

Robin Sundseth Gjermstad

Hydrolysater av restråstoff fra laks (*Salmo salar*) - effekten av antioksidanter på kvaliteten under lagring

Masteroppgave i Industriell kjemi og bioteknologi

Veileder: Turid Rustad

Juni 2020

Robin Sundseth Gjermstad

Hydrolysater av restråstoff fra laks (*Salmo salar*) - effekten av antioksidanter på kvaliteten under lagring

Masteroppgave i Industriell kjemi og bioteknologi
Veileder: Turid Rustad
Juni 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne masteroppgaven ble utført våren 2020 ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, og markerer avslutningen på fem år ved Industriell kjemi og bioteknologi på NTNU i Trondheim. Denne studien bygger på prosjektoppgaven med samme tittel, som ble utført høsten 2019.

Først og fremst vil jeg takke min veileder, professor Turid Rustad, for godt samarbeid og hyppige tilbakemeldinger gjennom hele våren. Jeg setter pris på de faglige diskusjonene, og at du alltid tok deg tid til å hjelpe meg når jeg stod fast, både under labarbeidet og i oppgaveskrivingen. En stor takk rettes til stipendiat og biveileder Kristine Kvangarsnes ved NTNU i Ålesund. Takk for at du alltid var behjelpelig via e-post, og for alle gode tips og ideer knyttet til oppgaven. Ingeniør Siri Stavrum fortjener også en takk. Først og fremst for god opplæring på labutstyret og kjøring av HPLC-analysen, men også fordi du alltid møtte meg med et smil på lab. I tillegg vil jeg takke overingeniør Anne Kathrine Streitlien på campus Kalvskinnet for god opplæring av Kjeldahl-metoden.

Mine foreldre, Wenche og Jostein, fortjener en stor takk for god støtte gjennom masteroppgaven og de fem årene ved NTNU. Jeg vil også takke min morfar, Bernt Sigurd, og min farmor, Anne Kari, som alltid har oppmuntret meg til å ta en god utdanning. Til slutt vil jeg takke min kjæreste, Christina, for mange hyggelige stunder og for at jeg aldri mistet motivasjonen under masteroppgaven.

Trondheim, juni 2020

Robin Sundseth Gjermsstad

Prosjektoppgaven

Introduksjonen og undersøkelsene gjort i denne masteroppgaven er basert på prosjektoppgaven, men er utvidet i denne studien. I teksten er det tydeliggjort hvilke figurer som også ble presentert i prosjektet. Følgende undersøkelser ble utført på hydrolysatene med ingen, 1 og 2 måneders lagringstid i prosjektoppgaven:

- Mengde vannløselige proteiner og syreløselige peptider ble analysert ved Lowrys metode.
- Mengde og sammensetning av totale og frie aminosyrer ble bestemt ved HPLC.

I denne studien ble disse undersøkelsene også utført på lakseråstoffet og proteinhydrolysater med lagringstid 4 og 6 måneder. Fargemåling med bruk av kolorimeter ble utført på hydrolysatene med ingen, 1 og 2 måneders lagringstid i prosjektet, men ble analysert på nytt i masteroppgaven.

Sammendrag

Årlig genererer oppdrett av laks (*Salmo salar*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) i Norge flere hundre tusen tonn restråstoff. Dette restråstoffet inneholder verdifulle omega-3-fettsyrer og lett-fordøyelige proteiner. I Norge går 7% av dette restråstoffet til humant konsum, mens omtrent halvparten går til ensilasje og videre produksjon av fiske- og husdyrfôr. For å øke verdiskapningen er det ønskelig å øke produksjonen av høyverdige produkter til humant konsum. Ved enzymatisk hydrolyse av restråstoffet kan det produseres proteinhydrolysater med bedre funksjonelle, bioaktive og ernæringsmessige egenskaper sammenlignet med de opprinnelige proteinene i råstoffet.

I denne oppgaven ble proteinhydrolysater (PH) produsert ved enzymatisk hydrolyse av kvernedde laksehoder (*S. salar*). Målet var å undersøke hvordan tilsats av ulike antioksidanter påvirker løseligheten, oksidasjonsnivået og fargen til proteinhydrolysaten, og hvordan disse endres under lagring i romtemperatur. I denne studien ble det tilsatt naturlige (askorbinsyre og sitronsyre) eller syntetiske antioksidanter (propylgallat og butylhydroksytoluen (BHT)). Hvis hydrolysater skal anvendes i humant konsum, må de kunne lagres uten at proteinkvaliteten reduseres eller at hydrolysaten misfarges eller oksideres.

Resultatene viste at proteinhydrolysaten hadde et relativt høyt innhold av vannløselige proteiner og de essensielle aminosyrene Ile, Leu, Lys, Thr og Val. Aminosyren Met ble funnet i liten grad, noe som indikerer oksidasjon til metionin sulfoksid. Oksidasjon av Tyr ble observert i alle hydrolysaten, bortsett fra i hydrolysaten tilsatt askorbinsyre. Lagring og tilsats av antioksidanter påvirket hydrolysegraden og sammensetningen av frie og totale aminosyrer i liten grad.

Reduksjon i innhold av tioler ved økende lagringstid i PH tilsatt askorbinsyre, sitronsyre, BHT og kontrollprøven, indikerte oksidasjon av Cys og dannelse av disulfidbindinger. Oksiderte proteinhydrolysater kan selv indusere oksidasjon i matvarer de tilsettes i, noe som kan resultere i uønsket smak og lukt. Tiolinnholdet i PH tilsatt propylgallat var relativt stabilt, og propylgallat var dermed den antioksidanten som beskyttet best mot oksidasjon av Cys.

Propylgallat beskyttet også best mot misfarging. Etter seks måneders lagring fremsto hydrolysaten tilsatt propylgallat som tilnærmet uendret. Dette hydrolysaten hadde også høyest innhold av nitrogen, samt et relativt lavt innhold av frie aminosyrer. Totalt sett kan det konkluderes med at propylgallat var antioksidanten som bevarte hydrolysaten best under lagring.

Abstract

Annually, farming of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Norway generates hundreds of thousands of tonnes of rest raw material. This rest raw material contains valuable omega-3 fatty acids and easily digestible protein fractions. In Norway, 7% of this rest raw material goes to human consumption, while about half goes to silage and further production of fish feed and livestock fodder. In order to increase the wealth creation, it is desirable to increase the production of high-quality products for human consumption. By enzymatic hydrolysis of the rest raw material, protein hydrolysates with better functional, bioactive and nutritional properties, compared to the intact proteins in the raw material, can be produced.

In this thesis, protein hydrolysates (PH) were produced by enzymatic hydrolysis of minced salmon heads (*S. salar*). The aim was to investigate how the addition of different antioxidants influence the solubility, the level of oxidation and the color of the hydrolysates, and how these change during storage at room temperature. In this study, natural (ascorbic acid and citric acid) or synthetic antioxidants (propyl gallate and butylated hydroxytoluene (BHT)) were added. In order to use hydrolysates in human consumption, they must be able to be stored without reducing protein quality. In addition, oxidation and discoloration of the hydrolysates need to be prevented during storage.

The results showed that the protein hydrolysates had a relatively high content of water-soluble proteins and the essential amino acids Ile, Leu, Lys, Thr and Val. The amino acid Met was found in small amounts, indicating oxidation to methionine sulfoxide. Oxidation of Tyr was observed in all the hydrolysates, except from the hydrolysate added ascorbic acid. Storage and addition of antioxidants affected the degree of hydrolysis and the composition of free and total amino acids to a small extent.

Reduction of thiol content, with increased storage time in PH added ascorbic acid, citric acid, BHT and the control sample, indicated oxidation of Cys and formation of disulfide bonds. Oxidized protein hydrolysates can induce oxidation when added in products, which can result in undesirable taste and odor. The thiol content of PH added propyl gallate was relatively stable, and propyl gallate was therefore the most useful antioxidant to protect against oxidation of Cys.

Furthermore, propyl gallate showed the best protection against discoloration. After six months of storage, the hydrolysate added propyl gallate appeared almost unchanged. In addition, this hydrolysate had the highest content of nitrogen, as well as a relatively low content of free amino acids. To conclude, propyl gallate was the antioxidant that best preserved the hydrolysates during storage.

Innhold

Forord	i
Prosjektoppgaven	ii
Sammendrag	iii
Abstract	iv
Innhold	vii
Tabeller	ix
Figurer	xii
Forkortelser	xiii
1 Bakgrunn	1
1.1 Marint restråstoff	3
1.2 Dagens bruk av marint restråstoff	3
1.3 Proteinhydrolyse	4
1.3.1 Kjemisk hydrolyse	5
1.3.2 Enzymatisk hydrolyse	6
1.4 Funksjonelle og bioaktive egenskaper til FPH	8
1.4.1 Funksjonelle egenskaper	8
1.4.2 Bioaktive egenskaper	9
1.5 Anvendelsesområder for proteinhydrolysater	11
1.6 Dagens utfordringer ved FPH	12
1.6.1 Oksidasjon	12
1.6.2 Bitterhet	16
1.7 Kvalitetsendringer ved lagring av proteinhydrolysater	18
1.8 Målet med masteroppgaven	19

2	Materialer og metoder	20
2.1	Råstoff	20
2.2	Enzymer og kjemikalier	20
2.3	Enzymatisk hydrolyse	20
2.4	Kjemiske analyser	22
2.4.1	Råstoff	22
2.4.2	Proteinhydrolysater	23
2.5	Bestemmelse av tørrstoff og aske	24
2.6	Bestemmelse av totalt lipidinnhold	24
2.7	Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering	24
2.8	Bestemmelse av protein- og nitrogeninnhold ved Kjeldahl-metoden	25
2.9	Bestemmelse av mengde vannløselige proteiner	25
2.10	Bestemmelse av syreløselige peptider	26
2.11	Bestemmelse av total aminosyresammensetning	26
2.12	Bestemmelse av frie aminosyrer	26
2.13	Kvantifisering av SH-grupper	27
2.14	Bestemmelse av molvektfordeling ved FPLC	27
2.15	Fargemåling ved kolorimetri	28
2.16	Statistisk analyse	28
3	Resultater og diskusjon	29
3.1	Tørrstoff, aske og lipidinnhold	29
3.1.1	Råstoff	29
3.1.2	Proteinhydrolysater	30
3.2	Hydrolysegrad	30
3.3	Protein- og nitrogeninnhold	32
3.4	Bestemmelse av mengde vannløselige proteiner	33
3.4.1	Råstoff	33
3.4.2	Proteinhydrolysater	33
3.5	Syreløselige peptider	35
3.5.1	Råstoff	36
3.5.2	Proteinhydrolysater	36
3.6	Aminosyresammensetning	37
3.6.1	Bestemmelse av total aminosyresammensetning	37
3.6.2	Mengde og sammensetning av frie aminosyrer	42
3.7	SH-grupper	47
3.8	Molvektsfordeling	48
3.8.1	Råstoff	49
3.8.2	Proteinhydrolysater	50
3.9	Fargeendring ved lagring	54
3.10	Korrelasjon	56
4	Konklusjon	58
5	Videre arbeid	60

Bibliografi	60
Vedlegg A Tørrstoff, aske og lipidinnhold	82
A.1 Tørrstoff	82
A.2 Aske	82
A.3 Lipider	83
Vedlegg B Hydrolysegrad	84
Vedlegg C Protein- og nitrogeninnhold	85
Vedlegg D Vannløselige proteiner og syreløselige peptider	87
D.1 Vannløselige proteiner	87
D.2 Syreløselige peptider	91
Vedlegg E Total aminosyresammensetning	93
Vedlegg F Frie aminosyrer	98
Vedlegg G SH-grupper	103
Vedlegg H Molvektsfordeling	105
H.1 Kromatogram til standarder	106
Vedlegg I Korrelasjon	108

Tabeller

1.1	Sammenligning av autolyse, enzymatisk og kjemisk hydrolyse. Tabellen er modifisert fra Guerard (2007).	7
1.2	Funksjonelle og bioaktive egenskaper i fiskeproteiner (Halim et al., 2016; Kim & Wijesekara, 2010).	8
2.1	Antioksidantene som ble tilsatt under hydrolysen.	22
2.2	Destillering- og titreringsparametre for KJELMASTER K-375/K-376. . .	25
3.1	Innhold av tørrstoff (% av våtvekt) (n = 3), aske (% av våtvekt) (n = 3) og lipider (% av våtvekt) (n = 2) i lakseråstoffet.	30
3.2	Innhold av tørrstoff (% av tørt pulver) og aske (% av tørt pulver) i hydrolysaten (n = 2).	30
3.3	Frie aminogrupeer og hydrolysegrad til hydrolysaten og råstoffet (n = 2). Verdier i % av tørt pulver for FPH og % av våtvekt for råstoffet.	31
3.4	Protein- og nitrogeninnhold i proteinhydrolysater med ingen lagringstid (0 md.) og lakseråstoffet. Standardavvik er gitt for n = 2. Verdier i % av tørt pulver for FPH og % av våtvekt for råstoffet.	32
3.5	Innholdet av totale aminosyrer [mg/g FPH] og standardavviket (n = 3) til proteinhydrolysaten. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).	39
3.6	Mengde frie aminosyrer [mg/g FPH] og standardavvik (n = 2) til proteinhydrolysaten. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).	43
3.7	Fargen til hydrolysaten ved økende lagringstid. P: parameter, AO: antioksidant, AA: askorbinsyre, CA: sitronsyre, PG: propylgallat, K: kontroll. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05). . .	54
D.1	Absorbans for BSA-fortynningene.	87
D.2	Absorbans for 1:100- og 1:200-fortynningene.	88
D.3	Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon i FPH (fortynnet 1:200) og råstoffet (fortynnet 1:50).	90

D.4	Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon i FPH (fortynnet 1:100).	90
D.5	Absorbans for proteinekstrakt (1:100) tilsatt 20% TCA.	91
D.6	Gjennomsnittlig konsentrasjon av syreløselige peptider i FPH (fortynnet 1:100) og råstoffet (fortynnet 1:10).	92
E.1	Rådata fra HPLC for kontrollprøven ved lagringstid 6 måneder.	94
E.2	Total aminosyresammensetning i PH tilsatt askorbinsyre.	95
E.3	Total aminosyresammensetning i PH tilsatt sitronsyre.	95
E.4	Total aminosyresammensetning i PH tilsatt propylgallat.	96
E.5	Total aminosyresammensetning i PH tilsatt BHT.	96
E.6	Total aminosyresammensetning i kontrollprøven.	97
E.7	Total aminosyresammensetning i råstoffet.	97
F.1	Rådata fra HPLC for kontrollprøven ved lagringstid 6 måneder.	99
F.2	Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt askorbinsyre.	100
F.3	Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt sitronsyre.	100
F.4	Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt propylgallat.	101
F.5	Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt BHT.	101
F.6	Sammensetning av frie aminosyrer i kontrollprøven.	102
F.7	Sammensetning av frie aminosyrer i råstoffet.	102
G.1	Absorbans for kontrollprøven.	103
G.2	Innhold av tioler i hydrolysatene og råstoffet.	104
H.1	Molekylvekt, elueringsvolum og K_{av} -verdien til vitamin B ₁₂ , aprotinin og cytokrom c.	105

Figurer

1.1	Restråstoff fra laks i prosent av total våtvekt. Figuren er modifisert fra Stevens et al. (2018).	3
1.2	Bruksområder for restråstoff i 2018 (Bærekraft i havbruk, 2020). Figuren ble også presentert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019).	4
1.3	Hydrolyse av peptidkjeden. Figuren er modifisert fra Coultate (2016). . .	5
1.4	Oksidasjonsreaksjon med initiering, propagering og terminering, der • symboliserer et uparet elektron (Coultate, 2016). Figuren ble også presentert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019).	13
1.5	Tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon. Figuren er modifisert fra Baron & Kjærsgård (2007).	14
1.6	Strukturformler og tilhørende egenskaper til askorbinsyre, sitronsyre, propylgallat og BHT (Fisher Scientific, 2020).	15
2.1	Oppsett for hydrolysen.	21
2.2	Fraksjonene etter sentrifugering.	21
2.3	Oversikt over hydrolysen og produksjon av proteinhydrolysater av laksehoder.	21
2.4	Oversikt over utførte analyser på lakseråstoffet.	23
2.5	Oversikt over utførte analyser på FPH.	23
3.1	Mengde vannløselige proteiner [vekt%] i hydrolysaten (fortynnet 1:200) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	34
3.2	Mengde vannløselige proteiner [vekt%] i hydrolysaten (fortynnet 1:100) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	35
3.3	Mengde syreløselige peptider [vekt%] i hydrolysaten (fortynnet 1:100) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	37
3.4	Total aminosyresammensetning [mg/g råstoff] for laksehodene. Standardavvik er gitt for n = 3.	38
3.5	Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt askorbinsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	40

