

Forord

Denne masteroppgaven utgjør siste steg av et 2-årig masterprogram i mat og teknologi (FTMAMAT) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven ble skrevet som en del av et pågående prosjekt Re-Food, som er en del av det Indo-Norwegian samarbeidsprosjektet mellom Norge og India. Prosjektet er koordinert av SINTEF Ocean og inkluderer Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Gjennom prosjektet fikk jeg muligheten til å oppleve et kortere studieopphold ved Central Food Technological Research Institute (CFTRI) i Mysore, India. Mye av laboratoriearbeidet ble derfor utført ved CFTRI, India. SINTEF Sealab, har også bidratt med supplerende analyser under masterperioden.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere fra NTNU, prodekan Eva Falch, professor Turid Rustad og universitetslektor Kari Helgetun Langfoss samt Veronika Hammer Hjellnes for god hjelp med å skrive masteroppgaven. Jeg vil også takke mine veiledere Dr. Sachindra, og doktorgradsstudent Nikita Ramprathap under India-perioden ved CFTRI for god hjelp og støtte under oppholdet.

I tillegg ønsker jeg å takke mine medstudenter ved institutt for bioteknologi og matvitenskap, som har vært gode motivatorer gjennom tiden som student. En spesielt stor takk til Frida Holm Larsen og Kristin Brustad som har motivert meg gjennom hele India oppholdet. Jeg vil også rette en stor takk til familie og venner som har vist stor støtte og vært oppmuntrende når jeg trenger det.

Trondheim, 20. juni 2019

Sara Aakre

Sammendrag

Å sikre god kvalitet på råstoff til konsum innenfor alle deler av verdikjeden, fra hav til marked kan være en utfordring. Økt fokus og kunnskap om kvalitetsvurdering, håndtering, produksjon og anvendelse av marint råstoff vil bidra til å økt verdiskapning og lønnsomhet innenfor hav- og fiskeindustrien. Marint restråstoff er en ressurs som er i gang med å bli godt utnyttet, men som fortsatt viser stort potensial for økt utnyttelse. Råstoffets høye innhold av verdifulle næringsstoffer og bioaktive komponenter, gjør at det er et attraktivt alternativ innen flere marked.

Målet i denne oppgaven var å fremheve bærekraftig verdiskapning fra marine ressurser, herunder restråstoff. Utnyttelse av marint restråstoff innen produksjonslinjer i Norge og India ble undersøkt og om enzymatisk hydrolyse og fraksjonering av marine peptider kan gi en bedre utnyttelse av peptidenes bioaktive egenskaper. Oppgavens fokus var å fremheve marine peptiders evne til å inhibere ACE-hemmende effekt, og dermed redusere høyt blodtrykk.

Bioaktive peptider kan ha flere gunstige helseeffekter men det har det vist seg å være vanskelig å bekrefte disse, *in vivo*. For at et matprodukt skal få dokumentert helseeffekt og dermed godkjent helsepåstand kreves det at det utført humane intervensjonsstudier. Flere *in vitro* studier indikerer at fiskeproteinhydrolysat (FPH) har ACE-inhiberende effekt. Likevel er det få studier av dyreforsøk som har blitt utgitt og enda færre kliniske studier utført på mennesker. Peptider fra marine kilder anses som mildere og bedre tolererbart av kroppen sammenlignet med syntetiske legemidler. Det så langt ikke er påvist noen bivirkninger ved inntak av naturlige ACE-inhibitorer. Det er likevel et behov for ytterligere kliniske studier for at disse skal kunne brukes til humant konsum.

Det ble tatt utgangspunkt i sildehydrolysat fra sildeoljefabrikken Pelagia i Bodø, fra tre ulike restråstoff-fraksjoner (hode og slo, skinn og bein, samt raffinert fiskeavskjær av Pink perch) fra surimifabrikken Kaiko, India. Informasjon om surimiproduksjon og innhenting av fiskeråstoff er gjort fra egne observasjoner under feltarbeid, spesielt under omvisningen av surimifabrikken Kaiko. Informasjon har også blitt innhentet fra fagpersoner, doktorgradsstudenter som var tilstede under industriworkshop i Mumbai. Metoden Cushman og Cheung (1971) ble benyttet for analysering av % ACEI fiskeproteinhydrolysat av sild, samt i de tre sildfraksjonene etter ultrafiltrering, 150 kDa, cut-off og 4 kDa, cut-off. Metoden ble også brukt for analysering av % ACEI for surimihydrolysat for hode- og slofraksjon. Metoden viste seg til å gi ulike utfordringer under analysering.

Forkortelser

ACE	A ngiotensin I- C onverting E nzyme
ACEI	A ngiotensin I- C onverting E nzyme I nhibition
DH	D egree of H ydrolysis
FPH	F ish P rotein H ydrolysate
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography
SDGs	S ustainable D evelopment G oals
UF	U ltra f iltration

Innhold

1.	Introduksjon	1
1.1	Problemstilling	1
2.	Bakgrunn	2
2.1.	Indisk fiskeri og akvakultur	3
2.2	Surimi	3
2.4	Marint restråstoff	6
2.5	Proteinhydrolyse av marint restråstoff	6
2.5.1	Hydrolyse av marine proteiner og dens bioaktive egenskaper	7
2.6	Membranfiltrering	8
2.7	Hypertensjon.....	10
2.7.1	Renin-angiotensin system (RAS)	10
2.7.2	Spektrofotometrisk metode og egenskapene til ACE.	11
2.7.3	ACE-inhibitorer fra marine peptider som tilskudd i funksjonell mat.	11
2.8	EFSA og helsepåstander	12
2.8.1	Mattrygghet i India	14
2.9	Feltarbeid og kvalitative analyseverktøy	14
3	Material og metode.....	16
3.1	Målprosess	17
3.1.1	Beskrivelse av feltarbeid	18
3.2	Beskrivelse av råstoff	18
	Case 1: Sildehydrolysat fra Pelagia	18
3.2.1	Den ideelle prosessen	21
3.3	Prosess og analyser.....	21
	Case 1: Gjennomføring av prosess og analyser for sildehydrolysat.....	21
3.3.1	Fraksjonering av sildehydrolysat ved ultrafiltrering	23
	Membranfiltrering	23
3.3.2	Frysetørking	24
3.4	Analyser utført på sildehydrolysat, samt fraksjoner.	24
3.4.1	Fett	24
3.4.2	Forberedelse av prøver med av heksan	24
3.4.3	Protein	24
3.4.4	Bestemmelse av ACE-inhibering ved ekstrahering av hippursyre	25
3.4.5	Bestemmelse av ACE-inhibering ved ekstrahering av hippursyre	28
	Formel brukt til å beregne % ACE.....	29
3.4.6	Molvektsfordeling	30
3.5	Case 2: Prosess og analyser for restråstoff fra surimiproduksjon.....	30

3.6	Karakterisering av råstoffet fra Kaiko	31
3.6.1	Vanninnhold	31
3.6.2	N-protein	31
3.6.3	Aske	31
3.6.4	Fett	31
3.6.5	Hydrolyse med og uten enzym	31
3.6.6	Frysetørring av surimihydrolysat.....	33
3.6.7	Protein	33
3.6.8	Bestemmelse av hydrolysegrad	34
3.6.9	Oilbath Digestion.....	34
3.6.10	Trinitrobenzensulfonsyre (TNBS)	34
3.6.11	Molekylvektsfordeling.....	35
3.6.12	Bestemmelse av total aminosyresammensetning i frysetørket hydrolysat for hode og slo.....	35
4.	Resultat og diskusjon	36
4.1	Case 1: Gjennomføring av prosess og analyser for sildehydrolysat	36
4.1.1	Fraksjonering av sildehydrolysat ved ultrafiltrering	36
4.1.3	Bestemmelse av ACE-inhiberende effekt i fraksjoner fra sildehydrolysat.....	37
4.1.4	Oppkonsentrering av ACEI-peptider ved bruk av UF	38
4.1.5	Molvektsfordelingen i sildehydrolysat, samt de ulike fraksjonene.....	39
4.1.6	Bestemmelse av (%) ACEI for torskehodehydrolysat etter metoden Cushman og Cheung (1971).....	40
4.1.7	Ekstrahering av hippursyre med etylacetat	41
4.1.9	Konklusjon og forslag til videre arbeid for case 1.....	43
4.2	Case 2: Prosess og analyser for restråstoff fra surimiproduksjon.....	43
4.2.1	Karakterisering av surimiråstoff	43
4.2.2	ACE- inhiberende aktivitet for restråstoff fra Kaiko, Mumbai	44
4.2.3	Hydrolyseprosessen.....	44
4.2.4	Bestemmelse av hydrolysegrad.....	44
4.2.5	Peptidenes molvektsfordeling	45
4.3	Kvalitative analyseverktøy.....	48
	Observasjoner og fagstoff innhentet under industriworkshop i Mumbai	48
	Observasjoner fra laboratoriearbeid	51
4.2.7	Konklusjon og forslag til videre arbeid for case 2.....	55
	Referanseliste	56
	Vedlegg A: Vaskeprosedyre under membranfiltreringen.....	60
	Vedlegg B: sildehydrolysat.....	61
	Vedlegg C: Resultater fra ACEI-aktivitet	61
	Vedlegg D: Bestemmelse av hydrolysegrad ved TNB.....	68

Vedlegg E: Aminosyresammensetningen i hode og slo.....69

1. Introduksjon

Å sikre god kvalitet på råstoff til konsum innenfor alle deler av verdikjeden, fra hav til marked kan være en utfordring. Økt fokus og kunnskap om kvalitetsvurdering, håndtering, produksjon og anvendelse av marint råstoff vil bidra til å øke verdiskapning og lønnsomhet innenfor hav- og fiskeindustrien. Det produseres store mengder restråstoff fra matindustrien som kan være en potensiell kilde til bioaktive komponenter til humant konsum. Produksjon av næringsmidler-, helsekost-, functional food- og farmasiprodukter tas inn i det globale markedet og drives etter behovet for å løse utfordringer med fokus på helse og livsstil, deriblant livsstilssykdommer som følge av blant annet overvekt. Marint restråstoff inneholder essensielle fettsyrer og proteiner som består av aminosyrer og bioaktive peptider som potensielt kan gi flere gunstige helseeffekter (Richardsen, 2017).

Ifølge Richardsen (2017) kan marint restråstoff defineres som det råstoffet av fisken som ikke er det primære hovedproduktet og utgjør mellom 30 – 70 % av fisken avhengig av type bearbeiding. Det består hovedsakelig av fiskehoder, innvoller og slo, skinn, fiskeskjell og bein (Richardsen, 2017; Bruno *et al.*, 2018).

Marine proteiner fra restråstoff kan utvinnes eksempelvis gjennom enzymatisk hydrolyse. Metoden benyttes for å gjenopprette proteiner fra marint restråstoff slik at de funksjonelle egenskapene og dens bioaktive egenskaper ivaretas. Marine peptider har en balansert aminosyresammensetning i tillegg til en rekke bioaktive egenskaper. Flere studier viser også til at komponenter i råstoffet har flere potensielle helseeffekter som blant annet kan bidra til å senke risikoen for fedmerelaterte sykdommer med tilknytning til hjerte og karsykdommer (Grimsmo, 2015). Det har tidligere blitt vist at marint restråstoff kan ha bioaktive egenskaper som inhiberende effekt av angiotensin-I-konverterende enzym (ACE) i marint restråstoff. Dette inngår i blodtrykksregulering.

1.1 Problemstilling

I denne oppgaven blir det lagt vekt på å fremheve bærekraftig verdiskapning fra marine ressurser, herunder restråstoff. Det vil bli sett på utnyttelse av marint restråstoff innen produksjonslinjer i Norge og India for å undersøke om enzymatisk hydrolyse og fraksjonering av marine peptider kan gi en bedre utnyttelse av peptidenes bioaktive egenskaper. Det ble spesielt lagt fokus på ACE-hemmende effekt, som inngår i blodtrykksregulering. Det ble tatt utgangspunkt i to ulike typer råstoff.

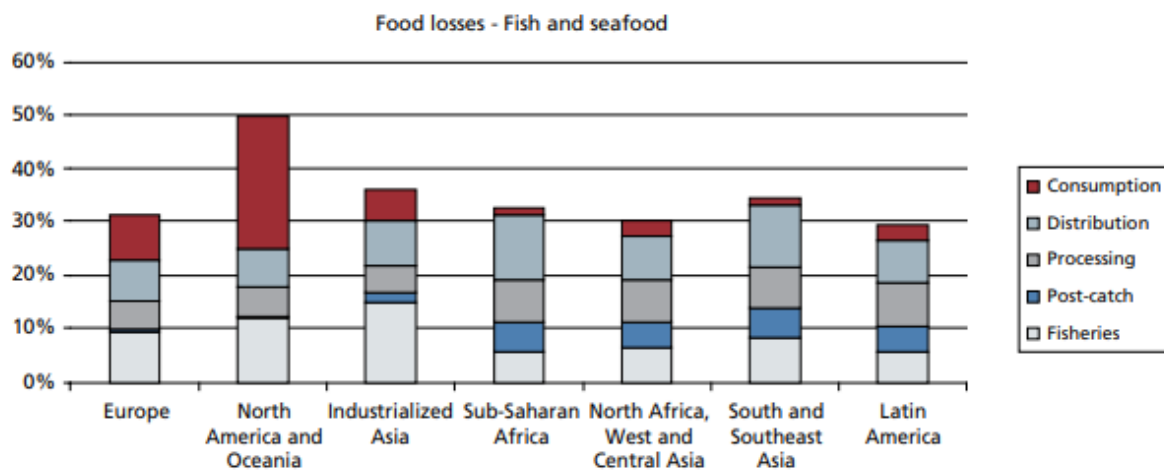
Case 1: Råstoffet som ble undersøkt var sildehydrolysat fra sildoljefabrikken Pelagia i Bodø. Hydrolysatet hadde på forhånd gjennomgått enzymatisk hydrolyse som en del av fabrikkens normale produksjon. Hydrolysatet ble membranfiltrert (150 kDa og 4 kDa) for å videre studere peptidene i ulike fraksjoner. Det ble videre gjort ulike analyser med hensyn til protein, lipid, molekylvektfordeling, tørrstoff og aminosyresammensetning.

Case 2: Hode og slo, skinn og bein, samt raffinert fiskeavskjær av Pink perch, *Nemipterus sp* fra surimifabrikken Kaiko i Mumbai, India ble undersøkt. Dette er restråstoff som oppstår under fabrikkens normale produksjon. Det ble utført enzymatisk hydrolyse samt karakterisering av peptidsammensetning i råstoffet.

2. Bakgrunn

Ifølge «Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)» går omtrent en tredjedel av maten som blir produsert til konsum tapt gjennom matproduksjonskjeden. Dette innebærer alt tapet fra produksjonsnivå til konsumernivå (ca. 1,3 milliarder tonn per år). Samtidig er det ventet en befolkningsøkning til 9 milliarder mennesker frem mot 2050. Dette vil kunne føre med seg store fremtidige utfordringer med tanke på å skaffe nok mat og energi til alle, uten at det går på bekostning av miljøet (FAO *et al.*, 2011). I 2015 vedtok EU og medlemsstatene bærekraftsmål (SDGs) for 2030. SDGs tar for seg blant annet den globale matproduksjonen, der et av målene var å halvere matavfallet per innbygger innen handel og forbrukernivå for 2030. Dette inkluderte også reduksjon av mattap langs produksjonskjeden og forsyningskjeden.

Ifølge analyser gjort av WRI (World Resources Institute) forekommer den største andelen av tapt fisk og sjømatprodukter i industrialiserte regioner. Den største andelen oppstår hos forbruker, der 15 % av det totale mat tapet skjer etter fangst og prosessering som vist i figur 1. Hos utviklingsland skjer høye tap under fiskeri- til distribusjonsleddet, ofte som en kombinasjon av tropiske temperaturer, manglende utstyr og infrastruktur grunnet fravær eller mangel på trygg vannforsyning, strøm, lagringsanlegg inkludert kjøleanlegg og transportanlegg. Dette bidrar til problemer med ivaretagelse av råstoffkvalitet etter fiskefangst (Flanagan *et al.*, 2018; PwC, 2018; Kortversjon Meld. St. 22, 2013; FAO *et al.*, 2011).



Figur 1: Oversikt over tap av sjømat (fisk og sjømat) i de gitte regionene fra ulike steg i matproduksjonskjeden (FAO *et al.*, 2011)

For å kunne gjennomføre bærekraftsmålene 2030 må forskjellene mellom utviklingsland og industriland håndteres. Mye skyldes økt økonomisk avhengighet i utviklingsland, kombinert med begrenset ledelse og styringskapasitet. Samarbeidsprosjektet RE-Food jobber med en integrert tilnærming for å håndtere disse utfordringene med fokus på vedvarende utnyttelse av matressurser for å møte den globale etterspørselen etter mat og føringredienser (Eilertsen *et al.*, 2018; FAO, 2018).

Fokuset til prosjektene er å utvikle den globale bioøkonomien ved å forbedre utnyttelsen av matressursene på en energisparende og klimavennlig måte. Samarbeidet inkluderer CSIR- Central Food Technological Research Institute, Indian Institute of Technology Kharagpur, Amity University and BITS Pilani fra India. Alle partnere bidrar aktivt til forskning, innovasjon og utdanning innen samarbeidsprosjektet. Prosjektet er koordinert

av SINTEF Ocean og inkluderer Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). I 2019 ble Re-food, en årlig industriworkshop holdt i Mumbai. Målet med møtet var å dele kunnskaper innen utdanning og innovasjon, samt forskningsresultater oppnådd gjennom prosjektet (Widell *et al.*, 2019). I workshopen i Mumbai fikk deltakerne mulighet til å besøke surimifabrikken Kaiko. Der det ble vist et innblikk i hvordan surimiproduksjonen fungerer, hvilke typer råstoff som tas i bruk og hvilke utfordringer fabrikken står ovenfor. Re-Value prosjektet ønsker å bidra til å forbedre kjølekjeden for surimifabrikken, samtidig som man ser på løsninger for å konvertere verdiskapende restråstoff og vaskevann til protein og olje som kan tilsettes i mat og fôr.

2.1. Indisk fiskeri og akvakultur

India er et land med en stor populasjon (17 % av verdens befolkning) og har den nest største akvakulturen på global basis (FAO Fisheries, 2011; Flanagan *et al.*, 2018). Indisk fiskeri er også en viktig industri for matproduksjon, da landets kystlinje utgjør 8118 km og bidrar til en stor andel av den globale fiskefangsten (3 599 693 tonn fisk). Dette gjør at India er 3. størst når det kommer til fiskefangst på global basis. Landet har også store områder med innlandsvann (ca. 7 millioner hektar), der det produseres opp mot 10 millioner tonn fisk årlig.

Produksjon av fisk og fiskeprodukter bidrar til å gi næringsmessig og økonomisk trygghet til den indiske befolkningen. India har hatt en kontinuerlig og vedvarende økning i fiskeproduksjon, der fiskerisektoren bidrar til 1,1 % av bruttonasjonalprodukt. Produksjonen er ikke uten problemer, da det forekommer mattap på rundt 30 % som følge av tap etter innhøsting på grunn av mangel på blant annet kuldekjede og riktig matprosesseringsenheter (Widell *et al.*, 2019; Dhillon. *et al.*, 2018).

2.2 Surimi

Surimi er et japansk uttrykk for «vått proteinkonsentrat» og kommer fra vasket, mekanisk avbeinet og hakket fisk (Aguilera og Rademacher, 2004). Proteinproduktet består av for det meste av muskelproteiner som inneholder 70-80 % myofibrillære proteiner (Bruno *et al.*, 2018; Xiong, 2018). For å fjerne bein, fett og de sarkoplasmatiske bestanddelene i fiskemuskel gjennomgår råstoffet flere vasketrinn (Xiong, 2018). Etter raffinering og utvanning er produktutbytte rundt 20% (Aguilera og Rademacher, 2004). Surimi kan beskrives som et mellomprodukt da det vanligvis blir videre bearbeidet til nye produkter som for eksempel imitasjonskjøtt av krabbe eller forskjellige «Kamaboko-produkter» (Xiong, 2018).

Det finnes 7-8 surimifabrikker i India og Kaiko i Mumbai er en av de mindre fabrikkene. Ved anlegget blir fersk fisk vasket, mekanisk avbenet og hakket innimellom vasketrinn før tilsetning av frostbeskyttende midler og innpakning (Widell *et al.*, 2019). To ulike varianter av surimi produseres i fabrikken. Den første er laget som en kombinasjon av ulike fiskearter, hvor de bruker flere ulike varianter av mager og fet fisk som blandes i forskjellige kombinasjoner i produksjonen. Den andre surimivarianten består av en enkel kombinasjon, som vil si at de tar for seg én variant av fiskekjøtt. De ulike artene brukt i fabrikkens produksjon er fremstilt i tabell 1. I denne oppgaven er det restråstoff fra Pink Perch, *Nemipterus sp* som ble benyttet.

Pink Perch er en mager fiskeart som utgjør rundt 4,32 % av fiskefangsten i India. Arten har et også høyt proteininnhold. Etter at surimiindustrien kom til India i 1993 har arten blitt sett på som et viktig råstoff innen surimiproduksjon på grunn av dens mangfold, lave pris og hvite kjøtt (Xiong, 2018)..

Tabell 1: Ulike fiskearter som blir brukt i surimiproduksjonen ved Kaiko, Mumbai (Gupta, 2018).

Fiskeart	Latinsk navn
Pink Perch	<i>Nemipterus sp</i>
Big eye	<i>Priacanthus harmur</i>
Ribbon fish	<i>Iepuracanthus savala/ Trichiurus lepturus</i>
Lizard fish	<i>Saurida sp</i>
Croaker fish	<i>Johnius sp.</i>
Barracuda	<i>Sphyraena sp.</i>
Reef cod	<i>Eplinephelus sp.</i>
Bronze croaker	<i>Otolithoides biauritus</i>
Sardine	<i>Sardinella longiceps</i>
Mamakari	<i>Sardinella brachysoma</i>

Prosessvannet fra surimiproduksjonen har et høyt innhold av organisk materiale som består hovedsakelig av løselige proteiner og enzymer. Innholdet vil variere ut ifra hvilke råmaterialer og volum som brukes i prosessanlegget. Forholdet mellom prosessvann og produkt er derfor en viktig faktor som påvirker det organiske innholdet (Chowdhury, Viraraghavan og Srinivasan, 2010; Shahidi, 2006). På grunn av den høye konsentrasjonen av organisk materiale bør det ikke slippes direkte ut i elver eller sjø uten effektiv behandling, dette for å hindre en negativ innvirkning på miljøet. Hvis produksjonen er lokalisert nær hvor folk bor er prosessvannet nødt til å gå gjennom en filtreringsprosess for å redusere biologisk og fast avfall før vannet kan føres videre til elver. Kostnadene ved behandling av vann er basert på hvor stort innhold av fast stoff og det totale volumet av behandlet vaskevann (Morrissey, Park og Huang, 2000). Ifølge artikkelen «Surimi Processing Waste, Its control and Utilization» av Michael T Morrissey et al. er det målt et relativt høyt proteininnhold i de fleste prosessvann fra surimiproduksjon.

Ifølge Shahidi (2006) (tabell 2) består restråstoffet fra surimiproduksjonen hovedsakelig av enzymer, lipid og protein fra viscera, kollagen og mineraler fra skinn og bein, kollagen fra raffinert avskjær som består av bindevev.

Tabell 2: Restråstoff generert under prosessering av surimi (Shahidi, 2006)

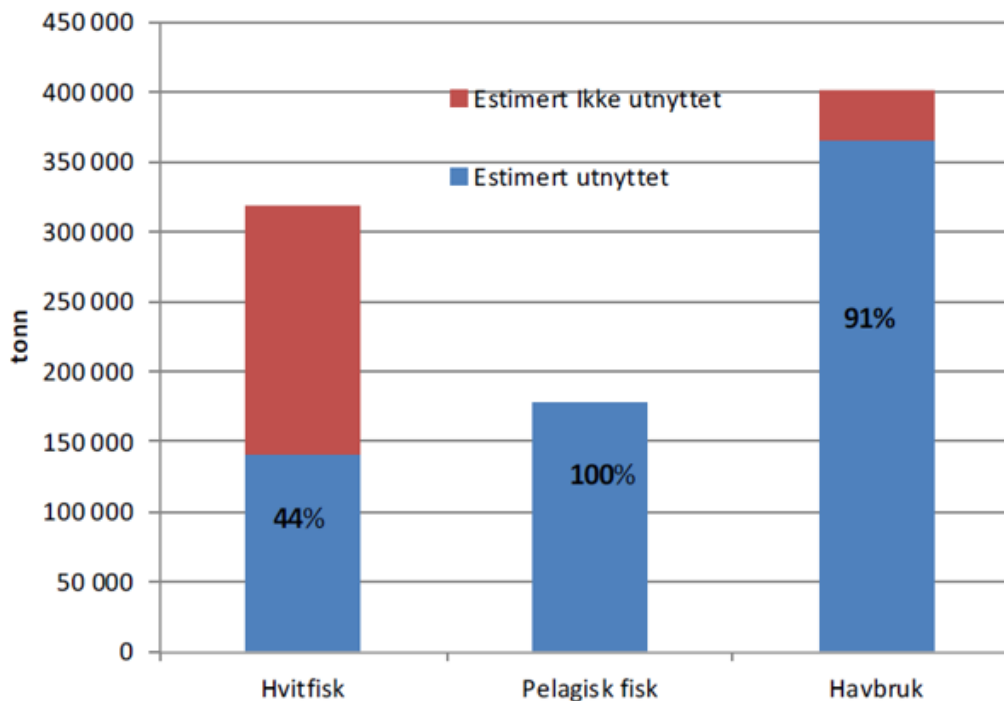
Prosesseringssteg	Prosesseringsprodukter	Andel av fisk (%)	Verdifulle komponenter
Sløyting	Viscera	15-30 %	Enzymer, lipid, protein
Hodeavkapping	Hode	14-20	Mineraler
Filetering	Filet-avskjær	17	Protein, mineral
Hakking	Skinn/bein	8-10	Kollagen, mineral
Vasking	Prosessvann	14-16	Løselige proteiner, enzymer
Raffinering	Bindevev	4-8	Kollagen

Surimifabrikken Kaiko produserer ca. 900 tonn restråstoff per år. Mesteparten av restråstoffet går til fiskemelfabrikk eller blir kastet (Naik, 2019; Widell et al., 2019). Proteinene fra prosessvannet har et stort potensial for verdiøkning hvis de kan oppkonsentreres ved bruk av fraksjonering (membranfiltrering) (Afonso og Borquez, 2002; Singh og Heldman, 2014).

2.3 Norsk vårgytende sild (NVG-sild)

Som en av verdens fremste sjømatnasjoner er Norge den nest største globale eksportøren for fisk og fiskeprodukter. Industrien har utviklet seg til å bli den største akvakulturprodusenten av laks, samtidig som det opprettholdes store fiskeflåter for fangst av sild, makrell, torsk og andre arter av hvitfisk og pelagisk fisk (FAO, 2018). Sild en viktig ingrediens i den globale fôrindustrien gjennom produksjon av sildemel- og olje og selges som ulike filetprodukter eller rundfrys, alt etter hva markedet etterspør (Nilssen og Elvestad, 2019).

Bestanden av NVG-sild utgjør grunnlaget for norsk vintersild, småsild og feitsild (Sildesalgslag, 2019). Sammen med lodde, kolmule og makrell representerer de restråstoffgrunnlaget innenfor den pelagiske sektoren, der silda utgjør mesteparten (Richardson, 2017). Pelagisk fisk er kjent for å ha en kjemisk sammensetning som varierer med årstiden. Dette henger sammen med fiskens vandringsmønster og gyting spesielt når det gjelder tilgang på fett og protein. Dette bekreftes også i Sintef-rapporten om kvalitet om pelagisk fisk, hvor det ble funnet signifikante høyere verdier av fett i de første månedene av året (Falch, Aursand og Digre, 2006). I følge statistisk sentralbyrå for fiskeri ble det i 2018 fisket 498 041 tonn sild i Norge (SSB, 2018). Hvis man sammenligner tallene på utnyttet restråstoff fra 2017, indikerer dette at utnyttelsen av restråstoff har vært lik 100 % de siste 5 årene ifølge analysene til fangst- og produksjonsstatistikk fra fiskesalgslagene (Ocean, 2018). Dette forholdet bekreftes også i Richardson (2017) som vist i figur 2.



