende frekvensen på radiobølgene resonansfrekvensen til en av atomkjernene, vil atomkjernen eksitere og endre retning relativt til det ytre magnetiske feltet. Direkte etter at atomkjernen eksiteres vil atomkjernen orientere seg tilbake til utgangsstilling, og frigi energi. Samtidig vil et signal detekteres på radiomottakeren i spektrometeret (55).

Effekten av det eksterne magnetiske feltet avhenger av hvor godt kjernen skjermes av elektroner, og den påvirkes av antall elektroner som sirkulerer rundt kjernen, samt hvilket kjemisk miljø molekylet befinner seg i. Ulik påvirkning av eksternt magnetisk felt fører til at atomkjernen absorberer stråling med ulik frekvens (10MHz – 1GHz), og gir ulike signaler.



Forskjellen i absorpsjonsfrekvens for et bestemt proton i et molekyl, og absorpsjonsfrekvensen til et referanseproton, kalles kjemisk skift og er gitt i ppm (55).

Matematisk sett er spinnet til en atomkjerne kvantisert, og kvantetallet kalles I. Kvantetallet kan ha verdiene  $I = 0, 1/2, 1, 3/2$  osv., og er en karakteristisk størrelse for hver isotop. Isotoper med  $I = 1/2$  er mest studert og inkluderer  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  og  $^{15}\text{N}$ . For isotoper med likt antall protoner og nøytroner, som  $^{12}\text{C}$  og  $^{16}\text{O}$ , er kvantetallet  $I = 0$ , og isotopene gir ingen signaler i NMR (54).

Antall stillinger en atomkjerne kan orientere seg i under et påtrykt ytre magnetisk felt, er gitt av formelen  $2I+1$ . I  $^1\text{H}$ -NMR har dermed protonene 2 mulige orienteringer. Det magnetiske dipolmomentet til kjernen ( $m$ ) fører til at den potensielle energien til atomkjernen under det ytre magnetiske feltet ( $B_0$ ), blir  $m = 1/2$  når dipolmomentet er orientert med feltet, og  $m = -1/2$  når dipolmomentet er orientert mot det magnetiske feltet. Energien til spinntilstanden kan uttrykkes med følgende ligning (54)

$$E_i = -m_i \frac{\gamma h \mathbf{B}_0}{2\pi}$$

der  $h$  er Planks konstant,  $\gamma$  er kjernens gyromagnetiske forhold, og  $\pi$  er en konstant. Forskjellen i energi ( $\Delta E$ ) mellom to spinntilstander kan dermed uttrykkes

$$\Delta E = E_{(m=-\frac{1}{2})} - E_{(m=\frac{1}{2})} = \frac{\gamma h \mathbf{B}_0}{2\pi}$$

Protonet kan absorbere et foton med energi  $h\nu$  ( $E = h\nu$ ) der  $\nu$  er frekvensen. Dermed kan sammenhengen mellom tilført radiofrekvens og ytre magnetisk felt beskrives av grunnligningen for NMR (54):

$$\nu = \left( \frac{\gamma}{2\pi} \right) \mathbf{B}_0$$

# 3 Materialer og metoder

## 3.1 Materialer

Materialene i dette forsøket er delt inn i fiskeprøver og bryggeriprøver. Fiskeprøvene omfatter restråstoff fra solgt fisk/fiskeprodukter fra lokal fiskehandler og produksjonsvann fra lakseslakteri. Bryggeriprøvene er prøver av avfall fra et benkeplate-bryggeprosjekt ved NTNU.

### 3.1.1 Fiskeprøver

#### Fisk

Avskjær fra laks, uer, lange, torsk og sei ble hentet fra Ravnkloa Fisk & Skalldyr, mandag 21. september. Avskjæret inkluderte ryggbein, hoder, v-kutt og slo, se Tabell 3.1. Fiskene var slaktet 3-4 dager i forveien og ble gjort opp mandag morgen. Restråstoff ble lagt direkte på is etter slakt, og ble videre fraktet på is til NTNU, der prøvene ble plassert på et kjølrrom (+4°C). 7 dager senere ble avskjæret fra hver enkelt fisk kuttet i mindre biter og malt til farse med bruk av en manuell kjøkkenkvern med hull på 4 mm. Farsene ble videre blandet med en sleiv, fordelt i zip-låsposer (1L) og fryst ned ved -20°C.

Farse av makrell ble gitt fra material brukt i masterprosjektet til Yazan Al-janabi, ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Makrellen ble hentet fra Pelagia 28. mai. Den ble fraktet rund på is til SINTEF, og ble videre filetert og kvernet umiddelbart etter ankomst. Farsen fra ryggbein, buklist, hode og innvoller ble lagt i separate zip-låsposer og fryst ned til -80°C. Fem måneder senere ble makrellfarsene levert til NTNU på is. En pose med hver av de ulike farsene ble blandet sammen og homogenisert i en foodprocessor, samlet i en zip-låspose (1L) og lagret ved -20°C.

Ryggbein fra laks (laks RB) ble hentet fra det lakseslakteriet til Salmar. De ble holdt på is, og fryst hele (-20°C) under 24 timer etter produksjon.

**Tabell 3.1: Data for fiskeprøver**

<b>Prøve</b>	<b>Dato fisket</b>	<b>Inneholder</b>	<b>Behandling</b>	<b>Tid før prøven ble fryst</b>
<b>Laks</b> ( <i>Salmo salar</i> )	18.09.2015	Ryggbein, hode	Kvernet til farse, fryst	≤ 7 dager
<b>Uer</b> ( <i>Sebastes Norvegicus</i> )	18.09.2015	Hode, slo	Kvernet til farse, fryst	≤ 7 dager
<b>Lange</b> ( <i>Molva molva</i> )	19.09.2015	Ryggbein	Kvernet til farse, fryst	≤ 7 dager
<b>Atlantehavstorsk</b> ( <i>Gadus morhua</i> )	18.09.2015	Ryggbein	Kvernet til farse, fryst	≤ 7 dager
<b>Sei</b> ( <i>Pollachius virens</i> )	18.09.2015	Ryggbein, nålebein	Kvernet til farse, fryst	≤ 7 dager
<b>Makrell</b> ( <i>Scomber scombrus</i> )	27.05.2015	Ryggbein, hode, buklist, innvoller	Kvernet til farse, fryst	Umiddelbart
<b>Laks Ryggbein</b> ( <i>Salmo salar</i> )	-	Ryggbein	Fryst hele	≤ 24 timer

#### Produksjonsvann fra lakseslakteri

Produksjonsvann ble levert fra Salmar AS, to ganger i løpet av vinteren, 2. desember og 22. januar. Det ble samlet opp produksjonsvann to steder i prosesseringen: etter fiskeslakting (slaktevann) og etter filetering (filetvann). Under 24 timer etter ankomst til laboratoriet, ble vannet lagret i zip-låsposer (1L) og fryst ved -20°C. En oversikt over prøvene er listet opp i Tabell 3.2.

**Tabell 3.2: Data for produksjonsvannsprøver fra lakseslakteri**

<b>Prøve</b>	<b>Dato prøvetakning</b>	<b>Behandling</b>	<b>Tid før prøven ble fryst</b>
Slaktevann 1	02.12.15	Fryst	≤ 24 timer
Slaktevann 2	22.01.16	Fryst	≤ 24 timer
Filetvann 1	02.12.15	Fryst	≤ 24 timer
Filetvann 2	22.01.16	Fryst	≤ 24 timer

### 3.1.2 Bryggeprøver

Maltvann, rester av brukt malt og rester av brukt humle, ble gitt fra to bryggeprosjekter ved NTNU. Maltvann defineres i denne oppgaven, som oppsamlet vann fra rensing av maltrør etter at maltet er fjernet fra vørteren. Malten er samlet opp før vørteren kokes opp, og humlen ble tatt ut før vørteren ble satt til avkjøling, før tilsats av gjær. Prøvene ble lagret i zip-låsposer (1L) og lagret ved -20°C, se Tabell 3.3. Det ble laget to øl; Saison Krabbiade15 (Saison) og Trulsøl. Det opprinnelige innholdet i malten og humlen fra disse bryggeprosjektene er listet opp i Tabell 3.4 og Tabell 3.5.

**Tabell 3.3: Data for bryggeprøver**

Prøve	Øl	Dato brygget	Behandling
Malt Saison	Saison Krabbiade15	25.09.2015	Fryst -20°C
Humle Saison			
Maltvann Saison			
Malt Trulsøl	Trulsøl	28.09.2015	Fryst -20°C
Humle Trulsøl			
Maltvann Trulsøl			

**Tabell 3.4: Innhold i Saison Krabbiade15 øl**

Type	Navn	Mengde
Malt	Weyerman Premium Pilsner (3,9 EBC)	10000g
	Wheat Malt Blanc	2500g
	Caramel/Crystal Malt - 60 L (150.0 EBC)	800g
Humle	Saas [4,40 %] - Kokt i 60 min	80g
	Saaz [4,00%] - kokt 15 min	100g
	Saaz [4,00%] - kokt 5 min	60g
	Perle [4,40 %] - Kokt i 5 min	30g
	Tettnang (Tettnang Tettnager) [2,10 %] - kokt 5 min	30g
Raffinering	Whirlfloc Tablet (Kokt 15 min)	2 stk.

Tabell 3.5: **Innhold i Trulsøl**

Type	Navn	Mengde
Vann	Jonsvatnet, Trondheim Mørk saison	55L
Vannjusterer	Gypsum (Kalsiumsulfat) (Bland 60 min)	13g
	Kalsiumklorid (Bland 60 min)	6,5g
	Bakepulver (Bland 60 min)	5,5g
Malt	Pale Malt, Maris Otter (5,9 EBC)	10000g
	Caramel/Crystal Malt - 60L (118,2 EBC)	0,60g
	Mais, flakform (2,6 EBC)	0,50g
	Havre, flakform (2,0 EBC)	0,50g
Humle	Target [10,7%] – (kok 60 min)	30g
	Fuggles [4,10 %] – (kok 15 min)	100g
	Fuggles [4,10 %] – (kok 5 min)	100g
Raffinering	Whirlfloc Tablet (kok 15 min)	3 stk.