3.6	Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt sitronsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	40
3.7	Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt propylgallat etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	41
3.8	Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt BHT etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	41
3.9	Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for kontrollprøven etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.	42
3.10	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g råstoff] for laksehodene. Standardavvik er gitt for n = 4.	43
3.11	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt askorbinsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 2.	45
3.12	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt sitronsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 2.	45
3.13	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt propylgallat etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 2.	46
3.14	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt BHT etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 2.	46
3.15	Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for kontrollprøven etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 2.	47
3.16	Mengde tioler [nmol/mg protein] i hydrolysatene etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder og råstoffet. Standardavvik er gitt for n = 3.	47
3.17	Kromatogrammet for lakseråstoffet. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	49
3.18	Kromatogrammet for PH med ingen lagringstid (0 md.). De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	50
3.19	Kromatogrammet for PH ved lagringstid 1 måned. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	51
3.20	Kromatogrammet for PH ved lagringstid 2 måneder. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	52
3.21	Kromatogrammet for PH ved lagringstid 4 måneder. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	53
3.22	Kromatogrammet for PH ved lagringstid 6 måneder. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B ₁₂	53
3.23	Visuell fremstilling av hydrolysatene ved økende lagringstid.	55
3.24	Sammenheng mellom DH og mengde frie aminosyrer i hydrolysatene (0 md.).	56
3.25	Sammenheng mellom DH og konsentrasjon av syreløselige peptider i hydrolysatene tilsatt antioksidanter (0 md.).	57
D.1	Standardkurve til BSA-fortynningene.	88
H.1	Standardkurve basert på molekylvekten og elueringsvolumet til vitamin B ₁₂ , aprotinin og cytokrom c.	106
H.2	Kromatogrammet til vitamin B ₁₂	106
H.3	Kromatogrammet til aprotinin.	107

H.4	Kromatogrammet til cytokrom c.	107
I.1	Sammenheng mellom hydrolysegrad og mengde vannløselige proteiner i hydrolysatene (0 md., fortynnet 1:100).	108

Forkortelser

AA	=	askorbinsyre
ACE	=	angiotensin-konverterende enzym
Ala	=	alanin
Arg	=	arginin
Asn	=	asparagin
Asp	=	asparaginsyre
BHT	=	butylhydroksytoluen
BSA	=	bovint serumalbumin
CA	=	sitronsyre
Cys	=	cystein
Da	=	dalton
DH	=	hydrolysegrad
DNP	=	dinitrofenylhydrazin
DTNB	=	ditiobisnitrobenzosyre
FAA	=	frie aminosyrer
FPH	=	fiskeproteinhydrolysat
FPLC	=	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Gln	=	glutamin
Glu	=	glutaminsyre
Gly	=	glycin
Hb	=	hemoglobin
His	=	histidin
HPLC	=	<i>high performance liquid chromatography</i>
Ile	=	isoleucin
Leu	=	leucin
Lys	=	lysin
Met	=	metionin
PG	=	propylgallat
PH	=	proteinhydrolysat
Phe	=	fenylalanin
Pro	=	prolin
ROS	=	reaktive oksygenforbindelser
Ser	=	serin
TAAC	=	total aminosyresammensetning
TCA	=	trikloreddiksyre
Thr	=	treonin
Trp	=	tryptofan
Tyr	=	tyrosin
Val	=	valin

Bakgrunn

I Norge ble det i 2018 produsert 1,5 millioner tonn laks (*Salmo salar*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Dette resulterte i 417 900 tonn restråstoff (Bærekraft i havbruk, 2020). Restråstoff er definert som de delene av fisken som ikke er primære hovedprodukter (Richardsen et al., 2017), og inkluderer blant annet avskjær, skinn, bein, innvoller og hoder (Bekkevold & Olafsen, 2007). Dette restråstoffet går hovedsakelig til produkter med lav markedsverdi, slik som ensilasje og fiskemel (Richardsen et al., 2019). For å øke verdiskapningen er det ønskelig å øke produksjonen av høyverdige produkter til humant konsum, som for eksempel lakseolje og proteinhydrolysat (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019a).

Sjømat Norge har en strategi for å doble verdiskapningen i sjømatnæringen innen 2030 (Sjømat Norge, 2018a). Strategien innebærer blant annet en økt produksjon av oppdrettsfisk, flere arbeidsplasser og nye næringer basert på restråstoffet som ikke utnyttes godt nok i dag (Sjømat Norge, 2018b). Økt produksjon av oppdrettsfisk vil resultere i en større andel restråstoff. Laks, som er den største oppdrettsfisken målt i volum og verdi, stod i 2018 for 68,5% av verdien for norsk sjømateksport (Norges Sjømatråd, 2019). 84% av laksen ble eksportert som hel fisk (sløyd, men ikke hodekappet), mens 16% av råstoffet ble behandlet før eksport (Norges Sjømatråd, 2019). Det er flere grunner til at en større andel av laksen bør bearbeides i Norge før eksport:

- En større mengde restråstoff blir igjen i Norge ved økt bearbeiding (PwC, 2018). Dette sikrer også flere arbeidsplasser i fiskeindustrien (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019b).
- Den marine ingrediensindustrien i Norge er i vekst, og ønsker en større andel norsk restråstoff i sin produksjon. Dette restråstoffet gir økt verdiskapning (Richardsen et al., 2016).

Restråstoff fra fisk inneholder verdifulle omega-3-fettsyrer, slik som eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA), i tillegg til lett-fordøyelige proteinfraksjoner (Rustad et al., 2011). Proteinene kan gjenvinnes ved enzymatisk hydrolyse, som er en effektiv

metode for å forbedre proteinenes funksjonelle og ernæringsmessige egenskaper (Gildberg, 1993; Liaset et al., 2000; Rustad, 2007). Ved bruk av kommersielle enzymer brytes proteinene ned til hydrolysater bestående av peptider med ulik størrelse (Rustad, 2007). Disse hydrolysaterne er tilnærmet fargeløse, og kan brukes som ingrediens i produkter der vannløselighet og vannbindingsevne er viktig (Shahidi, 2007).

- Proteinhydrolysater (PH) har et høyt innhold av essensielle aminosyrer, og kan derfor tilsettes i supper og sauser for å øke proteinnivået (He et al., 2013).
- PH har gode emulgeringsegenskaper, og derfor er de egnet som ingrediens i dressinger, majones og kjøttpålegg (Saha & Hayashi, 2001).
- Hydrolysater kan brukes i næringsdrikker for eldre som trenger proteintilskudd for å holde kroppsvekten ved like eller i dietter for spedbarn som er allergiske mot det opprinnelige proteinet (Aspevik et al., 2017). I Norge er ca. 2-3% av barn mellom 0 og 3 år allergiske mot kumelk (Norges Astma- og Allergiforbund, 2017).

Tidligere var meieriprodukter hovedkilden til bioaktive peptider (He et al., 2013). I dag er det også stor interesse rundt bioaktive peptider fra marint restråstoff (Sánchez & Vázquez, 2017). Proteinhydrolysater inneholder peptider med bioaktive egenskaper, slik som antioksidative og antihypertensive egenskaper (Kim & Mendis, 2006). Disse egenskapene gjør hydrolysaterne egnet som ingrediens i kosttilskudd og funksjonell mat (Slizyte et al., 2016).

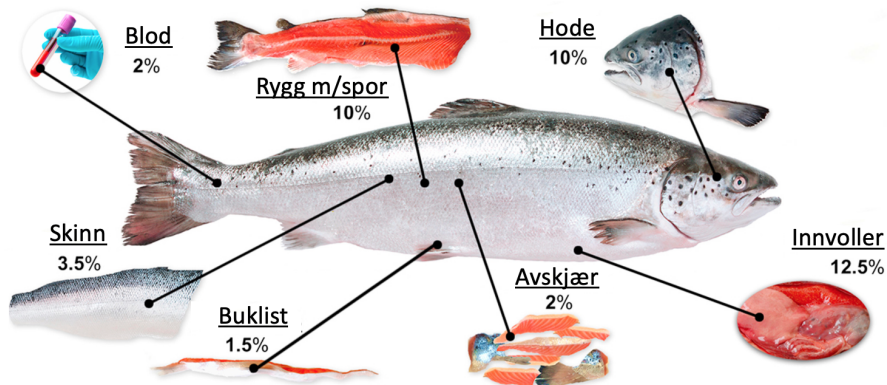
Det er flere utfordringer som hindrer økt verdiskapning fra restråstoff i Norge. For det første er det for liten tilgang på restråstoff av optimal matkvalitet, slik at det produseres lavverdig ensilasje i stedet for produkter til humant konsum (PwC, 2018). I tillegg er restråstoffet utsatt for enzymatisk nedbrytning, oksidasjon og mikrobiell ødeleggelse (Rustad, 2007). Det er derfor nødvendig at råstoffet bearbeides hurtig etter slakt, noe som gjør det mulig å produsere proteinhydrolysater med høy ernæringsmessig kvalitet (Rustad et al., 2011). I tillegg er det utfordringer knyttet til bruken av fiskeproteinhydrolysat (FPH) som ingrediens i menneskemat:

- Ulemper ved bred anvendelse av FPH i ingrediensindustrien er at det ofte smaker bittert (Slizyte et al., 2010). Ved hydrolyse dannes det også en uønsket fiskesmak (Aspevik, 2016).
- Ved lagring kan fordøyeligheten og kvaliteten til proteinhydrolysater endres (Rao et al., 2016). For eksempel kan aggregering redusere løseligheten (Klompong et al., 2012).
- Oksidasjon kan resultere i fargeendring ved lagring (Rao et al., 2016). Hvis hydrolysater skal tilsettes i hvite matvarer, som for eksempel fiskeboller, er det ønskelig at de bevarer fargen ved lagring.

1.1 Marint restråstoff

I animaliebiproduktforskriften (2016) defineres animalske biprodukter som deler eller produkter fra dyr som ikke skal benyttes til humant konsum. Marint restråstoff som er ment for humant konsum, er ikke inkludert i denne definisjonen (Rustad et al., 2011). Tidligere var det vanlig å bruke ord som "fiskeavfall" og "biprodukter" på det som er igjen på fisken etter at fileten er sortert ut (Bekkevold & Olafsen, 2007). Imidlertid kan disse ordene oppfattes som negative av forbrukerne (Rustad et al., 2011). I dag er det vanligere å bruke ordet "restråstoff" (Bærekraft i havbruk, 2020), og derfor vil denne betegnelsen benyttes i denne studien.

Figur 1.1 viser at restråstoffet utgjør 41,5% av den totale våtvekten til en laks. Det er et stort potensial i å utnytte dette råstoffet bedre, og dermed også øke dets verdi (Nofima, 2016). Kjøtt fra ryggbein og avskjær kan brukes til å produsere surimi, mens bein, finner og skinn kan gi opphav til marint kollagen (Rustad, 2007). Innvoller har et høyt innhold av lipider, noe som gjør at de kan brukes som substrat for produksjon av marine oljer (Shahidi, 2007). Hvis råstoffet skal benyttes til høyverdige produkter, slik som ingrediens i næringsmiddelindustrien, må det håndteres som mat hele veien (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019a). Dette sikrer god kvalitet på både råstoffet og det ferdige produktet.

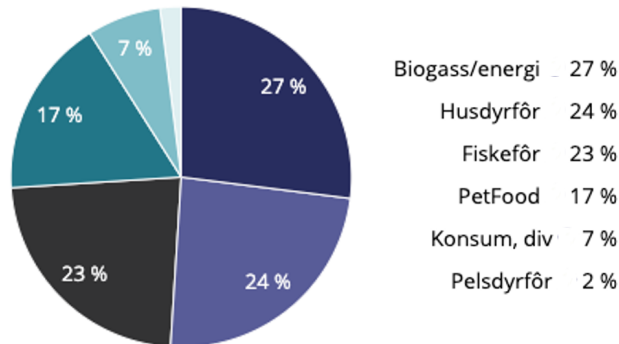


Figur 1.1: Restråstoff fra laks i prosent av total våtvekt. Figuren er modifisert fra Stevens et al. (2018).

1.2 Dagens bruk av marint restråstoff

I 2018 ble 91% av restråstoffet fra laks og ørret utnyttet (380 289 tonn) (Bærekraft i havbruk, 2020). Figur 1.2 viser at nesten halvparten (47%) gikk til ensilasje og videre produksjon av fiske- og husdyrfôr. Ved ensilering vil restråstoffet blandes med et konserveringsmiddel (hovedsakelig maursyre) for å stoppe bakterieveksten i fiskemassen. Ved pH

mellom 3,5 og 4,5 og temperatur over 5 °C, vil endogene enzymer i fisken bryte ned blandingen (autolyse) til en flytende masse (Rubin, 1993). Ensillasjen kan deretter separeres til olje og fiskeproteinkonsentrat, som er etterspurte råvarer i fôrindustrien (Bekkevold & Olafsen, 2007; Bærekraft i havbruk, 2020). Blod er det eneste råstoffet som ikke benyttes, siden det i dag ikke finnes teknologi som kan utnytte denne fraksjonen på en økonomisk og bærekraftig måte (Bærekraft i havbruk, 2020).

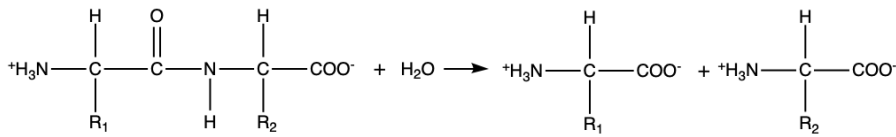


Figur 1.2: Bruksområder for restråstoff i 2018 (Bærekraft i havbruk, 2020). Figuren ble også presentert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019).

Kun 7% av restråstoffet går i dag til human konsum, enten som sjømatprodukter (tørkede fiskehoder, tunger eller buklist fra laksefileter) eller indirekte gjennom foredla produkter (tran eller proteinekstrakter) (Richardsen et al., 2017). For at denne prosentandelen skal øke, må mengden restråstoff som går til biogass og fôr reduseres. I dag forskes det mye på fremtidige fôringredienser, slik som krill, mesopelagisk fisk, tang og insekter (Belghit et al., 2018; Bærekraft i havbruk, 2018). Nye fôringredienser vil muligens redusere behovet for å bruke restråstoff til fôrproduksjon. I tillegg må regelverket legge til rette for at det skal være lønnsomt å produsere høyverdige produkter av restråstoffet (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019a). Proteiner er verdifulle komponenter som kan separeres fra restråstoff ved hydrolyse, og deretter anvendes som ingrediens i matvarer til human konsum (Nofima, 2016).

1.3 Proteinhydrolyse

Restråstoffet kan inneholde opptil 10-20% (v/v) av fiskens totale proteinnivå (Zamora-Sillero et al., 2018). Flere studier har vist at innholdet av råprotein i restråstoffet varierer fra 8 til 35% (Sila & Bougatef, 2016). En effektiv måte å øke verdien på dette proteinet er ved hydrolyse (Zamora-Sillero et al., 2018). I denne prosessen brytes proteiner ned til peptider og frie aminosyrer, som er mer vannløselige enn de opprinnelige proteinene (Adler-Nissen, 1976). Figur 1.3 viser hydrolytisk kløyving av peptidkjeden.



Figur 1.3: Hydrolyse av peptidkjeden. Figuren er modifisert fra Coultate (2016).

For å kunne produsere hydrolysater med funksjonelle og bioaktive egenskaper er det viktig å ha kontroll over hydrolysen (Kristinsson & Rasco, 2000). Disse egenskapene vil bli nærmere utdypet i delkapittel 1.4. Hydrolysegrad (DH) blir brukt som kontrollparameter (Adler-Nissen, 1986), og defineres som prosentandelen av spaltede peptidbindinger (Adler-Nissen, 1976). Formolittrenging er en mye brukt metode for å bestemme hydrolysegraden til fiskeproteiner og restråstoff (Rutherford, 2010). Prosentvis grad av hydrolyse kan uttrykkes slik (Adler-Nissen, 1986):

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100\% \quad (1.1)$$

h er antall brutte peptidbindinger og h_{tot} er totalt antall peptidbindinger i proteinet. En økende grad av hydrolyse gir en større andel brutte peptidbindinger, noe som i teorien vil gi hydrolysater med høyere løselighet. Dette vil diskuteres nærmere i delkapittel 3.10.

1.3.1 Kjemisk hydrolyse

Kjemisk hydrolyse kan enten utføres med syrer eller baser (Petrova et al., 2018). Denne metoden er relativt billig, og har derfor vært den industrielt foretrukne metoden (Kristinsson & Rasco, 2000). Imidlertid er metoden vanskelig å kontrollere grunnet høye temperaturer og bruk av sterke syrer og baser, noe som resulterer i et heterogent utbytte av peptider med lav næringsverdi (Celus et al., 2007; Zamora-Sillero et al., 2018).