Figur 2: Utnyttelsesgrad av restråstoff fordelt for de ulike fiskerisektorene i 2016 (Richardson, 2017).

2.4 Marint restråstoff

Marine arter er en begrenset ressurs og må bevares på en bærekraftig måte. Det er derfor et økt behov for å optimalisere utnyttelsen av råstoffet. Som nevnt innledningsvis er restråstoff det man sitter igjen med etter at fisken er filetert, som vil si alt utenom det «primære» produktet etter anvendelse av marint råstoff (Richardsen, 2017). Marint restråstoff er en ressurs som er i gang med å bli godt utnyttet Norge. Råstoffets innhold av verdifulle næringsstoffer og bioaktive komponenter, gjør at det er et attraktivt alternativ innen flere markeder (Richardsen, 2017). Marint restråstoff blir også sett på som en ny kilde til ulike næringsstoffer grunnet bedre teknologi og produksjonsanlegg som ivaretar kvaliteten på råstoffet på en mer effektiv måte. Til sammen utnyttes ca. 650 000 tonn marint restråstoff per år i Norge. Likevel er det fortsatt et stort utnyttelsespotensial, spesielt innenfor hvitfisksektoren, der 56 % av restråstoffet i 2016 ikke ble benyttet, som vist over i figur 2 (Ocean, 2018; Richardsen, 2017; Stevens *et al.*, 2018).

Det er viktig å kunne skille mellom restråstoff og biprodukt da, disse produktene behandles under forskjellige regelverk og benyttes til ulike formål. Produkter som benyttes til humant konsum eller selges som fôringsredienser behandles etter hygieneregelverket, og går under benevnelsen restråstoff. Restråstoff kan deles inn i ulike grupper ut fra opprinnelse og videre håndtering. Opprinnelse og håndtering har betydning i forhold til hvordan råstoffet kan tas i bruk. Hvis råstoffet håndteres etter hygieneregelverket kan det benyttes til humant konsum eller selges videre til fôrindustrien. Biprodukt er råstoff som ikke kan benyttes til humant konsum og håndteres etter biproduktregelverket. Det kan deles inn i to ulike kategorier (kategori II og III). Kategori II omfatter dyr fra akvakultur og er hovedsakelig av fisk som er syk, død eller i andre sjeldne tilfeller inneholder for store mengder av medisiner eller kjemikalier fra oppdrettsanlegg. Kategori III utgjør slaktet fisk som var ment for humant konsum, men som av ulike grunner ikke ble benyttet til det. Da kan råstoffet benyttes i ensilering og i fiskemelproduksjon (Richardsen, 2017).

I 2010 ble det generert over 350 000 tonn restråstoff fra pelagisk industri, det meste i form av restråstoff fra filetering av sild. Restråstoff inneholder proteiner som kan hydrolyseres, separeres, oppkonsentreres og tørkes. Andelen sild som blir filetert har hatt en økning fra 30 til 50 % fra 2003 til 2010, og ifølge Grimsmo (2015) og Toldnes (2012) forventes det en ytterligere økning i årene fremover. Restråstoff fra sild har et høyt næringsinnhold med betydelige mengder protein og lipider. Dette bidrar til å gjøre råstoffet mer attraktivt siden det kan ses på som en potensiell proteinkilde (Toldnes, 2012; Grimsmo, 2015).

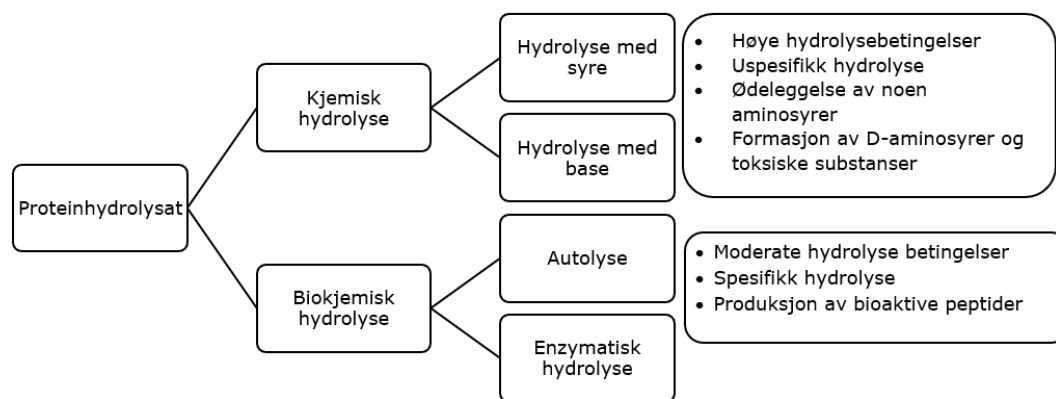
2.5 Proteinhydrolyse av marint restråstoff

Marint restråstoff inneholder verdifulle komponenter som blant annet flerumettede fettsyrer (omega-6, omega-3), fosfolipider, vannløselige vitaminer og andre bioaktive komponenter. Det inneholder også verdifulle proteiner og essensielle aminosyrer som kan bli brukt til nye verdiskapende produkter. Marint restråstoff er en rik proteinkilde, der enzymatisk hydrolyse kan separere ut olje, fiskesediment og vannfasen ved bruk av ulike enhetsoperasjoner og teknologier. Dette inkluderer høy temperatur, trykk, fordamping og tørking. Disse trinnene er viktig for å unngå forringelse av råstoffet forårsaket av endogene enzymer eller lipidoksidasjon.

Hydrolyse er en bred definisjon og kan formuleres som «et stoff som reagerer med vann» (Brady, 2004). Prosessen omfatter alle næringsstoffene (peptider, aminosyrer, karbohydrater, lipider og mineraler) som er tilstede under hydrolyseprosessen.

Næringsstoffene kan være en del av substratet eller i løsningen sammen med enzymet og proteinet. Et proteinhydrolysat blir ofte karakterisert etter graden av hydrolyse, som vil si i hvor stor grad proteinet er spaltet. Graden av hydrolyse måles ved antall peptidbindinger som har blitt spaltet, og deles med totalt antall peptidbindinger som multipliseres med 100 (Pasupuleti og Demain, 2010). I en industriell sammenheng er kjemisk og biologisk hydrolyse de mest brukte prosessene. Det finnes likevel få hydrolyserte fiskeprodukter på markedet i dag med unntak av en del østasiatiske krydder og sauser (Rasco, 2000).

En hydrolyseprosess kan deles inn i kjemisk- og biokjemisk hydrolyse som vist i figur 3. Kjemisk hydrolyse involverer bruk av syrer eller alkaliske stoffer og blir sett på som mindre kostbart og vanskeligere å kontrollere sammenlignet med enzymatisk hydrolyse. Biokjemiske prosesser inkluderer autolyse og enzymatisk hydrolyse (Zamora-Sillero, Gharsallaoui og Prentice, 2018; Kim *et al.*, 2016a)



Figur 3: Ulike metoder for produksjon av proteinhydrolysat (Zamora-Sillero, Gharsallaoui og Prentice, 2018).

Ved bruk av kommersielle enzymer kan proteiner fra råstoffet utnyttes til ulik industriell produksjon for dannelse av flere produkter innenfor matindustrien (Rasco, 2000). Flere forfattere har gjort studier om oppkonsentrering av proteiner og dens løselighet ved bruk av enzymatisk hydrolyse over de 60 siste årene (Aspmo, Horn og Eijsink, 2005). Som Christensen (1935) demonstrerte i sitt arbeid med denaturering og proteolyse, er ikke hydrolyseproduktet bare avhengig av substratets og enzymets sammensetning, men det avhenger også av pH, temperatur og konsentrasjon av substrat og enzym. Hans resultat pekte på hvilke muligheter man har for å kontrollere utfallet i proteinhydrolysatet ved å endre på hydrolysens parametere. Ved bruk av enzymatisk hydrolyse kan man gjøre hydrolyseprosessen mer kontrollerbar da man bestemmer hvilken type og mengde proteaser man tilsetter, hydrolysetid og hydrolysetemperatur, samt mengde tilsatt vann (Grimsmo, 2015; Adler-Nissen, 1976).

2.5.1 Hydrolyse av marine proteiner og dens bioaktive egenskaper

Fiskeproteinhydrolysat (FPH) kan ifølge Abejón *et al.* (2018) defineres som et produkt fra en kjemisk eller enzymatisk hydrolyseprosess som hovedsakelig bryter peptidbindinger i proteinene fra fisk, som dermed spaltes til kortere peptider eller aminosyrer (Abejón *et al.*, 2018). Fra denne prosessen frem til FPH har man andre fraksjoner som separeres slik som sedimenter (uløselige proteiner, lipider evt. bein) og fiskolje. Disse som utgjør hovedfraksjonene etter enzymatisk hydrolyse. FPH har en balansert aminosyresammensetning i tillegg til en rekke bioaktive peptider. Bioaktive peptider

beskrives ofte som proteinmolekyler med mindre enn 20 aminosyrer og utøver ingen fysiologisk aktivitet når de representerer polypeptidsekvensen i proteinmolekylet. Ved frigjøring fra proteinmolekylet, som forekommer gjennom enzymatisk hydrolyse vil peptidet bli fysiologisk aktivt eller bioaktivt. Flere studier viser til at bioaktive peptider i FPH kan gi lavere blodkolesterol, bedre nyrefunksjon og bidra til å senke risiko for fedmerelaterte sykdommer med tilknytning til hjerte/karsykdommer. Fiskeprotein kan derfor ses på som en gunstig kilde som potensielt kan bidra til helsefremmende effekt (Chew, Toh og Ismail, 2019; Grimsmo, 2015).

FPH består av vannløselige komponenter, sedimenter (uløselige proteiner, lipider evt bein) og fiskeolje er hovedfraksjoner etter enzymatisk hydrolyse (Grimsmo, 2015). Peptidenes bioaktivitet er ofte av stor betydning og påvirkes av hydrolysetiden. Jo lengre hydrolysetid, desto mer vil peptidene bli spaltet (høy hydrolysegrad). Som vil si størrelsen og aminosammensetningen til peptidene (Marciniak *et al.*, 2018). I tillegg er parameterne pH og temperatur viktig for å kunne optimalisere enzymaktiviteten. Det er flere typer proteolytiske enzymer som kan benyttes og som kan bidra til å tilegne råstoffet verdi gjennom funksjonelle, biologiske og næringsmessige egenskaper. Eksempler på kommersielle enzymer brukt for å hydrolysere biprodukter er alkalase, papain, pepsin, trypsin og neutrase. Enzymene kan bryte ned proteinene til peptider som til slutt inneholder mellom 2 til 20 aminosyrer (Zamora-Sillero, Gharsallaoui og Prentice, 2018).

2.6 Membranfiltrering

Membranteknologi har i løpet av de siste ti-årene blitt en viktig separasjonsteknikk og har gode bruksområder, spesielt innenfor matproduksjon. Dette henger først og fremst sammen med at metoden ikke behøver noen form for kjemikalier, i tillegg er teknologien både energisparende og har lave kostnader (Hayes, 2018). Membranfiltrering kan defineres som et lukket system som separerer substanser etter ulik størrelse ved bruk av en semipermeabel membran. Væsken blir separert ved bruk av hydrostatisk trykk over membranen, der blant annet membranens porestørrelse vil påvirke distribusjonen av væsken (Singh og Heldman, 2014). Membranteknologi benyttes innenfor sjømatindustrien der det blant annet brukes til å oppkonsentrere, rense og fraksjonere molekyler fra prosessvann eller fra restråstoff av marine prosesseringsanlegg (Bourseau *et al.*, 2009). Industrien produserer store mengder prosessvann som inneholder organisk materiale bestående av blant annet lipider, kitin, karotenoider og proteiner. Flere studier viser at bruken av membranteknologi kan bidra til å gjenopprette disse komponentene (Bruno *et al.*, 2018). Ifølge artikkelen Pezeshk *et al.* (2018) kan ultrafiltrering (UF) og nanofiltrering (NF) benyttes til å opprettholde fraksjoner med biologisk aktivitet, der membransystemet viser potensial til å gjenvinne ACE-hemmende effekt fra proteinhydrolysat av restråstoff av arten *Tilapia* (Pezeshk *et al.*, 2018).

De fleste kommersielle membraner fremstiller av organiske polymerer (polysulfoner og polyamider) og uorganiske materialer, som keramiske membraner (basert på oksider, av zirkonium, titan, silisium og aluminium). Porestørrelsen er med på å skille de ulike membranene fra hverandre, og er avgjørende for hvilken partikkelstørrelse de kan separere (mikrometer, μm). Den molekylære vekt cutoff (MWCO) (kilo Daltons), er et ytelsesrelatert parameter, og kan defineres som den nedre grensen for oppløst molekylvekt med en avvisning på 95-98 % (Muro, Riera og del Carmen Díaz, 2012). Væskegjennomstrømningen (fluxen) spiller også inn for hvilke partikler som blir avvist av eller transportert gjennom membranen og er derfor med på å avgjøre hva som blir retentat (partikler som blir avvist av membranen) og permeat (partikler som trenger seg

gjennom membranen). Den faktiske membranyttelsen er derfor et samspill mellom membranfunksjonene og prosessforholdene i membransystemet. Innen membran-teknologi er NF, mikrofiltrering (MF), UF og revers osmose metoder som ofte blir brukt innenfor sjømaindustrien. (Hayes, 2018; Nazir *et al.*, 2019). Partikkelstørrelsen i ulike membranstrukturer er vist i figur 4.

Membrane technology	Reverse osmosis	Nano-filtration	Ultrafiltration	Microfiltration	Particle filtration		
Examples	Metal ions Aqueous salts Flavours		Viruses Gelatin Egg albumin	Plant pigments Bacteria	Yeast cell Milled flour	<i>Giardia</i> cyst	
Microns (log scale)	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000
Approx. molecular weight	200	20 000	200 000				

Figur 4: Oversikt over de ulike membransystemene og deres evne til å separere ulike molekyler etter størrelse (Fellow, 2017)

Tettheten (porestørrelsen) i membranen påvirker retensjonen i løsningen som nevnt tidligere, spesielt når man benytter ultrafiltrering og mikrofiltrering. UF (MWCO 20-150 kD) holder tilbake store molekyler som fett, pigmenter, sukker, organiske mikropartikler og store proteiner i retentat som vist i figur 4, og har en avvisningsgrad på 95-100 % for høy-molevekt og 0-10 % av lav-molekylærvækt (Singh og Heldman, 2014; Fellow, 2017).

En utfordring med utnyttelse av marine bioaktive peptider er å få oppkonsentrert ønsket bioaktivitet etter enzymatisk hydrolyse. UF kan være en potensiell effektiv måte å oppkonsentrere peptidenes bioaktivitet på. I denne sammenheng fokuseres det ofte på peptidenes størrelse, ladning og hydrofobisitet, avhengig av anvendelsesområde. Ultrafiltrering kan benyttes til å kontrollere og separere peptider ut ifra definerte størrelser på membranen (MWCO). Membrantrykket og peptidinnholdet, kan også fungere som komplementære eller antagonistiske faktorer. Membrantrykket kan derfor justeres i fordel med peptidenes MWCO (Chabeaud *et al.*, 2009). På denne måten bidrar UF til å oppkonsentrere peptider med ønskede funksjoner. ACEI-peptider har relativt lav MW, og består generelt av dipeptider og pentapeptider med MW 150 – 800 Da. Med tanke på dens lave molekylære masse vil UF være en gunstig metode for å fraksjonere

og oppkonsentrere peptidene med denne størrelsesordenen med hensyn til ACEI (Pan *et al.*, 2012; Udenigwe og Aluko, 2012). Membranteknologi kan potensielt være en effektiv måte for å oppkonsentrere, rense og fraksjonere verdifulle peptider fra marint restråstoff. Fraksjonerte peptider fra marine proteiner viser potensial i å forhindre dannelsen av høyt blodtrykk (hypertensjon) da flere FPH har dokumentert innhold av ACEI-peptider.

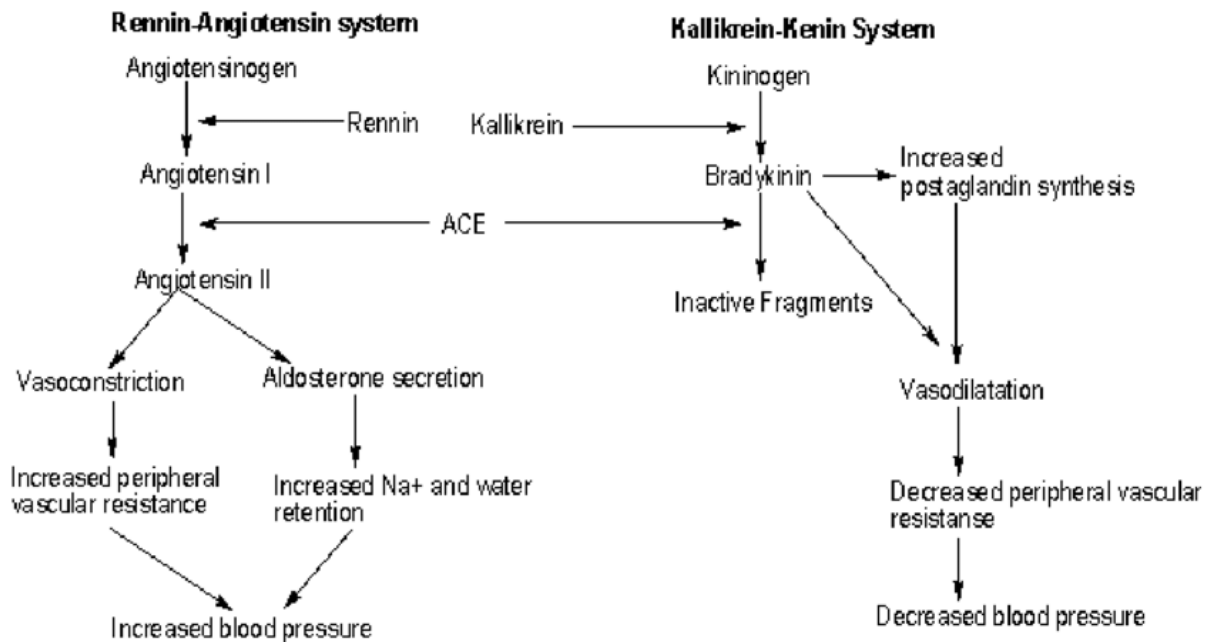
2.7 Hypertensjon

I følge Helsedirektoratet (2008) kan hypertensjon eller høyt blodtrykk defineres som blodtrykk ≥ 140 mm Hg systolisk og/eller ≥ 90 mm Hg diastolisk ved gjentatte målinger under standardiserte forhold (Börjesson, Kjeldsen og Dahlöf, 2008). Utbredelsen av hypertensjon øker med alderen til det punktet hvor mer enn halvparten av befolkningen fra 60 til 69 år, og omtrent tre fjerdedeler av de som er 70 år og eldre blir rammet. Økt risiko for høyt blodtrykk er tilstede i alle aldersgrupper fra 40 til 89 år. For hver 20 mm Hg systolisk eller 10 mm Hg diastolisk økning i BN, er det en dobling av dødelighet fra både iskemisk hjertesykdom og hjerneslag (Chobanian *et al.*, 2003).

Flere studier viser at høyere blodtrykk kan assosieres med økt risiko for kardiovaskulære sykdommer (Vasan *et al.*, 2001). Høyt blodtrykk blir sett på som en av de større uavhengige faktorene for kardiovaskulære sykdommer og er et alvorlig helseproblem da 20 % av verdens befolkning lider av høyt blodtrykk (Wijesekara og Kim, 2010). Ifølge studien til Stephen S. Lim *et al.* (2012) ble også høyt blodtrykk målt til å være den ledende risikofaktoren for globale sykdommer i 2010.

2.7.1 Renin-angiotensin system (RAS)

Renin-angiotensin system (RAS) er et hormonsystem som regulerer både blodtrykk og væskebalansen i kroppen og ses som den viktigste regulatoren for aldosteronsekresjon (Wong, 2016). Når blodtrykket synker frigjøres det proteinspaltende enzymet renin i blodet som omdanner angiotensinogen til angiotensin I. Det finnes flere former av angiotensin der de viktigste er angiotensin I (decapeptid) og angiotensin II (oktapeptid) (Lima, 1999). Angiotensin I (inaktiv) omdannes til angiotensin II (aktivt) av det proteinspaltende enzymet angiotensin konverterende enzym (ACE). Konverteringen stimulerer til vasokonstriksjon av blodårene (arteriolene trekker seg sammen) og gir økt blodtrykk (Kumar *et al.*, 2010). Angiotensin II-produksjonen bestemmes ut fra hvor mye renin som blir frigjort (Sand *et al.*, 2006).



Figur 5: Rollen til Angiotensin konverterende enzym (ACE) i regulering av blodtrykk. (Kumar et al., 2010)

ACE inhibitorer er en av de mest aktive klassene av molekyler som bidrar til å redusere blodtrykket (Lima, 1999). Dette skjer ved å avbryte RAS som forhindrer omdannelsen fra Angiotensin I til Angiotensin II. Det bidrar også til å øke plasmanivåene av bradykinin, som har vasodilatoriske og vevsbeskyttende egenskaper og ses på som et nyttig verktøy til forebygging av kardiovaskulære sykdommer (Sentandreu og Toldrá, 2006).

2.7.2 Spektrofotometrisk metode og egenskapene til ACE.

En sensitiv spektrofotometrisk metode for analyse av ACE måler produksjonshastigheten av hippurinsyre fra hippuryl-L-histidyl-L-leucin (HHL). ACE fra kaninlunge acetonpulverekstrakt når sin optimale aktivitet ved pH 8.1 – 8.3 i nærvær av 300mM klorid-ioner og 5- 10 mM HHL. Under standardiserte analyseforhold defineres 1 enhet ACEI som mengden som katalyserer dannelse av 1 μmol hippurinsyre fra HHL i 1 min ved 37°C. I studien ble et stort antall standard enzym-inhibitorer (chelateringsmidler, tiolforbindelser, tungmetall ioner og peptider) med ulike virkningsmekanismer testet for inhiberingsaktivitet for ACE ved konsentrasjoner fra 0.1 – 1000 μM . De mest effektive inhibitorene som ble målt på aktiviteten til ACE på HHL var peptider. (Cushman og Cheung, 1971).

2.7.3 ACE-inhibitorer fra marine peptider som tilskudd i funksjonell mat.

Hos fysisk aktive personer med høyt blodtrykk er syntetiske ACE-inhibitorer et medisinsk alternativ som senker blodtrykket etter aktivitet (Börjesson, Kjeldsen og Dahlöf, 2008). Medikamenter som captopril, enalapril og benazepril har lenge blitt klinisk brukt for å forhindre eller behandle hypertensjon. Det antas likevel at syntetiske inhibitorer har bivirkninger som hoste, nedsatt nyrefunksjon, angioødem og utslett, noe som har medført økt interesse for å finne ikke-toksiske og sikrere ACE inhibitorer (Jensen *et al.*, 2014).

Flere *in vitro* studier indikerer at fiskeproteinhydrolysat (FPH) har ACE-inhiberende effekt. Likevel er det få studier av dyreforsøk som har blitt utgitt og enda færre kliniske studier utført på mennesker (Jensen *et al.*, 2014). Peptider fra marine kilder anses som mildere og bedre tolererbart av kroppen sammenlignet med syntetiske legemidler. Det så langt

ikke er påvist noen bivirkninger ved inntak av naturlige ACE-inhibitorer. Det er likevel et behov for ytterligere kliniske studier for at disse skal kunne brukes til humant konsum (Wijesekara og Kim, 2010). I tillegg til dette er det flere utfordringer som man må ta hensyn til, både regulatoriske aspekter og det fremtidige markedet må vurderes før eventuelle ACE-inhibitorer kan implementeres i matprodukter.

Utvinning og rensing av marine peptider kan gjøres ved bruk av enzymatisk hydrolyse for å hente frem de ønskede egenskapene fra råstoffet, som i dette tilfellet er ACE-inhiberende effekt. I en studie av Bougatef, N. et al. (2008), ble proteinhydrolyse av sardiner utført med hensyn til fem ulike proteolytiske enzymer. FPH viste seg å ha betydelige høyere nivå av ACE-inhiberende effekt sammenlignet med ubehandlet restråstoff fra sardiner. Den høyeste målte ACE-verdien kom fra hydrolysert viscera-råstoff, behandlet med alkalase ($63,2 \pm 1,5$ % ved 2 mg/ml). Bougatef, N. et al. (2008), konkluderte med at hydrolysert restråstoff, i denne sammenhengen fra sardiner, potensielt kan utnyttes til å utvikle funksjonell mat med mål om å redusere høyt blodtrykk. Det understrekes at videre arbeid er nødvendig for å dokumentere ACE-inhibering *in vivo* (Bougatef et al., 2008)

Det finnes fremdeles flere utfordringer rundt enzymatisk hydrolyse som prosess, og i sammenheng med utvinning av bioaktive peptider. En av utfordringene knyttet til markedet er bittersmak på FPH. Dette skyldes peptidenes moderate hydrofobiske aminosyrer og dens lave hydrolysegrad. Dannelse av bitter smak er et kjent problem som påvirker den sensoriske aksepten til hydrolysatet og gjør det derfor utfordrende å få implementert produktet inn i markedet (Rustad, Storrø og Slizyte, 2011). Spesielt FPH med endopeptidaser oppleves som bitre. Peptidene med høyt innhold av hydrofobiske aminosyrer oppleves som bitrere enn hydrolysat med høyt innhold av frie aminosyrer. I følge Nilsang et al. (2005) har flere forsøk blitt gjort for å redusere bitterheten gjennom å kontrollere graden av hydrolyse. Aminosyrene som bidrar til den bitre smaken er valin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, leucin og tyrosin (Nilsang et al., 2005). Et av kriteriene for at FPH skal kunne benyttes som matsupplement vil derfor være å redusere bittersmak.

Et annet viktig aspekt som inngår under regulatoriske krav er hygienisk håndtering av råstoff. Kvaliteten til råstoffet og opprettholdelse av kvalitet til restråstoff er en viktig forutsetning for effektiv utnyttelse av marint restråstoff. Råstoffkvalitet avgjør hvordan restråstoffet kan utnyttes videre.

2.8 EFSA og helsepåstander

EU-kommisjonen (EC) definerer funksjonell mat som matprodukter med gunstige funksjoner på menneskers helse, i tillegg til grunnleggende næringseffekter ved konsum av matproduktet (Chalamaiah et al., 2019). En økt mengde matprodukter i EU bærer såkalte nærings- og helsepåstander. I følge EC er en næringspåstand enhver påstand som antyder at et matprodukt har gode næringsegenskaper som for eksempel: «lite fett», «høyt fiberinnhold» (EC). En helsepåstand er en uttalelse om en helsemessig effekt av et næringsmiddel, eller et stoff som finnes i et næringsmiddel og hvordan det kan påvirke kroppen. Uttalelsen brukes på etikker, i markedsføring eller i reklame og formidler at helsemessige fordeler kan oppstå ved konsum av gitte matprodukter eller fra dens komponenter som vitaminer, mineraler, fibre og probiotiske bakterier (EFSA; Chalamaiah et al., 2019).