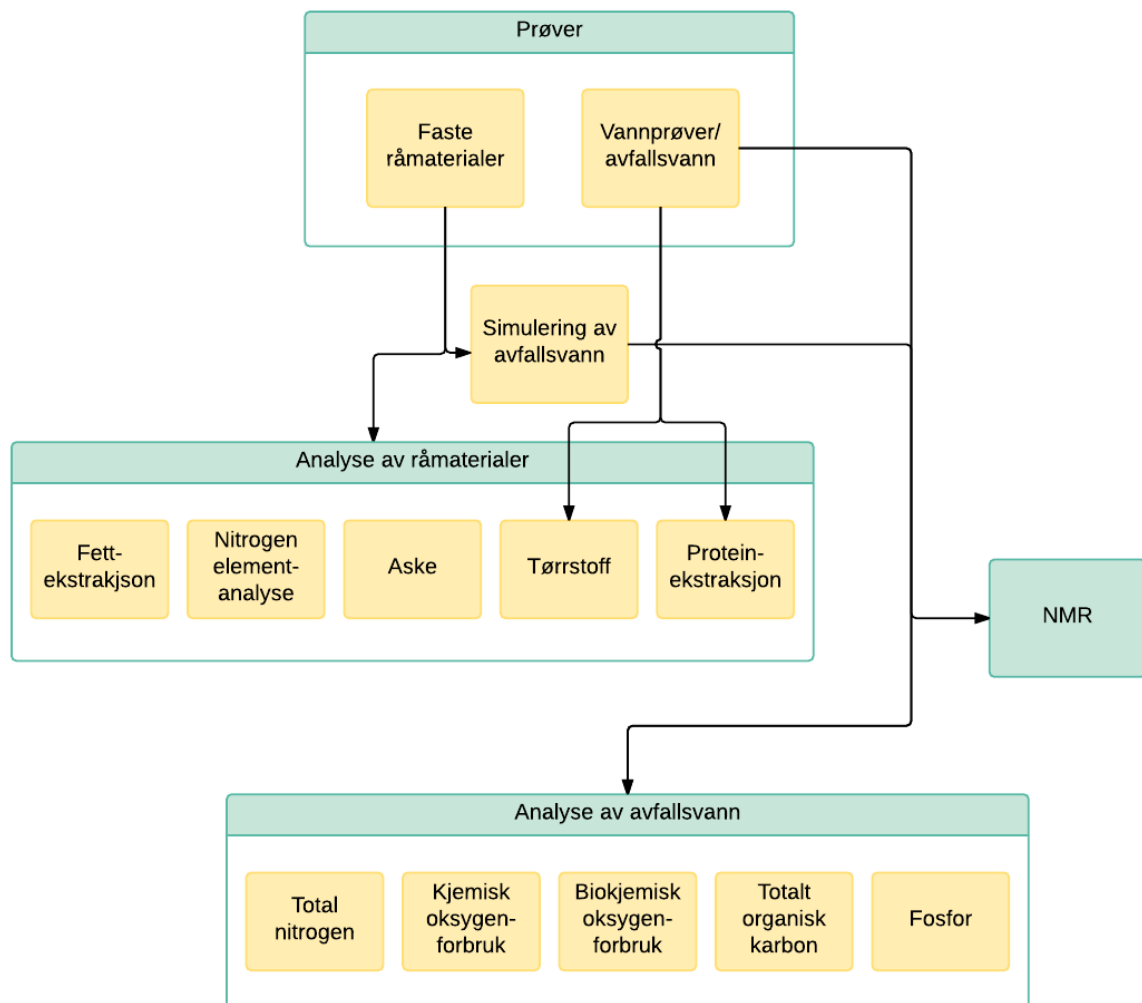
### 3.1.3 Faste råmaterialer og vannprøver

Under analysen av prøvene, fulgte de faste materialene og vannprøvene ulike analyseveier. For å forenkle forklaringene under metode (se avsnitt 3.2.2 og 3.2.3) er prøvene her delt inn i faste råmaterialer og vannprøver. Faste råmaterialer omfatter de oppmalte fiskeprøvene (laks, uer, lange, torsk, sei, makrell), laks RB, malt (saison og trulsøl) og humle (saison og trulsøl). Vannprøvene inkluderer produksjonsvann fra lakseindustrien (slaktevann 1 og 2, og filetvann 1 og 2) og maltvann (Saison og trulsøl). En oversikt over analyseveiene er vist i avsnitt 3.2.1.

## 3.2 Metoder

### 3.2.1 Arbeidsflyt

Figur 3.1 viser en oversikt over hvilke analyser som er gjennomført i forbindelse med denne oppgaven. Beskrivelse av de ulike analysene er beskrevet i avsnittene nedenfor.



**Figur 3.1: Oversikt over analyser som er gjennomført i denne oppgaven**

### 3.2.2 Analyse av råmaterialer

#### Fettinnhold

For å bestemme fettinnholdet i de faste råmaterialene, ble fett ekstrahert fra prøvene etter en modifisert utgave av metoden til Bligh and Dyer (56), modifisert av SINTEF Fiskeri og havbruk (kilde). Metoden baserer seg på egenskapen lipider har til å løse seg i upolare løsemidler som kloroform, og samt at de er uløselige i polare løsemidler som vann. Fra ferske råmaterialer, ble 10 gram prøve veid nøyaktig ut i sentrifugekopper. Til sentrifugekoppene ble det tilsatt vann (16 ml), metanol (40 ml) og kloroform (20,0 ml). Sentrifugekoppene ble satt på is og innholdet ble homogenisert med ULTRA-TURAX® T25 (13,500 rpm) i 2 minutter. Mer kloroform (20,0 ml) og vann (20 ml) ble tilsatt, og prøvene ble homogenisert i 40 sekunder etter hver av tilsetningene. Sentrifugekoppene ble så sentrifugert med Sorvall Instruments RC5 C med 5000g, på 4°C i 15 min. En prøve av kloroformfasen (2,0 ml) ble pipettert over i et veid, glødet og avkjølt glassrør, og kloroformfasen ble dampet av (60°C) med tilførsel av nitrogengass. Glassrørene ble avkjølt i eksikator og veid.

#### Vannløselige proteiner

Mengde vannløselig protein ble bestemt med Lowry-metoden, slik den er beskrevet av Lowry et al. (1951) (57). Vannløselige proteiner ble ekstrahert ved at de faste råmaterialene ble tilsatt ionefritt vann (50 ml), og fra vannprøvene ble 5 ml prøveløsning pipettert ut, og overført til nye sentrifugerør. Alle løsningene ble homogenisert med IKA® T10 basic i 40 sekunder, og overført til sentrifugekopper, før de ble sentrifugert i 15 minutter med Sorvall RC-5B, ved 4°C på 8000 rpm. Supernatant (1000µl) ble pipettert over i en målkolbe (50ml) og fortynnet 1:50 med destillert vann. Under hele prosessen ble prøvene holdt på is. I forkant av forsøket ble Ca. 10 gram av alle prøvene overført til 50ml sentrifuge rør med skrukork, og lagt til tining på kjølerommet (ca. 24 timer).

Bovint serum albumin (BSA) ble brukt som standard.

#### Bestemmelse av nitrogen og karbon

Nitrogen- og karbon-innholdet i de faste råmaterialene, ble bestemt med elementanalyse. Analysen ble utført på frysetørkede prøver av fiskefarse, malt og humle. Til frysetørkingen ble omtrentlig 30 gram prøve veid ut i forhåndsveide veieskip. Prøvene ble kjølt frosset inn ved -80°C, og frysetørket med Alpha 1-4 LD type GT5 (-60°C, 0,05mbar) tilkoblet en EDWARDS

RV5 pumpe. Etter 48 timer ble prøvene tatt ut og trykket på med spatelsspiss for å teste om farsen var fri for is. Prøvene ble videre knust med en liten kjøkkenmaskin, overført til små zip-lås poser og lagret på et kjølerom. Før elementanalysen ble de frysetørkede prøvene veid ut med Mettler MTS vekt (550-850  $\mu\text{g}$ ) og de ble veid ut i tinnkapsler (5x9 mm) for stoffer i fast form, fra Santis Analytical. Kapslene ble lukket og pakket sammen med pinsett, plassert på brønnplate og lagt på kjølerom. Etter et par dager ble prøvene sendt til SINTEF, og analysert med CHN-S/N elementanalysator 1106 (Carlo Erba Instruments S.p.A., Milan, Italia).

For å beregne mengde protein, ble nitrogeninnholdet multiplisert med Kjeldahls faktor på 6,25 (52).

### Tørrstoff og aske

Brente digler ble veid på nøyaktig gramvekt med 4 desimaler, og det ble tilsatt fersk prøve (ca 2g). Diglene ble veid på nytt, og prøvene ble plassert i varmeskap (105°C) i 24 timer. Under avkjøling av diglene, ble de plassert i eksikator, og deretter veid. Etter siste innveining ble prøvene satt i foraskningsovn (550°C) i 24 timer. Prøvene ble så tatt ut, og diglene ble satt til avkjøling i eksikator og veid på nytt.

## 3.2.3 Analyse av prosessvann

### Modellsystem for prosessvann

For å få flere representative prøver, ble det laget et modellsystem der det ble generert prosessvann fra de faste råmaterialene. Laks RB-prøven ble lagt til tining på kjølerom over natten, i en lufttett pose med zip-lås. Dagen etter ble ryggbeinet veid i en liten plastbalje, og det ble tilsatt vann etter forholdene 1 del prøve til 1 del vann (1:1), 10:4 eller 10:3. Riktig mengde vann ble basert på vekt og vannet ble målt opp med målesylinder på 250 ml og 30 ml. For at prosessvannet fra modellsystemet skulle være tilnærmet prosessvannet fra matindustrien, var vannet som ble tilsatt fra springen (ca. 10°C). Baljen ble så ristet rolig for hånd i 10 minutter. De resterende prøvene ble veid ut (ca. 10 g) i 45 ml sentrifugerør med skrukork, og satt til tining i romtemperatur i 1 time. Vann fra springen ble tilsatt, og de faste råmaterialene ble ristet på Grant bio, Orbital Shaker PSU-101, i 10 minutter på 200 rpm. Prosessvann ble laget med tre ulike mengder vann i forhold til fast prøve 1:1, 10:4 og 10:3. Riktig mengde vann ble tilsatt



med automatpipette. Etter ristingen, ble alle prøvene filtrert med glassull, og helt over i 45 ml sentrifugekopper. Prøvene ble videre sentrifugert med Sorvall RC-5B i 15 minutter, ved 4°C på 10 000 g. Supernatanten ble filtrert gjennom et sprøytefilter (0,45 µm, polyethersulfone membran), direkte over i 15 ml sentrifugerør med skrukork. Filtratet ble deretter plassert på is før bruk, eller fryst ned (-20°C) til senere bruk.

### Vannanalyser med testsett

Prøvevannet/prosessvannet og modellprosessvann ble analysert med testsett fra kjemi- og laboratedistributør Hach (United Kingdom). Ulike sett bestemmer innholdet av ulike parametere, og prosessvannet ble analysert for parameterne: total nitrogen (TN), kjemisk oksygenforbruk (COD), biokjemisk oksygenforbruk (BOD), totalt organisk karbon (TOC) og fosfor (P). Navn på de brukte analysesettene og fortynningsspekteret for hvert sett er oppgitt i Tabell 3.6. Settene inneholdt kyvetter og alle kjemikalier til gjennomføring av analysene. Prosessvannet ble fortynnet, og analysene ble utført ved å tilsette prøvevann/filtrat til kyvettene etter protokoller levert fra leverandøren, og å følge protokollene trinn for trinn. Avslutningsvis ble kyvettene tørket av med linsepapir og avlest på fotospektrometeret DR3900 Benchtop VIS Spectrophotometer.

For COD og TOC er det ikke nødvendig med blankprøver, ettersom turbiditeten og fargen på prøven bestemmes av metoden. Dette er derimot påkrevd for TN og P, og blankprøve ble forberedt for disse parameterne.

**Tabell 3.6: Analysesett brukt ved bestemmelse av ulike forurensningsparametere. Settene er fra Hach (United Kingdom).**

Parameter	Prøve	Analysesett	Fortynning
COD	Alle prøver	LCK 014	1000-10 000 mg/L O <sub>2</sub>
TOC	Alle prøver	LCK 381	60-735 mg/L C
TN	Fiskefarse 10:3	LCK 138	1-16 mg/L TN <sub>b</sub>
	Alle prøver (minus fiskefarse 10:3)	LCK 338	20-100 mg/L TN <sub>b</sub>
TP	Alle modell-prosessvann 1:1	LCK 349	2.0 -20.0 mg/L PO <sub>4</sub> -P

## Frysing av filtrat

For å effektivisere analysene av vann fra modellprosessen, ble det gjennomført et forsøk med frysing av filtrat. Modell-prosessvann for prøver av makrell og laks RB ble laget slik det er beskrevet over. Halvparten av filtratene fra prosessvannet ble delt inn i 5 paralleller og analysert samme dag, men den andre halvparten ble fryst ned i sentrefugerør med skrukork, ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Etter to uker ble filtratene tint i romtemperatur (2 timer), delt inn i 5 paralleller og analysert på tilsvarende måte som den første halvparten.