Syrehydrolyse

Syrehydrolyse er mer vanlig enn alkalisk hydrolyse (Kristinsson & Rasco, 2000). I denne prosessen blandes fiskeprotein med saltsyre eller svovelsyre, som deretter hydrolyseres ved høy temperatur og høyt trykk. Deretter nøytraliseres blandingen til pH mellom 6,0 og 7,0, før den til slutt konsentreres eller tørkes, avhengig av hva hydrolysater skal brukes til videre (Thakar et al., 1991). Hydrolysater produsert ved syrehydrolyse blir hovedsakelig brukt som gjødsel (Sanmartín et al., 2009). Ulemper ved å hydrolysere proteiner med 6 M saltsyre er som følger:

- Asparagin (Asn) og glutamin (Gln) vil hydrolyseres til henholdsvis asparagin- (Asp) og glutaminsyre (Glu) (Ghaly et al., 2013), mens tryptofan (Trp) vil ødelegges (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008). Ved bestemmelse av total aminosyresammensetning er det derfor ikke forventet å finne disse aminosyrene.
- Cystein (Cys) og metionin (Met) vil enten delvis ødelegges eller oksideres til henholdsvis cysteinsyre eller metionin sulfoksid (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

- NaOH-nøytralisering øker mengden salt, noe som gjør hydrolysatene lite egnet som matingrediens (Kristinsson & Rasco, 2000).

Alkalisk hydrolyse

Alkalisk hydrolyse, som vanligvis utføres med natrium-, kalium- eller kalsiumhydroksid, er en relativt enkel prosess (Pasupuleti & Braun, 2008). I hydrolysen skjer det først en hurtig kløyving av proteiner til store, vannløselige polypeptider. Deretter brytes disse polypeptidene ned til peptider og aminosyrer i en sakte prosess (Slizyte, 2004). Fordelen ved denne metoden er at Trp bevares (Pasupuleti & Braun, 2008). Alkalisk hydrolyse er likevel lite brukt i matindustrien grunnet utfordringene prosessen medfører:

- Treonin (Thr), serin (Ser), Cys og arginin (Arg) vil ødelegges under hydrolysen (Ghaly et al., 2013; Gupta et al., 1997).
- Rasemisering av L-aminosyrer og dannelse av D-aminosyrer (Linder et al., 1995). Disse aminosyrene tas ikke opp av mennesker (Lahl & Braun, 1994).
- Addisjons- og eliminasjonsreaksjoner kan danne lysinoalanin, en forbindelse som er giftig for mennesker (Lahl & Braun, 1994).

1.3.2 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse brukes til å lage proteinhydrolysater med bedre funksjonelle, bioaktive og ernæringsmessige egenskaper sammenlignet med det opprinnelige proteinet (Kim & Wijesekara, 2010; Shahidi et al., 1995). Ved å kombinere milde reaksjonsbetingelser med spesifikke enzymer, er det mulig å kontrollere prosessen i større grad, og dermed kunne produsere skreddersydde hydrolysater (Pasupuleti & Braun, 2008). Adler-Nissen (1984) foreslo fem uavhengige variabler som er involvert i hydrolysen: substratkonsentrasjon, enzym-substrat-forhold, tid, temperatur og pH. I tillegg er type enzym og substratets egenskaper viktige faktorer (Pasupuleti & Braun, 2008).

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra fisk starter med å blande kvernet råstoff med vann, før blandingen homogeniseres og enzym tilsettes (Guerard, 2007). Hydrolysen kan vare fra én til flere timer ved temperaturer rundt 35-65 °C (Petrova et al., 2018). Valg av enzym er en viktig faktor, siden forskjellige enzymer har ulike reaksjonsbetingelser og spesifisitet, noe som resulterer i produkter med ulik sammensetning (Kristinsson, 2007). Ved produksjon av FPH har det blitt anvendt enzymer av animalsk opprinnelse (f.eks. pepsin), fra planter (f.eks. papain og bromelain) og mikrobielle kilder (f.eks. Alcalase®) (Guerard, 2007; Petrova et al., 2018). Når ønsket hydrolysegrad er oppnådd, blir enzymet inaktivert ved å varme opp løsningen til temperaturer mellom 85-95 °C i 5-20 minutter (Zamora-Sillero et al., 2018).

Ved kontrollerte hydrolyser blir det tilsatt kommersielle enzymer (Kristinsson, 2007). Proteaser er enzymer som kløyver peptidbindinger ved tilsats av vann (Slizyte, 2004). Disse enzymene er ofte brukt i matindustrien (Guerard, 2007), og er delt inn i fire grupper (aspartiske, serin-, cystein- og metalloproteaser) basert på deres katalytiske mekanisme (Rao et al., 1998). Proteaser er videre delt inn etter hvor i peptidkjeden de kutter (Mackie, 1982).

1. Endopeptidaser kløyver bindinger inne i peptidkjeden. Dette resulterer i mange peptider, men relativt få frie aminosyrer (Kristinsson, 2007). Antall kløyvinger av peptidkjeden kan bestemmes av spesifisiteten til endopeptidaser (Slizyte, 2004).
2. Eksopeptidaser fjerner aminosyrer fra amino- eller karboksylenden ved hydrolyse av peptidbindinger (Kristinsson & Rasco, 2000; Mackie, 1982). Ved aminoenden frigjør aminopeptidaser én enkelt aminosyre, et dipeptid eller et tripeptid. Ved karboksylenden vil karboksylpeptidaser frigjøre enten en fri aminosyre eller et dipeptid (Rao et al., 1998). Bruk av eksopeptidaser resulterer i mange frie aminosyrer, men et lite antall store peptider (Kristinsson, 2007). Ved å kombinere endopeptidaser med eksopeptidaser oppnås en mer fullstendig nedbrytning (Guerard, 2007).

Autolyse

Hydrolyse kan også utføres ved hjelp av fiskens fordøyelsesenzymer (proteaser) (Rustad, 2007). Disse enzymene varierer etter type fisk, alder og årstid, men består i all hovedsak av serin- og tiolproteaser. Stor variasjon i mengde og aktivitet til enzymene gjør det vanskelig å kontrollere hydrolyseprosessen, noe som resulterer i en væske bestående av små peptider og frie aminosyrer (Kristinsson & Rasco, 2000). Autolyse blir som regel brukt til å produsere ensilasje og fiskesaus (Slizyte, 2004).

Valg av type hydrolyseprosess er derfor avgjørende for hvilket sluttprodukt som er ønskelig. Tabell 1.1 viser fordeler og ulemper ved autolyse, enzymatisk og kjemisk hydrolyse.

Tabell 1.1: Sammenligning av autolyse, enzymatisk og kjemisk hydrolyse. Tabellen er modifisert fra Guerard (2007).

Prosess	Fordeler	Ulemper
Autolyse	<ul style="list-style-type: none"> - Milde reaksjonsbetingelser - Ingen tilsats av enzymer - Lave kostnader - Ingen ødeleggelse av aminosyrer 	<ul style="list-style-type: none"> - Sakte prosess - Endogene enzymer med ulike reaksjonsbetingelser - Stor variasjon i enzymsammensetning - Sluttprodukt med dårlige funksjonelle egenskaper og ulik molekylvekt
Enzymatisk hydrolyse	<ul style="list-style-type: none"> - Milde reaksjonsbetingelser - Gir sluttprodukter med funksjonelle og bioaktive egenskaper, samt høyt næringsinnhold - Ingen ødeleggelse av aminosyrer - Kontroll på molekylvekten til sluttproduktene 	<ul style="list-style-type: none"> - Enzymkostnader - Kompleks prosess
Kjemisk hydrolyse	<ul style="list-style-type: none"> - Lave kostnader - Høy løselighet - Hurtig reaksjon 	<ul style="list-style-type: none"> - Høye temperaturer og sluttprodukter med store mengder salt - Ødeleggelse av aminosyrer og rasemisering

1.4 Funksjonelle og bioaktive egenskaper til FPH

Proteiner fra restråstoff fra fisk er verdifulle og næringsrike forbindelser med gode egenskaper som kan anvendes i næringsmiddelindustrien (Rustad et al., 2011). I tabell 1.2 er viktige funksjonelle og bioaktive egenskaper listet opp.

Tabell 1.2: Funksjonelle og bioaktive egenskaper i fiskeproteiner (Halim et al., 2016; Kim & Wijesekara, 2010).

Funksjonelle egenskaper	Bioaktive egenskaper
God løselighet i et bredt pH-spekter	Antihypertensive
Vann- og oljebindingsevne	Antitrombotiske
Emulgerings- og skumegenskaper	Immunmodulerende
Kan forbedre tekstur i mat	Antioksidative
Mulighet for å danne gel	Antimikrobielle

1.4.1 Funksjonelle egenskaper

Funksjonelle egenskaper er definert som fysikalsk-kjemiske egenskaper til proteiner i mat ved prosessering, lagring og konsumering (Halim et al., 2016). Ved kontrollert enzymatisk hydrolyse kan egenskapene til proteiner fra restråstoff endres (Chalamaiah et al., 2012). For det første kan antall ioniserbare grupper økes, og for det andre kan molekylvekten reduseres. Som et resultat av nedbrytingen av proteinet, vil også aminosyrenes hydrofobe grupper eksponeres i større grad (He et al., 2013). Her presenteres de viktigste funksjonelle egenskapene i matvarer; løselighet, emulgeringskapasitet og oljebindingsevne (He et al., 2013).

Løselighet

Proteiner som skal anvendes i supper og drikker må ha høy løselighet i systemet (Adler-Nissen, 1976). Høy løselighet kan oppnås ved høy hydrolysegrad, noe som gir mindre peptider med lavere molekylvekt, samt økt eksponering av ioniserbare amino- og karboksylgrupper i aminosyrene (Gauthier et al., 1993; Shavandi et al., 2019). Gbogouri et al. (2004) viste at hydrolysater fra laksehoder hadde høyere løselighet (95%) sammenlignet med ikke-hydrolyserte proteiner fra laksehoder (22%). Løselighet vil også påvirke andre funksjonelle egenskaper, slik som emulgeringskapasitet og geldannelse (He et al., 2013).

Emulgeringsegenskaper

Proteinhydrolysater er overflate-aktive forbindelser som kan fremme olje-i-vann-emulsjoner på grunn av deres hydrofile og hydrofobe grupper (Gbogouri et al., 2004; Wilding et al., 1984). Proteiner vil absorberes til overflaten av nydannede oljedråper under homogenisering, og på den måten danne et beskyttende lag som hindrer dråpene i å smelte sammen (Demetriades et al., 1997; Kristinsson & Rasco, 2000). I studien til Slizyte et al. (2005) ble det funnet at emulgeringskapasiteten til hydrolysater fra torsk (*Gadus morhua*) (innvoller og rygg med spor, 128,3 g olje emulgert/g pulver) var høyere enn emulgeringskapasiteten til kasein (17,0 g olje emulgert/g pulver). Slizyte et al. (2005) observerte også at et høyere

proteininnhold i FPH førte til økende emulgeringskapasitet.

Kontrollerte hydrolysebetingelser er viktig for å oppnå FPH med optimale emulgerings-egenskaper (Kristinsson & Rasco, 2000). Klompong et al. (2007) fant at emulgeringskapasiteten til hydrolysater av taggmakrell (*Selaroides leptolepis*) sank med økende hydrolysegrad. En høy hydrolysegrad vil føre til mange små peptider. Disse peptidene vil gi en dårligere reduksjon i overflatespenningen sammenliknet med proteiner med større molekylvekt, siden de ikke kan utfolde og reorientere seg på overflaten (Gbogouri et al., 2004). Tilsvarende vil lave hydrolysegrader gi bedre emulgeringsegenskaper (Klompong et al., 2007).

Oljebindingsevne

Oljebindingsevne defineres som mengde olje som er direkte bundet av proteinet (Gbogouri et al., 2004), og er derfor avhengig av hydrofobisiteten til proteinet (He et al., 2013). Denne funksjonelle egenskapen er spesielt viktig i kjøtt- og konditorvarer (Sathivel et al., 2004). Slizyte et al. (2005) fant at oljebindingsevnen til torskhydrolysater (fra 1,6 til 5,0 g olje/g protein) var signifikant høyere enn oljebindingsevnen til proteiner fra soyabønner (1,2 g olje/g protein). I tillegg var det positiv korrelasjon mellom fettabsorpsjon og mengde lipider i proteinhydrolysaten.

1.4.2 Bioaktive egenskaper

Bioaktive peptider er peptider med biologiske egenskaper som kan gi helsemessige fordeler (Agyei et al., 2019). I dag er det en økende interesse for å utnytte disse peptidene i mat- og helseprodukter (Agyei et al., 2019; Chakrabarti et al., 2018). Flere studier har vist at det er mulig å utvinne bioaktive peptider fra restråstoff fra fisk og skaldyr (Kim & Mendis, 2006; Kim & Wijesekara, 2010). Disse komponentene kan isoleres ved enzymatisk hydrolyse, ekstraksjon eller mikrobiell fermentering av proteiner. Næringsmiddel- og farmasøytisk industri ønsker produkter som verken er giftige eller som er produsert med organiske løsemidler. Dette gjør at enzymatisk hydrolyse er en foretrukket produksjonsmetode (Kim & Wijesekara, 2010).

Bioaktiviteten er avhengig av molekylvekten og størrelsen på peptidene (Zamora-Sillero et al., 2018). Vanligvis inneholder peptidene mellom 2 og 20 aminosyrer per molekyl (Meisel & FitzGerald, 2003), og har en molekylmasse på mindre enn 6000 Da (Sun et al., 2004). Peptidstrukturen er også avhengig av det opprinnelige proteinet, hydrolysegrad og type enzym brukt under hydrolysen (Välilmaa et al., 2020). Det er publisert en rekke artikler som har undersøkt egenskapene til bioaktive peptider, deriblant antihypertensive, antitrombotiske, immunmodulerende og antioksidative egenskaper (Sánchez & Vázquez, 2017).

Antihypertensive egenskaper

Det er kjent at høyt blodtrykk (hypertensjon) gir en større risiko for å utvikle hjerte- og karsykdommer (Fuchs & Whelton, 2020; Kjeldsen, 2018). Blodtrykket øker ved at angiotensin-I (inaktiv) omdannes til angiotensin-II (aktiv) ved ACE (angiotensin-konverterende enzym), noe som igjen gir større belastning på hjertet (Al-Karbawi, 2019). Inhibering av ACE er derfor viktig for å kunne kontrollere blodtrykket (Kim & Wijesekara, 2010). Flere

studier har vist at proteinhydrolysater fra marint restråstoff har ACE-inhiberende effekt (Välilmaa et al., 2020). I dag finnes det flere FPH-baserte produkter på markedet som antas å redusere blodtrykket, f.eks. Vasotensin® og PeptACE® avledet fra makrell (*Sarda orientalis*) (Chalamaiah et al., 2012).

Antitrombotiske egenskaper

Inntak av mat med bioaktive peptider som hemmer trombose (koagulering av blod i en blodåre) kan være med å senke forekomsten av hjerte- og karsykdommer (Scilingo et al., 2016). I dag brukes heparin som et kommersielt antikoagulasjonsmiddel ved behandling av trombose. På grunn av bivirkninger knyttet til bruken av heparin, er det ønskelig med tryggere midler til antitrombotisk behandling (Kim & Wijesekara, 2010).

Jung & Kim (2009) viste at bioaktive peptider isolert fra blåskjell hadde bedre antikoagulerende egenskaper enn heparin. I en studie av Khiari et al. (2014) hadde bioaktive gelatinpeptider fra makrellskinn bedre antikoagulerende egenskaper sammenlignet med den syntetiske forbindelsen aspirin. Aminosekvensen spiller en viktig rolle ved inhibering av plateaggregering (Chalé et al., 2016). Høyt innhold av aminosyrene isoleucin (Ile), leucin (Leu) og fenyilalanin (Phe) har vist høy antitrombotisk aktivitet (Shimizu et al., 2009). Siden marine antikoagulerende peptider ikke er giftig, kan de fungere som funksjonelle ingredienser i mat (Kim & Wijesekara, 2010).

Immunmodulerende egenskaper

Substanser som kan øke eller redusere immunresponser ved å endre det medfødte eller ervervede immunforsvaret, kalles immunmodulatorer (Chalamaiah et al., 2018). Mesteparten av dagens immunmodulerende medisiner er kostbare og har giftige bivirkninger, og er derfor ikke egnet for behandling av kroniske sykdommer (Chalamaiah et al., 2018; Duarte et al., 2006; Wang et al., 2010). Derfor er det en økende interesse i å identifisere nye forbindelser som kan styrke det ervervede immunforsvaret (Yang et al., 2001).

Fiskeproteiner inneholder store mengder bioaktive sekvenser, som igjen kan fungere som immunmodulatorer. Studier har vist at inntak av fiskeproteiner i kostholdet har ført til lavere kolesterolnivå (Wergedahl et al., 2004), samt økning av kroppsvekt og balanse i aminosyreprofilen hos hemodialysepasienter (Tietze & Pedersen, 1991). Det har blitt rapportert om at immunmodulerende peptider består av mellom 2 og 10 aminosyrer, samt at de har et høyere innhold av glycin (Gly), Leu, prolin (Pro), valin (Val), Phe, tyrosin (Tyr) og Glu (Chalamaiah et al., 2018).