For at et matprodukt skal få dokumentert helseeffekt og dermed godkjent helsepåstand kreves det at det har blitt utført humane intervensjonsstudier. Likevel om bioaktive peptider kan ha flere gunstige helseeffekter, har de vist seg å være vanskelig å bekrefte *in vivo*. For at et peptid skal utøve sin bioaktivitet på et målorgan, må det ha et stabilt kjemisk komposisjon, være av rett konsentrasjon og må kunne absorberes av målorganet (Rønning *et al.*, 2016)

Det globale markedet for bioaktive peptider som funksjonell mat, inkludert nutraceuticals eller bioaktive ingredienser har steget jevnt, grunnet økt interesse fra forbrukerne og deres forståelse om positiv sammenheng mellom bioaktive peptider og helsefremmende effekt. Globalt er det flere land som har utviklet regulatoriske rammeverk for å beskytte forbrukerne mot risiko og misvisende påstander relatert til funksjonell mat. For å kunne få godkjent helsepåstand er vitenskapelig forskning og dokumentasjon for fysiologisk effekt og sikkerhet for helse viktige aspekter og er avgjørende for godkjenning av helsepåstander. Data fra *in vitro* studier og dyreforsøk er alene ikke tilstrekkelig for å hevde helsemessige fordeler av bioaktive peptider. Det kreves også betydelige bevis fra humane studier (Chalamaiah *et al.*, 2019).

«European Food Safety Authority» (EFSA) er et europeisk byrå, finansiert av EU som opererer uavhengig av de utøvende institusjonene (kommisjon, råd og parlament) og EU-medlemstater. EFSA er ansvarlig for å godkjenne de vitenskapelige helsepåstandene som sendes inn av selskaper som ønsker godkjenning i EU. Hovedmålet til EFSA gitt i forordning (EF) nr. 1924/2006 om ernærings- og helsepåstander til matprodukter er å sikre et høyt beskyttelsesnivå hos forbruker, gi rettferdig konkurranse innen næringsmiddelindustrien, sørge for et effektivt fungerende indre marked og å verne om innovasjoner (Asp og Bryngelsson, 2008). Etter implementering av forordning (EF) nr. 1924/2006 har bruken av helsepåstander for matprodukter i Europa blitt strengere regulert. EFSA's forskningspanel for ernæring, diettprodukter og allergier har gitt retningslinjer til produsenter og leverandører av nutraceuticals og funksjonelle matvarer om hvordan man kan gå frem for å få godkjent helsepåstand på sine produkter. Selv om evalueringen av helsepåstandene er gunstig for forbrukernes sikkerhet, har reguleringen ifølge Gevaert *et al.* (2016) medført svært lav godkjennelsesprosent blant søkerne grunnet strenge krav, som vist i tabell 2 (Gevaert *et al.*, 2016).

Etter publisering av EU-forordning 432/2012 (EU, 2012) må søknader for helsepåstander gjøres med hensyn til fire artikler, avhengig av hvilken type helsepåstander det gjelder. Søknader må enten gjøres via kategori 13.1 som gjelder generelle funksjonskrav, eller 13.5 som gjelder krav basert på nyutviklet vitenskapelig bevis, artikkel 14.1a krav som gjelder reduksjon for sykdomsrisiko eller via 14.1b som gjelder helsepåstander for barns helse og utvikling. De ulike kategoriene blir vist i tabell 3. Hvor lang tid det tar for at en påstand skal bli godkjent varierer, avhengig av flere punkter (Sadler og Arens, 2015).

Tabell 3: Oversikt over EU-forordning 432/2012 (EU,2012) godkjente og ikke-godkjente helsepåstander i EU fordelt i de gitte kategoriene (Sadler og Arens, 2015)

Kategori	Godkjent	Ikke godkjent
13.1 «Generelle funksjonskrav»	229	1874
13. 5 Krav basert på nyutviklet vitenskapelig bevismateriale	1	84
13.5 Krav basert på proprietære data	4	0
14.1(a) Reduksjon av sykdomsrisiko	14	20
14.1(b) Påstander om barns utvikling og helse	11	36

Som nevnt tidligere må søknad om helsepåstander tas gjennom EFSA-NDA for evaluering i henhold til forordning (EF) nr. 1924/2006. Dette må gjøres før noen helsepåstand kan benyttes som et nutraceutical eller funksjonell mat. Beslutningen om produktet anses som trygt blir gjort etter at EU-kommisjonen har spurt EFSA-NDA om en vitenskapelig uttalelse om sikkerheten til produktet(Gevaert *et al.*, 2016).

2.8.1 Mattrygghet i India

Helseorganisasjonen «World Health Organization» definerer mattrygghet som å begrense tilstedeværelse av farer, enten kronisk eller akutt, som kan gjøre mat skadelig for forbrukerens helse. Mattrygghet handler om å produsere, håndtere, lagre og preparere mat på en slik måte at man forhindrer infeksjon og forurensning i næringsmiddelkjeden og for å sikre at matkvalitet og næringsverdien opprettholdes for å fremme god helse(WHO, 2015). Å kunne gi trygg mat til forbrukere er et av de større bekymringene i et stadig voksende globalt marked. En betydelig drivkraft for å opplyse om mattrygghet er risikoen for matbårne patogener og kjemikalier, som i høy grad bidrar til matbårne sykdommer. Virkningene av matbåren sykdom er ofte knyttet til forurenset mat og forekommer hyppig i de fleste utviklingsland. Matbårne sykdommer kan skade handel og turisme, og vil føre til tap av fortjeneste, arbeidsledighet og rettsaker i det gjeldende landet (Shukla, Shankar og Singh, 2014). FAOs retningslinjer (FAO, 2003) bygger på å styrke nasjonale matkontrollsystem der fokuset ligger på myndighetene og de som er ansvarlige for regulering av matkontroll. Modellen baseres på seks elementer: matkontrollstyring, kvalitetsinformasjon, utdanning og kommunikasjon. Rundt 1990 implementerte flere land, samt EU HACCP-systemet i deres nasjonale matkontrollsystem(Shukla, Shankar og Singh, 2014).

2.9 Feltarbeid og kvalitative analyseverktøy

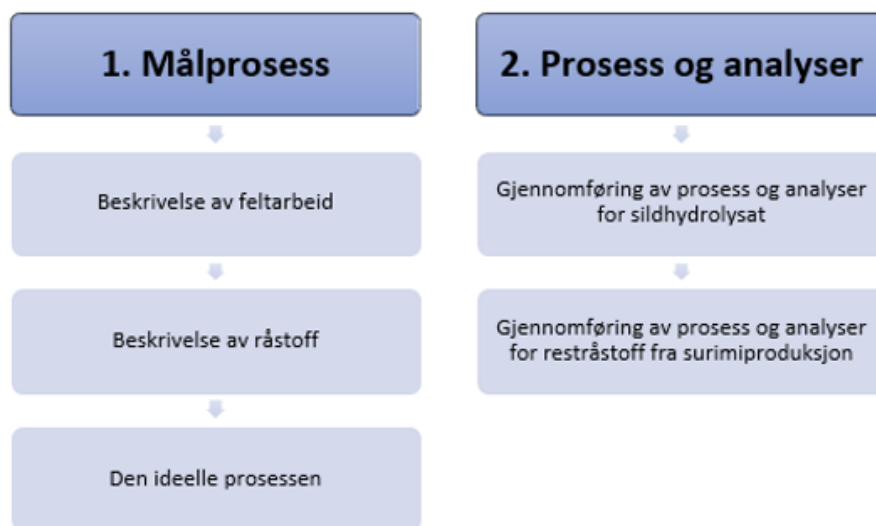
Kvalitativ forskning innebærer mange forskjellige datainnsamlingsmetoder og er preget av følsomhet, der egen tolkning og forståelse ligger til grunn for forskningen. Man er ofte tett på de som deltar og de som blir observert, noe som kan medføre ulike utfordringer, også med tanke på etiske prinsipper. Problemstillingen kan ofte endres og utvikles underveis alt ettersom hvilket datamateriale man samler inn(Tjora, 2017; Fangen, 2015).

En av de brukte datainnsamlingsmetodene er observasjonsstudier. Det er en betegnelse som omfatter en ren observasjon og kan utgå i ulike former for interaksjon. Dette innebærer både *deltagende-* og *ikke-deltagende observasjoner*. *Deltagende observasjon* er en betegnelse som ofte benyttes i sammenheng med feltarbeid, der forskeren deltar på samme tid som det gjøres observasjoner. Observatøren kan likevel karakteriseres som passiv men synlig eller ha en aktiv fremtredelse. Det er mange gode grunner for å gjøre en observasjonsstudiet. For det første gir det tilgang til situasjoner som de

involverte selv ikke nødvendigvis hadde tolket på samme måte som en selv (slik som ved et intervju). Ifølge Robert Dingwall (1997) er observasjoner den beste måten å skaffe seg kunnskap om den intersubjektive konstruksjonen av virkeligheten, som sier noe om en felles forståelse av virkeligheten mellom flere personer. Observatørene bør være åpen for alle inntrykk og samle inn data der man legger vekt på fysisk setting, deltakere, oppgaver, roller, rutiner, ritualer, fortolkninger og interaksjon. Man kan også bemerke seg hvor ofte gjentatte elementer repeteres, varigheten, faser og stadier. Feltnotatene bør også kunne skille mellom (a) hva forskeren mener er den rette framstillingen av situasjonen og (b) hva som er de faktiske funnene, gjennom registrerte data etter observasjon. Dataene baseres på personlige refleksjoner og tolkninger (Tjora, 2017; Opdahl, Giæver og Johansen, 2000).

3 Material og metode

For å gjøre dette kapitlet mest mulig oversiktlig ble det valgt å dele inn «Material og metode» inn i tre deler. I første del «målprosess» vil det bli presentert en beskrivelse av feltarbeidet som innebærer hva som er ønsket oppnåelse i dette prosjektet og hva den gjennomtenkte planen var på forhånd. I kapitlets andre del vil det presenteres en oversikt over de ulike prosessene og analysene som har blitt gjennomført både for sildehydrolysat og restråstoff fra surimiproduksjon. Til slutt vil den reelle prosessen bli beskrevet. Her vil de ulike utfordringene bli beskrevet med tanke på laboratoriearbeid i India og Norge, samt deres ulikheter og likheter. Det vil bli gjennomført en SWOT analyse som tar for seg styrker, svakheter, muligheter og utfordringer i dette prosjektet knyttet til Norge og India. Tabell x viser en oversikt over den overordnede planen for denne oppgaven, målet og planlagt arbeidsprosess i utviklingsarbeidet innenfor laboratoriet og hvilke utfordringer det medførte.



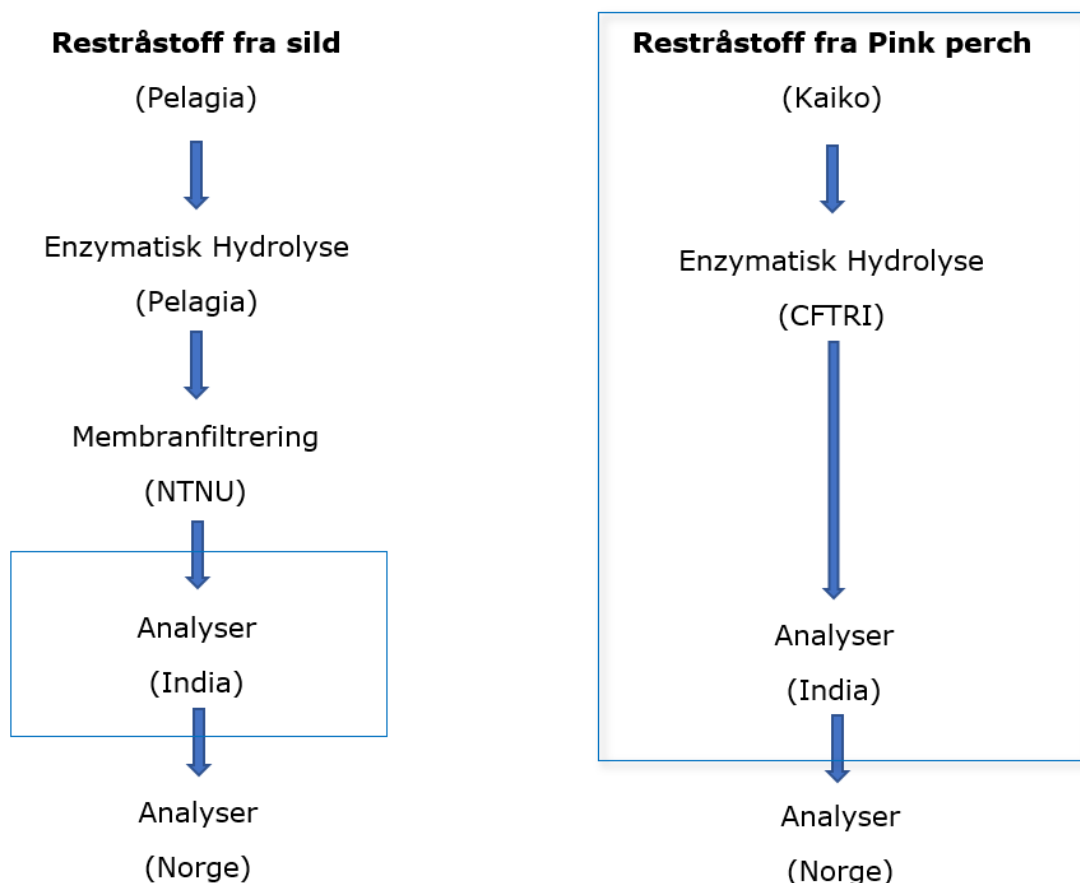
Figur 6: Oversikt over hva som inngår i kapitlet material og metode

3.1 Målprosess

Målet var å sette lys på bærekraftig verdiskapning av marine ressurser, herunder restråstoff fra marin sektor. For å utrede mulighetene for økt utnyttelse av marine peptider ved bruk av enzymatisk hydrolyse med fokus på ACEI i Norge og India, ble det sett på to ulike varianter av marint restråstoff. Restråstoff fra sild og restråstoff fra surimifabrikk.

Case 1: Restråstoff fra sild inngår innen norsk pelagisk sektor. Råstoffet har gjennom Pelagia's normale produksjon gjennomgått enzymatisk hydrolyse. Når hydrolysatet ankom NTNU ble det gjennomført membranfiltrering for å oppkonsentrere og fraksjonere peptidene. Dette resulterte i fire fraksjoner (sildehydrolysat, retentat > 150 kDa, retentat > 150 kDa og permeat < 4 kDa) som ble frysetørket før videre analyser i India.

Case 2: Restråstoff fra Pink perch kom fra indisk surimiindustri der målet var å skape en effektiv konvertering av restråstoff til peptider med fokus på ACEI som potensielt kan tilsettes i mat og fôr-applikasjoner i India. Punktene som inngår innenfor blå ramme er arbeid som har blitt utført i India.



Figur 7: oversikt over feltarbeidet gitt for case 1 og case 2, med hensyn til hvilket laboratoriearbeid som ble utført i India (markert med rødt) og hvilket laboratoriearbeid som ble utført i Norge.

3.1.1 Beskrivelse av feltarbeid

På grunn av at laboratorieforholdene ikke var helt slik man hadde forventet på forhånd, som følge av en del funn underveis i feltarbeidet fikk oppgaven et annet fokus enn det som i utgangspunktet var planlagt. Dette medførte justeringer av oppgaven med tanke på både råstoff, prosess og analyser. For å kunne gi en dypere innsikt i de ulike utfordringene og erfaringene ble det valgt å beskrive disse funnene gjennom bruk av kvalitative analyseverktøy. Dette for å få klart frem hvilke forandringer som fant sted og for å gi perspektiv på feltarbeidet fra november (2018) til mai (2019).

Det ble valgt å henvise til perioden der de ulike observasjonene og erfaringene ble gjort for «feltarbeid». Feltarbeidet tar for seg observasjoner og erfaringer gjort i deltagelse på industriworkshop i Mumbai og for New Dehli's toppmøte mellom Norge og India om løsninger for bærekraftig vekst. Sist men ikke minst besøket hos surimifabrikken og studieoppholdet samt laboratoriearbeidet som ble gjort ved Central Food Technological Research Institute (CFTRI) i Mysore og ved NTNU i Norge.

3.2 Beskrivelse av råstoff

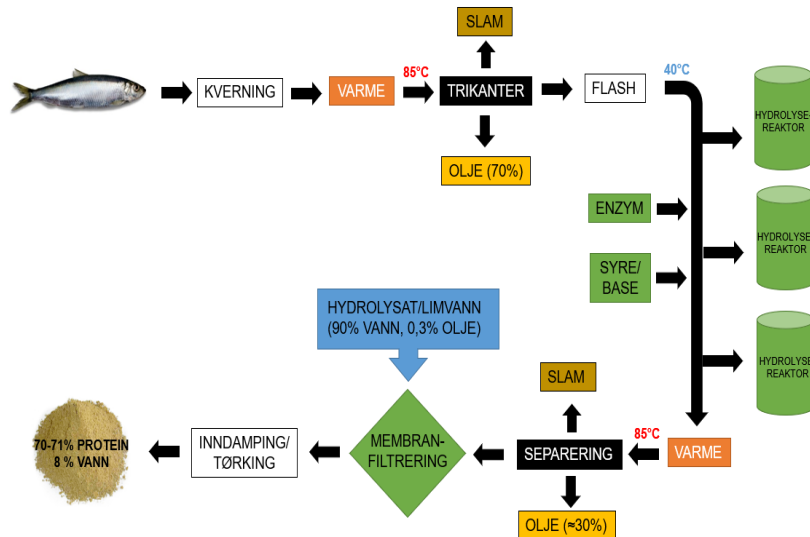
Case 1: Sildehydrolysat fra Pelagia

Sildehydrolysatet ble transportert som to enheter på 1,5 liter dypfrost hydrolysat fra Pelagia i Bodø. Hydrolysatet bestod av sild med ukjent restråstoffopprinnelse som ble fisket i november 2018. På grunn av at det kun ble mottatt en batch ble det ikke utført noen analyser med hensyn til sesongvariasjon for silden. Laboratoriearbeidet ble utført ved NTNU, Kalvskinnet og Gløshaugen og ved CFTRI, Mysore. Pelagia hadde på forhånd utført tørrstoff, protein og vannanalyser og informerte om at hydrolysatet hadde 30 % tørrstoff, 70-71 % protein og 8 % vann.



Figur 8: sildehydrolysat fra Pelagia før membranfiltrering

Hydrolysatet ble produsert ved enzymatisk hydrolyse som en del av Pelagia's normale produksjon. Dette innebærer kverning av silda før den ble varmebehandlet ved 85 °C. Videre ble råstoffet sendt inn til en trikanter der slam og olje ble separert. Det ble separert 70% råolje i dette trinnet. Videre behandles råstoffet ved 40 °C inne i hydrolysereaktorer der det tilsettes enzym. Reaksjonens pH reguleres også for å oppnå optimale reaksjonsbetingelser. Det ble ikke gitt noen opplysninger om hvilke enzymer som ble benyttet under hydrolysen. I neste trinn gjennomgår råstoffet enda en varmebehandling ved 85 °C, der de siste 30 % av oljen separeres ut. Se figur x for flytskjema over hydrolysemetoden.



Figur 9: Flytskjema over produksjonslinjen og den enzymatiske hydrolysen til Pelagia, Bodø. Figuren viser alle stegene i produksjonen og hva som til slutt endte opp som fiskehydrolysat. Dette innebærer 2 steg med oljeseparering som gir hydrolysatet inneholdte 90 % vann og 0,3% olje (Hjellnes, 2018). de fire fraksjonene ble frysetørket før videre analysering i India



Figur 10: Bilde viser de fire ulike sildehydrolysatene etter frysetørking. (A) sildehydrolysat før ultrafiltrering ved 150kDa/MWCO og 4kDa/MWCO. (B) Retentat >150 kDa filtrert ved keramisk filtrering, 150kDa/MWCO. (C) Retentat >4 kDa filtrert ved keramisk- og polymer- membranfiltrering, 150kDa/MWCO og 4kDa/MWCO. (D) Permeat <4 kDa ble filtrert ved keramisk- og polymer- membranfiltrering, 150kDa/MWCO og 4kDa/MWCO.

Case 2: Restråstoff fra Kaiko

Restråstoffet fra surimiproduksjonen ble fraktet fra Mumbai i frossen tilstand og transportert med fly til Bangalore. Fra Bangalore ble restråstoffet hentet med bil og fraktet til forskningsinstituttet CFTRI i Mysore.

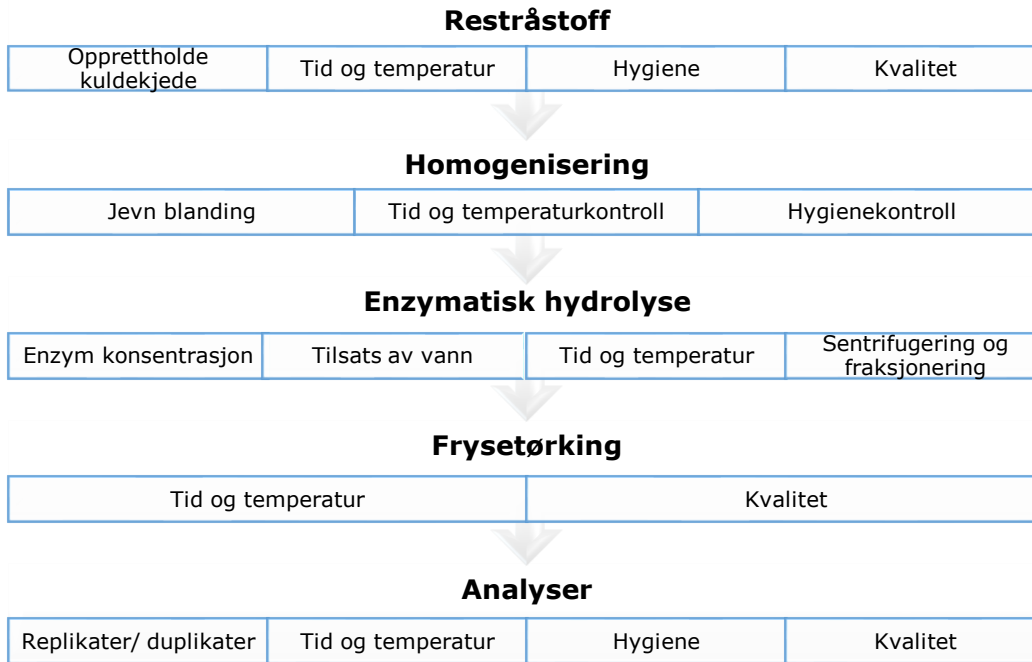
Restråstoffet fra Kaiko bestod av tre ulike varianter restråstoff fra fisken Pink perch, *Nemipterus sp.* Det ble mottatt 3 kg hode og slofraksjon, 3 kg skinn og bein og 2 kg raffinert avskjær.



Figur 11: Restråstoffet fra Kaiko's surimiproduksjon bestod av hode og slo fraksjon (Head waste), raffinert avskjær (Refiner waste) og skinn og bein (Skin & bone) fra fiskearten Pink Perch.

3.2.1 Den ideelle prosessen

Den ideelle prosessen for utnyttelse av marine peptider for restråstoff av surimiproduksjonen er gitt i figur. 12.



Figur 12: Oversikt over nødvendige parametere for at prosessen skal kunne gi gode resultater med hensyn til restråstoff, homogenisering, enzymatisk hydrolyse, frysetørking og analyser

3.3

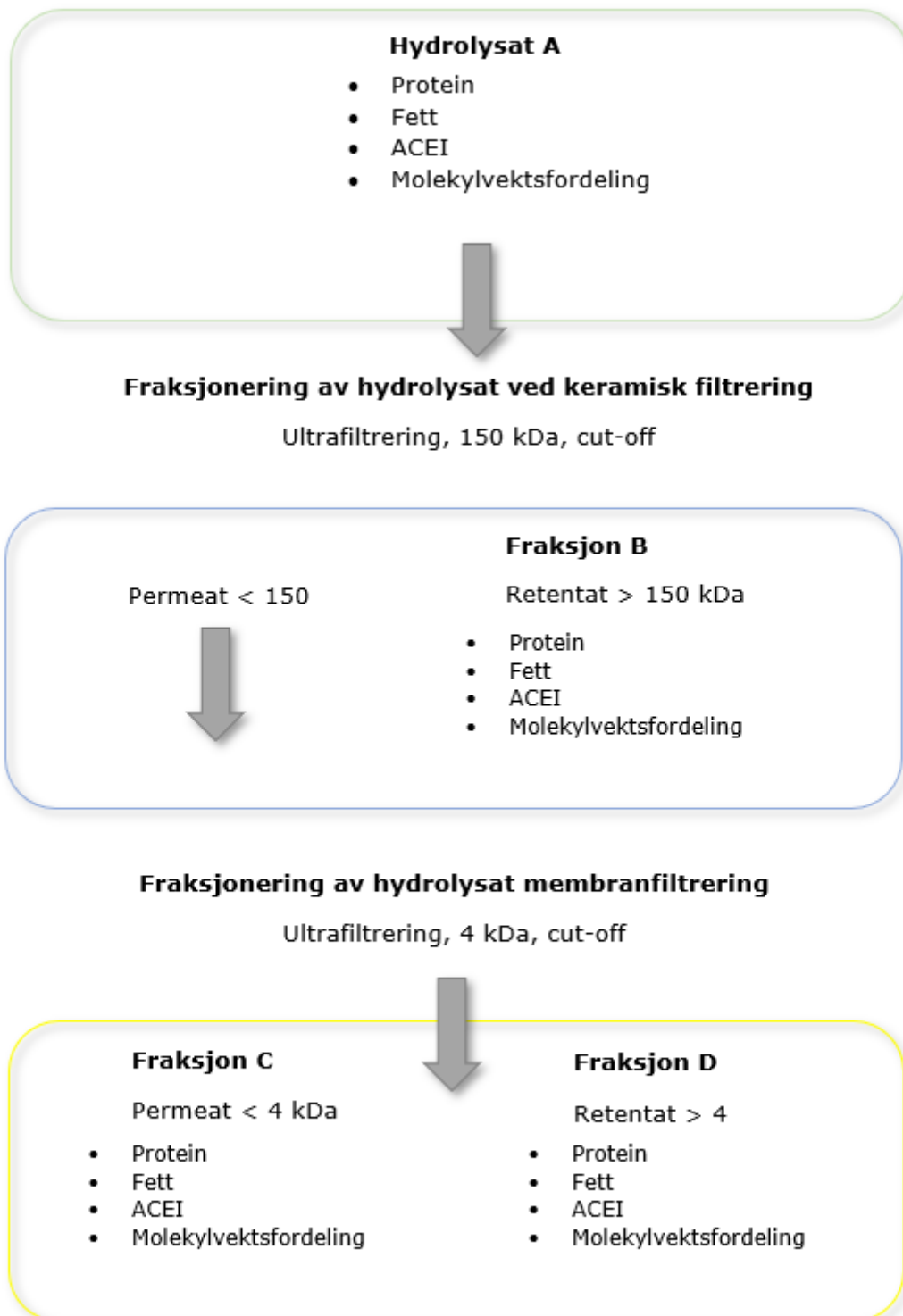
Prosess og analyser

Case 1: Gjennomføring av prosess og analyser for sildehydrolysat

Som nevnt tidligere utførte Pelagia analyse av tørrstoff, vanninnhold og protein på råstoffet før enzymatisk hydrolyse. Videre analyser utføres etter enzymatisk hydrolyse.

Før videre analysering ble det utført fraksjonering av hydrolysatet med ultrafiltrering ved 150 kDa og 4 kDa. Membranfiltreringen ble gjentatt to ganger, først med keramisk filter, 150kDa og så med membranfiltrering, 4kDa. Dette resulterte til slutt med tre fraksjoner (B, C og D). Figur x viser et flytskjema over fraksjoneringsprosessen og de utførte analysene for de ulike fraksjonene. Fraksjonene samt det originale hydrolysatet ble senere frysetørket før videre analyser ble utført ved CFTRI, Mysore og ved NTNU.