### 3.2.4 NMR

NMR ble brukt til å bestemme hvilke stoffer prosessvannprøvene og modellprosessvannet inneholder. Til NMR analysen ble det tatt ut 1 ml med rent prosessvann/ filtrat fra modellprosessvannet (1:2). Vannet ble overført til 1,5 ml eppendorfrør, natriumazid (0,04 %) ble tilsatt og rørene ble fryst ned ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Før NMR-analysene ble prøvene tint, deuterert kloroform (200  $\mu\text{l}$ ) ble tilsatt for å fjerne rester av fett, og prøvene ble mikset og sentrifugert i 5 min. Kloroformfasen ble pipettert ut, og vannfasen ble tilsatt mononatriumfosfat (20 mM). Vannfase (900  $\mu\text{l}$ ) ble overført til nye eppendorfrør, og deuteriumoksid (100  $\mu\text{l}$ ) ble tilsatt. Prøvene ble blandet med en vortexer, sentrifugert, og supernatant (600  $\mu\text{l}$ ) ble overført til NMR-rør. Analysen ble gjennomført med 600 Mhz på  $300^{\circ}\text{K}$  av Elena Shumilina på institutt for bioteknologi, ved NTNU.

# 4 Resultater og diskusjon

## 4.1 Analyse av råmaterialer

Næringsinnholdet i biråstoffprøver av fisk, malt og humle, ble bestemt for å danne et sammenlikningsgrunnlag mellom næringsinnhold i faste råmaterialer, og avløpsvannet generert fra de faste råmaterialene. En videre utdypning av modellprosessen der avløpsvann genereres fra biråstoffprøvene, er beskrevet i avsnitt 3.2.3. Biråstoffprøvene ble analysert for fett-, protein-, tørrstoff- og askeinnhold slik det er beskrevet i avsnitt 3.2.2. For en bedre oversikt presenteres først næringsinnholdet i fiskeprøvene, vist i avsnitt 4.1.1, og deretter for bryggeprøver av malt og humle vist i avsnitt 4.1.2. Rådata og utregninger for de respektive næringsstoffene står beskrevet vedlegg A-D.

### 4.1.1 Fiskeprøver

Balanse av næringsinnholdet for biråstoffprøver av laks, uer, lange torsk og sei er vist i Tabell 4.1. Sammensetning, og behandling av fiskeprøvene er listet opp i Tabell 3.1. Samtlige av prøvene inneholder ryggbein, i tillegg inneholder prøvene av laks, uer og sei henholdsvis hode, slo og avskjær.

**Tabell 4.1: Balanse av næringsinnhold i biråstoffprøver fra ulike fiskearter**

<b>Prøve</b>	<b>Lipider (g/100g)</b>	<b>Proteiner (g/100g)</b>	<b>Aske (g/100g)</b>	<b>Vann (g/100g)</b>	<b>Totalt (g/100g)</b>
Laks	24,4 ± 0,5	15 ± 1	3,7 ± 0,3	57,2 ± 0,1	<b>100,8</b>
Uer	10,95 ± 0,04	12,2 ± 0,9	4,8 ± 0,4	70,6 ± 0,6	<b>98,6</b>
Lange	1,06 ± 0,06	18,0 ± 0,5	6,3 ± 0,7	75,9 ± 0,3	<b>101,2</b>
Torsk	1,4 ± 0,4	18 ± 2	6,1 ± 1,3	76,8 ± 1,5	<b>101,9</b>
Sei	2,0 ± 0,9	19,1 ± 0,5	5,9 ± 0,4	75,8 ± 0,5	<b>102,9</b>

Ettersom prøvene ikke var filet, men av ryggbein, hoder, slo og avskjær, kan ikke biråstoffprøvene sammenlignes med innholdet i filet/muskel direkte. Massebalansen er kun direkte sammenlignbar med andre massebalanser med tilnærmet likt innhold. Massebalanser fra filet kan allikevel brukes som et hjelpemiddel til å kontrollere at verdiene fra de analyserte biråstoffprøvene virker rimelige.

## Vanninnhold

Vanninnholdet for biråstoffprøvene ble målt for laks ( $57,2 \pm 0,1$  g/100g), uer ( $70,6 \pm 0,6$  g/100g), lange ( $75,9 \pm 0,3$  g/100g), torsk ( $76,8 \pm 1,5$  g/100g) og sei ( $75,8 \pm 0,5$  g/100g), se Tabell 4.1. De fleste av fiskeprøvene, med unntak av uer, inneholder ryggbein. Toppe et al. (22) har bestemt en tilnærmet massebalanse av næringsinnholdet i fiskebein fra ulike fiskearter fanget i Norge, se Tabell 2.4. I massebalansen analysert av Toppe et al., er vannmengden svært lav;  $5,0 \pm 0,3$  g/100g for laks,  $7,77 \pm 0,04$  g/100g for torsk, og  $5,21 \pm 0,01$  g/100g for stor sei, sammenlignet med vanninnholdet i biråstoffprøvene. I torskeprøven, som kun inneholder ryggbein, var også variansen stor. Forskjellene i vanninnhold kan skyldes at fiskebenene beskrevet av Toppe et al., ble kokt og rensket for kjøtt, mens ryggbenene i denne oppgaven ble malt til farse med kjøttrester sittende igjen på benene. Kjøtt/muskel inneholder store mengder vann, se Tabell 2.2, i motsetning til bein, se Tabell 2.4. Dette gjør at relativt små mengder kjøtt kan gi signifikante utslag på vanninnholdet i prøvemassen. Dermed vil mengden fett, protein, og aske bli mindre i prosent, når massen til disse oppgis utifra totalvekten. Lavere innhold av protein, fett og aske, er derfor å forvente ved sammenligning med rene ryggbein.

Lipidinnholdet ble målt for biråstoffprøver av laks ( $24,4 \pm 0,5$  g/100g), uer (10,95 g/100g), lange ( $1,4 \pm 0,4$  g/100g), torsk ( $1,4 \pm 0,4$  g/100g) og sei ( $2,0 \pm 0,9$  g/100g), se Tabell 4.1. Av fiskene brukt i disse prøvene, er laks den eneste fisken betegnet som en fet fisk, mens resten er betegnet som magre fisker, se avsnitt 2.1. Magre fiskearter, er arter der fettinnholdet i musklene/fileten ligger lavere enn 2%. Lipidinnholdet for lange torsk og sei, er tilnærmet like lipidinnholdet i filet, mens for uer ligger den målte lipidverdien, langt over lipidinnholdet i fileten (0,9 mg/100g). Uerprøven inneholdt hode og slo, som blant annet omfatter mage, lever, tarm og gjeller. Både hode og lever er rike på lipider, og kan forklare den høye forekomsten av lipider i biråstoffprøven (19).

Det prosentvise askeinnholdet ligger generelt litt høyere for biråstoffprøvene enn for massebalansen for filet. Forskjellene kan forklares med at massebalansene ikke er helt sammenlignbare, og fiskebein inneholder store mengder mineraler (19).

Med unntak for torsk, ligger proteininnholdet generelt litt lavere i biråstoffprøvene enn i filetene. Resultatene virker rimelige, da massebalansene ikke er helt sammenlignbare, og tatt i betraktning at det er individuelle forskjeller.

### Massebalanse av næringsinnhold

Hovednæringsstoffene i fisk er lipider, proteiner, vitaminer, mineraler og sporstoffer. Det er svært lite karbohydrater i fisk, og det er derfor mulig å sette opp en massebalanse ved å måle, lipider, proteiner og askeinnholdet. Ved å summere prosentandelen av disse stoffene i forhold til totalvekten, bør summen bli tilnærmet 100 %. I Tabell 4.1 er mengden lipider, proteiner og askeinnhold summert for råstoff fra hver fisk. For samtlige av fiskene ligger innholdet rundt  $100 \pm 2,9$  %. Usikkerhet på 2,9 % er relativt lavt, og næringsinnholdet per masse kan dermed beregnes til å være tilnærmet balansert.

### Vannløselig protein

Mengde vannløselige proteiner i biråstoffprøvene av fisk, ble bestemt med Lowry slik det er beskrevet i avsnitt 3.2.2, og mengden per 100g prøve i våtvekt, er vist i Tabell 4.2. For samtlige prøver ligger mengden vannløselige proteiner mellom 1,5-2,5 g/100g, der den laveste er for torsk og den høyeste for sei. Tabellen viser i tillegg prosentandelen av vannløselige proteiner i forhold til den totale mengden proteiner. Andelen av vannløselige proteiner er mye lavere enn den totale mengden, og utgjør mellom 8,3 - 15,6 % av proteinene, se Tabell 4.1, der den laveste prosentandelen er for torsk og den høyeste for uer. Rådata står beskrevet vedlegg C.

**Tabell 4.2: Prosentandel vannløselige proteiner i biråstoffprøver av ulike fiskearter.**

<b>Prøve</b>	<b>Vannløselige proteiner i prøve (g/100g)</b>	<b>Vannløselige proteiner av totalmengden proteiner (%)</b>
Laks	2,2 ± 0,2	14,7
Uer	1,9 ± 0,7	15,6
Lange	1,8 ± 0,1	10,0
Torsk	1,5 ± 0,5	8,3
Sei	2,5 ± 0,1	13,1

## Totalt karbon

Totalt karbon ble bestemt ved elementanalyse, slik det er beskrevet i avsnitt 3.2.2. Resultatet er vist i Tabell 4.3. I rangert rekkefølge er karboninnholdet høyest for laks ( $24 \pm 6$  g/100g), deretter uer ( $14,6 \pm 0,7$  g/100g), sei ( $11,4 \pm 0,4$  g/100g), lange ( $11 \pm 1,1$  g/100g) og torsk ( $9,8 \pm 0,8$  g/100g). Av næringsinnhold i fisk er det i hovedsak lipider og proteiner som inneholder store mengder karbon. Ved å legge sammen verdiene for lipid og protein i Tabell 4.1, vil de i rekkefølge fra høyest prosentandel til lavest bli rangert som følgende: laks ( $39,4$  g/100g), uer ( $23,15$  g/100g), sei ( $21,2$  g/100g), torsk ( $19,4$  g/100g) og lange ( $19$  g/100g). Rrangereringen samsvarer for alle fiskene, med unntak av torsk og lange. Etersom lipider og proteiner består av andre grunnstoff i tillegg til karbon, som oksygen, nitrogen og hydrogen, vil forholdet mellom mengden karbon og innhold av fett og proteiner variere med sammensetningen av lipider og aminosyrer. Resultatet vil derfor bare til en viss grad korrelere med innholdet av disse forbindelsene for fiskene vist i Tabell 4.1, men sammenhengen gir en viss pekepinn på om karboninnholdet samsvarer med mengden lipid og protein i prøven.

**Tabell 4.3: Karboninnhold (C) i biråstoffprøver av ulike fiskearter**

<b>Prøve</b>	<b>C (g/100g)</b>
Laks	24 ± 6
Uer	14,6 ± 0,7
Lange	11 ± 1,1
Torsk	9,8 ± 0,8
Sei	11,4 ± 0,4

## 4.1.2 Bryggeprøver

Balanse av næringsinnholdet for biråstoffprøver av brukt malt, og humle er vist i Tabell 4.4. Det opprinnelige innholdet i maltet og humlen før bruk er vist i Tabell 3.4 og Tabell 3.5. Biråstoffprøvene ble analysert for fett-, protein-, tørrstoff- og askeinnhold slik det er beskrevet i avsnitt 3.2.2. Vannmengden ble regnet fra mengden tørrstoff.