Antioksidative egenskaper

Reaktive oksygenforbindelser (ROS) genereres kontinuerlig under celleånding (Välilmaa et al., 2020; Zamora-Sillero et al., 2018). Studier har vist at disse frie radikalene kan være en årsak til hypertensjon, kreft og diabetes (Chalamaiah et al., 2012). ROS kan også oksidere fett i matvarer ved lagring, noe som kan resultere i harsk lukt og smak (Sarmadi & Ismail, 2010; Välilmaa et al., 2020). For å hindre oksidasjon i mat, blir det brukt store mengder syntetiske antioksidanter (Kim & Wijesekara, 2010). Grunnet helserisiko knyttet til syntetiske antioksidanter, letes det i dag etter naturlige antioksidanter (Franco et al., 2020).

Peptider fra fiskeproteiner er funnet å kunne fungere som antioksidanter i ulike oksidative systemer (Jun et al., 2004; Rajapakse et al., 2005; Slizyte et al., 2009). Disse peptidene er inaktive i det opprinnelige proteinet, men kan frigjøres ved enzymatisk hydrolyse (Chalamaiah et al., 2012). Aminosyresammensetning og hydrofobisitet er to faktorer som påvirker antioksidative egenskaper til peptider fra FPH (Ren et al., 2008).

Flere studier har vist at antioksidative peptider inneholder mellom 2 og 16 aminosyrer (Bougatef et al., 2010; You et al., 2010), samt aromatiske (histidin (His), Tyr, Trp og Phe), hydrofobe (alanin (Ala) og Val) og svovel-inneholdende (Cys og Met) aminosyrer (Liu et al., 2016; Sarmadi & Ismail, 2010). Aromatiske aminosyrer kan lage kompleksbindinger med prooksidanter, mens hydrofobe aminosyrer kan øke løseligheten til peptider i lipidfasen (Agyei et al., 2019). Cys kan hindre oksidasjon ved at SH-gruppen kan fungere som en radikal fjerner (Ren et al., 2008).

1.5 Anvendelsesområder for proteinhydrolysater

I dag er det knyttet stor interesse til å bruke fiskeproteinhydrolysater i matindustrien. For det første har råstoffet i utgangspunktet lav verdi, og for det andre har sluttproduktet et høyt proteininnhold. I tillegg er de essensielle aminosyrene funnet i rikelige mengder i FPH (Chalamaiah et al., 2012). Nesse et al. (2014) viste at Amizate®, et proteinhydrolysat avledet fra laks (*S. salar*), fungerte som et proteinsupplement i dietten til underernærte barn. Barn som inntok en sjokoladedrikk tilsatt Amizate® i fire måneder, hadde signifikant høyere kroppsmasseindeks sammenlignet med de som drakk sjokoladedrikk uten Amizate® (Nesse et al., 2014). Proteinhydrolysater kan også brukes i sportsernæring grunnet det høye innholdet av kortkjedete aminosyrer (Manninen, 2009).

Det høye innholdet av bioaktive komponenter gjør at FPH kan brukes som kosttilskudd (He et al., 2013). Sammenlignet med syntetiske medikamenter, har hydrolysater fra biologiske kilder flere fordeler. For det første har de relativt høy bioaktivitet, og for det andre anses de for å gi mindre bivirkninger. I tillegg er proteinhydrolysater og peptider med lav molekylvekt mindre allergifremkallende enn det intakte proteinet (Nasri, 2017). I dag finnes det FPH-baserte produkter på markedet som hevder å hjelpe mot blant annet oksidativt stress, søvnproblemer og konsentrasjonsvansker (Chalamaiah et al., 2012).

For at produkter med FPH skal kunne implementeres på markedet, må de være trygge for forbrukerne. Dette innebærer at produktene ikke skal gi allergiske reaksjoner, ha for høyt histamininnhold eller inneholde skadelige mikroorganismer (He et al., 2013):

- 22% av alle pasientene som er overfølsomme for mat, er allergisk mot sjømat (Pascual et al., 1992). Siden hydrolysater produseres fra fiskeprotein, kan også de gi allergier (He et al., 2013). Videre studier må derfor undersøke hvilke fiskearter, produksjonsmetoder og reaksjonsbetingelser som gir FPH uten allergifremkallende forbindelser.

- Ved dekarboksylering av fritt His, som finnes i store mengder i musklene til makrell og tunfisk (Taylor & Eitenmiller, 1986), dannes histamin (Visciano et al., 2014). Histaminforgiftning skjer ved inntak av fisk med uvanlig høyt innhold av histamin (Taylor et al., 1989). For at FPH skal kunne anvendes i mat må histaminnivået ikke overstige grensene satt av EU (< 400 mg/kg i fiskeprodukter som er enzymbehandlet i saltlake) (Visciano et al., 2014). Siden histamin sjelden finnes i fersk fisk, vil bruk av ferskt råstoff hindre at grensene overskrides (Shakila et al., 2003).
- Inaktivering av enzymet (90 °C i 30 minutter) brukt i hydrolyseprosessen tilsvarer pasteurisering. Denne prosessen kan eliminere rundt 90% av skadelige mikroorganismer (He et al., 2013).

1.6 Dagens utfordringer ved FPH

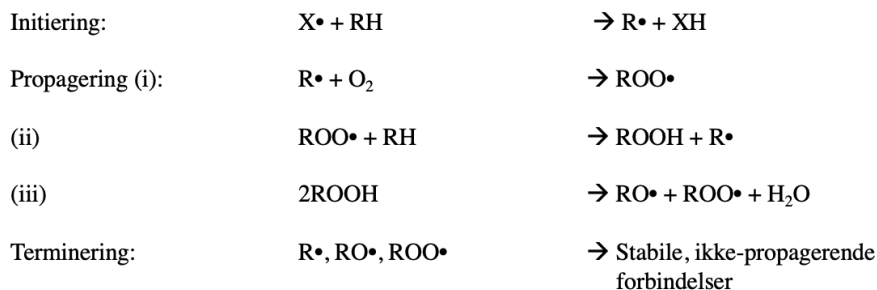
1.6.1 Oksidasjon

Restråstoff fra fet fisk, som f.eks. avskjær, hode, innvoller og rygg med spor, har et høyt innhold av polyumettede fettsyrer og prooksidanter, noe som gjør at det er særlig utsatt for oksidasjon (Halldorsdottir et al., 2014; Rustad et al., 2011). Ved lipidoksidasjon dannes det ustabile frie radikaler og hydrogenperoksider, som igjen kan påvirke smak og vitaminsammensetning. Videre vil det dannes hydrokarboner, ketoner, alkoholer, aldehyder og epoksider. Disse forbindelsene vil binde seg til proteiner og danne uløselige lipid-protein-komplekser (Halldorsdottir et al., 2014). Som et resultat av dette kan det føre til uønsket lukt og farge, samt reduksjon av kvaliteten til lipidene (Hematyar et al., 2019; Yarnpakdee et al., 2014).

Fisk som lever i kaldt vann, som f.eks. laks (*S. salar*) og regnbueørret (*O. mykiss*), har et høyt innhold av prooksidantene jern og hemoglobin (Hb) (Hultin, 1994). Hemoglobin kan fremme lipidoksidasjon, siden mye av blodet er igjen i råstoffet før hydrolysen (Richards et al., 2005). Hb inneholder en heme-gruppe, som består av et jernatom i en heterosyklisk ring. Ved autooksidering av jernatomet vil det endre tilstand fra Fe^{2+} til Fe^{3+} , der Fe^{3+} er ansvarlig for at lipidoksidasjonen akselereres. I denne prosessen vil det også frigjøres et superoksid anionradikal. Dette radikalet vil omdannes til hydrogenperoksid, som deretter produserer prooksidanten ferrylHb (Kanner & Harel, 1985; Yarnpakdee et al., 2014). I et forsøk utført av Fu et al. (2009) ble det funnet at Hb og enzymet lipoksygenase katalyserte lipidoksidasjon i kvernet sølvkarpe (*Hypophthalmichthys molitrix*), noe som resulterte i harskning og fiskelukt.

For å hindre uønsket smak og lukt i hydrolysatene, kan prooksidanter og fosfolipider fjernes ved å behandle råstoffet før hydrolysen. I et forsøk ble kvernet dyphavsabbor (*Lutjanus vitta*) forbehandlet med vasking og membranseparering, noe som resulterte i hydrolysat med antioksidativ aktivitet og et lavere innhold av prooksidanter og fosfolipider (Khantaphant et al., 2011). Dette hydrolysatet kan brukes til å senke lipidoksidasjon i mat med neglisjerbar prooksidativ aktivitet (Khantaphant et al., 2011).

Det er generelt akseptert at autooksidasjon av fettsyrer skjer i tre steg; initiering, propagering og terminering (Frankel, 1980; Paquette et al., 1985). Figur 1.4 viser reaksjonene som er involvert i autooksidasjonen:



Figur 1.4: Oksidasjonsreaksjon med initiering, propagering og terminering, der \bullet symboliserer et uparet elektron (Coultrate, 2016). Figuren ble også presentert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019).

I initieringen dannes det frie radikaler ($R\bullet$). Disse frie radikalene vil så reagere med atmosfærisk oksygen i propageringen, slik at det dannes peroksidradikaler ($ROO\bullet$). Peroksidradikaler, som er svært reaktive, kan angripe allyliske hydrogen i umettede fettsyrer, og deretter danne en blanding bestående av isomere hydrogenperoksider ($ROOH$) (Frankel, 1980; Paquette et al., 1985). Ved høye temperaturer eller ved tilstedeværelse av metaller kan $ROOH$ brytes ned til sekundære produkter, f.eks. aldehyder, ketoner eller kortkjedete hydrokarboner (Choe & Min, 2006). I propageringen regenereres også frie radikaler, som igjen fører til en kjedereaksjon (Coultrate, 2016). Til slutt kan kjedereaksjonen termineres ved at radikaler reagerer med hverandre og danner stabile endeprodukter (Coultrate, 2016; Hematyar et al., 2019).

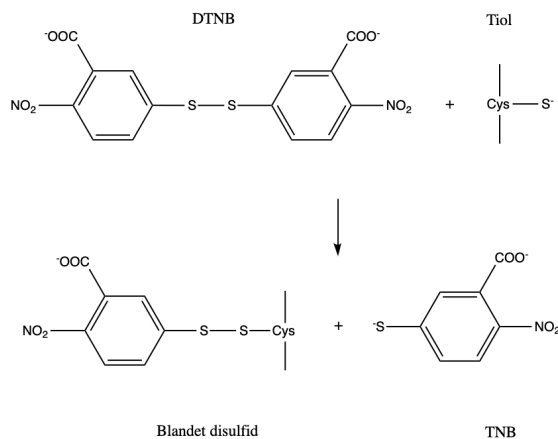
Proteinoksidasjon kan også resultere i kvalitetsendringer, der faktorene som fører til lipidoxidasjon også kan føre til proteinoksidasjon i både råstoffet og FPH. Oksidasjon av proteiner kan enten skje direkte eller indirekte (Hematyar et al., 2019). Ved direkte oksidasjon reagerer reaktive oksygen- eller nitrogenforbindelser med proteiner og peptider. Disse forbindelsene vil reagere med peptidkjeden og sidegruppene. Som et resultat av dette kan det dannes karbonylgrupper og hydrogenperoksider, eller kryssbindinger (disulfid- og dityrosinbindinger) (Lund et al., 2011). Ved indirekte oksidasjon reagerer proteiner med mellomprodukter fra lipidoksidasjonen (Hematyar et al., 2019; Lund et al., 2011).

Oksidasjon av proteiner i råstoffet kan føre til biokjemiske og strukturelle endringer, deriblant tap av essensielle aminosyrer. I tillegg kan funksjonelle egenskaper endres ved dannelse av kryssbindinger (Lund et al., 2011; Standal et al., 2018). De vanligste metodene for å bestemme proteinoksidasjon er ved å måle karbonylgrupper (1), dityrosin (2) eller tioler (3) (Hematyar et al., 2019):

1. I karbonylering, som skjer ved metall-katalysert oksidasjon av Arg, Pro og lysin (Lys) (Lund et al., 2011), dannes det ketoner og aldehyder (Suzuki et al., 2010).

Disse karbonylforbindelsene kan måles ved ELISA-metoden. Dette gjøres ved å reagere proteinene med dinitrofenylhydrazin (DNP), og deretter måle bundet DNP kolorimetrisk (Enzo, 2020).

- Oksidasjon av proteiner fører til dannelse av kryssbindinger mellom Tyr, noe som resulterer i dityrosin (Aeschbach et al., 1976). Mengden Tyr i proteinhydrolysater kan måles ved å bestemme total aminosyresammensetning eller ved å måle dannelse av dityrosin ved massespektrometri (Mukherjee et al., 2017).
- Tiolgruppen til Cys (R-SH) kan oksideres av hydrogenperoksid (Neumann, 1972). Tap av tioler i proteiner er ofte basert på Ellmans reagens, ditiobisnitrobenzosyre (DTNB) (Lund et al., 2011). DTNB, en symmetrisk disulfid-aryl, kan ved nærvær av frie tioler gjennomgå en tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon (figur 1.5). Sammenlignet med disulfidene har TNB-anionet som dannes i reaksjonen, en sterk absorpsjon ved 412 nm. Siden forholdet mellom tioler og TNB er 1:1, kan innholdet av tioler bestemmes ved bruk av spektrofotometer (Baron & Kjærsgård, 2007).

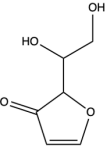
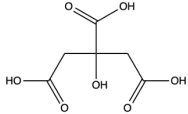
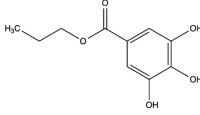
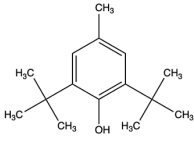


Figur 1.5: Tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon. Figuren er modifisert fra Baron & Kjærsgård (2007).

Antioksidanter

Det er flere måter å forsinke en oksidasjon på. En mulighet er å fjerne prooksidanter (f.eks. metaller). En annen mulighet er å tilsette antioksidanter (Choe & Min, 2009). I en studie utført av Yarnpakdee et al. (2012a) ble det funnet at tilsats av syntetiske antioksidanter (Trolox og EDTA) forhindret lipidoksidasjon under hydrolysen av nilmunnruger (*Oreochromis niloticus*). Som nevnt tidligere, er det en økende trend i å bruke naturlige antioksidanter. Halldorsdottir et al. (2013) rapporterte om signifikant lavere oksidasjon ved tilsats av naturlige antioksidanter (L-askorbinsyre og *Fucus vesiculosus*-ekstrakt) ved hydrolyse av hvit muskel fra torskefileter (*G. morhua*). Figur 1.6 viser antioksidative egen-

skaper til askorbinsyre (AA), sitronsyre (CA), propylgallat (PG) og butylhydroksytoluen (BHT).

Askorbinsyre	Sitronsyre	Propylgallat	BHT
			
Naturlig antioksidant	Naturlig antioksidant	Syntetisk antioksidant	Syntetisk antioksidant
Vannløselig	Vannløselig	Amfifil	Fettløselig
Radikalfjerner	Kompleksbinder	Kompleksbinder	Radikalfjerner
Prooksidant	Synergist	Radikalfjerner	

Figur 1.6: Strukturformler og tilhørende egenskaper til askorbinsyre, sitronsyre, propylgallat og BHT (Fisher Scientific, 2020).

Inaktivering av frie radikaler

Antioksidanter kan inhibere initieringen og propageringen (figur 1.4) ved å inaktivere eller fjerne frie radikaler (Decker, 1998). Dette gjøres ved å donere et H-atom slik at det dannes relativt stabile antioksidantradikaler (Choe & Min, 2009). Jo lavere energinivå det resulterende antioksidantradikalet har, jo mindre er sannsynligheten for at det vil oksidere andre molekyler i løsningen. Radikalets energinivå er et resultat av resonansstabilisering (Decker, 1998). I tillegg er effektiviteten til frie radikalfjerner i mat avhengig av matens pH-verdi og polaritet (Nawar, 1996).

Frie radikaler kan inaktiveres av fenoler, en gruppe aromatiske forbindelser bundet til en hydroksylgruppe. Hydrogendonasjon skjer gjennom hydroksylgruppen, og det resulterende antioksidantradikalet kan resonansstabiliseres av fenolgruppen (Decker, 1998). Effektiviteten til fenoler kan økes ved å erstatte hydrogenatomer i orto- og para-posisjoner med alkylgrupper. Dette fører til en økende elektrontetthet, noe som igjen gir økt reaktivitet mot lipidradikaler (Decker, 1998; Shahidi & Wanasundara, 1992). Eksempler på frie radikalfjerner er syntetiske fenoler (BHT og propylgallat) og vannløselige forbindelser (askorbinsyre).

BHT

BHT er en upolar antioksidant, noe som gjør at den brukes til å forhindre oksidasjon i animalsk fett, fiskefett og planteoljer (Shahidi & Nacz, 1995). Dette skjer ved dannelse av stabile fenolradikaler som ikke reagerer videre med oksygen, og dermed hindrer autooksidering (Shahidi & Wanasundara, 1992). I en studie utført av Özen & Soyer (2018) ble det funnet at BHT reduserte lipidoksidasjon ved fryselagring av kvernet makrell (*Scomber*

scombrus).