Figur 13: Oversikt over de ulike metodene som ble utført på sildehydrolysatet samt de tre vannløselige fraksjonene (A, B, C og D) som ble filtrert ved bruk av ultrafiltrering ved 150kDa/MWCO og 4kDa/MWCO. Analyse av proteininnhold og ACEI-hemmende effekt ble utført på alle fraksjonene samt hydrolysatet.



3.3.1 Fraksjonering av sildehydrolysat ved ultrafiltrering

Membranfiltrering

Sildehydrolysatet fra Pelagia ble fraksjonert med bruk av membransystemet MMS AG Membrane, Trippel Systems (Switzerland, 8902 Urdorf). Det ble brukt to forskjellige membranfilter: Keramisk membran, Triple system (ceramic disc, 1x Q 75 mm, h=2.5mm, Tami) og polymer membran (Nadir®UH004 P).

Membransystemet bestod av en celle på 28 cm². Utførelsesprosessen ble gjort i samarbeid med Kristin Brustad og Frida Holm Larsen ved NTNU, Kalvskinnet.

Hydrolysatet hadde et tørrstoffinnhold på 30 %, som ga en tykk konsistens. Av hensyn til membranfilterets sensitivitet ble det derfor utført 1:2 fortynning av hydrolysatet (400 ml destillert vann + 200 ml hydrolysat).

De ubrukte membranene ble behandlet etter rengjøringsprosedyren CIP 1, anbefalt av produsenten. Se vedlegg X for gjennomføring av vaskeprosedyre.

Vaskeprosedyren ble benyttet før og etter bruk for å rengjøre begge membranene etter UF-fraksjoneringsanalyse. Rengjøringseffektiviteten til membranen kan defineres som den gjennomsnittlige fluxen av permeat gjenvunnet etter rensing av membranen (Chabeaud *et al.*, 2009).

Keramisk membran ved 150 kDa (merke++) ble benyttet under første filtrering av sildehydrolysat. Det ble tilsatt 600 ml hydrolysat i feedtanken som ble filtrert gjennom instrumentet, helt til det nådde et volum på 100 ml. Dette for å forsikre seg om at minimumsvolumet på 50ml ikke ble nådd. Filtrering av hydrolysatet med keramisk membran ble utført to ganger. Filtreringen resulterte i to fraksjoner: et retentat, > 150 kDa og et permeat, < 150 kDa.

Permeatet ble videre filtrert med en syntetisk polymer membran ved bruk av ultrafiltrering, 4 kDa. Dette membransystemet bestod av tre celler på 28 cm². Gjennomføringen skjedde på samme måte som ved kjøring med keramisk membran. Dette gav igjen to nye fraksjoner: >4 kDa (retentat) og < 4 kDa (permeat).

Vi benyttet anbefalt vaskeprosedyre fra leverandør, CIP 1. dette var en tilstrekkelig vask da det ble ikke skulle gjøres noen sensorisk analyse av produktet.



Figur 14: Siste fraksjon fra membranfiltrering, (D) Permeat <4kDa

3.3.2 Frysetørking

Sildehydrolysat A, samt fraksjonene B, C og D ble utgangspunktet for analysene som skulle gjennomføres i Mysore, India. Av praktiske årsaker ble det valgt å frysetørke sildfraksjonene før transport av råmateriale. Frysetørkingen av fraksjonene ble gjort ved bruk av instrumentet FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Console Freeze Dry System. Etter at prøvene hadde blitt oppbevart ca. ett døgn ved – 80. Frysetørkingen tok ca. 72 timer.

3.4 Analyser utført på sildehydrolysat, samt fraksjoner.

3.4.1 Fett

Bestemmelse av lipidkonsentrasjon ble utført ved NTNU for sildehydrolysat, A. Senere ble metoden utført for hydrolysat B, C og D av medstudent Kristin Brustad ved CFTRI, India. Metoden er modifisert av Bligh, E.G & Dyer, W.J (1959). Analysen ble utført i samarbeid med medstudentene Frida Hold Larsen, Kristin Bruseth og laboratorieingeniør Oskar Speilberg.

Det ble veid ut 5,0 g hydrolysat i sentrifugerør og deretter tilsatt ionefritt vann (16,0 ml) og 40,0 ml metanol. 20,0 ml kloroform tilsettes rett før sentrifugering for å få minst mulig fordamping. Prøvene ble homogenisert i 2 minutter med ultra turax ved 7,2 rpm * 1000. Parallellene plasseres direkte på is etter homogeniseringen for minst mulig avdampning av kloroform. 20,0 ml kloroform ble tilsatt før ny homogenisering i 40 sekunder. 20 ml ionefritt vann ble tilsatt, og prøvene homogeniseres enda en gang i 40 sekunder. Prøvene ble sentrifugert ved 500 rpm i 15 minutter. 2 ml av kloroformfasen overføres til et reagensrør i glass. Parallellene holdes fortsatt på is. Vekten av de tomme reagensrørene ble veid og kloroformfasen ble overført til disse. Reagensrørene med kloroformfase ble deretter plassert i en varmeblokk ved 60°C, med tilførsel av nitrogen-gass for avdampning. Etter avdampning avkjøles prøvene i eksikator i en time før prøvene veies på nytt. % lipid beregnes av innveid prøve. Beregning av totalt lipidinnhold ble gjort ved bruk av formel x:

$$\text{Formel x: } a * b * \frac{100}{(c * v)}$$

$a =$ Inndampet fett i gram $b =$ Tilsatt kloroform i ml $c =$ Inndampet kloroform i

$v =$ Innveid prøve i gram

3.4.2 Forberedelse av prøver med av heksan

2 gram prøve ble fortynnet med 25ml heksan for å fjerne fett i hydrolysatet. På grunn av dårlig oppløsning på båndene i gel-elektroforesen ble det lagt mistanke på om det kunne skyldes høyt lipidinnhold (13 %). Det ble derfor valgt å løse opp to gram hydrolysat i 25 ml, 86,18 g/mol heksan, CH₃(CH₂)₄CH₃ (SF6S660451, Emplura,).

Løsningen stod i vippekap (Pisces, Ree O SL 3000) ved 37°C over natten for å fjerne fett fra prøvene. Manuell filtrering ved bruk av filterpapir (1001-150, Whatman, 150 mm Ø.) Etter filtreringen ble de fire fraksjonene ført over i petriskåler i varmeskap (W.C Heraeus GMBH HANAU) i 30 minutter ved 50 °C. Fraksjonenes løselighet ble deretter sjekket ved å blande ut 10 mg hydrolysat med 1 ml destillert vann.

3.4.3 Protein

Bestemmelse av protein ble utført med Biorad, som er en modifisert utgave av Bradford (Bradford, 1976). Metoden ble utført ved Gløshaugen, NTNU.

Metoden ble benyttet for å kvantifisere isolerte vannløselige proteiner fra (A) sildehydrolysat, (B) retentat >150 kDa/MWCO, (C) retentat >4kDa/MWCO og (D) permeat, 4 >kDa/MWCO. Metoden involverer binding av protein og fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Binding av fargestoffet til protein fører til en økning av absorpsjon fra 465 til 595 nm. Metoden ble utført i samarbeid med mastergradsstudent Frida Holm Larsen.

Hydrolysatprøver ble preparert med 100 mg hydrolysat i 9 ml destillert vann (1:10). Fargeløsning ble preparert med 40 ml standard fargeløsning i 160 ml destillert vann (1:5)

Standardprøver: Fortynnet standardløsning (1:4) av 1,5 mg/ml Bovint gamma globulin og vann tilsettes i reagensrør med tre paralleller etter oppgitt konsentrasjon i tabell 4.

Prøver: 100µl fortynnede hydrolysat (1:10) tilsettes i reagensrør, 3 paralleller for hver prøve.

Blank: 100µl destillert vann. Gjelder for både standardprøver og prøver.



Felles for alle rør: 5,0 ml fortynnet biorad-fargereagens (cat.:5000006) tilsettes og blandes godt med bruk av «whirl mixer».



Absorbans måles etter 5 minutter ved 595 nm. Prøvene blandes godt like før avlesning. Etter avlesning avhendes løsningene i spesialbeholder for Bioradavfall.

Tabell 4: Oppsett av standardkurve bestående av Bovint gamma globulin og Biorad fargereagens for måling av proteinkonsentrasjon i ml/mg

<i>Standard</i>	<i>Blank</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Standard (µl)	0	20	40	60	80	100
Vann (µl)	100	80	60	40	20	0

3.4.4 Bestemmelse av ACE-inhibering ved ekstrahering av hippursyre

Utført i CFTRI, India

Aktivitet for ACE inhibering ble først undersøkt for frysetørket sildehydrolysat ved bruk av en modifisert utgave av Cushman and Cheung (1979). Dette er en *in vitro*-prosedyre for indirekte måling av blodtrykkshemmende effekt. Metoden er basert på en reaksjon mellom substratet hippuryl-L-histidyl-L-leucin (HHL) og ACE som fører til dannelse av hippursyre (HA). HA måles deretter spektrofotometrisk ved 228 nm. ACE-inhiberingen beregnes ut ifra målte absorbansverdier (Cushman og Cheung, 1971) Nærmere informasjon om metoden er omtalt i avsnitt 2.7.2.

Metoden ble først gjennomført ved CFTRI etter veiledning av doktorgradsstudent ms. Nikita Ramprathap i India. Også tillaging av enzym-, buffer og substrat-løsning var på forhånd utført av Nikita Ramprathap.

Følgende reagens ble benyttet for å determinere ACE inhiberende aktivitet:

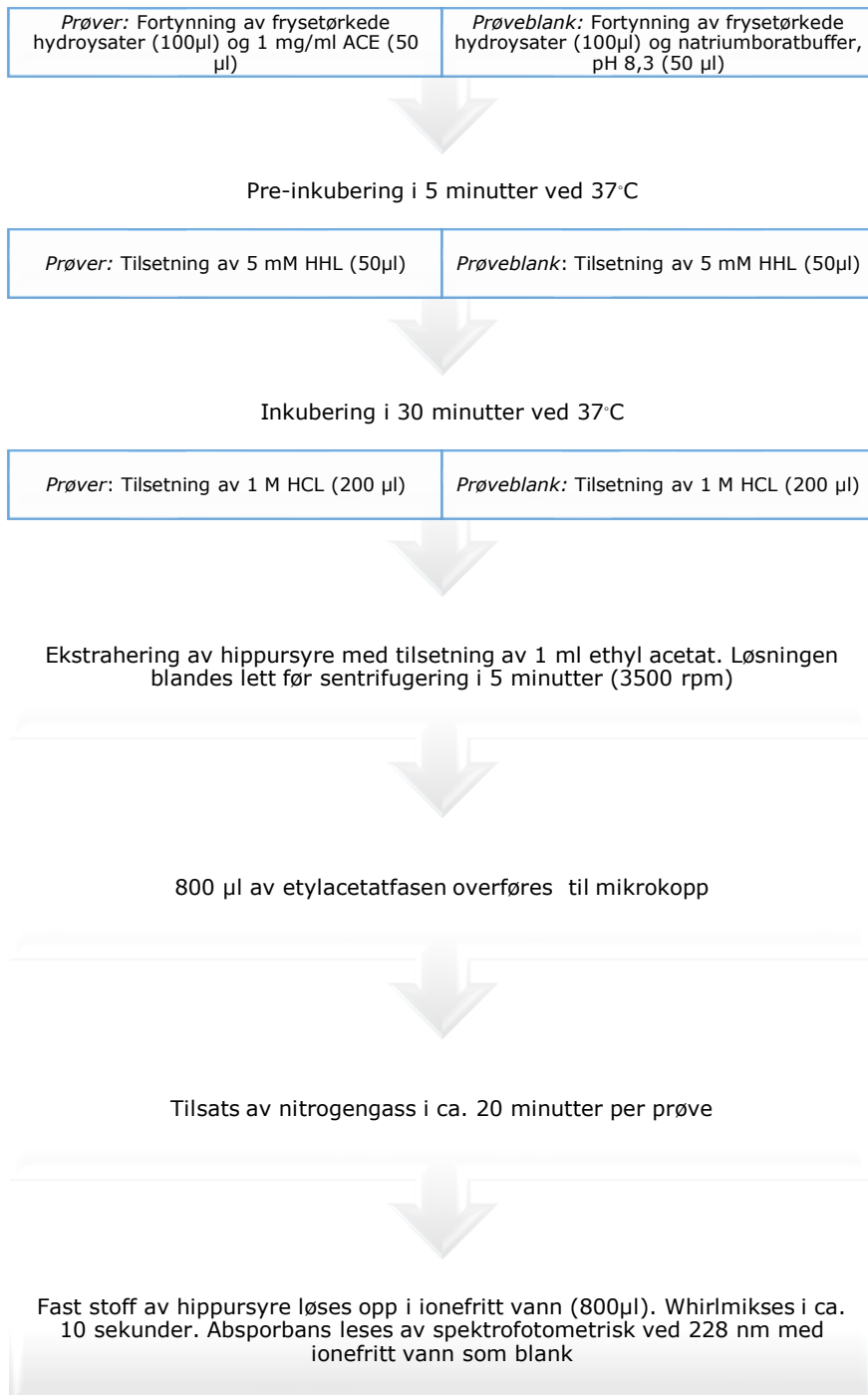
Enzym: ACE lyofilisert pulver fra kaninlunge (Sigma-Aldrich, kat. nr. A6778) ble benyttet som enzym. Optimal enzymaktivitet er ved pH 8.1 – 8.3. 1 unit ACE (≥ 2.0 units/mg protein) ble løst opp i 0,01 M borat NaCl- buffer (pH 8,5).

Substrat: N-hippuryl-His-Leu-hydrate (HHL) (Sigma-Aldrich, kat. nr. H1635-100MG) ble løst opp i 100 mM natriumboratbuffer (pH 8,3) for tillaging av 5 mM substrat-løsning. Stockløsningen ble frosset ved -20 °C, hvor den ble godt blandet etter tining og før bruk.

Kontroll: En teoretisk absorpsjonsverdi (0,908) ble benyttet for beregning av ACE hemmende effekt. Kontrollverdien var bestående av ACE + substrat og ble benyttet for alle beregningene utført i India

Fortynningsserie: Forskjellige konsentrasjoner av inhibering ble målt for å se på ulike grader av ACE-inhibering. Metoden ble utført ved fem ulike fortynninger (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 og 15.0), der 100mM Borat-NaCl buffer (pH 8.3) ble benyttet som fortynningsbuffer. Det er viktig å bemerke seg at fortynningene ble ikke kjørt med paralleller. Frysetørket hydrolysat fra Pelagia ble på forhånd preparert med 10mg/ml destillert vann. En beskrivelse over gjennomført prosedyre er vist i [figur x](#).

Beskrivelse over gjennomført prosedyre for deteksjon av ACE-hemmende effekt i frysetørkede hydrolysat



Figur 15: Analyseoppsett for deteksjon av ACE-inhiberende aktivitet med ekstrahering av hippursyre under utførelse ved CFTRI, India.

Absorbansmålingene ble utført ved bruk av kvartskyvette, som ble skylt med ionefritt vann mellom hver måling. Absorbans ble målt med bruk av UV/VIS spektrofotometer, 200V (U-2900, HITACHI, Japan). ACE-inhiberende aktivitet ble beregnet ut ifra ligning x. IC_{50} – verdi ble definert som konsentrasjonen som trengs for å inhibere 50 % av ACE-aktivitet.

Det ble også valgt å lage prøveblank med tilsats av Borat-NaCl buffer, prøveblank med tilsats av Hip-His-Leu, substratblank og enzymblank for å finne ut hvor mye hippursyre som finnes i kun enzym, substrat og i prøve. Det ble benyttet to ulike prøveblank for å kunne se forandringer etter man har tilsatt buffer og etter vi har tilsatt substrat. På denne måten kunne man se hvor mye substratet og buffer endrer absorpsjon, som leses av på 228nm. Til sammen ble det preparert 14 prøver til avlesning.

$$\% ACE = \frac{Kontroll - [Prøve - Prøveblank]}{Kontroll} \times 100$$

Kontroll er gitt som en teoretisk verdi (0,908) generert uten ACEI. *Prøve* er gitt absorpsjon av hippursyre ved tilstedeværelse av ACEI-komponenter. *Prøveblank* er absorpsjonen av hippursyre, uten ACE men med HHL.

3.4.5 Bestemmelse av ACE-inhibering ved ekstrahering av hippursyre

Utført ved NTNU, Norge

På grunn av uferdig laboratoriearbeid, samt manglende kontroll over kvalitet på resultatene ble det valgt å utføre bestemmelse av ACE-inhibering ved ekstraksjon av hippursyre en gang til. Både for sildehydrolysat og surimihydrolysat. Det ble valgt å bruke samme metode som det ble brukt i India (Cushman and Cheung, 1971), men med noen justeringer i prosedyren.

Det ble kun frysetørket en begrenset mengde av surimihydrolysat før avreise til Norge. På grunnlag av dette ble det også valgt å kjøre en pilottest av frysetørket hydrolysat av torskehoder. Dette for å forsikre om en vel fungerende prosedyre før eventuelle feil ble gjort på det allerede begrensede råstoffmaterialet. Gjennomføring av metoden ble utført med masterstudent Aleksandra Stensen.

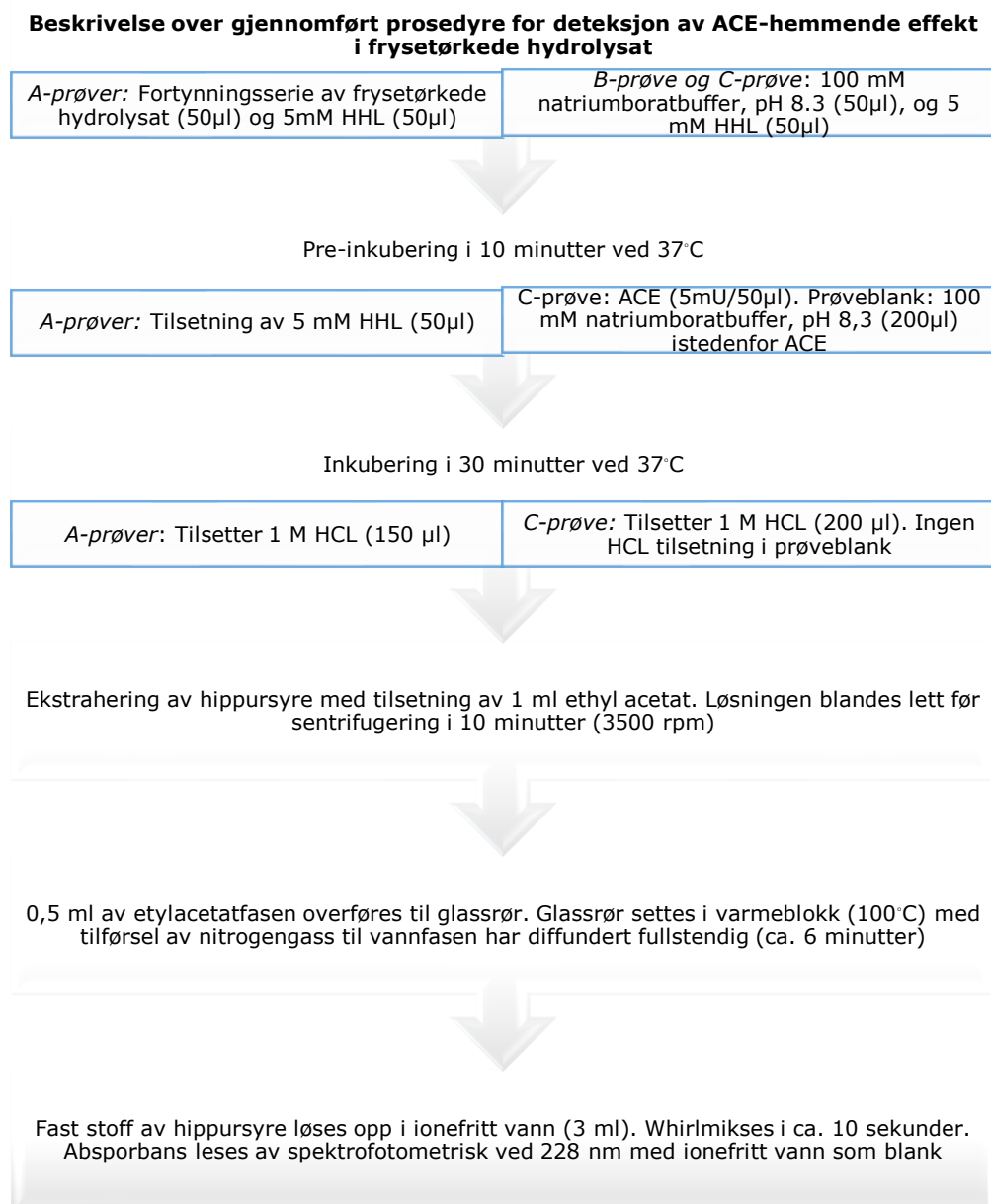
Pilottest ble gjort med fortynningene: 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0 og 30,0. Frysetørket hydrolysat ble fortynnet med 0,1 M natriumboratbuffer (pH=8,3).

Følgende reagens ble benyttet for å determinere ACE inhiberende aktivitet:

Enzym: ACE lyofilisert pulver fra kaninlunge (Sigma-Aldrich, kat. nr. A6778) ble benyttet som enzym. Det ble løst opp 5,4 U/mg pulver (0,29 mg) i 100 mM natriumboratbuffer, pH 8,3 (8,44 ml) for å få en konsentrasjon på 10 mU/50 µl. Dette ble tatt hensyn til ved senere utførelse av metoden, hvor det ble brukt en konsentrasjon på 5 mU/50 µl.

Substrat: HHL (Sigma-Aldrich, kat. nr. H1635-100MG) ble benyttet som substrat. 5 mM HHL-pulver (107,37mg) ble løst opp i 100 mM natriumboratbuffer, pH 8,3 (50ml) for tillaging av 5 mM substrat-løsning. Stockløsning (1,5 ml) ble fordelt i mikrokopper og fryst ned ved -20 °C. Løsningen ble blandet til homogen løsning før bruk.

Fortynningsserie: Forskjellige konsentrasjoner av inhibering ble målt for å se på ulike grader av ACE-inhibering. Metoden ble utført ved fem ulike fortynninger (0,5, 1,0, 5,0, 10,0 og 15,0), der 100mM natriumborat-buffer, pH 8,3 ble benyttet som fortynningsbuffer. En beskrivelse over gjennomført prosedyre er vist i figur 16.



Figur 16: Analyseoppsett for deteksjon av ACE-inhiberende aktivitet med ekstrahering av hippursyre under utførelse ved NTNU, Norge

Absorbansmålingene ble utført med kvartskyvetter, skylt med ionefritt vann mellom hver måling. Absorbans ble målt ved bruk av UV/VIS spektrofotometer, 200V (U-2900, HITACHI, Japan). ACE-inhiberende aktivitet ble beregnet ut ifra ligning x.

Formel brukt til å beregne % ACE

$$ACE \% = \frac{B-A}{B-C} * 100$$

A er hippursyre dannet av ACEI fra hydrolysat. *B* er hippursyre dannet uten ACEI. *C* er hippursyre dannet uten ACEI, men med HHL

3.4.6 Molvektsfordeling

Lengden på de forskjellige peptidene i de fire sildehydrolysatene ble bestemt ved bruk av gelfiltrering. Det ble brukt Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) med kolonne Superdex Peptide 10/300 GL. Academic Edition Äkta FPLC hadde en deteksjonslengde på 280 nm. Ved de ulike FPLC-kjøringene ble 0,05M sodium acetat buffer ved pH 5 benyttet under mobil fase.

0,1 g av hydrolysat ble løst i 4 ml sodium acetat buffer (filtrert gjennom 0,2µm filter). Prøvene ble filtrert (0,2µm) før injisering av 1 ml i kolonnen.

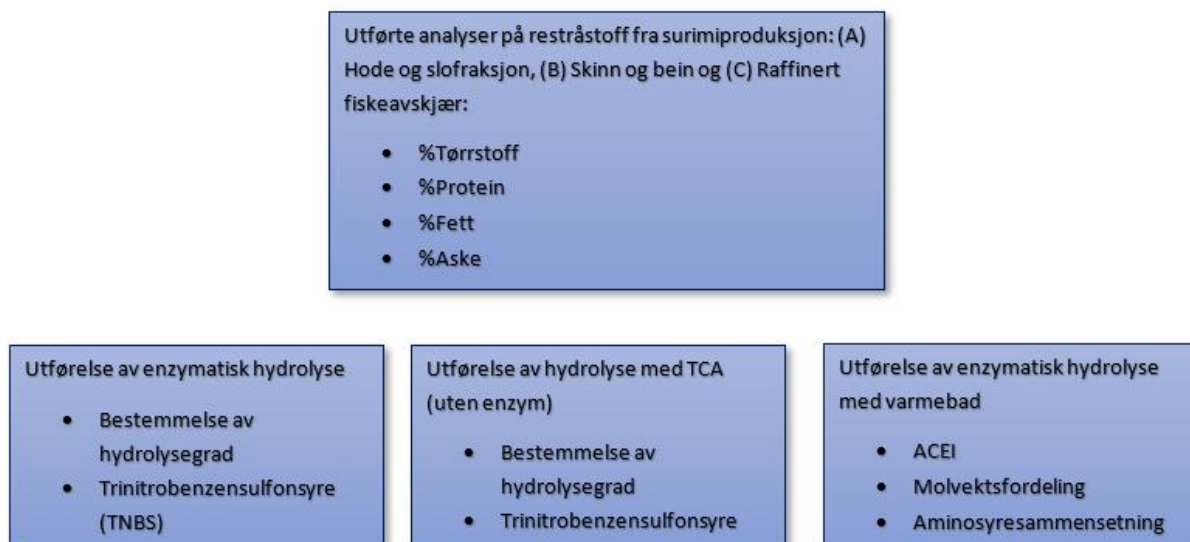
Det ble kjørt gelfiltrering for ulike standarder. Oversikt over de ulike standardene og molvektene er gitt i tabell 5

Tabell 5: Oversikt over molekylvekten til standardene aprotinin og B₁₂ som benyttet for deteksjon av peptidenes molekylvekt (kDa) (Talmard *et al.*, 2007)

Standard	Molekylvekt (kDa)
Aprotinin	6,5
B ₁₂	1,4

3.5 Case 2: Prosess og analyser for restråstoff fra surimiproduksjon

Figur 17 viser en oversikt over de utførte analysene for restråstoffet Kaiko. TNBS og «oilbath digestion» ble utført for å kunne regne ut hydrolysegraden til råstoffet. Bestemmelse av hydrolysegrad ble utført ved tre ulike temperaturer (30°C, 45°C og 60°C) under tre ulike tidsintervaller (30, 90 og 150 min) ved bruk av tre ulike enzymvolum (0.5ml, 1.5ml og 2.5ml). Det ble også utført karakterisering av råstoffet ved måling av vanninnhold, proteininnhold og fettinnhold.



Figur 17: Oversikt over analyser utført på restråstoff fra surimiproduksjon samt enzymatisk hydrolyse med TCA, hydrolyse (uten enzym) med TCA og enzymatisk hydrolyse med varmebad. Analyse av tørrstoffinnhold ble utført på råstoff for hode og slo og skinn og bein. Analyse av proteininnhold ble utført på alle de ulike råstoff-fraksjonene. Proteinenes hydrolysegrad ble bare utført på hydrolysatene tilsatt TCA. Analyse av DPPH og ACE-hemmende effekt ble kun utført på hydrolysat behandlet med varmebad ved 90°C.