**Tabell 4.4: Balanse av næringsinnhold i biråstoffprøver av malt og humle**

<b>Prøve</b>	<b>Lipider</b>		<b>Proteiner</b>		<b>Aske</b>		<b>Vann</b>		<b>Totalt</b>
Malt Saison	2,6	± 0,1	0,057	± 0,001	1,1513	± 0,0008	69,383	± 0,001	<b>73,1</b>
Malt Trulsøl	1,7	± 0,5	0,055	± 0,006	0,704	± 0,002	67,068	± 0,003	<b>69,5</b>
Humle Saison	2,8	± 0,2	-	-	0,9933	± 0,0009	78,759	± 0,008	<b>82,6</b>
Humle Trulsøl	2,7	-	-	-	0,7818	± 0,0004	75,662	± 0,007	<b>79,1</b>

Av Tabell 4.4 går ikke massebalansen opp i 100 %, men ligger mellom 69-82 %, og har dermed et avvik på mellom 18 % og 31 %. For maltet kan avviket forklares i at maltet fremdeles innehold karbohydrater, i tillegg til å inneholde fiber. Og for humlen kan avviket i at humle inneholder store mengder fiber. Resultatet fra massebalansen kan derfor være rimelig, men usikkerheten er litt større enn for fiskeprøvene.

## 4.2 Forurensningsparametere i avløpsvann

### 4.2.1 Produksjonsvann

Produksjonsvannprøver fra lakseslakteri, ble analysert for forurensningsparametere COD, TOC og TN, slik det er vist i avsnitt 3.2.3. Prøvene ble hentet fra to steder i prosessen, fra slakteprosessen, og ved filetering. Vann ble levert to ganger: kronologisk nummert som 1 og 2. Resultatet av analysen er vist i Tabell 4.5.

**Tabell 4.5: Totalt organisk karbon- (TOC) og totalt nitrogen- (TN) innhold i produksjonsvannprøver fra lakseslakteri.** Prøvene er tatt på to steder i prosessen, ved slakting, og ved filetering, og ved to anledninger nummer 1 og 2. n=1

	<b>COD*</b> <b>(mg/L)</b>	<b>TOC</b> <b>(mg/L)</b>	<b>TN (mg/L)</b>
Slaktevann 1	-	178	65,3
Slaktevann 2	-	57,8	41,7
Filetvann 1	-	418	45,9
Filetvann 2	-	71,2	30,2

\*COD for rene produksjonsvannprøver ble forsøk analysert, men mengden organisk materiale lå under laveste måleverdi til testsettet (1000-10 000 mg/L O<sub>2</sub>), og analysen ga derfor ingen gyldige verdier.

Verdiene for COD lå under laveste måleverdi for testsettet (1000-10 000 mg/L O<sub>2</sub>), og denne analysen ga derfor ingen resultater. Det er mulig å fastslå at COD-verdiene for samtlige produksjonsvannsprøver ligger under 1000 mg/L O<sub>2</sub>, men for bestemmelse av COD må det bli foretatt analyser med testsett for lavere konsentrasjoner. Grunnet tidsbegrensinger, og forsinkelse ved levering av nye testsett, er ikke dette blitt gjennomført.

TOC-verdiene varierer i stor grad og spenner fra 57,8-418 mg/L. TOC beregnes som differansen mellom totalt organisk karbon (TC) og totalt uorganisk karbon (TIC). For nesten samtlige analyser gjennomført i denne oppgaven, ligger TIC verdiene under målegrensen på testsettet på 15 mg/L C. TOC-verdiene er derfor oppgitt som TC-verdiene, og resultatene må vurderes med litt større usikkerhet.



Verdiene for slaktevannet (178 mg/L) og filetvannet (418 mg/L) fra dag 1 ligger generelt mye høyere enn ved dag 2, der slaktevannet ble målt til å være (57,8 mg/L) og (71,2 mg/L). Mer informasjon om prosesseringen de ulike dagene har ikke vært mulig å oppdrive, så det er vanskelig å si noe om grunnen til forskjellene mellom de ulike dagene. En mulig grunn er at det har vært en variasjon i mengden fisk prosessert på de ulike dagene, og at mengden prosessert fisk har innvirkning på mengde organiske forbindelser i vannet i forhold til mengde vann brukt.

TOC-verdiene i Tabell 4.5 viser også at verdiene i slaktevannet for dag 1 og 2 er lavere enn for filetvannet tatt samme dag. Under slakting er fisken relativt hel i forhold til under filetering (58), en økning i TOC-verdier fra slakting til filetering er derfor naturlig. For å se om det er prosentvis sammenhengen mellom TOC-verdier i slaktevann og TOC-verdier ved filetering bør det gjennomføres analyser av prøver fra flere dager.

De målte TN-verdiene variere fra 30,2-65,3 mg/L, der den laveste verdien er i filetvann 2, mens den høyeste verdien er målt for slaktevann dag 1. Det er ingen klar sammenheng mellom TN-verdiene og dag, eller sted prøvene er tatt for de fire prøvene representert i tabellen. Det er heller ingen klar sammenheng mellom verdiene for TN og TOC.

#### 4.2.2 Maltvannprøver

Maltvannprøver ble analysert for forurensningsparameterne COD, TOC og TN, slik det er vist i avsnitt 3.2.3. Prøvene ble tatt ut etter vasking av maltrør, og behandlet slik det er beskrevet i avsnitt 3.1.2. Resultatet av analysen er vist i Tabell 4.6.

**Tabell 4.6: Kjemisk oksygenforbruk (COD), totalt organisk karbon- (TOC) og totalt nitrogen- (TN) innhold i vannprøver fra rensing av maltrør etter brygging.**

	<b>COD</b> <b>(mg/L)</b> n = 2	<b>TOC</b> <b>(mg/L)</b> n = 1	<b>TN</b> <b>(mg/L)</b> n = 1
Maltvann Saison	202000 ± 1980	52000	290
Maltvann Trulsøl	319500 ± 594	134000	370

COD-verdiene ligger på  $202840 \pm 1980$  mg/L for maltvann Saison og  $319000 \pm 594$  mg/L for maltvann Trulsøl. Verdiene ligger over 1600 ganger høyere den tillatte konsentrasjonen av COD (125 mg/l O<sub>2</sub>) i avløpsvann for norske bedrifter, se avsnitt Tabell 1.1. TN-verdiene ligger over 19 ganger høyere enn den tillatte konsentrasjonsverdien for TN på maksimum 15 mg/L.

Også TOC-verdiene er høye, som viser at maltvannet inneholder store mengder organisk materiale. TOC-verdiene er lavere enn COD-verdiene, og dette indikerer at det er mindre innhold av totalt karbon, enn det der er av oksiderbart karbon, slik det stemmer med NIVA-rapporten «Bestemmelse av organisk stoff i avløpsvann» fra 1990 av Håvard Hovind (11). For maltvann Saison lå COD-verdien 3,8 ganger høyere enn for TOC-verdiene, mens for maltvann Trulsøl lå COD-verdiene 2,4 ganger høyere enn TOC-verdiene, og dette er rimelige verdier sammenlignet med den veiledende faktoren på 3.

## 4.3 Modellprosess: generering av prosessvann

For å kartlegge hvilken påvirkning ulike vannkonsentrasjoner har på forurensningsparametere, og konsentrasjonen av potensielt interessante komponenter ble det utarbeidet et modellsystem der avløpsvann ble generert fra fiske-, malt og humleprøvene beskrevet i avsnitt 3.1.1 og 3.1.2. De faste prøvene ble tint og vasket i vann, før vannet ble silt av og analysert slik det er beskrevet i avsnitt 3.2.3. Modell-prosessvannet ble analysert for parameterne COD, TOC, TN og TP, og det ble bestemt at forholdet mellom prøve og vann skulle være 1:1, 10:4 og 10:3. Tabell 4.7 viser en oversikt over prøvene som er brukt i modellprosessen, parameterne, og for hvilke forhold mellom prøve og vann de er analysert for. Analyse av TP for uer 1:1 ble ikke gjennomført, på bakgrunn av at mengden fiskefarse av uer ikke strakk til. Resterende analyser av prøvene vist i tabellen, ble ikke gjennomført på grunn av begrenset med tid, og forsinkelser med utsendinger av utstyr fra leverandør. Det var også meningen å analysere BOD mengden i modell-prosessvannet, men av samme grunn som tidligere nevnt, ble dette ikke gjennomført.

**Tabell 4.7: Oversikt over hvilke fortyninger og parametere modell-prosessvann er blitt testet for**

Hvilke prøver	COD			TOC			TN			TP		
	1:1	10:4	10:3	1:1	10:4	10:3	1:1	10:4	10:3	1:1	10:4	10:3
Laks	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Uer	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-
Lange	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Torsk	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Sei	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Makrell	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Laks RB	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malt Saison	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Malt Trulsøl	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Humle Saison	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
Humle Trulsøl	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-

### 4.3.1 Frysing av filtrat

Ved å fryse ned organisk materiale til under  $-10^{\circ}\text{C}$ , reduseres hastigheten på mikrobiell vekst, og reaksjonshastigheten til enzymer, og frysing er en effektiv måte konservere mat på. Frysing av filtrat er svært vanlig i biokjemiske laboratorier for å effektivisere analysene, og for at alle prøvene skal stille med likt utgangspunkt og behandles likt. For å effektivisere analysene av vann fra modellprosessen, ble det gjennomført et forsøk med frysing av filtratene. Målet med forsøket var å sjekke hvilken effekt frysing av filtrat fra modellprosessen ville ha på resultatene ved analyse av COD, TOC, TN og TP.

Til fryseforsøket ble modell-prosessvann fra makrell og laks RB analysert. Modell-prosessvannet ble generert på samme måte som tidligere, som beskrevet i avsnitt 3.2.3. For hver av prøvene ble halvparten av filtratet analysert direkte, mens den andre halvparten ble fryst ned ved  $-20^{\circ}\text{C}$ , og analysert etter 2 uker. Det ble analysert 5 paralleller for alle parameterne. Den prosentvise økningen av forurensningsparameterne COD, TC og TP etter 2 uker frysing er vist i Figur 4.1. Samtlige av resultatene for TN målt på nedfrosne prøver, etter 14 dager lå under deteksjonsgrensen på  $20\text{ mg/L TN}$ . Ingen differanse ble derfor oppnådd for endringer i TN, og denne parameteren er utelatt fra figuren. Rådata og utregnet gjennomsnitt og standardavvik for parameterne brukt i fryseforsøket er vist i vedlegg F.



**Figur 4.1: Prosentvis økning av forurensningsparameterne COD, TC og TP etter at modell-prosessvannsprøver har vært fryst i 2 uker ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Blå søyle er makrellprøver, og gul søyle er prøver av laks ryggbein.**

Frysing av filtrat i 14 dager ga varierende resultater for de ulike parameterne, og det var og store variasjoner mellom makrell og laks RB-prøven. I motsetning til verdiene for de andre parameterne, økte verdiene for COD etter frysing. For makrellen økte COD-verdiene med 12 % fra verdiene målt direkte, og for laks RB økte verdiene med 44 %.