Propylgallat

Propylgallat produseres kommersielt ved esterifisering av gallinsyre med propanol. Overflødig alkohol fjernes ved destillering (Shahidi & Naczk, 1995). Propylgallat er en amfil antioksidant, men er mer løselig i fett enn i vann. Antioksidanten beskytter mot oksidasjon på samme måte som BHT, men kan i tillegg danne kompleksbindinger med jernioner (Shahidi & Wanasundara, 1992). Kristinova et al. (2009) viste at propylgallat var effektiv mot oksidasjon av marine fosfolipider.

Askorbinsyre

Askorbinsyre er vannløselig, og kan derfor inaktivere frie radikaler som dannes i vannfasen til mat (Decker, 1998). Det er flere fordeler ved bruk av askorbinsyre. For det første er askorbatradikalet som dannes lite reaktivt med vann, og for det andre er askorbinsyre effektiv selv i små konsentrasjoner (Buettner, 1993). Askorbat er en reduserende forbindelse, noe som gjør at den kan katalysere reduksjon av overgangsmetaller. Disse kan danne radikaler hvis de reagerer med hydrogen- og lipidperoksider (Decker & Hultin, 1992; Kanner, 1992). For eksempel kan askorbat redusere jern til toverdige jern, som er mer prooksidativt enn treverdige jern (Decker, 1998). Dermed kan askorbinsyre virke som en prooksidant der det er jern til stede.

Kompleksdannelser med prooksidative metaller

Overgangsmetaller kan øke hastigheten til lipidoksidasjon, som igjen kan føre til harskning av mat (Goddard et al., 2012). Dette kan hindres ved kompleksbindere, forbindelser som kan reagere med metallioner for å gjøre dem inaktive (Loftsson, 2014). Aktiviteten til kompleksbindere er avhengig av pH, siden de kun er aktive i ionisert tilstand (Decker, 1998).

Sitronsyre

Sitronsyre, som er en vanlig metallbinder i mat, blir brukt til å øke lagringsstabiliteten ved normale temperaturer (Choe & Min, 2009; Frankel, 1980). Sitronsyre er løselig i vann (Decker, 1998), og kan virke på tre ulike måter: Enten kan den danne uløselige metallkomplekser, blokkere redoksyklusen til metaller eller hindre jern i å binde seg til vertsmolekylet (Graf & Eaton, 1990). Sitronsyre brukes også ofte som en synergistisk antioksidant. For eksempel kan den forbedre stabiliteten til fenoler, slik som BHT og TBHQ (Shahidi & Naczk, 1995).

1.6.2 Bitterhet

En annen utfordring ved å ta i bruk fiskeproteinhydrolysater i mat er at de ofte smaker bittert. Smak er en viktig faktor som påvirker forbrukerens valg, og derfor er det viktig å utvikle hydrolysater med lav bitterhet (Clemente, 2000). Bitterheten er avhengig av flere faktorer, deriblant sammensetning av råstoffet, hydrolysen og lagringen (Slizyte, 2004). Det er generelt akseptert at enzymatisk hydrolyse øker bitterheten, og at den primære

aminosyresekvensen til det opprinnelige proteinet bestemmer hydrolysatets grad av bitterhet (Kristinsson & Rasco, 2000; Mackie, 1982).

I en studie utført på proteinhydrolysater av torsk (*G. morhua*), ble det funnet at tilstedeværelse av galle førte til økt bitterhet (Dauksas et al., 2004). I galle er kolinsyre og taurokolinsyre de bitre forbindelsene (Dauksas et al., 2004; Slizyte, 2004). Bitterhet kan også påvirkes av fettinnholdet i råstoffet (Dauksas et al., 2004), der lavere fettinnhold kan gi lavere bitterhet (Hoyle & Merritt, 1994; Kristinsson & Rasco, 2000). I en studie utført av Slizyte et al. (2017) hadde hydrolysater produsert av en blanding av hoder, innvoller og rygg (laks) lavere bitterhet enn hydrolysater produsert av lakseinnvoller.

Ved enzymatisk hydrolyse kan bitre peptider frigjøres fra det opprinnelige proteinet (Fu et al., 2019). Bitterhet er relatert til kjedelengden til disse peptidene og aminosyre-sidekjedenes hydrofobisitet (Ney, 1979). Det er hovedsakelig de hydrofobe L-aminosyrene Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu og Val som forårsaker bitterhet (Coulter, 2016). En viktig faktor for å hindre dannelse av bitre peptider, er å ha god kontroll på hydrolysen. Hydrolysater med lav bitterhet oppnås ved DH lik 3-5% (Adler-Nissen, 1984), mens størst sannsynlighet for bitre hydrolysater er ved DH mellom 4 og 40% (Dauksas et al., 2004).

Molekylvekten til peptider påvirker også bitterheten til FPH (Idowu & Benjakul, 2019). Det antas at bitter smak skyldes peptider med lav molekylvekt (< 6000 Da) og hydrofobe sidekjer (Sen, 2005). I en studie av Cheung & Li-Chan (2014) ble en peptidfraksjon på 3000 Da fra restråstoff fra reker funnet å være bitter. Lalasidis et al. (1978) rapporterte om "bitter-frie" hydrolysat fra restråstoff fra torsk. Hydrolysatene bestod av mellom 15 og 45% frie aminosyrer, og hadde en gjennomsnittlig molekylvekt på mindre enn 1000 Da.

Kim & Li-Chan (2006) hevdet at bitterhet samsvarer med aminosyrenes plassering langs peptidkjeden. Peptider med store, hydrofobe aminosyrer ved karboksylenden, og store, basiske aminosyrer ved aminoenden, viste stor grad av bitterhet. Derimot viste Pedersen (1994) at bitterheten til små peptider var lavere når hydrofobe aminosyrer befant seg ved karboksyl- eller aminoenden. Lavest bitterhet ble observert når aminosyrene var frie (Pedersen, 1994), siden hydrofobe peptider er bitrere enn en blanding av frie aminosyrer (Kristinsson & Rasco, 2000). Bitterheten til proteinhydrolysater kan reduseres ved ekspeptidaser (1), kapselteknologi (2) og Maillard-reaksjon (3):

1. Ekspeptidaser kan redusere bitterheten til proteinhydrolysater ved å fjerne hydrofobe aminosyrer på amino- eller karboksylenden (Saha & Hayashi, 2001). En kombinasjon av endo- og ekspeptidaser fører til omfattende hydrolyse, noe som gir peptider med mindre bitterhet (Fu et al., 2019). Tilsats av ekstra ekspeptidaser kan føre til kløyving av aminosyrer som er nødvendige for sluttproduktets funksjonelle og bioaktive egenskaper (Cheung et al., 2015; Fu et al., 2019).
2. Innkapsling av proteinhydrolysater kan brukes for å forhindre at bitre peptider oppdages av smaksreseptorer (Fu et al., 2019). Fordelen med denne metoden er at kapselen ikke påvirker peptidsammensetningen, og heller ikke peptidets egenskaper (Mohan et al., 2015). Dermed er det mulig å bruke slik teknologi til å innkapsle bioaktive peptider som skal brukes til medisinske formål (Li et al., 2015).

3. I en Maillard-reaksjon mellom karbonylgrupper og aminoforbindelser kan mengden bitre peptider i et hydrolysat senkes, samtidig som smaken forbedres (Fu et al., 2019). En negativ effekt ved en slik reaksjon er at endring i peptidstrukturen kan føre til redusert bioaktivitet (Hong et al., 2016).

1.7 Kvalitetsendringer ved lagring av proteinhydrolysater

Proteinhydrolysater kan fungere som antioksidanter, og er ofte brukt som ingrediens for å øke lagringsstabiliteten til matvarer (Rao et al., 2016). Lagringsstabilitet er definert som hvor lenge maten opprettholder optimal kvalitet etter produksjon (Labuza, 1982), og er avhengig av faktorer som oksygennivå, temperatur og vannaktivitet (Rao et al., 2016). Proteinhydrolysater er hygroskopiske, og vil derfor også bli påvirket av disse faktorene (Klompong et al., 2012). Imidlertid er det publisert få vitenskapelige rapporter om hvordan prosessering og lagring påvirker stabiliteten til FPH (Korczyk et al., 2018).

Som nevnt tidligere, kan oksidasjon av lipider i råstoffet under hydrolysen resultere i hydrolysater med redusert næringsverdi og uønsket lukt (Yarnpakdee et al., 2012a; Yarnpakdee et al., 2012b). Shahidi et al. (1995) viste at et lavere innhold av lipider i råstoffet ga redusert oksidasjon, noe som igjen resulterte i økt lagringsstabilitet i hydrolysater av lodde (*Mallotus villosus*). Proteinhydrolysater med antioksidative egenskaper har også potensialet til å redusere oksidasjon i mat de tilsettes i. Dette må imidlertid kunne bekreftes eksperimentelt (Rao et al., 2016).

Lipidoksidasjon kan også påvirke fargen til proteinhydrolysater ved lagring. I en studie utført på proteinhydrolysater fra sild (*Clupea harengus*) ble det funnet at hydrolysatene ble mørkere ved lagring i tre måneder i romtemperatur (Hoyle & Merritt, 1994). Aldolkondensasjon av karbonyler som ble dannet ved lipidoksidasjon, kan være forklaringen på brune pigmenter i hydrolysatene (Hoyle & Merritt, 1994). Signifikant fargeendring ble også observert i hydrolysater av taggmakrell (*Decapterus maruadsi*) som var lagret ved 25 °C i seks uker (Thiansilakul et al., 2007). Disse hydrolysatene ble signifikant gulere sammenlignet med hydrolysatene som ble lagret ved 4 °C i seks uker.

Hvis FPH skal tilsettes i mat, må de kunne lagres over lengre tid uten at proteinkvaliteten reduseres. Hydrolysatene må heller ikke senke kvaliteten til matvarene de tilsettes i. Dette kan løses ved å bruke ferskt råstoff (1), fjerne lipider før bearbeiding (2), tørke hydrolysatene ved fravær av luft (3) eller pakke hydrolysatene uten tilgang på luft (4):

1. I en studie utført av Kendler (2019) ble det funnet at oksidasjonsnivået til råstoffet påvirket kvaliteten til fiskeproteinhydrolysatene. Råstoffet bør derfor være "blodferskt" når det videreføres, slik at det kan gi opphav til proteinhydrolysater med høy proteinkvalitet (Slizyte et al., 2010). Dette kan løses ved å bygge prosessanlegg i nærheten av fiskeslakteriene, eller ved effektiv transport av restråstoffet fra slakteri til videreføring (Guerard, 2007). I tillegg kan antioksidanter tilsettes for å bevare sensoriske og ernæringsmessige egenskaper ved frakt og lagring.

2. Lipidinnholdet i hydrolysater vil også påvirke hvor stabile de er mot oksidasjon (Petrova et al., 2018). For å unngå kvalitetsendringer ved lagring, bør fettinnholdet i fiskeproteinhydrolysater være ca. 0,5% (He et al., 2013; Spinelli et al., 1972).
3. Ved å tørke proteinhydrolysater i vakuum kan oksidasjon forhindres (Lin et al., 1998). Oksidasjon kan også reduseres ved å lagre proteinhydrolysater kaldt ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (He et al., 2013). Som et resultat av dette vil holdbarheten øke.
4. Modifisert atmosfære eller vakuumpakking blir brukt for å hindre oksidasjon, noe som resulterer i lengre holdbarhet (Rustad, 2007). Pacheco-Aguilar et al. (2008) vakuumpakket proteinhydrolysater fra lysing (*Merluccius productus*) for å bevare kvaliteten ved lagring.

1.8 Målet med masteroppgaven

Målet med masteroppgaven var å undersøke hvordan tilsats av ulike antioksidanter påvirker løseligheten, oksidasjonsnivået og fargen til proteinhydrolysater, og hvordan disse endres under lagring i romtemperatur. Hydrolysater ble produsert ved enzymatisk hydrolyse av kvernedede laksehoder (*S. salar*) og tilsatt naturlige (askorbinsyre og sitronsyre) eller syntetiske (propylgallat og BHT) antioksidanter sammen med enzymene papain og bromelain. Følgende spørsmål ble undersøkt i denne oppgaven:

- Finnes det en sammenheng mellom hydrolysegrad og løselighet, syreløselige peptider og frie aminosyrer?
- Hvilken antioksidant beskytter best mot oksidasjon?
- Hvilken antioksidant beskytter best mot misfarging?

Kapittel 2

Materialer og metoder

2.1 Råstoff

Hoder av oppdrettslaks (*Salmo salar*) med lik ferskhet og kvalitet ble donert av Hofseth i november 2018. Hodene ble først veid (ett og ett) og deretter kvernet i en Hobart A 200N (Illinois Tool Works Food Equipment Group, USA) med hullstørrelse 4,5 mm. Til slutt ble de frosset i partier på 1 kg ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dette ble gjort av stipendiat Kristine Kvangarsnes ved NTNU i Ålesund.

2.2 Enzymer og kjemikalier

Papain er en planteprotease (cystein protease) som kan isoleres fra papaya (*Carica papaya*) (Rao et al., 1998). Optimale reaksjonsbetingelser for papain er $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ og pH 5-9 (Smith & Hong-Shum, 2011). Bromelain er en planteprotease (cystein protease) som kan produseres fra stilken og juicen til ananas (*Ananas comosus*) (Rao et al., 1998). Enzymet fungerer optimalt ved $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ og pH 5,5-7,0 (Smith & Hong-Shum, 2011). Alle kjemikaliene var av analytisk renhet.

2.3 Enzymatisk hydrolyse

Figur 2.1 viser én av de to bioreaktorene (VWR International, USA) hydrolysen ble utført i. I hver av reaktorene ble det veid inn 1 kg råstoff og 1 liter vann ($53\text{ }^{\circ}\text{C}$). Reaktorene ble plassert i et vannbad, av typen CIRCULATOR BATH HEATING ED-33 (Julabo GmbH, Tyskland), som holdt $52\text{ }^{\circ}\text{C}$. Den flytende massen ble blandet ved 150 rpm av et rotorblad med tre blader (Heidolph Instruments, Tyskland). Da temperaturen på blandingen nådde $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, ble enzymene papain (0,05%) og bromelain (0,05%) tilsatt i mengde på 0,1% (v/v) av råstoffet. Hydrolysen foregikk ved $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i én time, og ble utført av stipendiat Kristine Kvangarsnes ved NTNU i Ålesund.

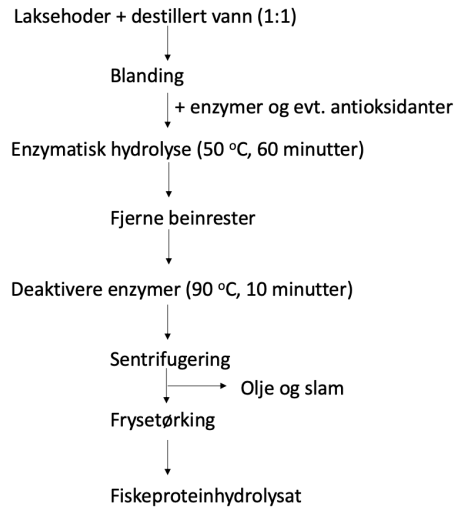
Etter hydrolysen ble blandingen tømt over en sil, slik at beinrester ble fraskilt. Deretter ble enzymene deaktivert ved 90 °C i 10 minutter i en mikrobølgeovn. Blandingen ble så avkjølt, før den ble sentrifugert ved 4100G i 30 minutter. Tre faser ble dannet; oljefase på toppen, flytende proteinfase i midten og slam på bunnen (figur 2.2). Proteinfasen ble skilt fra lipidfasen ved bruk av en skilletrakt, og deretter fryst ved -80 °C. Til slutt ble proteinfraksjonen frysetørket i 3 dager. Figur 2.3 oppsummerer hydrolyseprosessen.



Figur 2.1: Oppsett for hydrolysen.



Figur 2.2: Fraksjonene etter sentrifugering.



Figur 2.3: Oversikt over hydrolysen og produksjon av proteinhydrolysater av laksehoder.

Tabell 2.1 viser hvilke antioksidanter som ble tilsatt under hydrolysen. Kontrollprøven ble ikke tilsatt noen antioksidanter. Det ble tatt ut prøver av hydrolysatene etter frysetørringen, samt etter 1, 2, 4 og 6 måneders lagring i romtemperatur. Prøvene ble frosset ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, og deretter fraktet til Trondheim i frosset tilstand. I Trondheim ble prøvene oppbevart ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fram til analyse.

Tabell 2.1: Antioksidantene som ble tilsatt under hydrolysen.