3.6 Karakterisering av råstoffet fra Kaiko

3.6.1 Vanninnhold

Råstoffet ble overført til veide porselensskåler, porselensskålene ble veid på nytt med råstoff. Deretter ble porselensskålene med råstoffet satt i ovn ved 105 °C i ett døgn. Dagen etter ble porselensskålene veid på nytt, og prosentandelen av vanninnhold ble beregnet. Vanninnhold konsentrasjon ble beregnet ved bruk av formel x:

$$\frac{\text{Vekt av prøve + beholder} - \text{Vekt etter tørking}}{\text{Prøvevekt}} * 100$$

For å beregne tørrstoff ble denne formelen benyttet:

$$\frac{\text{Vekt etter tørking} - \text{Vekt av beholder}}{\text{Prøvevekt}}$$

3.6.2 N-protein

For å bestemme det totale proteininnholdet i råstoffet Total mengde nitrogen i prøvene ble bestemt md bruk av C/N-analyse utført etter Dumas metode, av medveileder Tharak Trivans ved CFTRI. Tørket råstoff ble veid på finvekt i små aluminiumsbåter. Total mengde protein ble beregnet ut ifra målt nitrogeninnhold ved bruk av omregningsfaktor 6,21.

3.6.3 Aske

Askeinnholdet for råstoffet ble bestemt i henhold til AOAC. Analysen ble utført av Frida Holm Larsen og Kristin Brustad. Porselensdigelens vekt veid. Så tilsettes mellom 0,5 – 1g prøve i digelen, vekten veies en gang til. Prøven i porselensdigelen ble så plassert inne i en gassbrenner, helt til det kun var aske igjen. Prøven ble til slutt plassert i en ovn ved 550 °C for 5 timer. Askeinnholdet ble beregnet ved denne formelen:

$$\% \text{ Aske} = \frac{\text{Vekt etter inkubering i ovn} - \text{digels vekt}}{\text{prøve med digel}} * 100$$

3.6.4 Fett

Fettinnholdet for surimiråstoff ble bestemt ved bruk av Soxhlet ekstraksjon. Metoden ble utført av medstudent Kristin Brustad ved CFTRI, India.

3.6.5 Hydrolyse med og uten enzym

Enzymatisk hydrolyse ble gjort på restråstoffet gitt fra surimifabrikken Kaiko. De ulike restråstoff-fraksjonene ankom CFTRI i fryst tilstand.

Restråstoffet ble tint i lunkent vann i ca. 90 minutter, og senere hakket separat ved bruk av instrumentet Robot Coupe R 10 (Serie 5, 3000 rpm) etterfulgt av homogenisering ved bruk av blender (PRO 250) ved 30 000 rpm ved bruk av foodprosessor. Homogenisert råstoff ble videre preparert for hydrolyse av råstoffet. Som vist i figur. 17 ble det utført tre ulike hydrolyseprosesser:

To av hydrolyseprosessene ble utført med ulike konsentrasjoner av enzymet alkalase. Første hydrolyseprosess inaktiverte alkalase ved bruk av tricarboxylsyre syklus (TCA), den andre inaktiverte enzymet med varmebad ved 90 °C. Det siste hydrolysatet ble preparert uten enzym, og med inaktivering av eventuelle endogene enzymer med TCA.

Figur 18: Bilde etter homogenisering og varmeinaktivering av de tre fraksjonene: hode og slo, skinn og bein, samt raffinert avskjær.

Enzymet alkalase, *Bacillus licheniformis* (LOT: 2920868, Merck, Germany), med en optimal aktivitet ved pH 8.0, ble benyttet for hydrolyse etter fortykning med destillert vann. 40g prøve ble veid opp og tilsatt 120 ml vann. For å få en best mulig homogenisert blanding ble homogenisator PRO250 benyttet ved 30 000 rpm.

Råstoffet ble fordelt i mindre poser med 50 gram i hver pose som vist i figur x. De ulike restråstoff-fraksjonene ble hydrolysert separat. Tre forskjellige volum av alkalase (200, 600 og 1000µl) ble tilsatt ved tre ulike temperaturer (30°C, 45°C og 60°C) i tre ulike tidsperioder (30, 90 og 150 minutter).



Figur 18: viser bilde restråstoff-fraksjonene hode og slo, skinn og bein, samt raffinert avskjær etter homogenisering og inaktivering endogene enzymer

Til inaktivering av alkalase ble det tilsatt trikloreddiksyre (TCA). TCA ble tilsatt i råstoff med enzym og uten enzym. For måling av DPPH og ACE-hemmende enzym ble det benyttet varmebad ved 90°C. Tabell 5. viser hydrolyseparameterene for temperatur, tid og enzymkonsentrasjon for de tre forskjellige restråstoff-fraksjonene. Dette ble gjort med intensjon om å finne de mest optimale hydrolysebetingelsene for råstoffet.

Tabell 6. Eksperimentelt design over enzymatisk hydrolyse. Den enzymatiske hydrolysen ble utført med hensyn til 3 ulike temperaturer, tid og enzymkonsentrasjoner.

	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Enzym (%)
1	30	30	0,5
2	30	30	1,5
3	30	30	2,5
4	30	90	0,5
5	30	90	1,5
6	30	90	2,5
7	30	150	0,5
8	30	150	1,5
9	30	150	2,5
10	45	30	0,5
11	45	30	1,5
12	45	30	2,5
13	45	90	0,5
14	45	90	1,5
15	45	90	2,5
16	45	150	0,5
17	45	150	1,5
18	45	150	2,5
19	60	30	0,5
20	60	30	1,5
21	60	30	2,5
22	60	90	0,5
23	60	90	1,5
24	60	90	2,5
25	60	150	0,5
26	60	150	1,5
27	60	150	2,5

3.6.6 Frysetørking av surimihydrolysat

For å kunne fortsette analyser for surimihydrolysat i Norge ble det valgt å utføre frysetørking på hydrolysatene. På grunn av mangel på utstyr og lang ventetid for utstørsbruk ble det kun frysetørket noen få hydrolysat. Frysetørkingen ble utført ved bruk av Gamma 2-16 LSCplus.

3.6.7 Protein

Deteksjon av protein i frysetørket hydrolysat ble utført med Biorad, som en modifisert utgave av Bradford (Bradford, 1976). Metoden ble utført ved Gløshaugen, NTNU i samarbeid med Frida Larsen.

Metoden ble benyttet for å kvantifisere isolerte vannløselige proteiner fra frysetørket FPH fra hode og slofraksjon. Metoden involverer binding av protein og fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Binding av fargestoffet til protein fører til en økning av absorpsjon fra 465 til 595 nm. Metoden ble utført i samarbeid med mastergradsstudent Frida Holm Larsen. Biorad-metoden ble utført i henhold til prosedyre

Hydrolysatprøver ble først preparert med 100 mg hydrolysat i 9 ml destillert vann (1:10). *Fargeløsning* ble preparert med 40 ml standard fargeløsning i 160 ml destillert vann (1:5) *Standardprøver:* Fortynnet standardløsning (1:4) av 1,5 mg/ml Bovint gamma globulin og vann tilsettes i reagensrør med tre paralleller etter oppgitt konsentrasjon i tabell 4. *Prøver:* 100µl fortynnete hydrolysat (1:10) tilsettes i reagensrør, 3 paralleller for hver prøve.

Blank: 100µl destillert vann. Gjelder for både standardprøver og prøver.



Felles for alle rør: 5,0 ml fortynnet biorad-fargereagens (cat.:5000006) tilsettes og blandes godt med bruk av «whirl mixer».



Absorbans måles etter 5 minutter ved 595 nm. Prøvene blandes godt like før avlesning. Etter avlesning avhendes løsningene i spesialbeholder for Bioradavfall.

Tabell 6: Oppsett av standardkurve bestående av Bovint gamma globulin og Biorad fargereagens for måling av proteinkonsentrasjon i ml/mg

Standard	Blank	1	2	3	4	5
Standard (µl)	0	20	40	60	80	100
Vann (µl)	100	80	60	40	20	0

3.6.8 Bestemmelse av hydrolysegrad

Hydrolysegrad kan defineres som den prosentdelen av peptidbånd som blir spaltet av proteinet (Adler-Nissen, 1979). Mengde aminosyrer fra den originale mengden protein (L_o) og total aminosyresammensetning i det originale proteinhydrolysatet (L_{max}) ble beregnet ved å bruke metoden Oil bath digestion → AA. TNBS-metode ble brukt til å finne mengde aminosyre per minutt (L_t).

$$\% DH = \frac{L_t - L_o}{L_{max} - L_o} * 100$$

L_t = Mengde aminosyre per minutt (30, 90, 150)

L_o = Mengde av aminosyre, original mengde protein (prøver uten enzym)

L_{max} = Total aminosyresammensetning i original proteinhydrolyse (Oilbath digestion)

3.6.9 Oilbath Digestion

Mengde aminosyrer fra den originale mengden protein (L_o) og total aminosyresammensetning i det originale proteinhydrolysatet (L_{max}) ble beregnet ved å bruke metoden Oil bath digestion →

1 gram prøve ble tilsatt 5 ml HCL i store reagensrør og varmet i oljebad i 24 timer.

3.6.10 Trinitrobenzensulfonsyre (TNBS)

Når man skal hydrolysere proteiner er det nødvendig å determinere graden av hydrolyse. TNBS ble benyttet for å beregne spaltede aminosyrer per minutt, som trengs for å beregne hydrolysegrad (%DH). TNBS er en generell metode for å vurdere graden av hydrolyse i proteinhydrolysatet. Det er en spektrofotometrisk metode som måler konsentrasjonen av de primære aminosyregruppene i hydrolysatet. Kromoforet blir formet av en reaksjon med TNBS og primære aminer, der reaksjonen foregår under noe alkaliske forhold og avsluttes med senkning av pH (Adler-Nissen, 1979).

TNBS-metoden ble utført på alle hydrolysat (hode og slofraksjon, bein og skinn, og raffinert avskjær) med tilsatt enzym og uten tilsatt enzym. Metoden ble også utført på prøvematerialet med HCL som hadde gjennomgått oljebad i 24 timer.

0,5 ml prøve tilsettes 0,5 ml TCA (5%). Løsningen sentrifugeres ved 800 rpm i 25 minutter. Etter sentrifugering ble supernatant overført til mikrokopp. 50 µl prøve overføres og tilsettes 50µl av TNBS (5%). Deretter tilsettes 100µl fosfat buffer (pH 8,2). TNBS reagens lages og tilsettes rett før inkubering da reagenset er lyssensitivt.

TNBS starter en reaksjon med de primære aminene i løsningen. Løsningen inkuberes deretter ved 50 grader i 30 minutter. Etter inkubering tilsettes 100µl sodium sulfitt for å stoppe reaksjonen. Absorbansen i løsningen måles spektrofotometrisk ved 420 nm.

3.6.11 Molekylvektfordeling

Molvektsfordelingen til peptider i frysetørket sildehydrolysat ble bestemt ved bruk av gelfiltrering. Det ble brukt Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) med kolonne Superdex Peptide 10/300 GL. Academic Edition Äkta FPLC hadde en deteksjonslengde på 280 nm. Ved de ulike FPLC-kjøringene ble 0,05M sodium acetat buffer ved pH 5 benyttet under mobil fase.

0,1 g av hydrolysat ble løst i 4 ml sodium acetat buffer (filtrert gjennom 0,2µm filter). Prøvene ble filtrert (0,2µm) før injisering av 1 ml i kolonnen.

Hydrolyse av proteiner vil gi peptider av ulik størrelse i hydrolysatet. Det ble kjørt gelfiltrering for ulike standarder. Oversikt over de to standardene som ble benyttet og molvekt er gitt i tabell x.

Tabell 7 Oversikt over molekylvekten til standardene aprotinin og B₁₂ som benyttes til deteksjon av peptidenes molekylvekt (kDa). (Talmard *et al.*, 2007)

<i>Standard</i>	<i>Molekylvekt (kDa)</i>
<i>Aprotinin</i>	6,5
<i>B₁₂</i>	1,4

3.6.12 Bestemmelse av total aminosyresammensetning i frysetørket hydrolysat for hode og slo

Analysen ble utført ble av Raza Slizyte fra Sintef Ocean. Den totale aminosyreprofilen i de frysetørkede hydrolysat fra hode og slo-fraksjon ble analysert ved hjelp av et HPLC system (Agilent Infinity 1260, Agilent Technologies). Koblet til en postkolonne derivatiseringsmodul (Pinnacle PCX, Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA) ved bruk av nynhydrin (Trione) som derivatiserende reagens og Na⁺-ion utvekslingskolonne (4,6 * 110 mm, 5µm)

HPLC-systemet var koblet sammen med 18 standard aminosyrer, samt ammonium og taurin, som ble kvantifisert fra standardkurver og målt med aminosyrestandarder. Prøvene ble filtrert ved bruk av mikrofilter, der pH ble justert til 2.2. Prøvene ble videre fortynnet med citratbuffer (pH 2.2) for HPLC analysen. Alle reagenser, buffere, aminosyrestandarder og kolonnen er gitt fra Pickering Laboratories (Mountain View, CA, USA) HCL og merkaptoethanol kom fra Sigma-Aldrich.

4. Resultat og diskusjon

4.1 Case 1: Gjennomføring av prosess og analyser for sildehydrolysat

Etter mottatt sildehydrolysat fra Pelagia's normale produksjon ble membranfiltrering og frysetørking utført ved Kalvskinnet, NTNU. Fryselagret sildehydrolysat ble tint og deretter fortynnet med 1:2 fortynning på grunn av tykk konsistens som skyldtes høyt tørrstoffinnhold. Fraksjonering ble utført med ultrafiltrering ved 150 kDa og 4 kDa. Membranfiltreringen ble gjentatt to ganger, først med keramisk filter, 150kDa/MWCO og så med polymer membran, 4kDa/MWCO. Dette resulterte med 4 ulike fraksjoner (A)Sildehydrolysat, (B) Retentat >150 kDa, (C) Retentat>4 kDa og (D) Permeat<4 kDa. Sildehydrolysat og fraksjoner ble senere analysert med hensyn protein, lipid, molekylvektfordeling og aminosyresammensetning, samt ACE-hemmende effekt.

4.1.1 Fraksjonering av sildehydrolysat ved ultrafiltrering

For å unngå opphopning av fett og store molekyler i polymer-filteret ble det utført grovfiltrering med keramisk membran (UF), ved 150 kDa/MWCO. Dette ble gjort for fjerne de største molekylene, samt fett og større proteiner. Filtrering med polymer-membran hadde mindre porestørrelse (4 kDa/MWCO), og er derfor dårligere egnet for større molekyler. Grovfiltrering resulterte i et permeat og et retentat. Retentat er fraksjon B (retentat > 150 kDa). Permeatet ble videre filtrert, denne gang ved bruk av polymer-membran, MWCP 4 kDa. Som resulterte i to nye fraksjoner, retentat (C)> 4kDa og permeat < 4kDa

4.1.2 Fett- og proteininnhold.

Tabell 8: Målt (%) fett- og proteininnhold for sildehydrolysat samt fraksjoner etter membranfiltrering.

	(A)Sildehydrolysat	(B)>150 kDa	(C)>4 kDa	(D)<4 kDa
% Lipidinnhold	13,8	20,5	1,1	0,5
% Protein	3,5	4,9	2,9	0,1

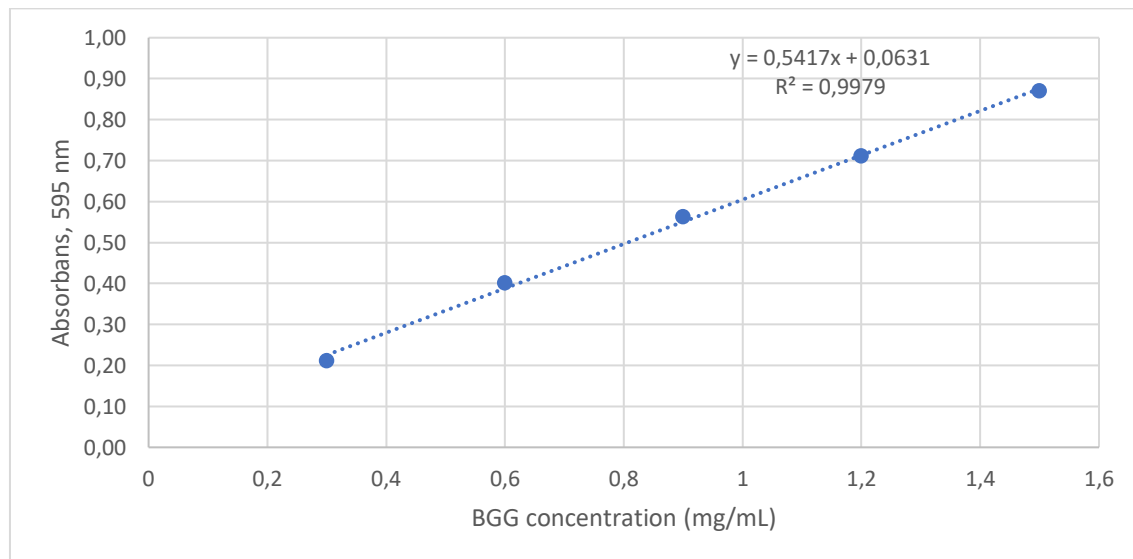
Siden sildehydrolysatet hadde et svært høyt fettinnhold fra starten av ble en stor mengde av fettprosenten oppsamlet i fraksjon B (20,5 %) som vist i tabell 8. Dette var et uventet høyt resultat. Med tanke på at det er ønskelig å ha et fettinnhold på under 0,5 % i FPH fra fisk (Šližytė, Rustad og Storrø, 2005). Under den keramiske filtreringen vil mesteparten av fett oppkonsentreres i retentatet siden fettmolekylene er for store til å komme gjennom membranen. Noe som er årsaken til høyest fettinnhold i (B) > 150 kDa. Filtreringsprosessen gikk noe fortere ved skifte til polymer-membran (MWCO 4 kDa). Sildehydrolysatet(A) hadde også et høyt fettinnhold, sammenlignet med andre FPH som generelt skal inneholde mindre enn 5 % fett(Kim *et al.*, 2016b). Fettmolekyler skal teoretisk sett filtreres bort ved UF > 150 kDa, likevel ble det målt et lavere fettinnhold i fraksjon (C)> 4 kDa og fraksjon (D)> 4 kDa.

Flere faktorer kan påvirke hva som transporteres gjennom membranfilteret(permeat) og hva som ikke transporteres gjennom(retentat). Som nevnt i avsnitt 2.5 vil tettheten eller porestørrelsen på membranfilteret påvirke retensjonen i hydrolysatet, spesielt når man benytter UF. Som vist i figur 4, avsnitt 2.5 holder UF tilbake store molekyler som blant annet makro molekyler, proteiner og organiske mikropartikler og har en avvissingsgrad på 95-100 % (Fellow, 2017). Det er derfor 5 % sjanse for at fett og større molekyler kommer seg over membranen.

Det var forventet at proteininnholdet i de fire prøvene var høyt, siden tørrstoff av FPH generelt inneholder mellom 81-93 % protein(Kim *et al.*, 2016b) . I tabell 8. ser man at

alle prøvene har veldig lave proteinverdier. Binding av fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 har dårlig effekt på små proteiner, spesielt har fargestoffet hatt dårlig virkning på aminosyrer som histidin, lysin, tyrosin, tryptofan og fenylalanin. Biorad virker av den grunn bedre på løsninger med større proteiner. Metoden Lowry kan derimot gi en grundigere informasjon om mindre fraksjonerte proteiner (Lucarini og Kilikian, 1999) Ved videre arbeid anbefales derfor å benytte Lowry metode, da den ses som bedre egnet for deteksjon av mindre proteiner.

Høyest konsentrasjon av vannløselige proteiner ble målt i retentat (B). Dette var forventet da pore størrelsen i den keramiske membranen (MWCO 150 kDa) påvirker retensjonen til å holde tilbake større molekyler. Likevel er det noen mindre proteiner som har blitt filtrert over til (C) > 4 kDa, og noe mindre til fraksjon (D).



Figur 18: Standardkurve for bestemmelse av vannløselige protein i hydrolysat fra sild, samt de tre fraksjonene.

Standardkurven til protein er gitt i figur x. som viser at det er god korrelasjon mellom målt absorbans og standardkonsentrasjon av bovint gamma globulin, og man kan derfor stole på analyseresultatene.

4.1.3 Bestemmelse av ACEI-inhiberende effekt i fraksjoner fra sildehydrolysat.

Frysetørket sildehydrolysat ble testet for ACEI- aktivitet for (A) sildehydrolysat, (B) >150 kDa, (C) >4 kDa og (D) <4 kDa under oppholdet i India.

Tabell 8: Oversikt over ACEI-resultatene fra India. (%) ACEI-effekt ble målt i fortynningskonsentrasjoner 5,0, 7,5, 10, og 15 µg/µl for de ulike fraksjonene, samt sildehydrolysat.

Fortynning [µg/µl]	(A) Sildehydrolysat	(B) >150 kDa	(C) >4 kDa	(D) <4 kDa
5,0	98,02	86,06	78,02	84,30
7,5	79,68	47,41	81,44	55,78
10	45,76	88,27	82,98	26,26
15	84,30	-	-	83,3

Når man tilsetter en høyere konsentrasjon av peptider, skal man få mindre ACE-aktivitet og derfor økt ACEI-effekt. Ut ifra resultatene i tabell 9. stemmer det med at lavest fortynning (5,0) gir høyest (%) ACEI i de fleste prøver. Resultatene fra metoden til Cushman og Cheung (1971) i India ga en høy ACEI (%) i alle prøver. Absorbansverdiene

hadde likevel ingen god korrelasjon med konsentrasjonene. Som kan skyldes dårlige absorpsjonsverdier, men også dårlig separasjon av ACEI under UF.

På grunnlag av at analysen ble utført med bruk av en teoretisk kontrollverdi og uten bruk av paralleller er resultatene til å stole på. For å oppnå sikre verdier for ACEI var det ønskelig å utføre analysen en gang til, denne gang med paralleller og kontroll.

4.1.4 Oppkonsentrering av ACEI-peptider ved bruk av UF

UF-membraner kan bidra til å øke ACE-inhiberende effekt i FPH ved å separere og oppkonsentrere de ønskede peptidene etter størrelse (kDa). Peptider med lav MW viser til høyere ACEI sammenlignet med peptider med høy MW. Ifølge Pan et al. (2012) består ACEI-peptider generelt av dipeptider og pentapeptider med MW 0,15- 0,80 kDa (Pan et al., 2012). Med tanke på dens lave molekylære størrelse og vekt er UF en gunstig metode for å fraksjonere og oppkonsentrere peptidene med denne størrelsesordenen med hensyn til ACEI.

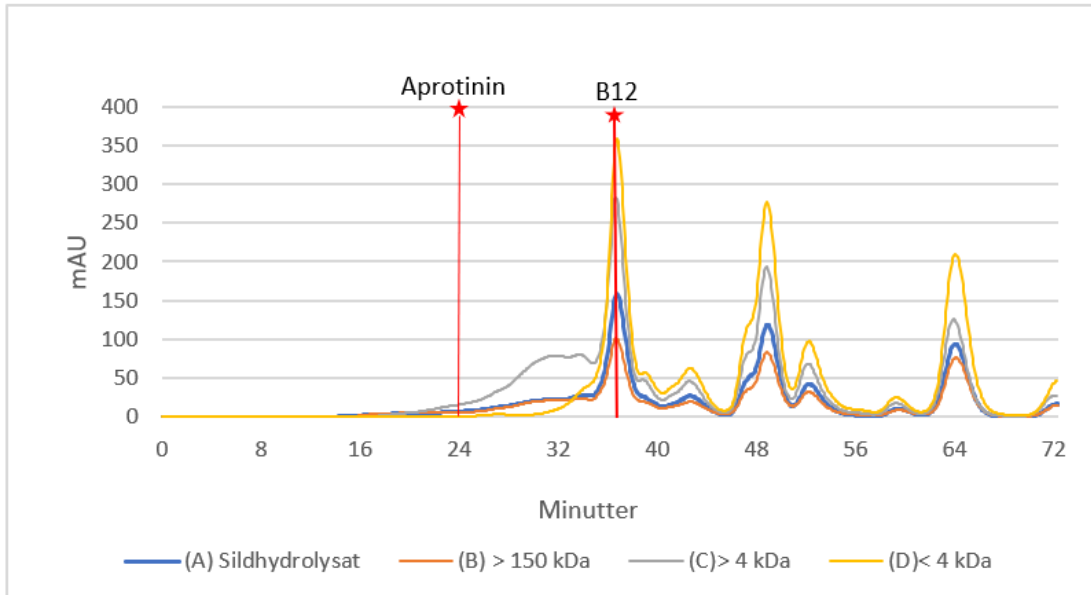
Siden ACEI-peptider er små peptider med lav MW var det forventet av høyest konsentrasjon av ACEI ville være i fraksjon (D). Ved konsentrasjon 7,5 og 10 ser det likevel ut som det er minst ACEI i denne fraksjonen. En av grunnene til dette kan være dannelse av fouling i membranen. Som nevnt tidligere kan dette forårsakes av fett, polysakkarider, proteiner og andre molekyler og bidrar til å redusere gjennomtrengeligheten i membranen. Høyt lipidinnhold kan ha ført til opphopning av både store og mindre molekyler, deriblant ACEI både i fraksjon (B) og (C).

Membranfilterets trykk påvirker gjennomstrømningen av peptider, spesielt peptider med høy molekylvekt (MW). Ved høyt trykk kan det forekomme polarisering av molekyler som bidrar til dannelse av et kompakt viskøst lag (fouling), som fungerer som en sekundær dynamisk membran. Fouling bidrar til økt retensjon og redusert gjennomstrømning i membranen (Chabeaud et al., 2009). Under kjøring av ultrafiltrering ble det benyttet et trykk på 3 bar.

Urent filter bidrar til redusert gjennomstrømning av molekyler og forårsaker opphopning i retentat. En vaskeprosedyre av membranfiltreringsystemet er derfor nødvendig for å opprettholde god gjennomstrømning i membranen. Vaskeprosedyren som ble brukt under membranprosessen er etter leverandørens anbefalinger som vist i vedlegg A (Membrane Systems, 2016). Det ble benyttet 3-trinns vaskeprosedyre (CIP 1) som innebærer rengjøring med lutvask og skylling med vann før og etter lutvask. Vaskeeffekten bidrar til å løse opp proteiner, polysakkarider og andre organiske komponenter som kan ha forurenset membranen. Siden det ikke var noen intensjoner om å forbedre de sensoriske egenskapene i hydrolysatet var det heller ingen behov for grundigere vaskeprosedyre. Det ble likevel observert en noe langsommere membranfiltreringsprosess.

Det ble ikke dokumentert bedre ACEI-aktivitet ved ultrafiltrering i de tre fraksjonene, sammenlignet med sildehydrolysat som ble målt til å være høyest. I studien Raghavan og Kristinsson (2009) fikk lignende resultat da de sammenlignet ACEI i fraksjonene > 30 kDa, 10-30 kDa og <10 kDa. Studien konkluderte med at det ville være mest økonomisk gunstig å utnytte FPH sitt fulle bioaktive potensial uten membranfiltrering (Raghavan og Kristinsson, 2009).

4.2.5 Molvektsfordelingen i sildehydrolysat, samt de ulike fraksjonene



Figur 19: Kromatogram fra gelfiltrering av sildehydrolysat, samt fraksjon (B), (C) og (D). Aprotinin og B₁₂ er benyttet som standarder. Kromatogrammets y-akse viser målt absorbanse i enheten mAU, x-akse viser hvor mange minutter molekylene bruker gjennom kolonnen (0,5ml per minutt).

Molvektsfordelingen til peptidene i sildehydrolysat, retentat og permeat ble analysert ved bruk av gelfiltrering med FPLC. Under gelfiltreringen ble peptider med lav molvekt filtrert inn i kolonnens stasjonære fase. Peptider med høy molvekt kommer ikke inn i kolonnens gelporer og vil derfor eluere raskere gjennom enn peptider med lav molvekt. Kolonnen Superdex Peptide 10/300 GL separerte peptidene med en molvekt fra 0,1- 7 kDa. Peptider med molvekt utenfor dette området vil derfor gi usikkert resultat.