Som tidligere nevnt måles TOC som differansen av totalt karbon (TC) og totalt uorganisk karbon (TIC). For makrellprøvene som ble analysert direkte, ble 3 av 5 paralleller målt til å ha TIC-verdier under deteksjonsgrensen for testsettet, på 15 mg/L C, se vedlegg E For laks analysert direkte, lå samtlige av de direkte analyserte verdiene under deteksjonsgrensen. På grunn av de lave TIC-verdiene, var det ikke mulig å beregne differansen av før og etter frysing, og kun TC er vist i Figur 4.1. Mengden total karbon har holdt seg stabilt for makrellprøven, med en målt endring på -0,2%, mens mengden totalt karbon har sunket med 25,6 % for laks RB-prøven. En stor del av det organiske innholdet i filtratet er vannløselige proteiner. Frysing av fiskemusklene fører til denaturering, og aggregering av proteiner, og kjennetegnes ofte av at mengden vannløselige proteiner synker (59). De tinte filtratene ble ikke aktivt ristet før filtrat ble pipettert over i kyvettetestene, og utfelling og denaturering av proteiner kan være en forklaring på lavere verdier av organisk karbon ved analyse av de frysede filtratene. Også de synkende verdiene for TN fra detekterbare verdier, til verdier under deteksjonsverdien, kan tyde på færre proteiner i kyvettetestene.

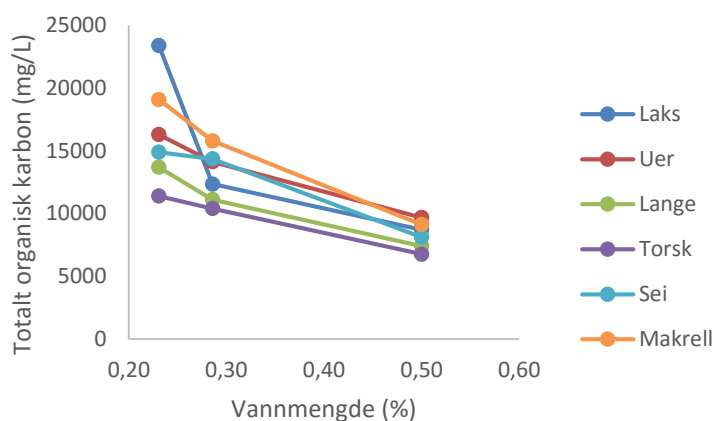
En trend i fryseforsøket er at filtratene for makrell, som i utgangspunktet har høyere konsentrasjoner av TOC, TC og TP, ble mindre påvirket av frysing enn det laks RB-prøvene ble. Dette kan skyldes sammensetningen av organisk materiale i prøvene.

Som et resultat av de varierende resultatene, ble det konkludert med at filtratene ikke kunne fryses, og resten av forsøkene ble analysert samme dag som modell-prosesseringsvannet ble generert.

## 4.3.2 Trender i modellsystemet

### Fiskeprøver

Analyse av modell-prosessvannet ble gjennomført direkte etter generering av prosessvannet fra biråstoffer fra de oppmalte fiskeprøvene. Rådata er vist i vedlegg F. Resultatene for analyse av TOC for modell-prosessvann av faste fiskeprøver skylt med vann, ved forholdene 1:1, 10:4 og 10:3 (biråstoff til vann), er vist i Figur 4.2.



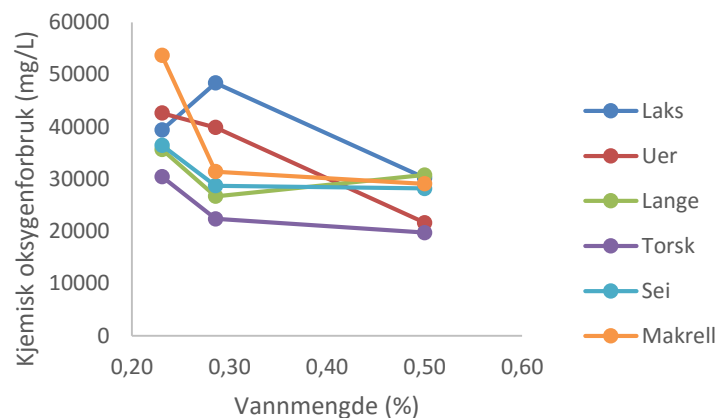
**Figur 4.2: Innhold av totalt organisk karbon (TOC) i modell-prosessvann generert fra biråstoffprøver fra fisk**

På samme måte som for prosessvannet fra lakselakteriet, lå konsentrasjonen av uorganisk karbon under deteksjonsgrensen for testsettet, og TOC er derfor oppgitt som TC-verdiene. TOC-verdiene for modell-prosessvannet til fiskeprøvene ligger mellom 6800 og 23400 mg/L O<sub>2</sub>. For alle fiskeprøvene med unntak av fortytning 10:3, er det en økning i verdi når vannmengden reduseres. Ved reduksjon av vannmengde vil organiske forbindelser, og andre stoffer som løser seg i vann, vil utgjøre en større prosentandel av totalmengden. Dermed vil det være forventet at konsentrasjonen av disse stoffene per liter vann gå opp, slik TOC-verdiene viser. Det må spesifiseres at for modell-prosessvann med forhold 10:3, ble samtlige av de oppmalte prøvene lagt press på ved filtrering, for å få nok ekstrakt til analysene. Et ekstra trykk på prosessvannet kan ha hatt en påvirkning på hvor mye organiske materialer og andre stoffer, som ble tatt opp av prosessvannet, og ført gjennom filteret. Konsentrasjonen av organisk karbon kan dermed være for høyt sammenlignet med de to andre fortytningene. Flere faktorer som løselighet og hvor mettete løsningene vil påvirke mengde organisk stoffer i vannet, og

sammenhengen mellom mengde vann og mengde organiske stoffer tatt opp i vannet, er sannsynligvis ikke lineær. For å nærmere kunne fastslå en sammenheng mellom TOC-konsentrasjoner for biråstoffprøver fra fisk, og mengde vann til vasking, må flere analyser gjennomføres. Analyse med av prøver med samme innhold, og flere paralleller for hver prøve, bør gjennomføres for å få et bedre mål på usikkerhet, og beregning av signifikante forskjeller.

Resultatene fra TOC målingene viser er ingen klare sammenhenger mellom næringsinnholdet i Tabell 4.1, og TOC-verdiene for fiskeprøvene. Generelt sett ligger TOC-verdiene for de fete fiskene litt høyere enn for de magre fiskene, men det er ingen signifikante forskjeller.

Resultatene for analyse av COD, for modell-prosessvann av faste fiskeprøver ved forholdene 1:1, 10:4 og 10:3 er vist i **Figur 4.3**.



**Figur 4.3: Innhold av kjemisk oksygenforbruk (COD) i modell-prosessvann generert fra biråstoffprøver fra fisk**

Verdiene for COD ligger mellom ca. 20 000-54 000 mg/L O<sub>2</sub>, og som **Figur 4.3** viser, er det ingen klar sammenheng mellom redusert vannmengde og endring i COD-verdier for fiskeprøvene. Det er heller ingen klar sammenheng mellom COD-verdiene, og nærings sammensetningen bestemt for de faste biråstoffprøvene vist i Tabell 4.1. Slik det er vist i **Figur 4.3**, har modell-prosessvannet fra uer og laks en klar økning i konsentrasjon av COD ved reduksjon av vann fra 1:1 til 10:4. Endringene av COD-verdiene ligger på henholdsvis 84 og 60%. Innholdet av laks og uer har et klart større lipidinnhold enn de resterende prøvene. Marine biråstoffer inneholder nøytrale lipider som triglyscerider, og kolesteroler, og polare

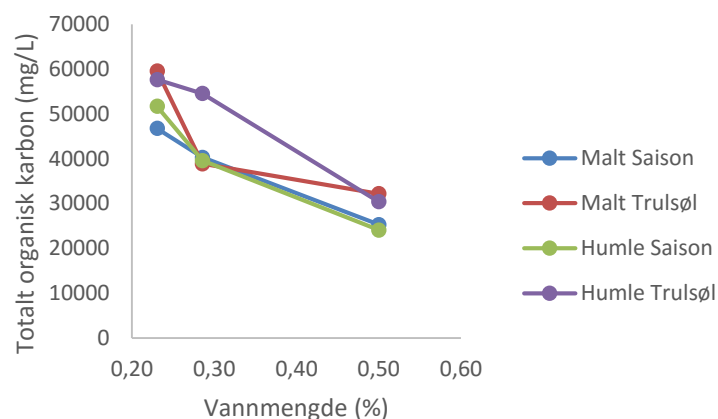
lipider som fosfolipider (19). Siden nøytrale lipider er løselige i upolare løsemidler, og polare lipider er løselige i væske med polare stoffer som metanol og etanol, sammen med organiske løsemidler (60). Generelt sett er lipider og frie fettsyrer, svært lite løselige i vann, og en sterk økning av lipider i vann vil derfor være unaturlig. I så tilfelle måtte dette være knyttet til at vannet tar opp stoffer med en emulgerende effekt, som binder til seg lipidene. Samtidig er makrell en svært fet fisk, se Tabell 2.2, og selv om ikke næringsinnholdet i makrellen er bestemt i denne oppgaven, er det naturlig å anta at makrellprøven som består av ryggbein, hode, buklist, og innvoller, også inneholder store mengder lipider. Endringen i COD-verdier for makrell ved reduksjon av vannmengde fra 1:1 til 10:4 er kun på 8 %, og en sammenheng mellom lipidinnhold og en økning i COD-verdier ved lavere vannkonsentrasjoner er dermed urimelig. Det er også viktig å ta i betraktning at verdiene i modellsystemet kun er bestemt ut ifra en parallell, dermed er verdiene noe usikre. For å kunne fastslå, evt. avvise enkelte sammenhenger bør analysene av modell-prosessvannet bli gjennomført med flere paralleller.

TN-verdiene for fiskeprøvene ligger mellom 2600 og 8800 mg/L TN. Verdiene er som COD-verdiene svært spredte, og ingen klare sammenhenger vises mellom TN-verdiene og endring av vannmengde. Rådata og figur er vist i vedlegg F.

### Bryggeprøver

Analyse av modell-prosessvannet fra biråstoffer fra malt og humle, ble også gjennomført direkte etter generering av prosessvannet. Resultatene for analyse av TOC for modell-prosessvann av faste bryggeprøver ved forholdene 1:1, 10:4 og 10:3 (biråstoff til vann), er vist i Figur 4.4





**Figur 4.4: Innhold av totalt organisk karbon (TOC) i modell-prosessvann generert fra biråstoffprøver av malt og humle.**

TOC-verdiene er satt lik TC-verdiene, ettersom TIC-verdiene var for lave til å detekteres. Av figuren, kan det observeres en klar stigning i TOC-verdier når vann mengden reduseres. Som for modell-prosessvannet for fiskeprøvene, er bare en parallell av hver prøve analysert. Modell-prosessvann for flere paralleller bør derfor analyseres for kunne fastslå en sammenheng mellom TOC-verdier og mengde vann biråstoffprøvene er skyldt med. Tilsvarende resultater er funnet for TN, og COD, figur og rådata er vist i vedlegg F.

#### 4.3.3 Vurdering av modellsystemet

Et av målene med BioSuck-prosjektet er å utvikle et beslutningsstøtteverktøy (DSS). På bakgrunn av informasjonen samlet i DSSen, kan man bestemme hvor og når det vil være fordelaktig å installere vakuumløslinjer i næringsmiddelindustrien. Formålet med å bruke vakuumløslinjene er blant annet å redusere vannforbruket med 50-80%, samt å redusere kostnadene for behandling av prosessvann. Det er derfor interessant og nyttig å undersøke hvilken påvirkning endring av vannmengden som brukes under prosessering har på konsentrasjonene av COD, BOD, TOC, TN og TP.