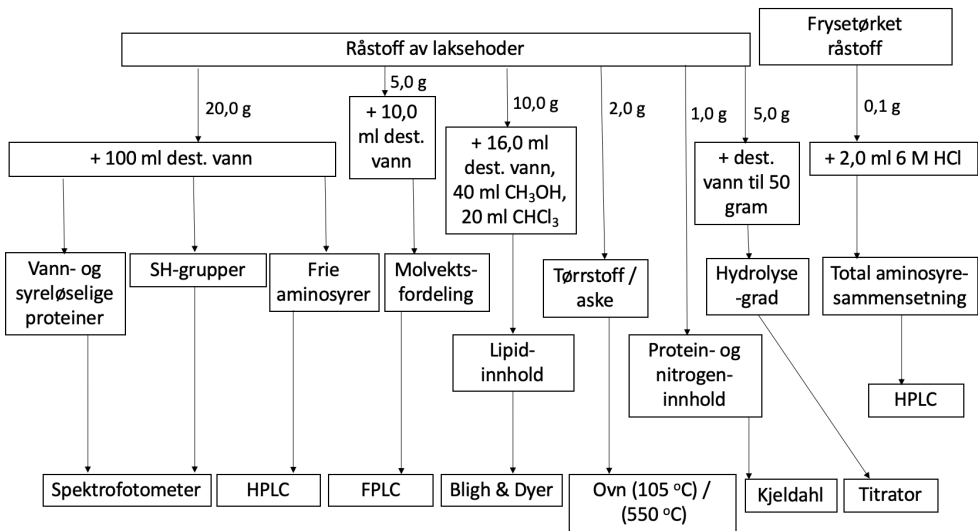
Antioksidant	Konsentrasjon [mg/kg råstoff]
Asorbinsyre	1000
Sitronsyre	1000
Propylgallat	500
BHT	200

2.4 Kjemiske analyser

2.4.1 Råstoff

Figur 2.4 viser hvilke analyser som ble utført på lakseråstoffet. Av råstoffet, som ble oppbevart ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ble det laget et vannekstrakt (1) og et frysetørket pulver (2).

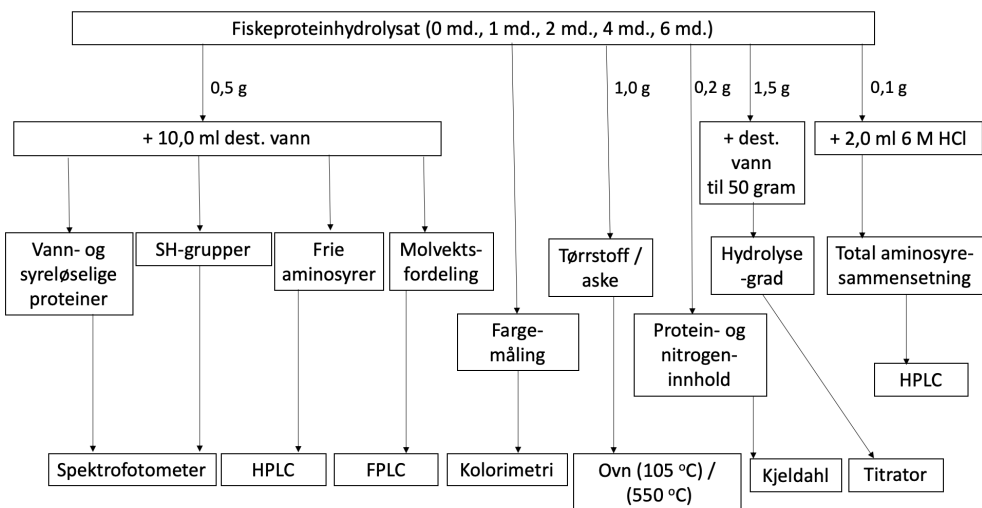
1. 20 gram av tint råstoff ble blandet med 100 ml destillert vann, før det så ble homogenisert ved bruk av en T 25 DIGITAL ULTRA-TURRAX® (IKA, Tyskland). Blandingen ble så sentrifugert ved 4080G i 15 minutter i en SORVALL® RC-5B PLUS-sentrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA). Deretter ble den dekantert gjennom glassull, og til slutt ble volumet fylt opp til 100 ml med destillert vann.
2. 5 gram av råstoffet ble frysetørket i to dager i en ALPHA 1-4 LD PLUS-frysetørke (Glems-Technik, Tyskland).



Figur 2.4: Oversikt over utførte analyser på lakseråstoffet.

2.4.2 Proteinhydrolysater

Figur 2.5 viser hvilke analyser som ble utført på proteinhydrolysaten. Bilder av de ulike hydrolysatenene er gitt i figur 3.23.



Figur 2.5: Oversikt over utførte analyser på FPH.

2.5 Bestemmelse av tørrstoff og aske

Tørrstoff (1) og aske (2) ble målt for proteinhydrolysater og tint råstoff (Slizyte et al., 2016). Hver prøve av hydrolysaten ble analysert i to paralleller, mens råstoffet ble analysert i tre paralleller.

1. Porselensdigler ble først tørket ved 105 °C i fem minutter, før de deretter ble veid. I diglene ble det veid inn henholdsvis 1 gram hydrolysat og 2 gram råstoff, før de ble tørket ved 105 °C. Etter 22 timer ble diglene avkjølt i eksikator og veid.
2. De avkjølte diglene ble så overført til en askeovn. Temperaturen ble satt til 550 °C. Etter 24 timer ble diglene avkjølt i eksikator og veid.

2.6 Bestemmelse av totalt lipidinnhold

Ekstrahering av lipider i lakseråstoffet ble utført i henhold til Bligh & Dyer (1959). Hver prøve ble analysert i to paralleller.

10 gram råstoff ble blandet med 16 ml destillert vann, 40 ml metanol og 20 ml kloroform. Blandingen ble homogenisert ved bruk av en T 25 DIGITAL ULTRA-TURRAX® (IKA, Tyskland) i 2 minutter. Deretter ble 20 ml kloroform tilsatt, før blandingen ble homogenisert i 40 sekunder. Løsningen ble så tilsatt 20 ml destillert vann, homogenisert i nye 40 sekunder og til slutt sentrifugert ved 4080G i 15 minutter i en SORVALL® RC-5B PLUS-sentrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA).

2 ml av kloroformfasen ble overført til et veid reagensrør, og dampet av på varmeblokk (60 °C) med tilførsel av N₂-gass. Etter avkjøling i eksikator ble røret veid og totalt lipidinnhold bestemt.

2.7 Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering

Hydrolysegraden til FPH og råstoffet ble bestemt i henhold til Taylor (1957). Hver prøve ble analysert i to paralleller.

1,5 gram av hydrolysatet (5 gram av råstoffet) ble blandet med destillert vann til en totalvekt på 50 g (råstoffet ble homogenisert). Blandingen ble så nøytralisert til pH lik 7,0 med 0,1 M NaOH, før den ble tilsatt 10 ml formaldehyd (pH 8,5). Etter 5 minutter ble løsningen titrert med 0,1 M NaOH ved bruk av en TITROLINE® 7000 (Xylem Analytics, USA). Mengden NaOH brukt ble notert ned.

2.8 Bestemmelse av protein- og nitrogeninnhold ved Kjeldahl-metoden

Protein- og nitrogeninnholdet i råstoffet og de ferske hydrolysaten (0 md.) ble bestemt med Kjeldahl-metoden på campus Kalvskinnet i Trondheim. En KJELDIGESTER K-449 ble brukt til å varme opp prøve og svovelsyre, mens avgassene ble rensert av en SCRUBBER K-415 festet til K-449. Destillering og kolorimetrisk borsyre-titrering ble utført med en KJELMASTER K-375 og KJELSAMPLER K-376 (Büchi Switzerland, 2013). Hver prøve ble analysert i to paralleller.

0,19 gram Gly ble overført til et prøverør á 300 ml, mens det ble overført et veiepapir i et annet rør (blank prøve). Deretter ble prøvene veid inn (1 g av råstoffet, 0,2 g av PH uten antioksidant og 0,5 g av PH tilsatt antioksidanter). I alle rør ble det tilsatt 2 titan-tabletter og 15 ml 98% svovelsyre. Rørene ble overført til en KJELDIGESTER K-449, som så ble varmet opp til 280 °C. Deretter ble prøvene fordøyet ved 320 °C i 20 minutter og ved 420 °C i 90 minutter. Etterpå ble de avkjølt i 35 minutter, før prøvene til slutt ble destillert og titrert. Tabell 2.2 viser parametrene KJELMASTER K-375 var innstilt på.

Tabell 2.2: Destillering- og titreringsparametre for KJELMASTER K-375/K-376.

H ₂ O-volum	50 ml	Titreringsløsning	H ₂ SO ₄ , 0,1 M
NaOH-volum	60 ml	Sensortype	Kolorimetrisk
Reaksjonstid	5 s	Titreringsmodus	Standard
Destilleringsmodus	Fast tid	Målemetode	Endepunkt-pH
Destilleringstid	180 s	pH, slutt	4,65
Rørehastighet, destillering	10	Rørehastighet, titrering	9
Damputgang	100%	Startvolum, titrering	4 ml
Titreringstype	Borsyre	Titreringsalgoritme	Optimal
Mottaksløsning	70 ml		

2.9 Bestemmelse av mengde vannløselige proteiner

Mengde vannløselige proteiner i hydrolysaten og råstoffet ble bestemt ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951). Hver prøve ble analysert i tre paralleller.

Et proteinekstrakt ble laget ved å blande 0,5 gram hydrolysat og 10,0 ml destillert vann, før det deretter ble sentrifugert ved 5000G i 10 minutter i en HERAEUS MULTIFUGE X1R-sentrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA). Av prøvene ble det laget to fortyngninger på henholdsvis 1:100 og 1:200. Vannekstraktet laget av råstoffet ble fortynnet 1:50.

En fortyngningsserie av bovint serumalbumin (BSA) (12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml og 300 µg/ml) ble brukt til å lage standardkurven. Blank prøve bestod av 0,5 ml destillert vann. Til alle rør ble det så tilsatt 2,5 ml alkalisk kobberreagens. Rørene ble blandet og satt til side i 10 minutter. Deretter ble 0,25 ml Folin-Ciocalteu-reagens tilsatt alle rør, før de så ble blandet. Etter 30 minutter ble absorbansen

målt ved 750 nm i et GENESYS 10S UV-VIS-spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.10 Bestemmelse av syreløselige peptider

Mengde syreløselige peptider i hydrolysaten og råstoffet ble bestemt i henhold til Hoyle & Merritt (1994). Hver prøve ble analysert i tre paralleller.

2,0 ml 1:100-fortynnet proteinhydrolysat og 2,0 ml 20% trikloreddiksyre (TCA) ble blandet og satt til side i 30 minutter, før blandingen ble filtrert gjennom et NR. 589¹ SCHWARZ-BAND 70 MM-filter (Schleicher & Schüll, Tyskland). Til slutt ble mengde syreløselige peptider bestemt ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951). Vannekstraktet av råstoffet (fortynnet 1:10) ble analysert ved samme fremgangsmetode.

2.11 Bestemmelse av total aminosyresammensetning

Syrehydrolyse ble brukt til å bestemme total aminosyresammensetning i hydrolysaten og råstoffet (Blackburn, 1978). Hver prøve ble analysert i tre paralleller ved bruk av et *high performance liquid chromatography* (HPLC)-system.

0,1 gram prøve (hydrolysat eller frysetørket råstoff) og 2,0 ml 6 M HCl ble hydrolysert ved 105 °C i 22 timer. Etterpå ble prøvene avkjølt, og overført til et begerglass ved bruk av ionefritt vann. Deretter ble de nøytralisert med NaOH (pH mellom 6,5 og 7,5), før de ble filtrert gjennom et WHATMAN GF/C-filter med diameter 25 mm (GE Healthcare, Storbritannia) ved bruk av vakuumpumpe (Heto-Holten A/S, Danmark). Volumet ble deretter fylt opp til 20 ml med ionefritt vann, og så fortynnet 1:500. De fortynnete prøvene ble filtrert gjennom et 0,2 µm WHATMAN-filter (GE Healthcare, Storbritannia). Til slutt ble 0,205 ml overført til HPLC-rør. Prøvene ble analysert ved bruk av omvendt fase væskkromatografi (SIL-9A Auto Injector, LC-9A Liquid Chromatograph, RF-530 Fluorescence HPLC Monitor, Shimadzu Corporation, Japan). Ingeniør Siri Stavrum utførte HPLC-analysen.

2.12 Bestemmelse av frie aminosyrer

Mengde frie aminosyrer ble bestemt i henhold til Osnes & Mohr (1985). Hvert hydrolysat ble analysert i to paralleller, mens råstoffet ble analysert i fire paralleller.

1 ml vannløselig proteinekstrakt (som beskrevet under delkapittel 2.4.1 og 2.9) ble blandet med 0,25 ml 10% sulfosalisylysyre (SSA), og deretter satt på kjøling ved 4 °C i 30 minutter. Prøvene ble så sentrifugert ved 9300G i 10 minutter i en 5415R-sentrifuge (Eppendorf, Tyskland). Etterpå ble prøvene fortynnet 1:50, før de ble filtrert gjennom et 0,2 µm WHATMAN-filter (GE Healthcare, Storbritannia). Til slutt ble 0,205 ml overført til HPLC-rør. Ingeniør Siri Stavrum utførte HPLC-analysen med samme utstyr som beskrevet i delkapittel 2.11.

2.13 Kvantifisering av SH-grupper

Mengde SH-grupper i hydrolysater og råstoffet ble bestemt i henhold til Ellman (1959). Hver prøve ble analysert i tre paralleller. For å utføre denne analysen ble det laget en 0,1 M natriumfosfat-buffer (buffer A) (1), en urea-løsning (2) og en DTNB-løsning (3).

1. En 0,1 M natriumfosfat-buffer ble laget i henhold til Cold Spring Harbor Protocols (2006). 3,1 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ og 10,9 gram Na_2HPO_4 ble blandet med 800 ml destillert vann, før pH-verdien ble justert til 7,4. Det ble så tilsatt 0,29225 gram etylendiaminetetraeddiksyre (EDTA). Til slutt ble volumet fylt opp til 1000 ml med destillert vann. Løsningen ble lagret ved 4 °C.
2. 48,048 gram urea og 40 ml destillert vann ble blandet under oppvarming. Løsningen ble justert til pH 7,4 ved tilsats av HCl, og til slutt ble volumet fylt opp til 100 ml med destillert vann.
3. 0,1 gram DTNB og 50 ml buffer A ble blandet, før pH-verdien ble justert til 7,4. Så ble volumet fylt opp til 100 ml med buffer A, og til slutt fryst ned i rør á 5 ml.

Proteinekstrakt av hydrolysater ble laget ved å blande 0,1 gram FPH og 10 ml destillert vann. Ekstrakter av råstoff ble laget som beskrevet i delkapittel 2.4.1, og deretter fortynnet 1:5 med destillert vann. 100 µl proteinekstrakt ble overført til eppendorf-rør. Blank prøve ble lagd med buffer A. Alle rørene ble så tilsatt 800 µl urea-løsning og 100 µl DTNB-løsning. Rørene ble blandet og satt til side i 30 minutter, før de så ble sentrifugert ved 13400G og 22 °C i 3 minutter i en 5415R-sentrifuge (Eppendorf, Tyskland). Til slutt ble absorbansen avlest ved 412 nm i et GENESYS 10S UV-VIS-spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.14 Bestemmelse av molvektfordeling ved FPLC

Molvektfordelingen til peptidene ble bestemt med gelfiltrering ved bruk av et *fast protein liquid chromatography* (FPLC)-system (ÄKTA PURIFIER) (GE Healthcare, Storbritannia) utstyrt med en SUPERDEX PEPTIDE 10/300-kolonne. Ved gelfiltrering separeres molekyler etter størrelse (GE Healthcare, 2010).

5 gram av råstoffet ble blandet med 10 ml destillert vann, og deretter homogenisert og sentrifugert som beskrevet under delkapittel 2.4.1. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0,2 µm WHATMAN-filter (GE Healthcare, Storbritannia) over i et eppendorf-rør. Vannløselig proteinekstrakt (som beskrevet under delkapittel 2.9) ble filtrert, på samme måte, over i et annet eppendorf-rør. Bølgelengden ble satt til 280 nm og strømningshastigheten til 0,5 ml/min, før 100 µl av prøvene forsiktig ble sprøytet inn i kolonna. 0,05 M natriumacetat (pH 5) ble brukt som buffer. Resultatene ble gitt som topper ved forskjellige elueringsvolum (ml). Hver prøve ble analysert én gang ved samme fremgangsmetode. Vitamin B₁₂, cytokrom c og aprotinin ble brukt som standarder.

2.15 Fargemåling ved kolorimetri

Fargen på hydrolysatene ble avlest som L^* -, a^* - og b^* -verdier (CIE-systemet) ved bruk av et CR-400-kolorimeter (Konica Minolta, Japan). L^* indikerer lyshet, og går fra svart (0) til hvit (100). a^* og b^* indikerer henholdsvis grønn(-)/rød(+) og blå(-)/gul(+). Hver prøve ble analysert i tre paralleller i plastveieskip.