Analysen ble utført for å finne en mulig korrelasjon mellom peptidenes molvekt og ACEI-effekt. Peptidenes størrelse i et hydrolysat vil også påvirke de sensoriske og funksjonelle egenskapene. Dette inkluderer løselighet, bitterhet og biotilgjengelighet. Siden fokuset i denne oppgaven er ACEI-effekt, vil små peptider være av interesse da de har høyest bioaktivitet, deriblant ACEI-effekt.

Det er forventet at peptider i retentat (B) > 150 kDa har høyest absorbanse ved kortere elueringstid, siden retentat (B) består av en oppsamling av store molekyler etter den keramiske membranfiltreringen. Det forventes også at peptider fra det originale sildehydrolysatet (A) har en jevnt fordelt molvektsdistribusjon siden det ikke har gjennomgått noen membranfiltrering og har derfor ikke separert peptidene etter størrelse. I motsetning til fraksjon (D), som er et permeat < 4kDa. Her forventes det en høyere konsentrasjon av peptider med lavere molvekt. For å estimere størrelsen til peptidene ble retensjonstiden til prøvene sammenlignet med retensjonstiden til to standarder med kjent molvekt. Standardene aprotinin (6,5 kDa) og B₁₂ (1,4 kDa), som har en retensjonstid på 37,1 (B₁₂) og 24,2 (aprotinin) minutter. Siden ingen av prøvene viste seg å ha topper nær aprotinin (6,5 kDa) ses det ikke nødvendig å diskutere området for denne standarden.

Fem fremtredende topper ble detektert i kromatogrammet for (A) sildehydrolysat, (B) > 150 kDa, (C) > 4kDa og (D) < 4 kDa. Permeat (D) inneholder høyest konsentrasjon av peptider med lav molvekt, men også høyest konsentrasjon av peptider med høyest molvekt (ca. 1,4 kDa).

Alle fraksjonene, samt det originale sildehydrolysatet har høyest konsentrasjon av peptider på størrelse med B₁₂ (1,4 kDa). Toppene fortsetter med økt retensjonstid som vil

si at alle prøvene inneholder peptider med en molvektsdistribusjon fra 1,4 kDa og lavere. Molekylvekt-distribusjonen til peptidene i sildehydrolysat er jevnt fordelt, i likhet med retentat (B). (A) og (B) viser til lavest konsentrasjon peptider sammenlignet med permeatene (C) og (D). Permeat (D) inneholdt høyest konsentrasjon av peptider, både med lav og høy molvekt. Membranfiltreringen har derfor hatt størst oppkonsentrering av peptider i denne fraksjonen, som er forventet. Dette indikerer også på at fraksjon (D) inneholder høyest konsentrasjon av ACEI-effekt, som støttes av resultatene til Pan et al. (2012) som beskrev ACEI-peptider til å være av molvekt rundt 0,15-0,80 kDa. Resultatene fra målt % ACEI-effekt i tabell 9. ble likevel målt til å ha høyest effekt i det originale sildehydrolysatet.

Siden membranfilteret med lavest porestørrelse var på <4 kDa og den høyeste målte molvekten er på 1,4 kDa, hadde det vært gunstig å filtrert permeatet til lavere porestørrelse slik at man kunne ha oppkonsentrert peptidene med lavere molvekt, og dermed oppkonsentrert ACEI-peptider.

Membranenes MWCO vil være avgjørende for hva som befinner seg av molekyler i de ulike fraksjonene. Siden sildehydrolysat ikke er filtrert er finnes det størst variasjon av ulike molekyler her. Fraksjon (B) skal i utgangspunktet bestå av større molekyler som ble avvist av UF ved 150 kDa. Det skal derfor ikke være mye ACEI-innhold i fraksjon (B) (Udenigwe og Aluko, 2012).

4.1.6 Bestemmelse av (%) ACEI for torskehodehydrolysat etter metoden Cushman og Cheung (1971)

Etter oppholdet i India var det kun en begrenset mengde prøvemateriale igjen. Det ble valgt å utføre metoden ved bruk FPH av torskehode som en slags pilot-test. Dette ble gjort for å optimalisere analysen før vi startet med sildehydrolysatet og dens 3 fraksjoner (B>150 kDa, C> 4kDa og D< 4 kDa).

Som vist i vedlegg x. 18 – 21 er det stor variasjon mellom parallellene. ACEI-verdiene har heller ingen samsvar mellom fortynningskonsentrasjonene, da % ACEI skal vise høyere % ACEI ved lave fortynningsverdier. Variasjonen er også høy mellom de forskjellige pilot-testene som ble utført ved ulik tidsperiode, likevel om alle ble utført med bruk av samme FPH

Feilkilder til metoden Cushman og Cheung (1971)

For å oppnå pålitelige verdier for metoden ble ulike analyseparametere testet ut for hva som kan ha gått galt under gjennomføring av metoden.

Kvartskyvetter kan måle ulike absorbansverdier. Absorbansmålinger med ionefritt vann viste at de forskjellige kvartskyvettene ga ulik absorbansverdier. Det ble derfor valgt å forholde seg til kun to kvartskyvetter som ga relativt like verdier. En kyvette ble valgt som «referansekyvette» med ionefritt vann, mens den andre ble benyttet som «prøvekyvette». Forskjeller i absorbans for referansekyvetten ble brukt til å justere absorbansverdiene for absorbans av «prøvekyvetten». Disse kvartskyvettene ble benyttet under alle absorbansmålingene.

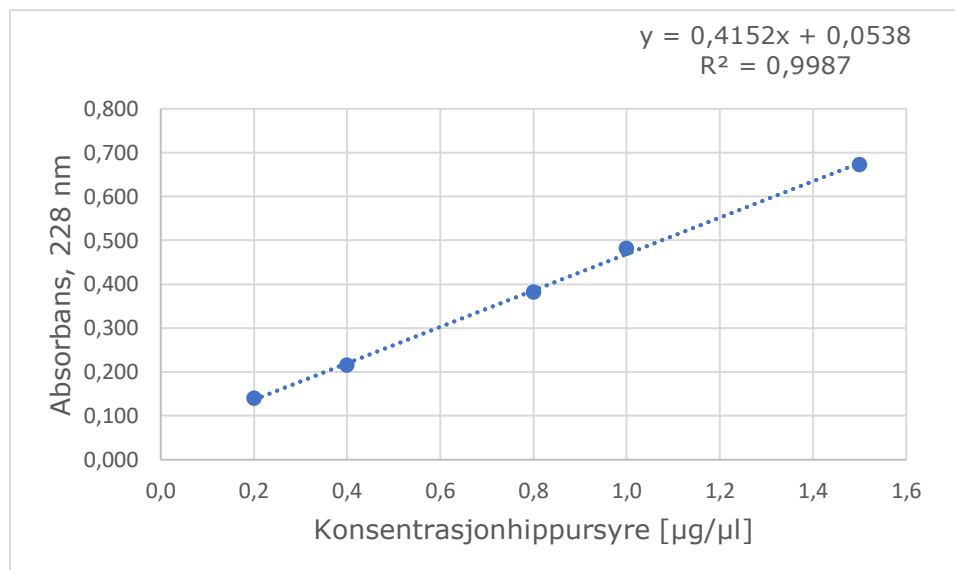
Siden metoden ga så ulike resultater ble holdbarheten til enzymet sjekket. Det viste til å ha gått ut på dato, likevel er det ingen informasjon som tyder på at dette skulle være en feilkilde til at metoden ikke fungerte. For sikkerhetsskyld ble bestilt opp nytt enzym av leverandøren Sigma-Aldrich. Ifølge produktleverandøren Sigma-Aldrich (1998) er det også beskrevet at enzymløsning skal prepareres umiddelbart før bruk. Det ble senere også kjent at substratløsningen (HHL) burde prepareres rett før bruk etter anbefalinger

fra leverandør (SIGMA-ALDRICH, 1998). Holdbarheten til torskkehodehydrolysatet kan også ha påvirket metodens usikkerhet.

Sigma-Aldrich (1998) oppgir gjennom sin brukerinformasjon at forventede absorbansverdier skal ligge mellom 0,4-1,0 etter 20 minutter av ferdig preparerte prøver for hydrolysat. Absorbansverdiene til prøvene var aldri over 0,4. Dette kan tyde på at komponenter i løsningen kan ha påvirket enzymreaksjonen og derfor påvirket dannelse av hippursyre. På grunn av stor variasjon av paralleller ble det valgt å undersøke om det kunne ha noe med hippursyrens løselighet å gjøre.

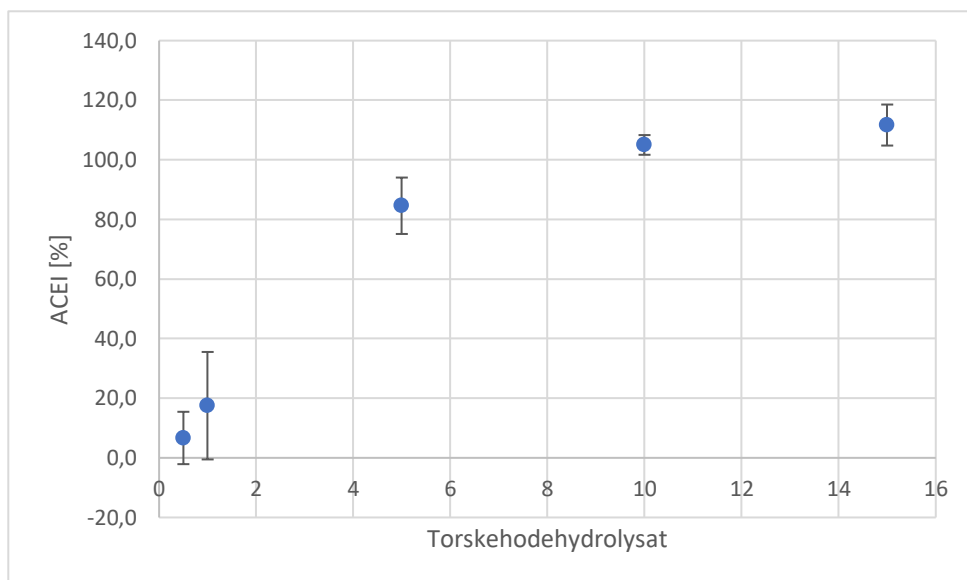
4.1.7 Ekstrahering av hippursyre med etylacetat

Standardkurven viser ekstrahert hippursyre med etylacetat er vist i figur 21 under. Hvis man observerer kurven ser man at standardkurvens nullpunkt ikke går direkte mot null, men ca. til 0,1. Dette tyder på at det ikke bare er hippursyre, men også andre organiske komponenter som har blitt dratt over i etylacetatfasen. Korrelasjonskoeffisienten viser at det er en god korrelasjon mellom absorbansen målt ved 228 nm og hippursyrens konsentrasjon. Det ser derfor ikke ut som om problemet ligger i ekstraheringen av hippursyre.



Figur 20: Standardkurve for ekstrahert hippursyre. Etylacetat benyttes til å ekstrahere tilsatt hippursyre. Metoden er hentet fra Cao et al. (2010).

Under preparering av standardkurvens løsninger ble det også testet om hippursyren ble godt nok blandet inn med etyl acetat før etylacetatfasen ble overført til glassrør og satt i varmeblokk. Det ble valgt å blande hippursyreløsningene i ett minutt per prøve med whirl mixer før sentrifugering, slik at hippursyren ble godt blandet inn med etylacetat før ekstraksjon. Siden standardkurven viste gode resultater ble det valgt å utføre metoden en gang til med samme FPH som tidligere. Analysen ble utført av Medstudent Alexandra Stensen. Denne gangen ga metoden godt resultat, der % ACEI øker tydelig med økt mengde peptider. Godkjente resultater for %ACEI i FPH av torskkehode er vist i figur 22.



Figur21: (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0.5, 1.0, 5.0, 10 og 15 for torskehodehydrolysat.

4.1.8 Frysetørking

For å kunne transportere råmateriale på best mulig måte ble det valgt å frysetørke sildehydrolysat samt de ulike fraksjonene etter membranfiltrering. Etter frysetørkingen hadde FPH-fraksjonene oppnådd pulverform. Man kunne tydelig se at jo mer fraksjonert råstoffet var jo klebrigere ble konsistensen. Noe som kan



Figur 19: Visuelt bilde av frysetørket sildehydrolysat og de ulike sildfraksjonene etter membranfiltrering.

De fire ulike fraksjonene var av både ulik farge og lukt. Det ble også observert en «klissete» konsistens for fraksjon C og D. Det kan være mange årsaker til dette, men likevel er det vanskelig å si akkurat hvorfor. Det kan være fukt, en eventuell oppkonsentrering av fett eller at små molekyler som reagerer ulikt fra når de er blandet med større molekyler.

4.1.9 Konklusjon og forslag til videre arbeid for case 1

Sildehydrolysat (A) ble målt til å ha den høyeste ACEI-effekten. Resultatet motstrider med teorien om at ACEI-effekt er høyest målt i små peptider med lav MW (0,15 -0,80 kDa). Det var derfor forventet høyest konsentrasjon av ACEI i fraksjon (D). Molvektsfordelingen gitt i figur 18 bekrefter også at fraksjon (D) har høyest konsentrasjon av peptider med lav molvekt. Resultatene som ble analysert i India blir derfor sett på som feilaktig. Dette ses også som meget sannsynlig siden analysering av % ACEI på FPH av torskehode i Norge ga veldig ustabile resultater.

Keramisk- og polymer membran ved UF fungerte bra med tanke membranfiltrenes størrelse (MWCO>150 kDa og MWCO<4 kDa) og utvinning av bioaktive peptider med ACEI-hemmende effekt. Likevel om fraksjoneringen ikke ble 100 %, da fraksjon B og C fortsatt bestod av en god del mindre peptider. Dette skyldes mest sannsynlig fouling på membranen grunnet høy konsentrasjon av fett i sildehydrolysatet. Ved videre arbeid med membranfiltrering anbefales det derfor å sentrifugere hydrolysatet før membranfiltrering, spesielt hvis det inneholder mye fett da dette skaper fouling som bidrar til dårligere fraksjonering av marine peptider.

Til videre arbeid anbefales det å beregne og veie fraksjonene man får ut av membranfiltreringsprosessen slik at man i tillegg til de kjemiske analysene kan analysere massefordelingen til sildehydrolysatet. Det anbefales også å analysere molvektsfordeling og hydrolysegrad før og etter membranfiltrering for å få en bedre karakterisering over størrelsene på peptidene i hydrolysatet. Slik at man kan sammenligne og bekrefte at de minste peptidene faktisk ble separert.

Siden dette er bioaktive peptider som potensielt skal benyttes til humant konsum er det essensielt at produktet har sensoriske egenskaper som blir godkjent av markedet. I tillegg er det gunstig at det produseres i store mengder volum, noe som hadde vært vanskelig å få til ved mindre porestørrelse enn 4 kDa MWCO. Man kunne likevel ha redusert porestørrelsen til 2 kDa MWCO for å få en enda høyere konsentrasjon av peptider med ACEI-effekt etter filtrering med 4 kDa MWCO.

4.2 Case 2: Prosess og analyser for restråstoff fra surimiproduksjon

4.2.1 Karakterisering av surimiråstoff

Tabell 9: Karakterisering av surimiråstoff, der tørrvekt, protein, fett og aske er beregnet fra råstoffet(våttvekt)

	Tørrvekt (%)	Protein (%)	Fett (%)	Aske (%)
Hode og slo	21.4	12,5	1,5	7,0
Skinn og bein	17.3	9,5	0,3	7,3
Raffinert avskjær	15.4	12,1	0,5	3,0

Karakterisering av homogenisert og tørket råstoff ble utført med hensyn til hode- og slofraksjon, skinn- og beinfraksjon og fra raffinert avskjær. Resultatene for tørrvekt, protein, fett og aske er oppgitt i (%) og vist i figur 9.

Siden Pink Perch er en mager fiskeart vil et lavt fettinnhold være forventet. Fettinnholdet i hode- og slofraksjon ble målt til å være høyest. Dette var forventet da fiskeslo inneholder mer fett enn de andre råstoff fraksjonene. Skinn og bein består av mye mineraler og har derfor høyest % aske.

Proteininnholdet ble målt til å være høyest for hode- og slofraksjon (12,5%), men også raffinert avskjær (12,1) hadde ca. samme proteinverdi. Resultatene er forventet da

raffinert avskjær består av en god del avskjær samt bindevev og finere bein som inneholder mye proteiner. Også viscera inneholder en god del proteiner, sammenlignet med skinn og bein som har størst innhold av mineraler som vist i tabell 2 i avsnitt 2.2.

Målt proteininnhold er likevel noe lavt da mengde fiskeråstoff generelt inneholder ca. mellom 18-20 % protein (Lilly, Immaculate og Jamila, 2017). Studien D.P Sen (2005) har målt proteininnholdet til surimifisken Pink Perch til å være 13,8 %, som er noe høyere enn funnene fra fraksjonene som ble analysert fra surimiråstoffet fra Kaiko, India (Sen, 2005). En annen studie fra Singh og Balange (2005) målte proteininnholdet i Pink Perch til å være 17,7 % (SINGH og BALANGE, 2005).

For beregning av proteinkonsentrasjon i restråstoff-fraksjonene ble Dumas metode brukt. Metoden er en indirekte måte å beregne proteinkonsentrasjonen på, da det er detektert nitrogeninnhold i råstoffet som benyttes for å beregne protein. Metoden bruker konverteringsfaktoren 6,25 som antar at det generelle nitrogeninnholdet i råstoffets proteiner er 16 %, og at nitrogenet er proteinbundet. Siden det relative nitrogeninnholdet varierer mellom aminosyrer og aminosyresammensetningen i proteiner, kan metoden estimere feil. I tillegg kan råstoffet inneholde forbindelser som nitrat, ammoniakk, urea, nukleinsyrer og frie aminosyrer (Mæhre *et al.*, 2018). Siden Dumas-metoden måler det totale nitrogen innholdet, inkludert den uorganiske fraksjonen, kan Dumas-metode være noe unøyaktig hvis råstoffet inneholder nitrater (Chang og Zhang, 2017).

Surimiråstoffet ble mottatt i surimifabrikken og transportert ubehandlet videre til Mysore uten mye temperaturkontroll underveis. Dette kan ha påvirket forringelsesprosessen i den kjemiske komposisjonen, som kan ha forårsaket nedbrytning av proteiner. I studien Sing og Balange ble også proteininnholdet i Pink Perch ved fryselagring (-20°C) målt i et gitt tidsperspektiv. Etter 4 uker i fryst tilstand hadde proteininnholdet gått ned fra 17,7 % til 16,2 %. Noe som tilsier at proteininnholdet i surimiråstoffet kan ha blitt redusert hvis råstoffet har vært i romtemperatur over lengre tid.

4.2.2 ACE- inhiberende aktivitet for restråstoff fra Kaiko, Mumbai

Tabell 10: Utvalgte hydrolysat fra samme råstoff men med ulike hydrolyseparametere. Analyse av hydrolysegrad (DH) og ACEI-effekt ble utført i India.

Hydrolysat av hode- og slofraksjon	DH (%)	ACEI (%)
Nr. 2: 30, 30, 1,5	20,6	78,0
Nr. 15: 45, 90, 2,5	8,3	93,6
Nr. 26: 60, 150, 1,5	1,1	98,7

4.2.3 Hydrolyseprosessen

For å optimalisere den enzymatiske hydrolysen ble «Response surface» benyttet. Metoden tar utgangspunkt i fremgangsmåten gitt i tabell 5, avsnitt 3.6.5 og ble utført av medstudent Frida Holm Larsen og veileder Dr. Sachindra under India oppholdet. De mest optimale hydrolysebetingelse for restråstoff fra hode og slo ble beregnet til å være ved 30°C i 30 minutter ved 0,5 % enzymkonsentrasjon. Det ble derfor valgt å fortsette analysene i Norge med bruk av dette hydrolysatet fra hode- og slofraksjon

4.2.4 Bestemmelse av hydrolysegrad

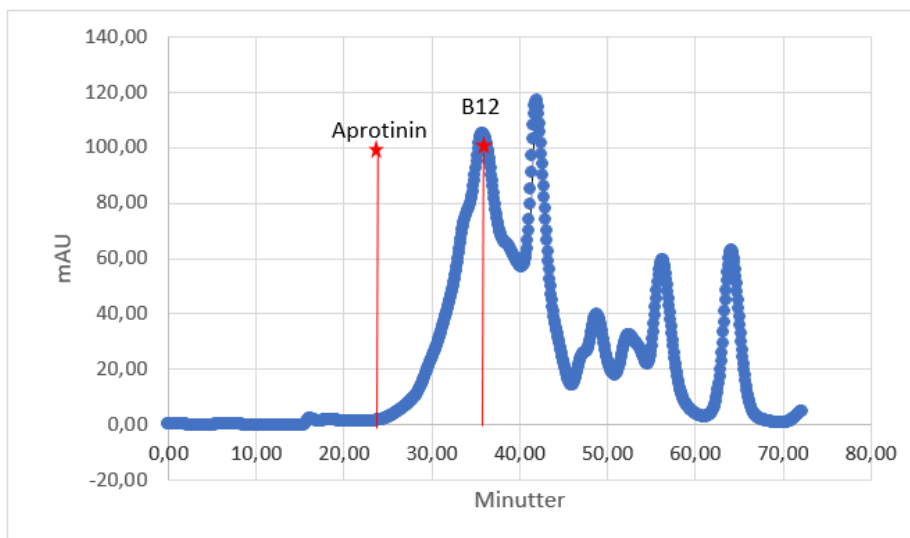
DH sier noe om hvor stor prosentdel av proteinenes peptidbånd som har blitt spaltet og som påvirker hydrolysatets funksjonelle egenskaper. DH på 100 % betyr at hydrolysatet består av 100 % frie aminosyrer (Damodaran, 2017).

Som vist i vedlegg D. ser man at de ulike DH fra de ulike restråstoff-fraksjonene er veldig varierte og mangler sammenheng med gitt temperatur, tid og enzymkonsentrasjon. Da en lengre hydrolysetid vil kunne gi enzymene bedre økt spaltede proteiner og dermed gi økt DH. Si Resultatene er derfor ikke til å stole på. Mest sannsynlig er det noe galt som har skjedd under utførelse av metoden.

Ifølge % DH for hydrolysat nr. 26 ser det ut som hydrolysatet har en veldig lav hydrolysegrad (1,1 %), men likevel et høyt innhold av ACEI (98,7 %). For å kunne fremstille bioaktive peptider med ACEI-effekt må proteiner spaltes til peptider. DH til hydrolysatet har derfor veldig dårlig samsvar til ACEI-effekten til peptidene målt i hydrolysat nr. 26. Ut ifra resultatene i tabell 11. ser man at hydrolysat nr. 2, produsert ved 60°C i 150 minutter med 1,5 % enzym hadde høyest målt ACEI-effekt. DH, som ble bestemt ved bruk av TNBS metode ble likevel målt til å være veldig lavt. Dårlig homogenisering av råstoffet kan gi til lavere hydrolysegrad. Dette kan komme av interferens av beinfraksjoner eller lignende har vært med på å upresist resultat.

4.2.5 Peptidenes molvektfordeling

For å estimere størrelsen til peptidene ble retensjonstiden til prøvene sammenlignet med retensjonstiden til aprotinin (6,5 kDa) og B₁₂ (1,4 kDa). Standardene har en kjent retensjonstid på 37,1(B₁₂) og 24,2 (aprotinin) minutter. Siden ingen av prøvene viste seg å ha topper nær aprotinin (6,5 kDa) ses det ikke nødvendig å diskutere området for denne standarden.



Figur 20: Kromatogram fra gelfiltrering for hydrolysat fra hode og slo. Aprotinin og B₁₂ er benyttet som standarder. Kromatogrammets y-akse viser målt absorps i enheten mAU, x-akse viser hvor mange minutter molekylene bruker gjennom kolonnen (0,5ml per minutt).

Molvektsfordelingen til peptidene ser ut til å ha en MW på 1,4 kDa eller mindre, da de ulike retensjonstidene er gitt ved standard B₁₂ og videre. Høyeste konsentrasjon ser man etter 43 minutter som, som tyder på at høyest konsentrasjon av peptider vil være noe mindre enn 1,4 kDa. Det er også mindre konsentrasjoner av mindre peptider.

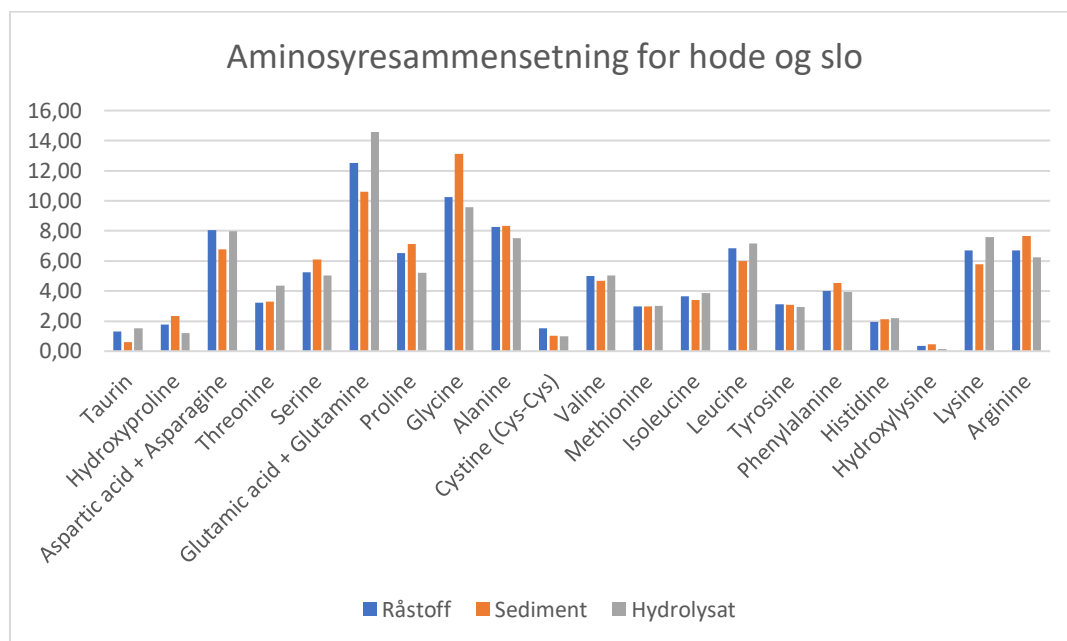
Som nevnt tidligere i avsnitt 4.2.6 har peptider med ACEI-effekt en lav MW, med en molvekt rundt 0,15-0,80 kDa. Ut ifra figur 21. ser det ut som hydrolysatet har peptider med denne MW.

4.2.6 Peptidenes aminosyresammensetning

Etter hydrolyse vil FPH bestå av frie aminosyrer og kortkjedede peptider med essensielle aminosyrer. Aminosyresammensetningen til FPH sier noe om næringsverdien og har innflytelse på hvilke funksjonelle egenskaper hydrolysatet har.

Aminosyresammensetningen til hydrolysatet vil være avhengig av flere faktorer som hvilket råstoff det består av, enzym og andre hydrolysebetingelser som temperatur og tid (Chalamaiah *et al.*, 2012). Distribusjonen av den totale mengden aminosyrer, samt sammenhengen mellom aminosyreinnholdet og ACEI-effekt vil også bli diskutert i dette avsnittet.

Den totale aminosyreprofilen i de frysetørkede hydrolysat fra hode og slo-fraksjon ble analysert ved hjelp av et HPLC system. 18 standard aminosyrer, samt ammonium og taurin ble kvantifisert fra standardkurver og målt med aminosyrestandarder for de tre ulike prøvene. Aminosyrene som ble detektert i hydrolysat, råstoff og sediment er gitt i % aminosyrer i protein, presentert i figur 22.



Figur 21: Aminosyrekomposisjonen (%aminosyrer i protein) for råstoff, sediment og hydrolysat av hode og slofraksjon.