For å kartlegge påvirkningen av ulike vannreduksjoner, ble det laget et modell-system. Som et utgangspunkt for modell-systemet ble vannmengden i forhold til biråstoff bestemt til å være 1:1, 10:4 og 10:3. I etterkant har det vist seg at vannmengden i modellsystemet har vært noe lavt sammenlignet med de vannforholdene som brukes i industrien. Det har vært vanskelig å finne oppdaterte tall på vannforbruk for prosessering av fisk, men i NIVA rapport 3600 fra 1997

(61) er det estimert at rundt 6 liter vann brukes per kg slaktet fisk ved bløgging og slakting. Ved å bruke et forhold mellom vann og råstoffprøve på 1:1 i modellsystemet, ble vannmengden redusert med 83 % i forhold til industrien, og tilsvarende ble vannmengden redusert med 95 % i forhold til industrien ved å bruke forholdet 10:3 i modellsystemet. Vannmengden i modellsystemet er dermed lavere enn det som er forventet å oppnå for BioSuck sin vakuuminlinje, og resultatene kan ikke brukes direkte til å estimere hvilke verdier av COD, BOD, TOC, TN og TP som kan oppnås med vakuuminlinjen.

For å få en bedre tilnærming til BioSuckst ønske om å redusere vannmengden 50-80 %, bør det vurderes å utvikle modell-systemet slik at vannmengden tilsvarer en 50-80 % reduksjon av vannforbruket i dag. Bedre tall på dagens vannforbruk bør skaffes, og vannmengden bør tilpasses etter disse tallene. Med utgangspunkt i at dagens vannforbruk ligger på 6 liter per kg fisk, kan passende vannmengde i forhold til biråstoff være 3:1, 2:1 og 1:1. Det kan også være lurt å kjøre alle analysene med flere paralleller, slik at usikkerheten for målingene kan bestemmes. Ved bruk av oppmalte biråstoffer, slik det ble for modell-prosessvannet for fiskeprøvene, kan prosessvann generes fra to ulike prøver, og analysere 3 paralleller fra hver av disse. Eventuelle signifikante forskjeller kan dermed regnes ut, og det er lettere å bestemme hvordan ulike vannmengder påvirker resultatene.

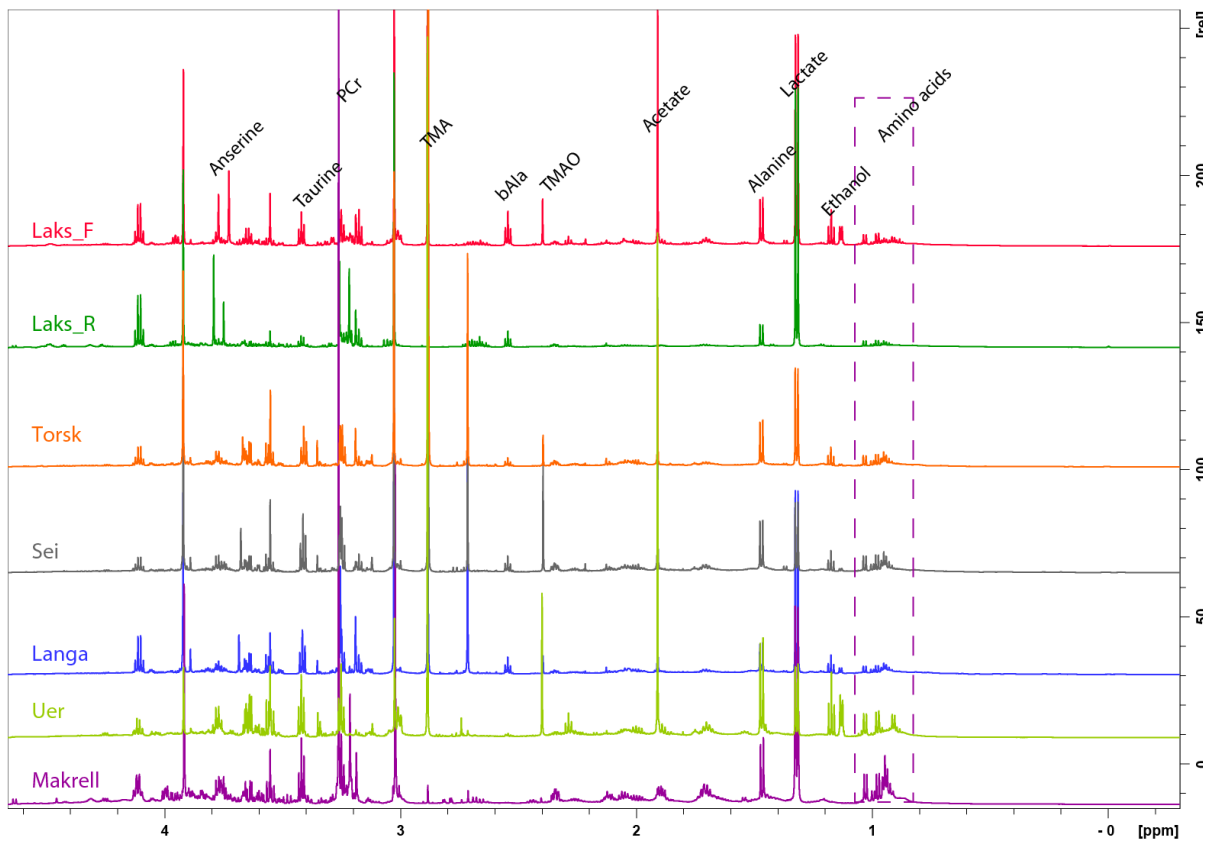
Til modell-prosessvannet fra fiskeprøvene ble det det brukt oppmalte biråstoffer. Oppmaling av biråstoffene ble i denne oppgaven gjennomført for å få en større mengde prøve, samt for å kunne analysere for alle parameterne på samme prøve, da det viste seg at filtratene ikke kunne fryses. Når biråstoffene males opp i mindre fraksjoner øker overflatearealet, og vannet vil få en større kontaktflate enn den ville gjort ved skylling av hele prøver. Industrielt er ikke biråstoffene malt opp, og det kan ved videre utvikling av modellsystemet vurderes å bruke hele prøver.

Hvilke endringer som bør gjøres i forhold til modellsystemet bør vurderes ut ifra resurser, tid, praktiske muligheter og finansiell bakgrunn. For mer vitenskapelige resultater, kan det vurderes å bruke standardmetoder i stedet for kommersielle testsett.

## 4.4 NMR

NMR er en av de viktigste analytiske metodene for en fullstendig oversikt over metabolitter i næringsmidler. Sammen med statistiske analyser kan NMR gi informasjon om kvaliteten på næringsmiddelet, geografisk opprinnelse, og prosessering (53). I denne oppgaven ble NMR brukt til å kartlegge metabolittene i prosessvann fra lakseslakteriet og i modell-prosessvann fra modellsystemet.

Det ble foretatt NMR-analysene av modell-prosessvann (1:1) fra biråstoffprøvene av laks, torsk, sei, lange, uer og makrell, samt modell-prosessvann fra laks RB. Figur 4.5 viser NMR-spektrene fra disse analysene.



**Figur 4.5:**

Av figuren kan det sees at mye av de samme metabolittene forekommer i de ulike prøvene. Figur 4.6 viser konsentrasjonene av de ulike forbindelsene for modell-prosessvann av fiskeprøvene beregnet fra NMR-spekteret. Figur 4.7 viser konsentrasjonene av prosessvann fra

lakseindustrien, og Figur 4.8 viser NMR-spektrene fra analysen av biråstoffprøvene (1:1) malt saison, malt trulsøl, humle saison og humle trulsøl.

### Aminosyrer

Prøvene inneholder ulike aminosyrer. Aminosyrer som er funnet i prøvene er valin (Val), isoleusin (Ile), leusin (Leu), phenylalanin (Phe), histidin (His), alanin (Ala), og beta alanin (b ala). Forekomsten av de forskjellige aminosyrene varierer mellom de ulike prøvene. Generelt sett er det størst forekomst av Ala og Leu, mens det prosessvannet fra bryggeprøvene også er et høyt innhold av Phe. Den høye forekomsten av aminosyrer er naturlig da prøvene inneholder en del vannløselige proteiner.

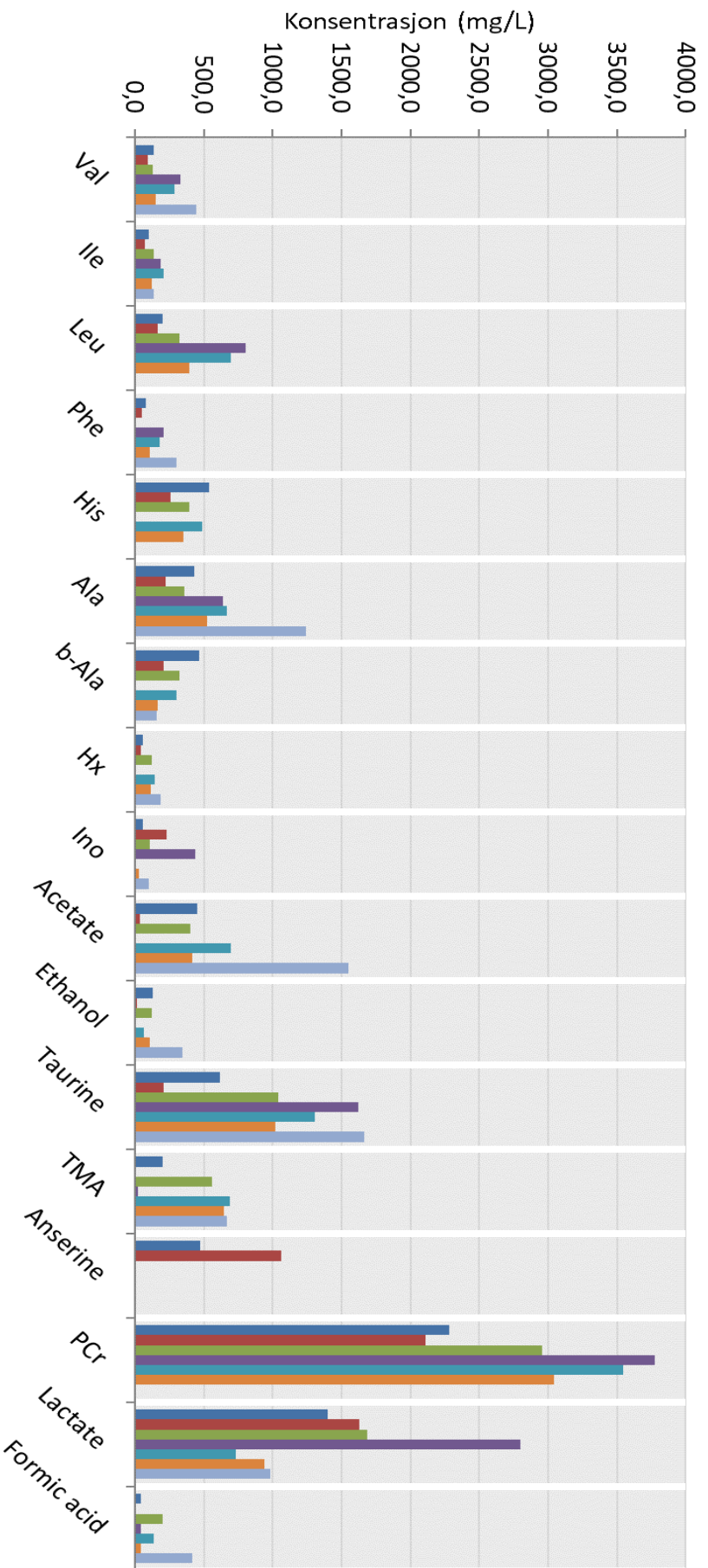
### Verdifulle metabolitter

I både modell-prosessvannet og i prosessvannet fra lakseindustrien er det funnet forholdsvis store konsentrasjoner av taurin, sammenlignet med konsentrasjonene av de ulike aminosyrene. Taurin er en aminosyrelignende forbindelse finnes i små mengder i de fleste typer vev hos pattedyr. Forbindelsen inngår i en rekke fysiologiske prosesser, og er med stor sannsynlighet viktig for blant annet immunomodulering og osmoregulering. Pattedyr kan ikke syntetisere taurin selv og mennesker er derfor avhengig av å få tilførsel av taurin gjennom kosten (62). Fisk og restråstoffer fra fisk er kan dermed være en god kilde til taurin, og det kan være interessant å undersøke mulighetene for oppkonsentrering av denne forbindelsen.