2.16 Statistisk analyse

Avhengig av metode ble alle testene utført med ingen, to, tre eller fire paralleller. Microsoft Excel 2020 (Microsoft, USA) ble brukt til beregninger og til å lage grafer. For å beregne standardavvik ble STDAV.S-funksjonen brukt, siden prøvene ble antatt å være et utvalg av en populasjon. Signifikansnivået ble bestemt til å være 5%, og alle prøvene ble antatt å være uavhengige og normalfordelte. Korrelasjon mellom hydrolysegrad og løselighet, syreløselige peptider og frie aminosyrer ble bestemt ved Pearsons korrelasjonskoeffisient (r).

Kapittel 3

Resultater og diskusjon

3.1 Tørrstoff, aske og lipidinnhold

Tørrstoff og askeinnhold i råstoffet og hydrolysatene ble bestemt i henhold til Slizyte et al. (2016), mens lipidinnholdet i råstoffet ble bestemt i henhold til Bligh & Dyer (1959). Resultatene er vist i tabell 3.1 og 3.2, og beregningene er gitt i vedlegg A.

3.1.1 Råstoff

Tabell 3.1 viser at mengde tørrstoff, aske og lipider i laksehodene var henholdsvis $39,1 \pm 1,0\%$, $3,6 \pm 0,3\%$ og $25,5 \pm 0,8\%$. Disse verdiene samsvarer med resultatene til Gbogouri et al. (2004), He et al. (2011) og Opheim (2015). Opheim (2015) bestemte mengde tørrstoff, aske og lipider i laksehoder (*S. salar*) til å være henholdsvis $39,0 \pm 4,0\%$, $4,0 \pm 1,0\%$ og $22,0 \pm 2,0\%$. I studien til Gbogouri et al. (2004) ble lipidinnholdet i laksehoder (*S. salar*) funnet å være $20,0 \pm 0,4\%$ ved metoden til Bligh & Dyer (1959), mens askeinnholdet var $2,6 \pm 0,6\%$. He et al. (2011) fant også et lavere fettinnhold i laksehoder (*S. salar*) ($22,6 \pm 0,7\%$). Forskjellen i fettinnhold kan skyldes flere grunner. For det første bestemte He et al. (2011) fettinnholdet ved AOAC-metode 960,39 (AOAC, 2000), mens det i dette forsøket ble bestemt i henhold til Bligh & Dyer (1959). For det andre påvirkes fettinnholdet av størrelsen på fisken, føringen og hvordan hodene kuttes av under slakteprosessen.

Mengde aske i fiskehoder varierer med type fisk, men er funnet til å ligge mellom ca. 1 og 5% (Batista et al., 2010; Bechtel, 2003; Gbogouri et al., 2004; He et al., 2011; Li et al., 2019; Oliveira et al., 2017; Opheim, 2015). Askeinnholdet utgjør det uorganiske materialet som blir igjen etter at råstoffet er varmebehandlet ved høye temperaturer (Li et al., 2019). En høyere andel bein i råstoffet kan føre til et høyere askeinnhold (Batista et al., 2010). Små variasjoner i mengde tørrstoff, aske og lipider i hoder fra samme fisk kan skyldes at sammensetningen er avhengig av størrelsen på fisken og hvor den er fanget (Akpambang, 2015).

Tabell 3.1: Innhold av tørrstoff (% av våtvekt) (n = 3), aske (% av våtvekt) (n = 3) og lipider (% av våtvekt) (n = 2) i lakseråstoffet.

	Tørrstoff [%]	Aske [%]	Lipider [%]
Lakseråstoff	39,1 ± 1,0	3,6 ± 0,3	25,5 ± 0,8

3.1.2 Proteinhydrolysater

Tabell 3.2 viser at det var tilnærmet like verdier i mengde tørrstoff ved 0 og 6 måneder for alle hydrolysaterne, bortsett fra i PH tilsatt propylgallat. Det var lavest innhold av tørrstoff i kontrollprøven (0 md., 91,0 ± 0,2%) og høyest innhold i PH tilsatt propylgallat (0 md., 96,4 ± 0,2%). Etter seks måneder ble det observert størst endring i innhold av tørrstoff i PH tilsatt propylgallat (92,53 ± 0,06%). Lavere innhold av tørrstoff ved økende lagringstid kan skyldes at hydrolysaterne er hygroskopiske, og at de har tatt til seg vann under lagring. Innholdet av tørrstoff i hydrolysater fra torskehoder (*G. morhua*) ble funnet å være mellom 87,62-97,67% (Asfour, 2018). Resultatene fra dette forsøket var derfor i samme område som verdiene til Asfour (2018).

Askeinnholdet i hydrolysaterne endret seg relativt lite fra 0 til 6 måneder. For alle hydrolysaterne, bortsett fra PH tilsatt propylgallat, sank mengden aske ved økende lagringstid. Verdiene i tabell 3.2 var ca. 1% lavere enn verdiene til Gbogouri et al. (2004), som rapporterte om et askeinnhold på 10,4 ± 1,1% i PH fra laksehoder. Askeinnholdet i FPH er avhengig av flere faktorer, deriblant sammensetningen av råstoffet og hydrolysebetingelser (tid, temperatur og type enzym). Askeinnholdet i FPH er funnet å ligge i området 0,45 - 27% av total sammensetning, men ligger vanligvis mellom 7 og 13% av total sammensetning (Chalamaiah et al., 2012). Det relativt høye askeinnholdet skyldes dannelse av salt ved justering av pH med syre eller base (Dong et al., 2005).

Tabell 3.2: Innhold av tørrstoff (% av tørt pulver) og aske (% av tørt pulver) i hydrolysaterne (n = 2).

Antioksidant	Tørrstoff [%]		Aske [%]	
	0 md.	6 md.	0 md.	6 md.
Askorbinsyre	94,74 ± 0,06	93,1 ± 0,2	9,0 ± 0,4	8,87 ± 0,07
Sitronsyre	92,71 ± 0,15	92,9 ± 0,0	9,10 ± 0,06	8,90 ± 0,14
Propylgallat	96,4 ± 0,2	92,53 ± 0,06	8,9 ± 1,0	9,12 ± 0,04
BHT	93,3 ± 0,2	92,77 ± 0,10	9,2 ± 0,2	9,05 ± 0,03
Kontroll	91,0 ± 0,2	92,82 ± 0,04	9,01 ± 0,11	9,0 ± 0,2

3.2 Hydrolysegrad

Hydrolysegraden til hydrolysaterne og lakseråstoffet ble bestemt ved formoltitrering i henhold til Taylor (1957). DH ble beregnet som andelen frie NH₂-grupper med hensyn på det totale nitrogeninnholdet i prøvene (Slizyte et al., 2016; Taylor, 1957). Nitrogeninnholdet

ble kun beregnet for hydrolysatene med ingen lagringstid og råstoffet. Det antas at nitrogeninnholdet ikke endres ved økende lagringstid, og derfor ble verdiene fra Kjeldahls metode brukt som utgangspunkt for å beregne DH både ved 0 og 6 måneder. Resultatene er vist i tabell 3.3, og beregningene er gitt i vedlegg B. DH til proteinhydrolysat tilsatt askorbinsyre og sitronsyre med ingen lagringstid (0 md.) ble bare målt på én prøve, og det er derfor ikke gitt noe standardavvik.

Tabell 3.3: Frie aminogruener og hydrolysegrad til hydrolysatene og råstoffet (n = 2). Verdier i % av tørt pulver for FPH og % av våtvekt for råstoffet.

Antioksidant	Frie aminogruener [%]		Hydrolysegrad [%]	
	0 md.	6 md.	0 md.	6 md.
Askorbinsyre	2,18	2,23 ± 0,02	16,27	16,70 ± 0,12
Sitronsyre	2,20	2,29 ± 0,02	17,06	17,8 ± 0,2
Propylgallat	2,18 ± 0,01	2,22 ± 0,01	15,93 ± 0,06	16,16 ± 0,04
BHT	2,26 ± 0,01	2,29 ± 0,03	16,85 ± 0,05	17,05 ± 0,07
Kontroll	2,13 ± 0,00	2,18 ± 0,02	15,92 ± 0,14	16,30 ± 0,04
Lakseråstoff	0,17 ± 0,02		7,85 ± 0,05	

Hydrolysegraden for hydrolysatene tilsatt antioksidanter og kontrollprøven økte fra 0 til 6 måneder. Imidlertid ville det vært naturlig å anta en lavere hydrolysegrad ved 6 måneder, siden det forventes at oksidasjon vil føre til aggregering. På den annen side kan oksidasjon av proteiner resultere i kjedebrudd, og dermed en høyere andel frie aminogruener ved 6 måneders lagring. Dette må undersøkes nærmere for å trekke en sikker konklusjon. Små forskjeller i DH mellom hydrolysatene indikerer at tilsats av antioksidanter har liten innvirkning på hydrolysegraden. Sammenhengen mellom frie aminosyrer og hydrolysegrad er diskutert i delkapittel 3.10.

DH til hydrolysatene påvirker også bitterheten (Dauksas et al., 2004) og funksjonelle egenskaper (Gbogouri et al., 2004). Gbogouri et al. (2004) viste at hydrolysater fra laksehoder med høy DH hadde høy løselighet, mens hydrolysater med lav DH hadde best emulgeringskapasitet. I det videre arbeidet bør de funksjonelle egenskapene til hydrolysatene undersøkes, siden det i dag er et stort behov for proteiner med god ernæringskvalitet og høy løselighet i matindustrien (Philippis-Wiemann, 2018; Özyurt & Serhat Özkütük, 2019).

Hydrolysegraden til PH tilsatt BHT og kontrollprøven med ingen lagringstid, var hhv. 16,85 ± 0,05% og 15,92 ± 0,14%. Disse verdiene var tilnærmet like resultatene for PH fra regnbueørret (*O. mykiss*) (Kendler, 2019). Kendler (2019) bestemte DH i kontrollprøven til å være 16,52 ± 0,14%, mens DH i hydrolysatet tilsatt BHT var 16,85 ± 0,05%. Dette kan skyldes at hydrolysatene ble produsert ved samme fremgangsmetode og reaksjonsbetingelser, samt at hydrolysegraden i begge forsøkene ble bestemt ved formoltitrering.

Industrielt produserte proteinhydrolysater fra laksefileter (*S. salar*) hadde en hydrolysegrad på 8,36% (Stensen, 2019). Det kan være flere grunner til at disse hydrolysatene hadde en lavere hydrolysegrad enn hydrolysatene i tabell 3.3. For det første har studier vist

at sammensetning av råstoffet påvirker DH (Opheim et al., 2015; Slizyte et al., 2005), og for det andre kan endogene enzymer i råstoffet påvirke hydrolysegraden (Opheim et al., 2015). Ved industriell hydrolyse vil det ta kortere tid å oppnå 52 °C, noe som igjen vil føre til en kortere hydrolyseprosess og dermed lavere DH (Opheim, 2015).

Laksehoder hadde mindre frie aminogruupper enn hydrolysatene, og dermed også lavere hydrolysegrad ($7,85 \pm 0,05\%$). Dette samsvarer med resultatene til Kendler (2019), som bestemte DH i kvernedede hoder av regnbueørret til å være $9,54 \pm 0,03\%$. Råstoffet hadde lavere hydrolysegrad enn PH siden råstoffet ikke ble brutt ned til mindre bestanddeler ved hydrolyse. Dette kan også observeres av molvektfordelingen i figur 3.17, som viser at lakseråstoffet har en høyere konsentrasjon av peptider med større molekylvekt sammenlignet med PH.

3.3 Protein- og nitrogeninnhold

Protein- og nitrogeninnhold i proteinhydrolysatene (0 md.) og lakseråstoffet ble bestemt ved Kjeldahl-metoden (Büchi Switzerland, 2013). Denne metoden er akseptert som standardmetoden for å bestemme proteininnholdet i en rekke materialer, deriblant drikkevarer, matvarer og legemidler (Rhee, 2001; Sáez-Plaza et al., 2013). Resultatene er vist i tabell 3.4, og beregningene er gitt i vedlegg C.

Tabell 3.4: Protein- og nitrogeninnhold i proteinhydrolysater med ingen lagringstid (0 md.) og lakseråstoffet. Standardavvik er gitt for $n = 2$. Verdier i % av tørt pulver for FPH og % av våtvekt for råstoffet.

Antioksidant	Protein [%]	Nitrogen [%]
Askorbinsyre	$83,5 \pm 0,2$	$13,36 \pm 0,03$
Sitronsyre	$80,60 \pm 0,09$	$12,90 \pm 0,01$
Propylgallat	$85,68 \pm 0,14$	$13,71 \pm 0,02$
BHT	$83,8 \pm 0,6$	$13,41 \pm 0,10$
Kontroll	$83,5 \pm 0,6$	$13,35 \pm 0,09$
Lakseråstoff	$13,4 \pm 1,6$	$2,1 \pm 0,3$

Tabellen viser at PH tilsatt sitronsyre hadde det laveste innholdet av protein ($80,60 \pm 0,09\%$) og nitrogen ($12,90 \pm 0,01\%$), mens PH tilsatt propylgallat hadde det høyeste protein- ($85,68 \pm 0,14\%$) og nitrogeninnholdet ($13,71 \pm 0,02\%$). Hydrolysatene hadde ca. 6 ganger høyere proteininnhold sammenlignet med råstoffet ($13,4 \pm 1,6\%$). Disse verdiene var noe lavere sammenlignet med proteininnholdet i regnbueørret- (Kendler, 2019) og laksehoder (Gbogouri et al., 2004). Ved Kjeldahls metode var proteininnholdet i regnbueørret- og laksehoder henholdsvis $14,28 \pm 0,14\%$ og $15,0 \pm 0,1\%$ (Gbogouri et al., 2004; Kendler, 2019).

Proteininnholdet i hydrolysatene og råstoffet ble beregnet indirekte ved å multiplisere nitrogeninnholdet med en omregningsfaktor (Moore et al., 2010). Faktoren 6,25 ble benyttet

i dette forsøket, og denne faktoren er basert på to antagelser. For det første antas det at proteiner inneholder ca. 16% nitrogen, og for det andre antas det at proteiner er opphavet til alt nitrogen i prøvene (FAO/WHO, 2019). Disse antagelsene er forholdsvis røffe, siden nitrogeninnholdet varierer mellom aminosyrer og aminosyresammensetningen ikke er lik i alle matproteiner (Mæhre et al., 2018; Sosulski & Imafidon, 1990). I tillegg inneholder mat andre nitrogenforbindelser, deriblant aminer, urea, fosfolipider og nitrater (ikke-protein nitrogen-forbindelser) (Mariotti et al., 2008). Som en konsekvens av at omregningsfaktoren også inkluderer disse forbindelsene, vil proteininnholdet overestimeres (Mariotti et al., 2008; Mæhre et al., 2018). Verdien som er gitt i tabell 3.4 antas derfor å være noe lavere.

3.4 Bestemmelse av mengde vannløselige proteiner

Mengde vannløselige proteiner i råstoffet og hydrolysatene ble bestemt ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951). Resultatene for hydrolysatene med ingen lagringstid (0 md.), samt hydrolysatene med lagringstid 1 og 2 måneder, ble analysert og diskutert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019). Beregningene er gitt i vedlegg D.

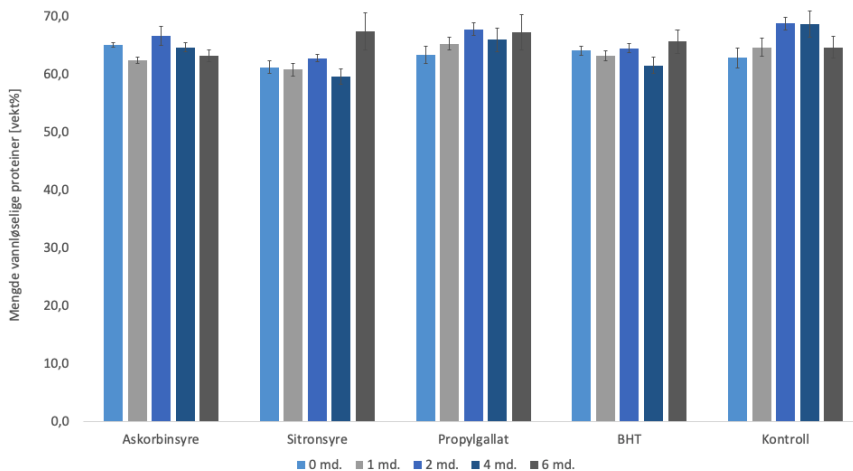
3.4.1 Råstoff

Mengde vannløselige proteiner i lakseråstoffet ble funnet å være $2,5 \pm 0,0\%$. Den lave mengden kan forklares med hvordan proteinene er bygd opp og hvilke aminosyrer som er til stede i råstoffet. I tillegg er bare 20% av proteinene i muskelvevet i hodet vannløselige (Rustad, 1998). Kollagen, som utgjør mesteparten av muskelens bindevev (Coulter, 2016), har et høyt innhold av aminosyrene Gly, Pro og hydroksyprolin. Den spesielle aminosyresammensetningen, kombinert med kovalente kryssbindinger, gjør molekylet relativt stivt og stabilt (Rustad, 1998). Kollagen er derfor ikke løselig i vandige buffere, og kan derfor ikke bestemmes ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951).