De mest dominerende aminosyrene i de tre prøvene ser ut til å være glutaminsyre og glycin, men også alanin, asparaginsyre har noe høyere innhold enn de andre. Ellers har aminosyrene en veldig uniform fordeling innen råstoff, sediment og hydrolysat. Det ser også ut til at aminosyrefordelingen har en jevn fordeling mellom de råstoff, sediment og hydrolysat.

De 7 essensielle aminosyrene som er nødvendig å få tilført gjennom kostholdet er lysin, leucin, threonin, isoleucin, valin og de aromatiske aminosyrene tryptofan og fenylalanin. Spesielt viktig er aminosyren lysin, som man er avhengig av å få gjennom animalske produkter da det finnes lite av dette i kornprodukter. Alle disse aminosyrene ble det detektert konsentrasjon av i moderate mengder (Aarnes, 2018).

Aminosyresammensetningens betydning for ACEI-effekt

Aminosyrenes sammensetning kan benyttes til å evaluere hvilke aminosyrer som bidrar til å gi best ACEI-effekt for hydrolysatet.

FPH er avhengig av å ha den rette sammensetningen av aminosyrer i peptidsekvensene, samt riktig peptidstørrelse for at peptidene skal kunne utøve ACEI-aktivitet. ACE ser ut til å foretrekke substrater eller inhibitorer med hydrofobe aminosyrer som har forgrenede eller aromatiske sidekjer, spesielt når de er tilstede i de tre C-terminale posisjonene (Vermeirssen, Van Camp og Verstraete, 2004). Det ble målt konsentrasjon av de hydrofobiske aminosyrene alanin, isoleucin, lysin og metionin. Samt konsentrasjon av fenylalanin, tryptofan og tyrosin som er de hydrofobiske aminosyrene med aromatiske sidekjer(SIGMA-ALDRICH, 2019). Hydrolysatet viser derfor potensial til å inneholde ACEI-effekt basert på dens aminosyresammensetning. FPH egnes seg også som kosttilskudd da essensielle aminosyrer er tilstede og som kan være et nyttig tilskudd for de som har et plantebasert kosthold.

4.3 Kvalitative analyseverktøy

Oppgaven har tatt en annen form enn det som i utgangspunktet var planlagt. Dette har medført en del justeringer med tanke på råstoff, prosess og analyser. På bakgrunn av dette ble det valgt å bruke kvalitative analyseverktøy for å få frem de ulike observasjonene og erfaringene som ble tilegnet feltarbeidet, da funnene ses på som et av de viktigere resultatene i oppgaven.

Observasjoner under feltarbeidet i India

Observasjoner og fagstoff innhentet under industriworkshop i Mumbai

Informasjon om surimiproduksjon og innhenting av fiskeråstoff er gjort fra egne observasjoner under feltarbeid, spesielt under omvisningen av Surimifabrikken Kaiko. Informasjon har også blitt innhentet fra fagpersoner, doktorgradstudenter som var tilstede under industriworkshop i Mumbai.



Figur 22: Bildene er tatt fra fiskebåt og fra havnen i Mumbai(Gupta, 2018)

Fangstinnhenting for surimiproduksjon: De fleste fiskebåtene benytter fiskenett som fangstmetode, deretter oppbevares fisken i lasterom fylt med knust is slik at fisken skal kunne være i frossen tilstand for omtrent 15 dager. Ifølge doktorgradstudent Gupta (2018) sorteres de ulike fiskeartene på selve båten og transporteres videre til havnen der det utføres en visuell kvalitetskontroll av fisken. Gjennomsnittlig varer fisketurene i ca. 10 dager. Godkjent fiskelast fraktes deretter i kasser med is som transporteres på kort avstand. Kjøleenheter er installert hvis fisken skal transporteres på lengre avstander. Fiskehoder selges videre til fiskemiddelindustrien og hodekappet fisk selges til surimiindustrien(Gupta, 2018).



Figur 23 Viser det første vaskesteget i surimiproduksjonen hvor en trommel vasker fisken ved bruk av isvann.

Prosessanlegg i surimifabrikk: Fersk fisk ankommer prosessanlegget i fabrikk der fisken veies og sendes til vasking i isvann. Noe av fisken blir hodekappet ved havnen, mens noe blir hodekappet i fabrikk. Hvilke prosessparametere som gjelder varierer ut fra hvilke fiskearter som brukes i produksjonen. Første prosessstrinn er å vaske fisk gjennom en roterende trommel (figur 24). I løpet av dette trinnet vil skjellene separeres bort. Det tenkes at det er kun 30 % av vaskevannet som gjenbrukes til neste vasketrinn (Gupta, 2018).

Videre blir fisken fraktet med et transportbånd til neste vask som fungerer på samme måte. Dette gjøres for å sikre god produktkvalitet og for å kunne fjerne mest mulig fiskeskjell før skinn og bein separeres bort. Fiskeskjellene som gjenvinnes benyttes videre til produksjon av mineraler og kollagen. Skinn og bein fjernes mekanisk ved bruk av ekstruderingskraft og sendes ut gjennom små hull i tanken ved rotasjon. Skinn, bein og blod sendes ut med transportbånd som restråstoff. Det resterende produktet som er igjen er utvannet fiskekjøtt.

For å unngå harskning og misfarging i sluttproduktet tilsettes 3 % saltløsning som fjerner fett. Videre tilsettes kjøttet salt og kalsium som bidrar til vannfjerning. En fjerde vask skjer ved bruk av en roteringsmaskin som skiller ut partikler som bindevev og finere bein og som til slutt ender opp som *raffinert avskjær* (som er en av de tre fraksjonene som ble vurdert i denne oppgaven).

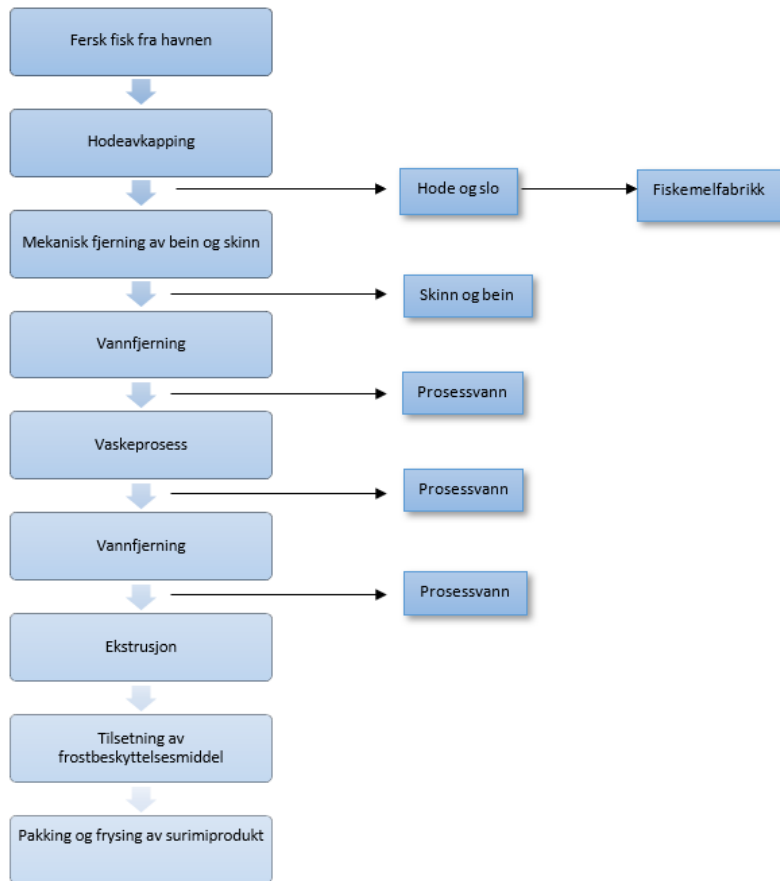
Neste steg i prosessen dehydrerer og reduserer vanninnholdet til 80 % ved ekstrudering. Fiskekjøttet blandes med 6 % sukker og 0,3 % natriumtripolyfosfat som fungerer som et frostbeskyttelsesmiddel. Ferdig surimiprodukt er en 10 kg av blokk fiskeprotein. Produktet sendes videre til kvalitetskontroll hvor mikrobielle og kjemiske analyser utføres, som for eks. gelstyrke, vanninnhold og hvithetsgradering. Godkjente produkter fryses ned til -40 °C, i 90-120 minutter, for å oppnå en kjernetemperatur på -18°C. Surimiblokker sendes videre til metalldeteksjon, pakkes i kartonger og lagres ved -22°C. Surimiprodukt har en holdbarhet på ca. 2 år (Gupta, 2018).

Tabell 11: Viser de ulike variantene av restråstoff og produkt, samt mengde produsert produkt per år (Gupta, 2018).

Produkt	Mengde (tonn per år)
Fiskeskjell	220-308
Fett	88-132
Skinn og bein	924-1012
Surimi	1848-1970

Surimiproduksjon genererer store mengder restråstoff som viscera, hode, filet-avskjær, skinn og bein, raffinert avskjær og ikke minst prosessvann fra de ulike vasketegene. Surimiproduksjonens prosessvann blir frigjort under de ulike vasketrinnene ved produksjon av surimi som vist i figur 25. Det estimeres at det produseres rundt 20 liter prosessvann per time. Dette tilsvarer en total produksjon på 20 tonn per dag. Som nevnt tidligere er det kun en liten mengde prosessvann som gjenbrukes (Gupta, 2018).

Figur 27: Flytdiagram over de ulike prosesstrinnene ved produksjon av surimi, observert i surimifabrikken Kaiko, Mumbai.

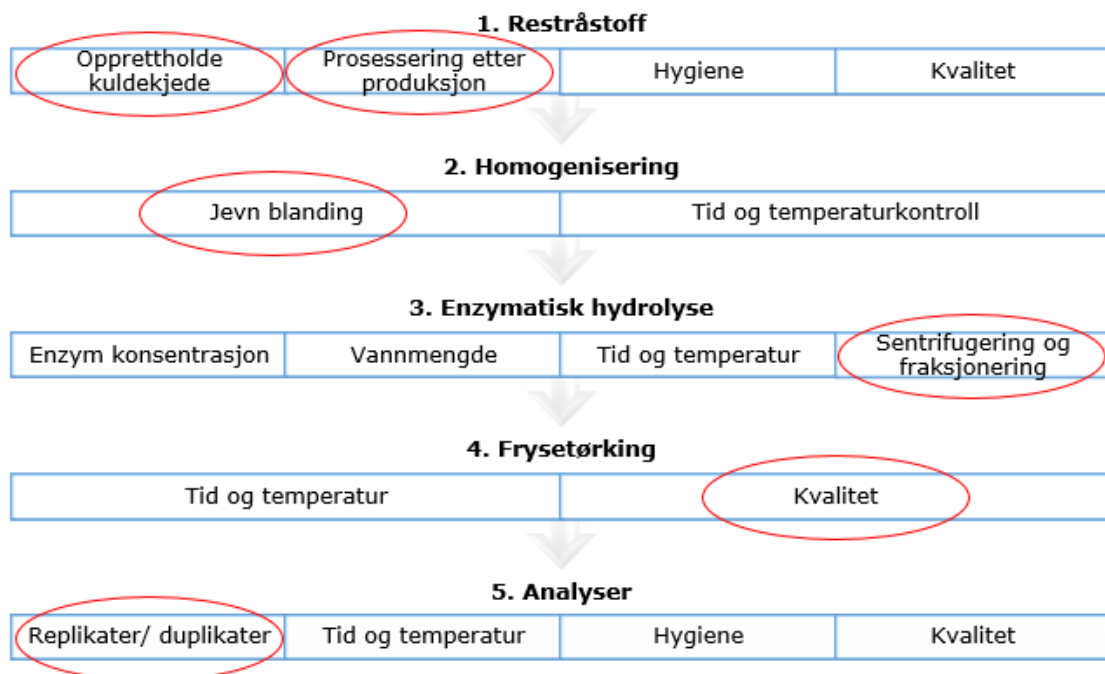


Observasjoner fra laboratoriearbeid

Som nevnt ovenfor var det flere utfordringer knyttet til feltarbeidet i India. Det har blitt valgt å legge vekt på felt- og laboratoriearbeid knyttet til surimiråstoff, da mesteparten av alle observasjoner og arbeid er relatert til surimiråstoffet, sammenlignet med sildehydrolysatet der mesteparten ble gjort i Norge som vist i figur 7. i avsnitt 3.1.

Hode og slo, skinn og bein, samt raffinert fiskeavskjær av Pink perch, *Nemipterus sp* fra surimifabrikken Kaiko i Mumbai, India ble undersøkt. Dette var restråstoff som oppstod under fabrikkens normale produksjon. Senere ble restråstoff-fraksjonene sendt til CFTRI, i Mysore hvor det ble utført homogenisering, enzymatisk hydrolyse samt karakterisering av peptidsammensetning i råstoffet. Før det senere ble frysetørket for videre analyser i Norge.

Målet var å vise en effektiv konvertering av restråstoff til peptider med fokus på ACE-inhiberende effekt. I den ideelle prosessen (figur 25) er gjennomføringen delt opp i 4 overordnede prosesstrinn. Prosessen starter med beskrivelse for fangst av fisk, produksjon av restråstoff og til utførelse av analyser for råstoff og hydrolysat. Figur 25. er gitt nedenfor med sirkel rundt de kritiske prosess-trinnene. Siden proteinfraksjonen potensielt skal utnyttes til humant konsum, av det formål av å oppkonsentrere ACEI-effekt er det strenge restriksjoner i forhold til sortering, lagring og håndtering av restråstoffet (Carvajal *et al.*, 2015). Prosesstrinnene blir videre diskutert.



Figur 8: viser den ideelle prosessen, der de kritiske prosesspunktene er sirklet med rød farge.

1. Fiskefangst - Produksjon av restråstoff:

Ansvar for marin råstoffkvalitet starter allerede hos de som håndterer fisken rett etter fangst, ombord i fiskebåten. Mange faktorer påvirker kvaliteten av landet fisk. De hygieniske forholdene under oppbevaring, vannkvalitet og kvantitet, temperaturforhold der fisken blir oppbevart, den generelle håndteringspraksisen og renhet av utstyr som blir brukt under håndtering er alle faktorer som vil påvirke råstoffets kvalitet. De første kritiske prosesstrinnene tar for seg «oppretholdelse av kuldekjede» og «prosessering etter produksjon» som to kritiske faktorer. I artikkelen «Adoption of Hygienic Fish Handling Practices by Fishermen» (2016) tar forfatterne for seg indiske data om fiskermenn og deres hygieniske forhold under fangsthåndtering om bord i båt. Av de 10 praktiserende båtene som ble vurdert var det ingen rutiner for å vaske fisken etter fangst. Det var likevel 96,2 % som benyttet is under oppbevaring, 77,5 % benyttet emballasje for oppbevaring og 60,8 tenkte på personlig hygiene (Singh *et al.*, 2016). Det er ingen utførte målinger for hygiene gjort på båtene som fisket råstoffet til surimifabrikken, fiskekulturen kan likevel være lik for flere fiskebåter langs kysten av India.

Restråstoffet fra surimifabrikken hadde en lang reisetid før det ankom CFTRI i Mysore, der det ble videre prosessert. Dette kan ha medført ytterligere forringelse og degradering av råstoffet. Restråstoff kan deles inn i (a) lett degraderbart restråstoff, eller (b) relativt stabilt restråstoff. Gruppe (a) inkluderer fraksjoner som inneholder et høyt nivå av ulike endogene enzymer. Som for eksempel innvoller og blod. Gruppe (b) tar for seg restråstoff som er mer stabile, som for eksempel hode, skinn og bein (Rustad, Storrø og Slizyte, 2011).

Råstoffet fra hode og slo går under gruppe (a) som gjør råstoffet er mer utsatt for forringelse og degradering på grunn av et høyere nivå av endogene enzymer sammenlignet med fraksjonene skinn og bein og raffinert avskjær. På grunn av den relativt høye enzymatiske aktiviteten vil lipider raskt degraderes, selv ved en inntakt kjølekjede. Degradering ved proteolytiske enzymer kan også gi redusert molekylvektfordeling av proteiner (Rustad, Storrø og Slizyte, 2011).

Bakterier kan også forurense utstyr eller forurense råstoffet ved menneskelig håndtering. Noe som kan bidra til forringelse og dermed redusert holdbarheten på råstoffet. Det er derfor viktig å prosessere restråstoffet med en gang ved surimi produksjon for å forsikre seg om opprettholdelse av god kvalitet i råstoffet.

2. Homogenisering og inaktivering av endogene enzymer:

Homogenisering av restråstoffet involverer å redusere størrelsen til partikler tilstede i råstoffmateriale. Et godt homogenisert råstoff er essensielt for å kunne gi enzymet best mulig tilgang til peptidbindingene(substratet). Når råstoffet er homogenisert vil proteinene være mer tilgjengelig/ha større overflate mot løsningen med enzym, enn hvis blandingen hadde vært av heterogen konsistens. Som vist i figur 28 ser man at blandingen etter homogenisering ikke er 100 % homogen. Noe som kan ha medvirket til dårlig hydrolysegrad av proteinene.



Figur 29. Homogenisering av restråfraksjoner i India

For å få god kontroll over den enzymatiske reaksjonen ble det valgt å inaktivere endogene enzymer før hydrolyseprosessen startet. Det var likevel en stor sjanse for at de endogene enzymer allerede hadde startet spaltningen av proteiner da råstoffet hadde vært uten behandling i ca. 24 timer. Restråstoffet ble tilført varme ved bruk av en bærbar kokeplate som vist i figur 27. Det var derfor ingen god kontroll over temperaturen som ble påført råstoffet. Ifølge Šližytė, Rustad og Storrø (2005) kan inaktivering av enzymer ved for høy temperatur føre til denaturering og utfelling av proteiner. Denaturerte proteiner kan også øke sjansen for dannelse av uløselig slam, som inneholder er en blanding av et høyt lipidinnhold, inkludert høy mengde fosfolipider (Šližytė, Rustad og Storrø, 2005).



Figur 30. viser kokeplaten som ble benyttet til varmebehandling av råstoffet når det ankom CFTRI. Neste bilde viser hvordan restråstoffet ble filtrert for større partikler

Enzymatisk hydrolyse:

Etter inaktivering med TCA eller varmebad under hydrolyseprosessen oppstod det problemer ved separere oljefasen fra sediment og vannfase. Dette kan være forårsaket på grunn slammet som ble dannet i løsningen, som er en uløselig blanding av olje og vann.



Figur 31: Bilde viser hydrolysat uten klar separasjon mellom oljefasen og vannfasen

3. Frysetørrking:

Frysetørkeprosessen i India skapte også en del problemer. For det første var det ikke mulighet for å få frysetørke alt av hydrolysat som hadde blitt produsert. Det ble derfor valgt kun en begrenset mengde hydrolysat for tilbaketuren til Norge, noe som var grunnen til at analysering av ACEI-effekt ble gjort av FPH av torskehode istedenfor på hydrolysatet fra India. Da formålet var å optimalisere metoden før analyser av det begrensede hydrolysatet.

For det andre ble ikke hydrolysatene fullstendig frysetørket, noe som skapte problemer under videre analyseringer i Norge, deriblant analysering av aminosyresammensetning da flere av hydrolysatene måtte frysetørket på nytt.

4. Analyser: Rutiner og laboratorieforhold ved CFTRI

Under analysering av ACEI-effekt i hydrolysatene ble det som nevnt tidligere ikke benyttet paralleller eller kontroll under utførelse av metoden Cushman og Cheung (1971). Det var også dårlige hygiene forhold da utstyret som ble benyttet under laboratoriearbeid kun ble vasket forhånd i kaldt vann.

Analyseforholdene ved laboratoriet var også selvfølgelig av annen standard enn hva man er vant med i Norge. Dette medførte at analysene tok noe lengre tid enn hva man hadde sett for seg. Som et eksempel kan man observere hvordan tilførsel av nitrogen gass ble gjort for diffusjon av vannfase som vist i figur. 31. Denne prosessen kunne ta opp mot 20 minutter per prøve, i tillegg til at det kun var tre prøver som kunne kjøres i gangen. I motsetning til å bruke glassrør i varmeblokk, der hver prøve bruker ca. 6 minutter.



Figur 32: Bilde viser hvordan tilsats av nitrogen gass for fullstendig diffusjon av vannfasen ble utført.

4.2.7 Konklusjon og forslag til videre arbeid for case 2

Case 2 startet som en kvantitativ oppgave men endte opp med en del fokus på det kvalitative også. Dette var på grunn av store forskjeller på laboratorieforholdene mellom Norge og India. Men også på grunn av alle erfaringene og observasjonene som har kommet med under oppholdet i India.

Surimiproduksjon genererer store mengder restråstoff som viscera, hode, filet-avskjær, skinn og bein, raffinert avskjær og ikke minst prosessvann fra de ulike vaskestegene. Mesteparten av restråstoffet som benyttes i dag går til fiskemelfabrikk eller blir kastet. Proteinene fra prosessvannet og fra restråstoff av surimiproduksjonen kan potensielt ha høy verdiskapning hvis det oppkonsentreres ved fraksjonering (membranfiltrering).

Utvinning av marine peptider ble utført ved bruk av enzymatisk hydrolyse for å undersøke peptidenes bioaktivitet med hensyn til ACEI-aktivitet. Under den enzymatiske hydrolysen ble alkalase (*Bacillus licheniformis*) benyttet til å spalte proteinene. Enzymet er funnet til å være det beste enzymet brukt i flere studier for produksjon av funksjonelle FPH. Da det har blitt dokumentert FPH med bruk av alkalase hadde det høyeste proteininnholdet og det laveste lipidinnholdet sammenlignet med hydrolysater der enzymer som Papain og Neutrase ble benyttet (Šližytė, Rustad og Storrø, 2005).

Basert på molvektsfordelingen viser peptidene en lavere MW-fordeling, som tilsier at hydrolysatet fra hode og slofraksjon inneholder med lav (MW). Der den høyeste MW ble målt til å være 1,4 kDa. Aminosyresammensetningen til hydrolysatets proteiner viste seg å inneholde alle de essensielle aminosyrene, samt de hydrofobe aminosyrene med aromatiske sidekjerder. Dette betyr at hydrolysatet inneholder peptider er av rett størrelse (MW) og har den rette sammensetningen av aminosyrer for å kunne utøve ACEI-effekt. Analyseresultatene fra metoden Cushman og Cheung (1971) støtter også påstanden da det ble målt til å være et høyt innhold av % ACEI i de tre hydrolysatene fra hode- og slofraksjon. Til tross for mye utfordringer med metoder og analyser viser FPH fra hode- og slofraksjon potensiale for å inneholde ACE-inhiberende egenskaper.

Til videre arbeid anbefales ultrafiltrering til å fraksjonere og separere peptidene etter størrelse for enda bedre oppkonsentrering av peptider med potensiell ACEI-aktivitet. Det har det vist seg å være vanskelig å bekrefte ACEI-effekt *in vivo*. For at ACEI-aktivitet fra marine peptider skal få dokumentert helseeffekt og godkjent helsepåstand fra EFSA kreves det humane intervensjonsstudier. Dette til tross for en klar korrelasjon mellom ACEI-effekt og blodtrykkreduserende effekt. For at et peptid skal utøve sin bioaktivitet på et målorgan, må det ha en stabilt kjemisk komposisjon, være av rett konsentrasjon og må kunne bli absorbert av målorgan.

Referanseliste

- Aarnes, H. (2018) *Aminosyrer, terpener og polyaminer*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/plfys/biokjemi/terpenarom.html>.
- Abejón, R. *et al.* (2018) Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes, *Separation and Purification Technology*, 197, s. 137-146.
- Adler-Nissen, J. (1976) Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(6), s. 1090-1093.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), s. 1256-1262.
- Afonso, M. D. og Borquez, R. (2002) Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes—prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry, *Desalination*, 142(1), s. 29-45.
- Aguilera, J. M. og Rademacher, B. (2004) Surimi gels, i Yada, R. Y. (red.) *Proteins in Food Processing*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, s. 468.
- Asp, N.-G. og Bryngelsson, S. (2008) Health claims in Europe: new legislation and PASSCLAIM for substantiation, *The Journal of nutrition*, 138(6), s. 1210S-1215S.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J. og Eijsink, V. G. (2005) Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera, *Process Biochemistry*, 40(5), s. 1957-1966.
- Bougatef, A. *et al.* (2008) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases, *Food chemistry*, 111(2), s. 350-356.
- Bourseau, P. *et al.* (2009) Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations, *Desalination*, 244(1-3), s. 303-320.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), s. 248-254.
- Brady, J. E. (2004) Syre-Base- Likevekter i vannløsninger, i Wiley, J. (red.) *Generell kjemi - Grunnlag og prinsipper*. Trondheim: Tapir akademisk Forlag.
- Bruno, S. F. *et al.* (2018) Green and innovative techniques for recovery of valuable compounds from seafood by-products and discards: A review, *Trends in Food Science & Technology*.
- Börjesson, M., Kjeldsen, S. og Dahlöf, B. (2008) Hypertensjon, i Bahr, R. (red.) *Aktivitetshåndboken for fysisk aktivitet i forebygging og behandling*
- Helsedirektoratet.
- Carvajal, A. *et al.* (2015) Production of high quality fish oil by thermal treatment and enzymatic protein hydrolysis from fresh Norwegian spring spawning herring by-products, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(8), s. 807-823.
- Chabeaud, A. *et al.* (2009) Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: application to the refining of bioactive peptidic fractions, *Separation and Purification Technology*, 66(3), s. 463-471.
- Chalamaiah, M. *et al.* (2012) Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review, *Food chemistry*, 135(4), s. 3020-3038. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
- Chalamaiah, M. *et al.* (2019) Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins, *Journal of Functional Foods*, 58, s. 123-129.
- Chang, S. K. og Zhang, Y. (2017) Protein analysis *Food analysis*. Springer, s. 315-331.
- Chew, L. Y., Toh, G. T. og Ismail, A. (2019) Application of Proteases for the Production of Bioactive Peptides. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, s. 247-261.
- Chobanian, A. V. *et al.* (2003) Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, *hypertension*, 42(6), s. 1206-1252.

- Chowdhury, P., Viraraghavan, T. og Srinivasan, A. (2010) Biological treatment processes for fish processing wastewater—A review, *Bioresource technology*, 101(2), s. 439-449.
- Cushman, D. W. og Cheung, H. S. (1971) *Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung*. Finnes ved 1637-1648.
- Damodaran, S. (2017) *Food proteins and their applications*. Routledge.
- Dhillon., B. S. et al. (2018) *All about Fish Farming in India*. Tilgjengelig fra: <https://krishijagran.com/featured/all-about-fish-farming-in-india/>.
- EC Nutrition claims. Tilgjengelig fra: https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/nutrition_claims_en (Hentet: 12.06 2019).
- EFSA Health claims. Tilgjengelig fra: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/health-claims>.
- Eilertsen, A. B. et al. (2018) 1st RE-food Symposium-Goa, India, Feb. 2018-Sustainable technologies for Food processing and preservation.
- Falch, E., Aursand, I. og Digre, H. (2006) *Pelagisk kvalitet - Sesongvariasjoner i næringsverdi og fettsammensetning i NVG sild og makrell*. (SFH80 A065018).
- Fangen, K. (2015) *Kvalitativ metode*. Tilgjengelig fra: <https://www.etikkom.no/fbib/introduksjon/metoder-og-tilnarminger/kvalitativ-metode/>.
- FAO (2003) *Assuring Food safety and quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems*.
- FAO et al. (2011) *fa*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2018) *The state of worlds fisheries and aquaculture - Meeting the sustainable development goals*. . (The State of the World). Rome. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>.
- FAO Fisheries (2011) Aquaculture Department. 2013, *Global Aquaculture Production Statistics for the year*.
- Fellow, P. J. (2017) Extraction and separation of food components *Food Processing Technology - Principles and Practice*. 4. utg. Woodhead Publishing, s. 235-283.
- Flanagan, K. et al. (2018) *SDG target 12.3 on food loss and waste: 2018 progress report*. Champions 12.3.
- Gevaert, B. et al. (2016) Fish hydrolysates: A regulatory perspective of bioactive peptides, *Protein and peptide letters*, 23(12), s. 1052-1060.
- Grimsmo, L. A. C. M., Ekrem; Slizyte, Rasa; Thakur, Maitri; Toldnes, Bendik; Wolff, Robert (2015) *Mulighetene for foredling og produkter fra restråstoff fra hvitfisk*. SINTEF Fiskeri og havbruk AS.
- Gupta, K. (2018) *Report of visit to Kaiko Surimi producer*. New Dehli: Amity Food and Agriculture Foundation.
- Hayes, M. (2018) Industrial Processing of Proteins, *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals, and Agriculture: Sources, Applications, and Advances*, s. 281.
- Hjellnes, H. V. (2018) Produksjonslinjen til Pelagia.
- Jensen, I.-J. et al. (2014) The potential of cod hydrolyzate to inhibit blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Nutrition research*, 34(2), s. 168-173.
- Kim, S.-K. et al. (2016a) *Seafood Processing By-Products*. Springer.
- Kim, S.-K. et al. (2016b) *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part II-Marine Organisms Producing Enzymes*. Elsevier.
- Kortversjon Meld. St. 22 (2013) *Verdens fremste sjømatnasjon - Sjømatmeldingen* Det kongelige fiskeri- og kystdepartement.
- Kumar, R. et al. (2010) Pharmacological review on natural ACE inhibitors, *Der Pharmacia Lettre*, 2(2), s. 273-293.
- Lilly, T., Immaculate, J. og Jamila, P. (2017) Macro and micronutrients of selected marine fishes in Tuticorin, South East coast of India, *International Food Research Journal*, 24(1).