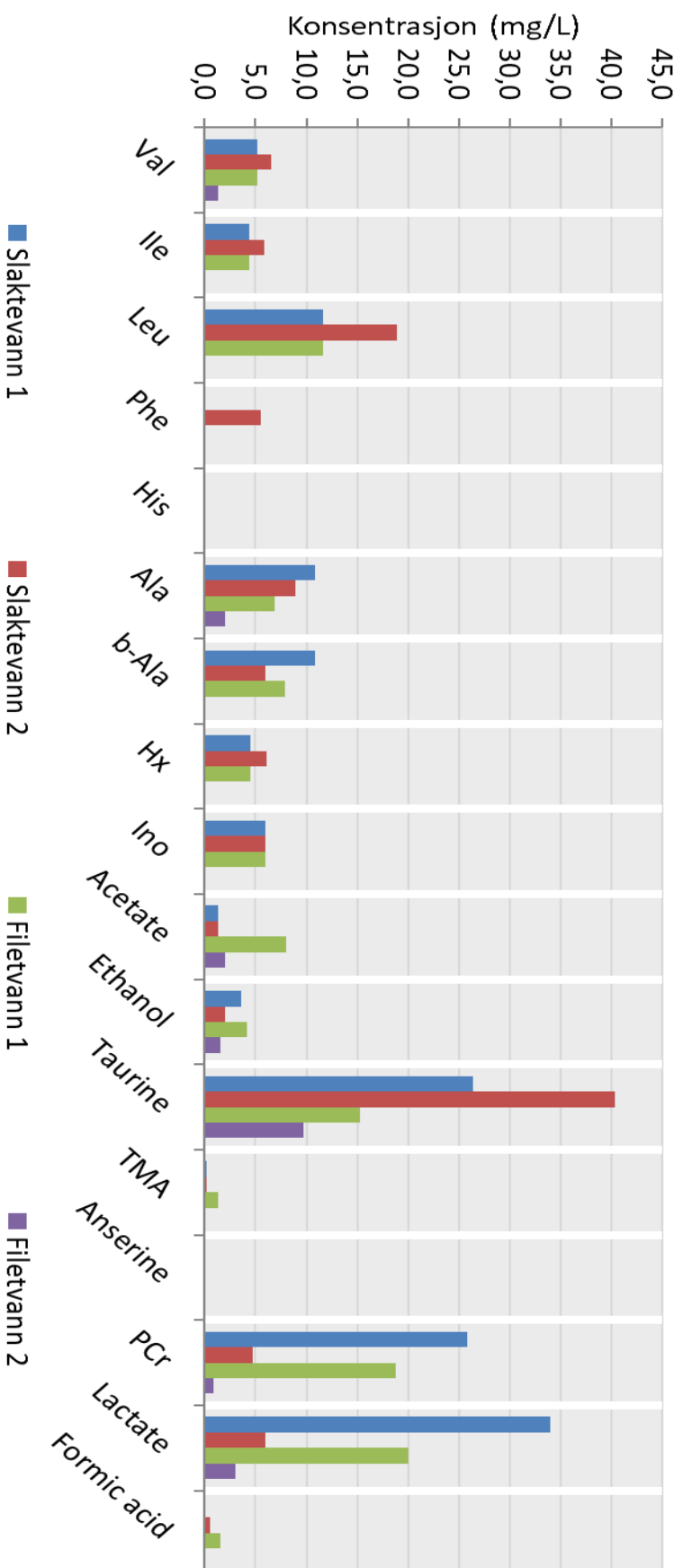
### Ferskhet på prøvene

Flere av de påviste metabolittene i prøvene kan indikere hvor ferske prøvene var ved ekstraksjon. Fosfokreatin (PCr) fungerer som en energibuffer, og spaltes til kreatin (Cr) ved behov for energi til musklene. Store mengder PCr indikerer dermed at prøven ikke har ligget lenge nok til at alle PCr-metabolittene er redusert til Cr. Som søylene Figur 4.6 viser, er fosfokreatin den metabolitten med generelt høyest forekomst i alle prøvene. På grunn av like skift for fosfokreatin og kreatin, er det ikke mulig å skille mellom forekomstene av disse forbindelsene. Mengden av PCr i Figur 4.6 viser dermed en samlet mengde av PCr og kreatin, og for å skille mengde av disse metabolittene fra hverandre må flere analyser foretas.  $^{31}\text{P}$  NMR kan brukes til å skille PCr og kreatin fra hverandre, men det er ikke foretatt slike analyser i forbindelse med denne oppgaven. PCr kan derfor ikke brukes til å se på ferskheten til prøvene i dette tilfellet.

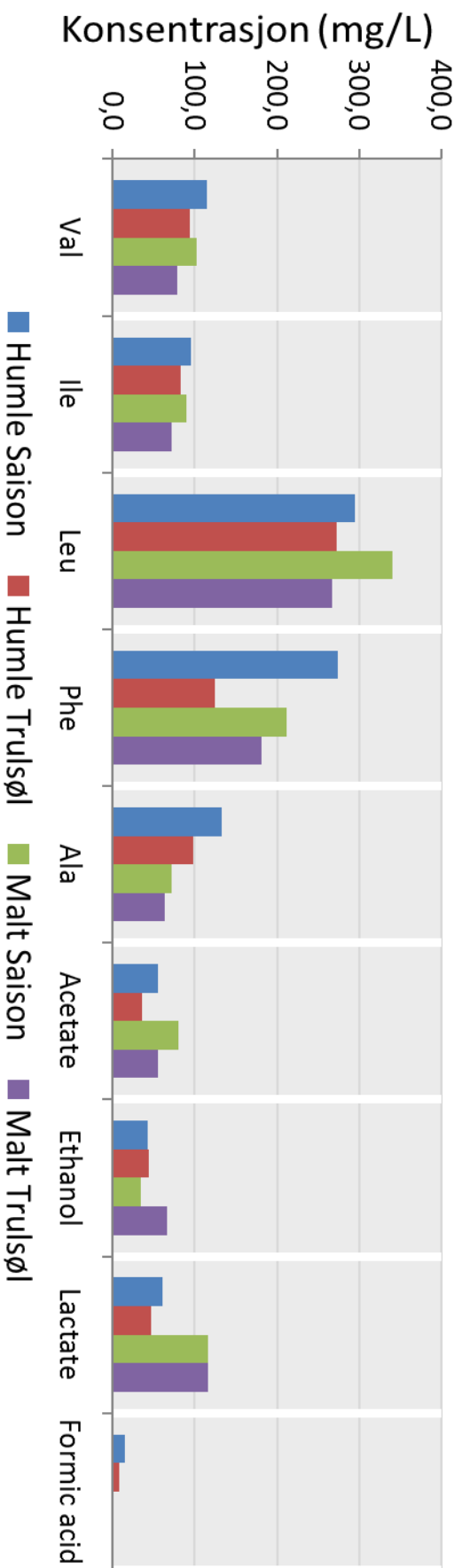
Andre metabolitter som indikerer forringelse av prøven, er laktat, inosin (Ino) og hypoxantin (Hx). Når fisken dør får ikke musklene tilførsel av mer oksygen, og glykogen brytes anaerobt ned til melkesyre/laktat (63). Av Figur 4.6 kan det sees at laktat generelt sett er den forbindelsen som det er nest mest av. Mengden laktat indikerer dermed at prøvene ikke var helt ferske ved frysing. Når fisk dør brytes adenosin-5'-trifosfat (ATP) ned ved autolyse, der de to siste forbindelse i reaksjonsveien er Ino og Hx. Hx er en av metabolittene som frembringer den bitre lukten og avsmaken fra gammel fisk. De oppmalte fiskeprøvene hadde forholdsvis stram lukt, etter tining men dette kan også skyldes andre forbindelser. Forekomsten av Ino og Hx vist i Figur 4.6, er lave og indikerer at autolysen i prøvene ikke er fullstendig. Prøvene kan dermed ikke kategoriseres som hverken fersk eller forringet, men de er heller ikke kommet langt i forringelsesprosessen.



**Figur 4.6: Konsentrasjonene (mg/L) av ulike forbindelser i modell-prosessvann (1:1) fra biråstoffprøvene av laks, torsk, sei, lange, uer og makrell, samt modell-prosessvann fra laks RB.** Aminosyrer som er funnet i prøvene er valin (Val), isoleusin (Ile), leusin (Leu), phenylalanin (Phe), histidin (His), alanin (Ala), og beta alanin (b ala). I tillegg er forekomsten av inosin (Ino), hypoxantin (Hx), acetat, etanol, teurin, trimethylamine (TMA), anserin, fosfokreatin/kreatin (PCr), laktat og maursyre (Formic acid) oppgitt.



**Figur 4.7: Konsentrasjonene (mg/L) av ulike forbindelser i prosessvann fra lakseslakteri: slaktevann 1 og 2, og filetvann 1 og 2.** Aminosyrer som er funnet i prøvene er valin (Val), isoleusin (Ile), leusin (Leu), phenylalanin (Phe), histidin (His), alanin (Ala), og beta alanin (b ala). I tillegg er forekomsten av inosin (Ino), hypoxantin (Hx), acetat, etanol, teurin, trimethylamine (TMA), anserin, fosfokreatin/kreatin (PCr), laktat og maurusyre (Formic acid) oppgitt.



**Figur 4.8: Konsentrasjonene (mg/L) av ulike forbindelser i modell-prosessvann fra bryggeprøver: malt Saison, malt Trulsøl, humle Saison og humle Trulsøl** Aminosyrer som er funnet i prøvene er valin (Val), isoleusin (Ile), leusin (Leu), phenylalanin (Phe), og alanin (Ala). I tillegg er forekomsten av acetat, etanol, laktat og maursyre (Formic acid) oppgitt.