- Lim, S. S. *et al.* (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *The Lancet*, 380(9859), s. 2224-2260.
- Lima, D. P. d. (1999) Synthesis of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: an important class of antihypertensive drugs, *Quimica nova*, 22(3), s. 375-381.
- Lucarini, A. og Kilikian, B. (1999) Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances, *Biotechnology techniques*, 13(2), s. 149-154.
- Marciniak, A. *et al.* (2018) Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and-production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology, *Trends in Food Science & Technology*.
- Membrane Systems, M. (2016) *Operating Manual - Triple System*. Switzerland.
- Morrissey, M. T., Park, J. W. og Huang, L. (2000) Surimi processing waste, *Surimi and surimi seafood*, s. 127-166.
- Muro, C., Riera, F. og del Carmen Díaz, M. (2012) Membrane separation process in wastewater treatment of food industry *Food Industrial Processes-Methods and Equipment*. IntechOpen.
- Mæhre, H. *et al.* (2018) Protein determination—method matters, *Foods*, 7(1), s. 5.
- Naik, A. (2019) Spørsmål om restråstoff.
- Nazir, A. *et al.* (2019) Membrane separation technology for the recovery of nutraceuticals from food industrial streams, *Trends in Food Science & Technology*.
- Nilsang, S. *et al.* (2005) Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases, *Journal of food Engineering*, 70(4), s. 571-578.
- Nilssen, F. og Elvestad, C. (2019) Konsekvenser ved langvarig lukking av det russiske markedet for sild.
- Ocean, S. (2018) *Utnyttelse av restråstoff*. Tilgjengelig fra: <https://www.barentswatch.no/havbruk/utnyttelse-av-restrastoff>.
- Opdahl, T., Giæver, H. og Johansen, F. (2000) Sosiologi Hovedfag UiO - Kvalitativ metode - Forelesningsnotat.
- Pan, D. *et al.* (2012) Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate, *Food chemistry*, 130(1), s. 121-126.
- Pasupuleti, V. K. og Demain, A. L. (2010) *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer Netherlands : Imprint: Springer.
- Pezeshk, S. *et al.* (2018) Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish Waste Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities, *Probiotics and antimicrobial proteins*, s. 1-8.
- PwC, S. (2018) *Økt foredling av sjømat og restråstoff i Norge - En analyse av muligheter, barrierer og lønnsomhet*. Innovasjon Norge.
- Raghavan, S. og Kristinsson, H. G. (2009) ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates, *Food chemistry*, 117(4), s. 582-588.
- Rasco, B. A. (2000) Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties AU - Kristinsson, Hordur G, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), s. 43-81. doi: 10.1080/10408690091189266.
- Richardson, R. O., SINTEF; Nystøyl, Ragnar, Strandheim Gunn, Marthinussen, Anders og Kontali Analyse AS (2017) *Analyse marint restråstoff; Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge*. (978-82-7174-286-7). Tromsø: SINTEF.
- Rustad, T., Storrø, I. og Slizyte, R. (2011) Possibilities for the utilisation of marine by - products, *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10), s. 2001-2014.
- Rønning, S. *et al.* (2016) *Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoffremstilling, funksjon og markedsmuligheter*. (1/2016).
- Sadler, M. J. og Arens, U. (2015) *Foods, nutrients and food ingredients with authorised EU health claims. : Volume 2*. Woodhead Publishing.
- Sand, O. *et al.* (2006) *Menneskekroppen*

- Fysiologi og anatomi*. Oslo: Gyldendal.
- Sen, D. (2005) *Advances in fish processing technology*. Allied Publishers.
- Sentandreu, M. A. og Toldrá, F. (2006) A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity, *Nature protocols*, 1(5), s. 2423.
- Shahidi, F. (2006) *Maximising the value of marine by-products*. Woodhead Publishing.
- Shukla, S., Shankar, R. og Singh, S. (2014) Food safety regulatory model in India, *Food Control*, 37, s. 401-413.
- SIGMA-ALDRICH (1998) Enzymatic Assay of ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (EC 3.4.15.1): SIGMA-ALDRICH. Tilgjengelig fra: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/a6778enz.pdf.
- SIGMA-ALDRICH (2019) *Amino Acids Reference Chart*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html>.
- Sildesalgslag, N. (2019) *NVG-Sild*. Tilgjengelig fra: <https://www.sildelaget.no/no/fiskeri/nvg-sild/>.
- SINGH, R. K. og BALANGE, A. K. (2005) Characteristics of pink perch (*Nemipterus japonicus*) surimi at frozen temperature, *Journal of food processing and preservation*, 29(1), s. 75-83.
- Singh, R. P. og Heldman, D. R. (2014) Chapter 11 - Membrane Separation, i Singh, R. P. og Heldman, D. R. (red.) *Introduction to Food Engineering (Fifth Edition)*. San Diego: Academic Press, s. 645-674.
- Singh, Y. J. et al. (2016) Adoption of hygienic fish handling practices by fishermen, *Indian Research Journal of Extension Education*, 12(1), s. 36-38.
- Šližytė, R., Rustad, T. og Storrø, I. (2005) Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions, *Process Biochemistry*, 40(12), s. 3680-3692.
- SSB (2018) *Fakta om fiske*. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/faktaside/fiske>.
- Stevens, J. R. et al. (2018) The rise of aquaculture by-products: Increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation, *Marine Policy*, 90, s. 115-124.
- Talmard, C. et al. (2007) *Supporting Information for Amyloid-Beta Peptide Forms Monomeric Complexes With Cu²⁺ and Zn²⁺ Prior to Aggregation*. CHEMBIOCHEM.
- Tjora, A. (2017) *Kvalitative forskningsmetoder - I praksis*. 3. utg. Gyldendal.
- Toldnes, B. (2012) Teknologi for uttak og sortering av restråstoff fra sild, *SINTEF*.
- Udenigwe, C. C. og Aluko, R. E. (2012) Food protein - derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits, *Journal of food science*, 77(1), s. R11-R24.
- Vasan, R. S. et al. (2001) Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease, *New England journal of medicine*, 345(18), s. 1291-1297.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. og Verstraete, W. (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, *British Journal of Nutrition*, 92(3), s. 357-366.
- WHO (2015) *Food Safety: What you should know*. Tilgjengelig fra: http://www.searo.who.int/entity/world_health_day/2015/whd-what-you-should-know/en/.
- Widell, K. N. et al. (2019) *Summary of Workshop and project meetings in Mumbai, 27-30 Nov 2018*. SINTEF Ocean, Trondheim: SINTEF Ocean.
- Wijesekara, I. og Kim, S.-K. (2010) Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry, *Marine drugs*, 8(4), s. 1080-1093.
- Wong, M. K. (2016) Renin-Angiotensin System *Handbook of Hormones*. Elsevier, s. 253-e229-253.
- Xiong, Y. (2018) Muscle proteins *Proteins in Food Processing*. Elsevier, s. 127-148.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A. og Prentice, C. (2018) Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: an overview, *Marine biotechnology*, 20(2), s. 118-130.

Vedlegg A: Vaskeprosedyre under membranfiltreringen

7.2 Cleaning Procedures for Lab and Pilot Systems

CIP Step	CIP 1	CIP 2	CIP 3	CIP 4
1	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min
2	Caustic Cleaner > pH: 10 – 12.5 > t: 15 – 30 min > T: 50 °C	Caustic Cleaner > pH: 10 – 12.5 > t: 15 – 30 min > T: 50 °C	Caustic Cleaner > pH: 10 – 12.5 > t: 15 – 30 min > T: 50 °C	Caustic Cleaner > pH: 10 – 12.5 > t: 15 – 30 min > T: 50 °C
3	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min
4		Acid Cleaner > pH 1.5 - 2.5 > t: 15 -30 min > T: 50 °C	Caustic & Chlorine Cleaner > pH 10 – 11 > t: 15 – 30 min > T: 50 °C	Caustic & Enzyme Cleaner > pH 10 – 10.5 > t: 15 – 45 min > T: 50 °C
5		Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min	Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min
6				Acid Cleaner > pH 1.5 - 2.5 > t: 15 -30 min > T: 50 °C
7				Water Flush > Cold/warm water > t: 5-10 min

A pure caustic cleaning (CIP1) can be carried out for weak pollutions based on organic compounds. Caustic/acid CIP combinations (CIP2) are suitable to remove organic and inorganic fouling compounds. A chlorine cleaning step (CIP3) can be added after a standard caustic cleaning to improve removal of organic fouling (please check membrane conformity before using chlorine). Enzymatic cleaning (CIP4) is used for special cleaning requirements (e.g. pH sensitive membranes or heavy protein fouling). A final acid cleaning step is required for inactivation of enzymes.

Vedlegg B: sildehydrolysat

B.1 Fett

	Prøveglass	Differanse(a)	Totalt lipid	Lipid %
S1 I	13,9804	0,0335	13,36	14,0139
S1 II	14,2116	0,0351	13,99	14,2467
S2 I	14,2861	0,0358	14,16	14,3219
S2 II	14,1145	0,0348	13,80	14,1493
S3 I	14,4039	0,035	13,88	14,4389
S3 II	14,3156	0,0343	13,61	14,3499

B.2 Protein

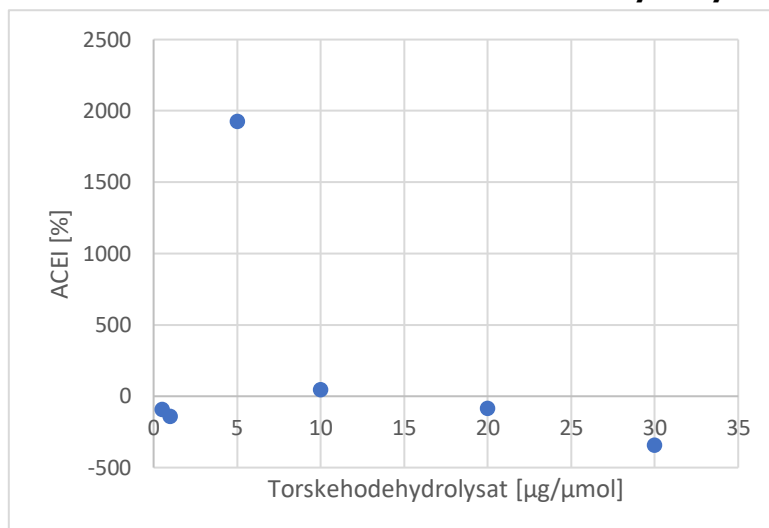
Fraksjon	Prøvemateriale	Bradford reagens	H ₂ O	Abs	Proteininnhold(µg/ml)
A	200	800		1,470	24,720
B	200	800		1,307	28,810
C	200	800		1,448	24,370
D	200	800		1,295	5,360
Kontroll		800	200	0,639	

Vedlegg C: Resultater fra ACEI-aktivitet

C1. Bestemmelse av ACE-hemmende aktivitet for sildehydrolysat

Hydrolysatfort.	Blank abs	Prøve abs	ACE (%)
A			
5	0,204	0,222	98,02
7,5	0,064	0,165	79,68
10	0,183	0,592	45,76
15	0,163	0,222	84,3
B			
5	0,185	0,228	86,06
7,5	0,184	0,578	47,41
10	0,17	0,193	88,27
C			
5	0,144	0,26	78,02
7,5	0,076	0,161	81,44
10	0,127	0,198	82,98
D			
5	0,147	0,206	84,3
7,5	0,218	0,536	55,78
10	0,105	0,691	26,26
15	0,182	0,25	83,31

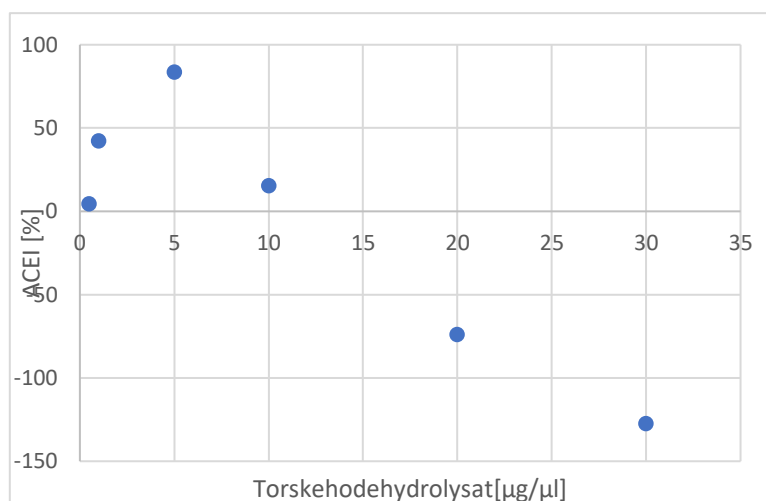
C1. Bestemmelse av ACE-hemmende aktivitet for sildehydrolysat



Figur 24: Pilottest 1. (27.02.19.) (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0,5, 1,0, 5,0, 10, 20, og 30 for torskehodehydrolysat.

Experiment 27/2 -
19

Konsentrasjon(µg/µl)	B		C			
	0,032		0,038			
	Abs		Abs			
	I	II	III	Gjennomsnit t	ACEI (%)	
0,5	0,040	0,038	0,001	0,026	100,0	
1	0,018	0,032	0,020	0,023	-144,4	
5	0,060	0,038	0,378	0,159	2111,1	
10	0,030	0,028	0,046	0,035	44,4	
20	0,050	0,022	0,008	0,027	-86,7	
30	0,009	0,023	0,002	0,011	-344,4	
	ACEI %					
	I	II	III	Gjennomsnit t		
0,5	133,3	100,0	-516,7	-94,4		
1	-233,3	0,0	-200,0	-144,4		
5	466,7	100,0	5766,7	2111,1		
10	-33,3	-66,7	233,3	44,4		
20	300,0	-160,0	-400,0	-86,7		
30	-383,3	-150,0	-500,0	-344,4		



Figur 20: Pilottest 3. (06.03.19.) (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, og 30 for torskehodehydrolysat.

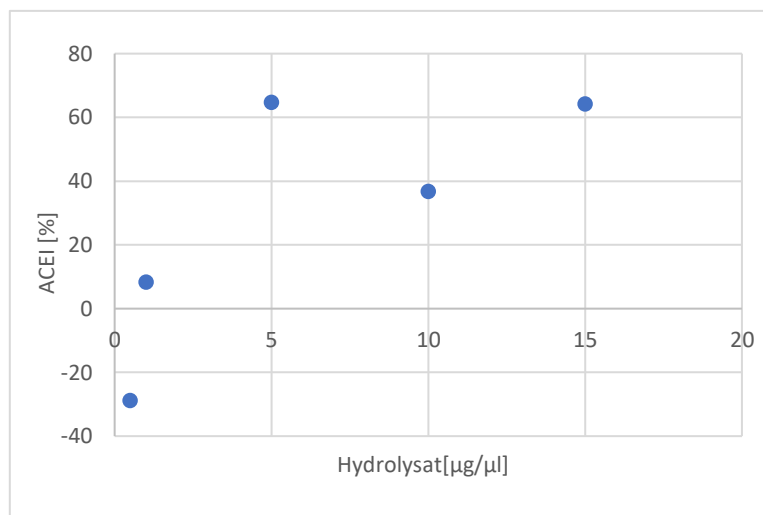
Experiment 6/3-19

B 0,122

C 0,063

Konsentrasjon(µg/µl)

	Abs				ACEI (%)			
	I	II	III	Gj.snitt	I	II	II	Gj.snitt
0,5	0,131	0,127	0,126	0,128	0	5,882353	7,352941	4,411765
1	0,096	0,106	0,105	0,102333	51,47059	36,76471	38,23529	42,15686
5	0,052	0,061	0,11	0,074333	116,1765	102,9412	30,88235	83,33333
10	0,046	0,059	0,257	0,120667	125	105,8824	-185,294	15,19608
20	0,268	0,131	0,145	0,181333	-201,471	0	-20,5882	-74,0196
30	0,216	0,251	0,186	0,217667	-125	-176,471	-80,8824	-127,451

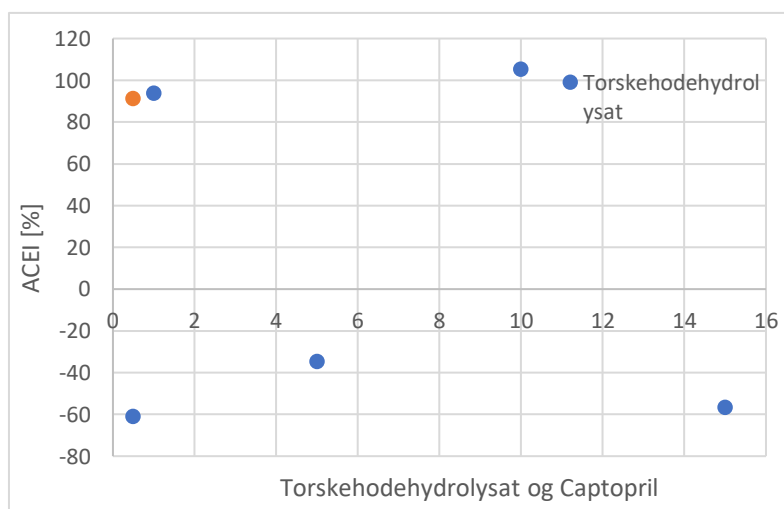


Figur 21: Pilottest 4. (11.03.19.) (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0.5, 1.0, 5.0, 10 og 15 for torskeshodehydrolysat.

Experiment 11/3-19

B	0,103	0,107	
C	0,041	0,043	0,022

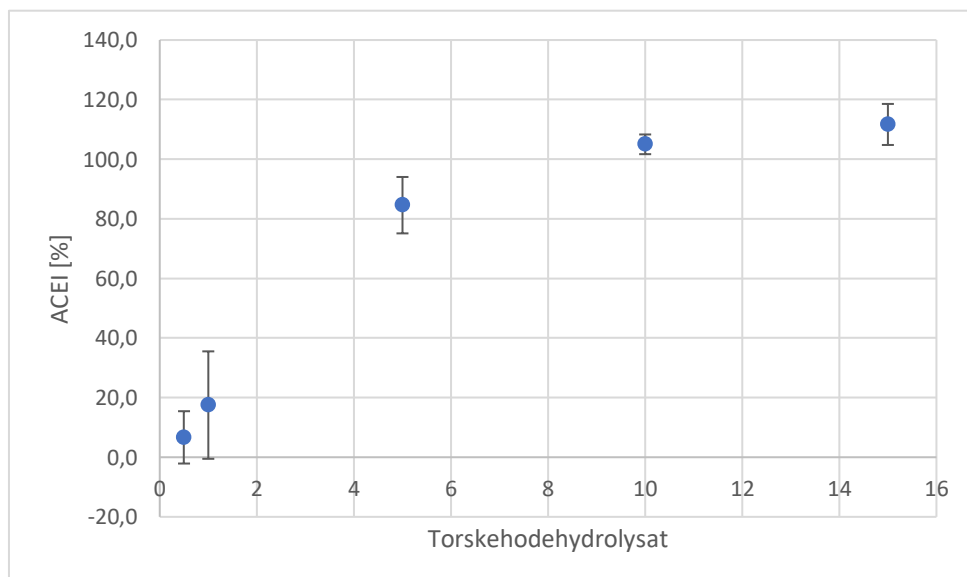
Konsentrasjon (µg/µl)	Abs			Gj.snitt	ACEI (%)			Gj.snitt
	I	II	III		I	II	III	
0,5	0,129	0,131	0,103	0,121	-41,9	-45,2	0,0	-29,0
1	0,097	0,039	0,099	0,078333	9,7	103,2	6,5	39,8
5	0,055	0,077	0,057	0,063	77,4	41,9	74,2	64,5
10	0,095	0,089	0,057	0,080333	12,9	22,6	74,2	36,6
15	0,099	0,096	0,091	0,095333	6,5	11,3	19,4	12,4



Figur 21: Pilottest 5. (11.03.19.) (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0.5, 1.0, 5.0, 10 og 15 for torskeshodehydrolysat.

Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Målt absorbans			Gjennomsnitt
	I	II	III	
A 0,5	0,266	0,211	0,134	
A 1	0,126	0,122	0,123	
A 5	0,140	0,240		
A 10	0,095	0,129	0,129	
A 15	0,237	0,207	0,115	
Captopril	0,106	0,109	0,160	0,1075
B	0,169	0,175	0,115	0,172
C	0,111	0,132	0,118	0,120

Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	% ACEI			Gjennomsnitt
	I	II	III	
A 0,5	-181,9	-75,5	73,5	-61,3
A 1	89,0	96,8	94,8	93,5
A 5	61,9	-131,6	332,9	87,7
A 10	149,0	83,2	83,2	105,2
A 15	-125,8	-67,7	110,3	-27,7
Captopril	127,7	121,9	23,2	91,0



Abs at 228 nm				
	I	II	III	Gjennomsnitt
<i>B</i>	0,113	0,127	0,15	0,13
<i>C</i>	0,053	0,062	0,035	0,05
Konsentrasjon (µg/µl)				
20	0,081	0,11	0,039	-
15	0,038	0,037	0,047	0,041
10	0,045	0,049	0,044	0,046
5	0,057	0,059	0,071	0,062

Figur21: Pilottest 4. (11.03.19.) (%) ACEI målt for fortynningskonsentrasjon 0.5, 1.0, 5.0, 10 og 15 for torskehodehydrolysat.

ACEI						
	I	II	III	Gjennomsnitt	Std.av	
15	115	116,25	103,75	111,7	6,9	
10	106,25	101,25	107,5	105,0	3,3	
5	91,25	88,75	73,75	84,6	9,5	
1	-2,5	32,5	22,5	17,5	18,0	Måling av
0,5	15	7,5	-2,5	6,7	8,8	N/C-

protein for surimiråstoff

Type restråstoff	Vekt (mg)	Proteinfaktor	Nitrogen	Protein (%)
Hode	50,2	6,25	9,36	58,53
Bein og skinn	51,3	6,25	8,74	54,65
Refinert avskjær	50	6,25	12,54	78,35

Måling av vanninnhold for surimiråstoff

Sample nr.	Empty weight	Prøvevekt	Vekt (tot)	Final wight	Moist %
1A	40,224	7,035	47,259	41,738	78,48
1B	43,140	7,636	50,776	44,769	78,67
2A	45,942	6,778	52,720	47,162	82,00
2B	48,569	6,054	54,623	49,578	83,33
3A	47,367	7,426	54,793	48,531	84,33
3B	44,268	6,574	50,842	45,264	84,85

Vanninnhold/tørrestoff ble målt ved bruk av tørking i ovn. Vanninnhold/tørrestoff konsentrasjon ble beregnet ved bruk av formel x:

Vedlegg D: Bestemmelse av hydrolysegrad ved TNB

Temp.	Time/min	Enzym	Hode og slo	Skind & bein		Raffinert avskjær		
			DH (%)	DPPH (%)	DH (%)	DPPH (%)	DH (%)	DPPH (%)
30	30	0,5	17,9	50,3	5,1	30,1	3,0	10,5
30	30	1,5	20,6	28,3	28,2	32,5	4,7	15,2
30	30	2,5	20,4	24,6	23,7	35,2	9,8	22,1
30	90	0,5	14,9	32,1	2,5	31,4	53,8	16,0
30	90	1,5	15,7	37,5	30,7	21,4	57,1	13,7
30	90	2,5	15,1	21,9	5,0	31,2	56,6	22,2
30	150	0,5	2,0	39,5	40,9	25,9	0,7	26,0
30	150	1,5	10,8	45,1	42,2	30,6	5,2	30,6
30	150	2,5	5,5	49,4	59,5	22,8	10,5	17,3
45	30	0,5	9,1	18,1	45,8	28,8	55,9	27,8
45	30	1,5	12,4	24,5	43,2	29,6	55,7	27,9
45	30	2,5	11,3	25,8	44,0	34,2	55,5	30,2
45	90	0,5	7,3	26,0	0,3	38,5	53,1	18,8
45	90	1,5	7,5	25,8	4,2	35,5	56,8	29,7
45	90	2,5	8,3	27,2	12,6	35,2	53,5	29,8
45	150	0,5	0,5	15,9	48,3	18,1	44,6	6,8
45	150	1,5	3,3	30,8	52,4	29,5	45,1	4,0
45	150	2,5	4,1	32,3	63,3	29,2	48,2	14,7
60	30	0,5	8,3	25,4	51,1	28,9	45,6	20,4
60	30	1,5	8,0	20,8	49,6	22,4	46,7	19,7
60	30	2,5	5,7	25,3	55,8	28,8	46,5	18,7
60	90	0,5	2,3	30,0	46,7	23,0	34,5	13,2
60	90	1,5	3,3	24,4	95,7	23,0	35,1	15,1
60	90	2,5	8,6	24,0	52,3	22,3	31,7	9,2
60	150	0,5	2,3	33,4	3,6	32,0	42,8	30,0
60	150	1,5	0,8	34,4	25,2	40,2	47,3	33,7
60	150	2,5	1,1	43,6	19,3	37,4	38,1	28,4

Vedlegg E: Aminosyresammensetningen i hode og slo

For tørket råstoff, tørket sediment og FPH.

Amino acid	Tørket råstoff - heads	Tørket sediments	FPH heads
	AA % (dw)	AA % (dw)	AA % (dw)
	Average	Average	Average
Taurin	1,30	0,59	1,51
Hydroxyproline	1,78	2,33	1,20
Aspartic acid + Asparagine	8,06	6,78	7,97
Threonine	3,23	3,28	4,37
Serine	5,25	6,10	5,02
Glutamic acid + Glutamine	12,53	10,60	14,57
Proline	6,54	7,12	5,22
Glycine	10,23	13,13	9,57
Alanine	8,26	8,34	7,51
Cystine (Cys-Cys)	1,51	1,02	0,99
Valine	5,01	4,69	5,04
Methionine	2,98	2,97	3,00
Isoleucine	3,67	3,40	3,85
Leucine	6,84	6,01	7,17
Tyrosine	3,12	3,10	2,95
Phenylalanine	4,00	4,54	3,92
Histidine	1,93	2,12	2,19
Hydroxylysine	0,36	0,46	0,15
Lysine	6,72	5,76	7,58
Arginine	6,69	7,66	6,23