## 5 Konklusjon

Analysen av TOC og TN i prosessvannet fra lakseindustrien viste at det er større mengder organiske materialer i vann fra filetering, enn i vann fra slakting. Konsentrasjonen av TOC lå på mellom 57-418 mg/L. For de målte TN-verdiene var det ingen observert sammenheng mellom verdiene og hvor i prosessen de ble hentet. Det ble heller ikke observert noen sammenheng mellom TN-verdiene og hvilken dag prøvene ble tatt ut. Konsentrasjonen av TN lå mellom 30-65 mg/L, og lå over den tillatte konsentrasjonsverdien for TN på 15 mg/L. Prosessvannet må dermed renses før det kan slippes ut i det kommunale avløpet. Ved analysen av COD, TOC og TN i maltvannet lå COD-verdiene over 1600 ganger høyere enn den tillatte konsentrasjonsverdien for COD på 125 mg/L. TN-verdiene lå over 19 ganger høyere enn den tillatte konsentrasjonsverdien for TN på maksimum 15 mg/L. Dette tyder på svært høye konsentrasjoner av organisk materialer i maltvannet. For maltvann Saison lå COD-verdien 3,8 ganger høyere enn for TOC-verdiene, mens for maltvann Trulsøl lå COD-verdiene 2,4 ganger høyere enn TOC-verdiene.

Fryseforøket som ble gjennomført for å forenkle analysen i modellsystemet, viste at det ikke var mulig å fryse ned prosessvann før testing av forureningsparametere COD, TOC, TN og TP. Påvirkningen av frysingen var varierende og verdiene for COD økte etter frysing, mens de sank for TOC og TP. For en nærmere undersøkelse av hvilken effekt frysing har på prosessvann og analyse av forureningsparametere, bør det foretas flere analyser knyttet til frysing av filtrat. Ved frakting av prøve fra fiskeprosesseringsanlegg fryses ofte prøvene. Det kan derfor være lurt å undersøke denne effekten, og i tillegg bør andre måter for transport av prosessvann fra prosesseringsanlegg vurderes.

Det viste seg at vannmengden brukt i forhold til biråstoff var lavere enn det som er mulig å oppnå med vakuuminjer i dag, og ved videre utvikling av modellsystemet vil det være nyttig å bruke større mengder vann i forhold til biråstoff prøve. Det ble kun brukt en parallell fra hver måling, og for å kunne bestemme usikkerheten på forsøket og for å se på signifikante forskjeller, bør det gjennomføres analyse av modell-prosessvann ved senere anledninger brukes flere paralleller. I tillegg bør det vurderes om prøvene skal males opp eller ikke.

NMR-analyse gjør det mulig å bestemme ulike forbindelser i prosessvann. Ved analyse av både modell-prosessvann fra fiskeprøvene, modell-prosessvann fra bryggeprøvene og prosessvann fra lakseslakteriet ble det funnet varierende mengder av ulike aminosyrer. Prosessvannet fra fiskeprøvene og fra lakseslakteriet inneholdt i tillegg taurin, en essensiell forbindelse som mennesker ikke syntetiserer selv, men som er viktige for en rekke fysiologiske prosesser i kroppen. I begge prøvene var mengden av taurin større enn mengden av de enkelte aminosyrene.

## 6 Bibliografi

1. Waldron K. 1 - Waste minimization, management and co-product recovery in food processing: an introduction. In: Waldron K, editor. Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing: Woodhead Publishing; 2007. p. 3-20.
2. Adenso-Díaz B, Mena C. Food Industry Waste Management. Sustainable Food Processing: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 435-62.
3. Miljødirektoratet. Våtorganisk avfall. In: miljøstatus.no, editor. 2015.
4. Understanding waste streams Treatment of specific waste: European Parliament; 2015 [updated June 2015. Available from: [http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2015/559493/EPRS\\_BRI\(2015\)559493\\_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2015/559493/EPRS_BRI(2015)559493_EN.pdf).
5. landsforening F-foh. Biråstoff. Et faktaark om bruk av biprodukt og restråstoff i lakseproduksjon. 2011.
6. Gowthaman M, Gowthaman P, Chandrasekaran M. Principles of food technology and types of food waste processing technologies. Valorization of Food Processing By-Products. 2012:109.
7. Forskrift om begrensning av forurensning (forurensningsforskriften). In: miljødepartementet K-o, editor. <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2004-06-01-9312004>.
8. Brennan JG, Grandison AS. Water and Waste Treatment. Food Processing Handbook 2011. p. 593-621.
9. De Borja B, Jack RF, Rohrer J. Determination of Total Nitrogen and Phosphorus in Wastewaters by Alkaline Persulfate Digestion Followed by IC.
10. forurensningsdirektoratet FK-o. Kontroll av næringsmiddelindustrien 2011. TA-2780. 2011.
11. Hovind H. Bestemmelse av organisk stoff i avløpsvann. NIVA - Rapport 2386. 1990;O-89023:86.
12. ISO 15705 (2013) Water Quality — Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) — Small-scale sealed-tube method.
13. Larsen R, Stormo SK, Eilertsen K-E, Mæhre H, Jensen IJ, Østerud B, et al. Prosessering av sjømat – Endring i næringsinnhold, biotilgjengelighet og helseeffekter. Nofima rapportserie (36/2010). 2010.
14. Larsen R. Sjømat - positive helseeffekter og næringsinnhold. landsforening NmoNs, editor 2008.

15. Tomczak-Wandzel R, Vik EA, Wandzel T. BAT in fish processing industry: Nordic perspective. Copenhagen: Copenhagen: Nordisk Ministerråd; 2015.
16. Sjømatdata [Internet]. 2005-2010 [cited 11.06.2016]. Available from: [http://www2.nifes.no/index.php?page\\_id=164&lang\\_id=1](http://www2.nifes.no/index.php?page_id=164&lang_id=1).
17. Fødevardata [Internet]. Danmarks Tekniske Universitet. 2015 [cited 11.06.2016]. Available from: <http://frida.fooddata.dk>.
18. RUBIN. Varestrømanalyse for 2011. 2012.
19. Rustad T, Storrø I, Slizyte R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011;46(10):2001-14.
20. Olsen J-V, Tobiassen T. Økt verdiskaping fra biprodukter og bifangst. *Fiskeforskning*. 2004;Rapport 3.
21. Flatøy LE. Integrert produksjon av biprodukter fra laks. Fiskekandidat oppgave fra Norges Fiskerihøgskole. 2001;Universitetet i Tromsø.
22. Toppe J, Albrektsen S, Hope B, Aksnes A. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 2007;146(3):395-401.
23. Eliassen S, Sverdrup-Jensen S, Holm P, Petter Johnsen J. Nordic Experience of Fisheries Management: seen in relation to the reform of the EU Common Fisheries Policy. 2009.
24. Olafsen T, Richardsen RN, Ragnar N, Gunn S, Jan PK. Analyse marint restråstoff 2013. Project number: 6020663. 2014 ISBN 978-82-14-05720-1.
25. Falch E, Rustad T, Jonsdottir R, Shaw NB, Dumay J, Berge JP, et al. Geographical and seasonal differences in lipid composition and relative weight of by-products from gadiform species. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6-7):727-36.
26. Kerry J, Murphy S, Shahidi F. Physical and chemical properties of lipid by-products from seafood waste. *Maximising the value of marine by-products*. 2007:22-46.
27. Rustad T. Physical and chemical properties of protein seafood by-products. *Maximising the value of marine by-products*. 2007:3-21.
28. Blanco M, Sotelo CG, Chapela MJ, Pérez-Martín RI. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(1):29-36.
29. Thordarson G, Hognason A, Haraldsson A. *Filtrex vatnshreinsibúnaður*. Reykjavík: Matis; 2013.
30. Liltved H. *Analyse av avløpsvann fra filet- og rekeindustri*. Oslo: Norsk institutt for vannforskning; 1997.
31. Briggs DE. *Malts and malting*: Springer Science & Business Media; 1998.

32. Speidel. Recirculating Infusion Mash System. <http://www.speidels-braumeister.de/en/>.
33. Boyles W. The science of chemical oxygen demand. Technical information series, Booklet. 1997;9(Hach Company).
34. Pisarevsky AM, Polozova IP, Hockridge PM. Chemical Oxygen Demand. Russian Journal of Applied Chemistry.78(1):101-7.
35. Hovind H. Sammenligning av kjemisk oksygenforbruk og totalt organisk karbon i industrielt avløpsvann. NIVA - Rapport 6069. 2010;10404.
36. ISO 6060 (2012) Water quality — Determination of chemical oxygen demand 2012.
37. Jouanneau S, Recoules L, Durand MJ, Boukabache A, Picot V, Primault Y, et al. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. Water Research. 2014;49:62-82.
38. Chemicals D. Principles and strategies related to the testing of degradation of organic chemicals. OECD Guideline for testing of chemicals. 2005;Section 3 part 1.
39. ISO 5815-1 (2013) Water quality — Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD<sub>n</sub>) — Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition.
40. Hovind H. Totalt organisk karbon (TOC) : analysemetoder og instrumenter. Oslo: Norsk institutt for vannforskning; 1988.
41. Water Column Nutrients [Internet]. Australian Government. [cited 30.05.2016]. Available from: [www.ozcoasts.gov.au/indicators/water\\_column\\_nutrients.jsp](http://www.ozcoasts.gov.au/indicators/water_column_nutrients.jsp).
42. Ferree MA, Shannon RD. Evaluation of a second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater samples. Water Res. 2001;35(1):327-32.
43. analytics a. Total Nitrogen in Wastewater.
44. Roig B, Gonzalez C, Thomas O. Measurement of dissolved total nitrogen in wastewater by UV photooxidation with peroxodisulphate. Analytica Chimica Acta. 1999;389(1-3):267-74.
45. Working procedure: LCK138 Total Nitrogen, TNb [Internet]. Hach Lange Company. 2013 [cited 31.05.2016]. Available from: <http://uk.hach.com/laton-total-nitrogen-cuvette-test-1-16-mg-l-tn-sub-bsub/productdownloads?id=26370268941&callback=qs>.
46. Thompson M. CHNS Elemental Analysers AMCTB No 29. 2008(Analytical Methods Committee ).
47. Price TD, Burton JH. Methods of Analysis. An Introduction to Archaeological Chemistry. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 73-126.
48. Protein: Danish Food Informatics; [updated 03.10.2016. Available from: [http://toolbox.foodcomp.info/ToolBox\\_Protein.asp](http://toolbox.foodcomp.info/ToolBox_Protein.asp).

49. Mariotti F, Tomé D, Mirand PP. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(2):177-84.
50. Jones DB. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins: US Department of Agriculture Washington, DC; 1941.
51. Sosulski F, Holt N. Amino acid composition and nitrogen-to-protein factors for grain legumes. *Canadian Journal of Plant Science*. 1980;60(4):1327-31.
52. Union E. Regulation (eu) no 1169/2011 of the european parliament and of the council of 25 October 2011. *Official Journal of the European Union*. 2011;L 304/18.
53. Mannina L, Sobolev AP, Viel S. Liquid state 1H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2012;66:1-39.
54. Macomber RS. *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*. New York: Wiley; 1998.
55. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7th ed. ed. Hoboken, N.J: Wiley; 2005.
56. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8):911-7.
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
58. Fileting for salmon and Sea Trout [Available from: [http://www.baader.com/en/products/fish\\_processing/salmonides/index.html#salmon\\_seatrout\\_en](http://www.baader.com/en/products/fish_processing/salmonides/index.html#salmon_seatrout_en).
59. Sikorski ZE, Olley J, Kostuch S, Olcott HS. Protein changes in frozen fish. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1976;8(1):97-129.
60. Kelly C. *Lipid Glossary 2, 2000*. Oxford, UK2001. p. 107-.
61. Liltved H, Norgaard E. Desinfeksjon av avløpsvann fra bedrifter som tilvirker oppdrettsfisk. 1997.
62. Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2006;9(6):728-33.
63. Balevik SB, Slinde E. Rigor mortis – dødsstivhet, avgjør kvalitet og økonomisk gevinst. *HAVBRUKSRAPPORT 2004*. 2004;Havforskningsinstituttet:2.