Kendler (2019) målte den vannløselige proteinkonsentrasjonen i råstoffet fra regnbueørret til å være $4,5 \pm 1,7\%$. En høyere konsentrasjon i hoder av regnbueørret enn i laks kan skyldes at regnbueørret har et høyere proteinnivå (He et al., 2011; Li et al., 2019). I tillegg er laksehoder funnet å inneholde høyere mengde Gly ($23,0 \pm 1,5\%$ av total aminosyresammensetning) (He et al., 2011) sammenlignet med hoder av regnbueørret ($4,8 \pm 0,2\%$ av total aminosyresammensetning) (Li et al., 2019). Gly er en viktig komponent i kollagen, og utgjør ca. 33% av proteinet (Rustad, 1998). Dette indikerer at laksehoder har en mindre andel proteiner som er løselige i vann.

3.4.2 Proteinhydrolysater

Figur 3.1 viser den vannløselige proteinkonsentrasjonen for 1:200-fortynningen. Mengde vannløselige proteiner endret seg relativt lite ved økende lagringstid, samtidig som tilsats av antioksidanter påvirket hydrolysatene i liten grad. Et høyt innhold av vannløselige proteiner er ønskelig fordi de lett tas opp i kroppen, de er lettfordøyelige og de er enkle å blande inn i produkter.



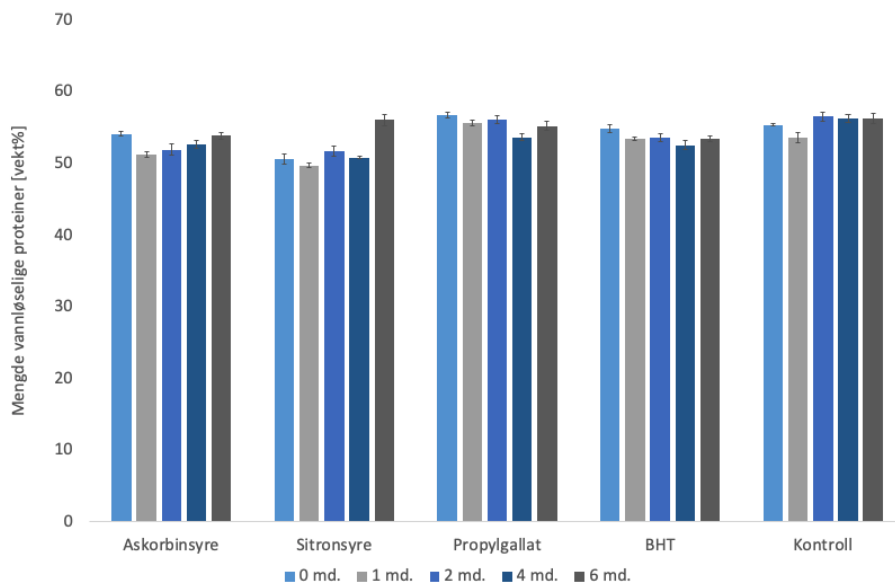
Figur 3.1: Mengde vannløselige proteiner [vekt%] i hydrolysaten (fortynnet 1:200) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 3$.

Minst mengde vannløselige proteiner ble funnet i PH tilsatt sitronsyre (4 md., $59,7 \pm 1,4\%$), mens størst mengde ble funnet i kontrollprøven (2 md., $68,9 \pm 1,1\%$) (figur 3.1). Likevel ble det funnet et høyere proteininnhold i PH tilsatt sitronsyre (4 md.) sammenlignet med kontrollprøven (2 md.) (tabell 3.5). Det kan skyldes at sitronsyre påvirket løseligheten, eller at mengden vannløselige proteiner i kontrollprøven ble overestimert grunnet interfererende forbindelser. For eksempel kan de frie aminosyrene Tyr og Trp bidra til en sterkere fargedannelse, og dermed også en høyere absorpsjon (Peterson, 1979). Imidlertid ble det funnet noe høyere innhold av fritt Tyr i PH tilsatt sitronsyre (4 md., $1,91 \text{ mg/g FPH}$) (figur 3.12) sammenlignet med kontrollprøven (2 md., $1,75 \text{ mg/g FPH}$) (figur 3.15). Det er derfor vanskelig å trekke en sikker konklusjon ut ifra resultatene fra Lowrys metode.

Hydrolysater fra hoder av regnbueørret hadde et høyere innhold av vannløselige proteiner enn hydrolysater fra laksehoder (Kendler, 2019). Kendler (2019) målte den vannløselige proteinkonsentrasjonen til å være $79,8 \pm 0,8\%$ og $86,5 \pm 5,4\%$ i henholdsvis kontrollprøven og hydrolysater tilsatt BHT. I dette forsøket var proteinkonsentrasjonen i kontrollprøven $62,9 \pm 1,7\%$ (0 md.), mens i PH tilsatt BHT var den $64,2 \pm 0,8\%$ (0 md.). Dette kan forklares med at hoder av regnbueørret har et høyere proteinnivå enn laksehoder. Li et al. (2019) viste at proteinnivået i regnbueørrethoder var $29 \pm 1 \text{ g/100 g}$, mens He et al. (2011) viste at proteinnivået i laksehoder var $23 \pm 1 \text{ g/100 g}$. I studien til Sandnes et al. (2003) ble det funnet at proteininnholdet i laksehoder var 11-13% av våtvekt.

Den vannløselige proteinkonsentrasjonen for hydrolysaten som ble fortynnet 1:200 (figur 3.1) var høyere enn i hydrolysaten som ble fortynnet 1:100 (figur 3.2), fordi 1:200-fortynningen ble multiplisert med en høyere faktor. Både hydrolysaten som var fortynnet 1:100 og 1:200 hadde avlesninger innenfor standardkurven. Hydrolysaten som var fortyn-

net 1:100 hadde generelt en sterkere blåfarge, noe som igjen resulterte i høyere absorpsans. Disse hydrolysatene lå i den høyere enden av standardkurven (figur D.1). PH med fortyning 1:200 hadde en svakere blåfarge, og lå cirka midt på standardkurven (ved BSA lik 150 µg/ml). Jo høyere proteinkonsentrasjon, jo mer kobberpeptid-komplekser vil dannes. Dette fører til en sterkere reduksjon av Folin-Ciocalteu-reagensen, noe som igjen gir en sterkere blåfarge (Lowry et al., 1951). I tillegg vil en høyere fortyning også gi en lavere konsentrasjon av interfererende stoffer, slik at de vil bidra i mindre grad.



Figur 3.2: Mengde vannløselige proteiner [vekt%] i hydrolysatene (fortynnet 1:100) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 3$.

3.5 Syreløselige peptider

Mengde syreløselige peptider i råstoffet og hydrolysatene ble bestemt ved å felle proteinene i 10% TCA (Hoyle & Merritt, 1994). Denne metoden bestemmer ikke antall brutte peptidbånd. I stedet baserer den seg på frie aminosyrer og peptiders løselighet i TCA (Rutherford, 2010). Resultatene for hydrolysatene med ingen lagringstid (0 md.), samt hydrolysatene med lagringstid 1 og 2 måneder, ble analysert og diskutert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019). Beregningene er gitt i vedlegg D.

3.5.1 Råstoff

Mengde syreløselige peptider i lakseråstoffet ble funnet å være $0,2 \pm 0,0\%$ av våtvekt. Sammenlignet med hydrolysaten var innholdet av syreløselige peptider over 100 ganger mindre. Dette var forventet siden laksehodene ikke var hydrolyserte, og dermed hadde peptider med større molekylvekt sammenlignet med hydrolysaten (figur 3.17). Yvon et al. (1989) viste at en økende peptidkjedelengde resulterte i en lavere løselighet i TCA.

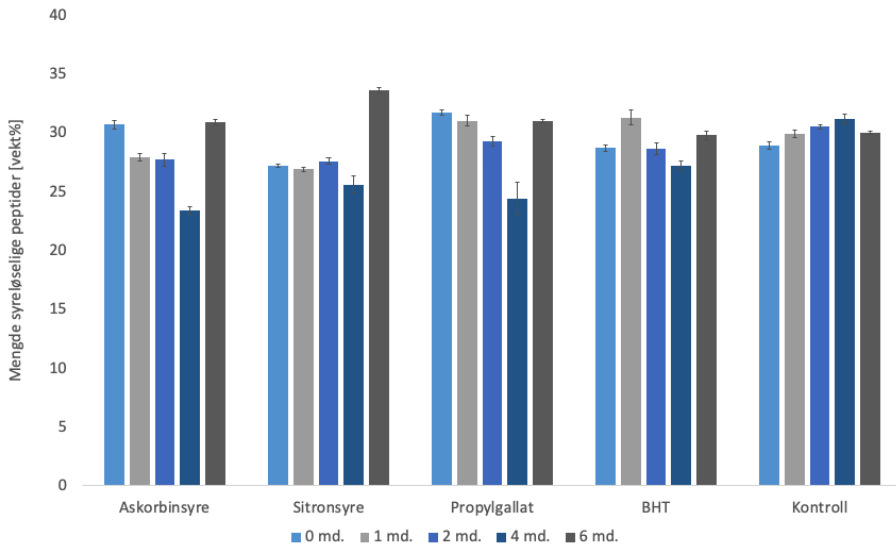
I studien til Greenberg & Shipe (1979) ble det funnet at den gjennomsnittlige molekylvekten til peptider løst i 10% TCA var mellom 330 og 380 Da (3-4 aminosyrer). Yvon et al. (1989) rapporterte om at peptider med mindre enn sju aminosyrer var løselige i 12% TCA. Figur 3.17 viser at lakseråstoffet hadde størst konsentrasjon av peptider med molekylvekt $> 12,4$ kDa og $\sim 6,5$ kDa. Dette indikerer at lakseråstoffet var lite løselig i TCA. Mengden syreløselige peptider i laksehoder var i samsvar med resultatene til Kendler (2019), som målte den syreløselige peptidkonsentrasjonen i råstoffet fra regnbueørret til å være 0,46% av våtvekt.

3.5.2 Proteinhydrolysater

Figur 3.3 viser mengde syreløselige peptider for hydrolysaten som var fortyntet 1:100. Mengden varierte fra $23,4 \pm 0,4\%$ (PH tilsatt askorbinsyre, 4 md.) til $33,6 \pm 0,3\%$ (PH tilsatt sitronsyre, 6 md.). Den høye verdien til PH tilsatt sitronsyre (6 md.) samsvarte med mengden vannløselig protein for PH tilsatt sitronsyre, der den høyeste verdien ble målt etter seks måneder (figur 3.1 og 3.2). I studien til Kendler (2019) var det $28,8 \pm 2,2\%$ syreløselige peptider i hydrolysatet tilsatt BHT, mens det var $28,4 \pm 0,9\%$ i kontrollprøven. Disse resultatene var i samsvar med verdiene i figur 3.3.

Trenden for PH tilsatt antioksidanter var relativt lik: Fra 0 til 4 måneder sank mengden syreløselige peptider i hydrolysaten, mens fra 4 til 6 måneder økte den. Kontrollprøven viste motsatt trend, altså at mengden syreløselige peptider økte fra 0 til 4 måneder og sank fra 4 til 6 måneder. Dette samsvarte også med endringen i mengde vannløselige proteiner i figur 3.2. Ved å sammenligne figur 3.2 og 3.3, observeres det at ca. 50% av de vannløselige proteinene også var syreløselige.

En høyere hydrolysegrad vil resultere i en større mengde peptider med lavere molekylvekt. Derfor ville det vært naturlig å anta at PH tilsatt sitronsyre (0 md.), som hadde høyest DH (tabell 3.3), også hadde størst konsentrasjon av syreløselige peptider. Dette var ikke tilfellet, da PH tilsatt sitronsyre (0 md.) hadde lavest konsentrasjon av syreløselige peptider blant hydrolysaten som ikke var lagret. Frie aminosyrer kan også reagere med Folin-reagensen, og dermed påvirke fargedannelsen og mengden syreløselige peptider (Lowry et al., 1951; Overrein, 2010; Peterson, 1979).



Figur 3.3: Mengde syreløselige peptider [vekt%] i hydrolysaten (fortynnet 1:100) etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 3$.

3.6 Aminosyresammensetning

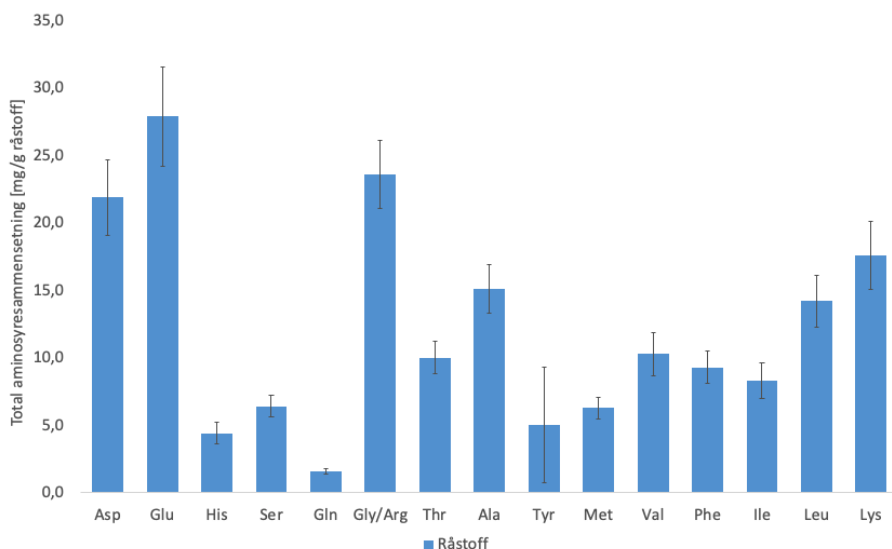
3.6.1 Bestemmelse av total aminosyresammensetning

Total aminosyresammensetning (TAAC) ble bestemt i henhold til Blackburn (1978). Aminosyresammensetningen til råstoffet er gitt i figur 3.4, mens det totale proteininnholdet i hydrolysaten er gitt i tabell 3.5. Total aminosyresammensetning i hydrolysaten med ingen lagringstid (0 md.), og i hydrolysaten med lagringstid 1 og 2 måneder, ble analysert og diskutert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019). Beregningene er gitt i vedlegg E.

Råstoff

Innholdet av totale aminosyrer i råstoffet ble funnet å være 182 ± 27 mg/g råstoff. Sammenlignet med proteininnholdet i PH uten antioksidant (kontroll, 0 md.) (468 ± 12 mg/g FPH), var proteininnholdet i råstoffet ca. 2,5 ganger lavere. Dette kan skyldes at proteinene ble isolert fra råstoffet ved hydrolyse. I tillegg bestod laksehodene av ca. 25% lipider. Lipidinnholdet i hydrolysaten ble ikke målt, men antas å være mye lavere siden hydrolysaten (kontroll, 0 md.) har et høyt innhold av tørrstoff ($91,0 \pm 0,2\%$ av tørt pulver), aske ($9,01 \pm 0,11\%$ av tørt pulver) og proteiner ($83,5 \pm 0,6\%$). Innholdet av totale aminosyrer ble funnet å være $43,5 \pm 6,2$ mg/g råstoff i hoder av regnbueørret (Kendler, 2019). Det lave innholdet av totale aminosyrer kan skyldes at regnbueørrethoder hadde et høyere innhold av aske ($4,46 \pm 0,03\%$) sammenlignet med laksehoder ($3,6 \pm 0,3\%$).

Råstoffet hadde høyest innhold av aminosyrene Glu ($27,9 \pm 3,7$ mg/g råstoff) og Gly/Arg ($23,6 \pm 2,5$ mg/g råstoff), og lavest innhold av Gln ($1,6 \pm 0,2$ mg/g råstoff). Det ble også funnet størst mengde av Glu og Gly/Arg i hoder av laks (Gbogouri et al., 2004; He et al., 2011) og rødlaks (*Oncorhynchus nerka*) (Wu et al., 2011). Høye verdier av Gly indikerer et høyt innhold av bindevevsproteiner i fiskehoder (Wu et al., 2011). Glu er viktig i aminosyremetabolismen og er nødvendig for å syntetisere glutation, en forbindelse som beskytter mot frie radikaler (Mohanty et al., 2014). Høye standardavvik for Tyr indikerer oksidasjon.



Figur 3.4: Total aminosyresammensetning [mg/g råstoff] for laksehodene. Standardavvik er gitt for $n = 3$.

Proteinhydrolysat - totalt proteininnhold

Innholdet av totale aminosyrer i hydrolysatene varierte fra 412 mg/g FPH (PH tilsatt sitronsyre, 1 md.) til 523 ± 18 mg/g FPH (PH tilsatt askorbinsyre, 6 md.). Den totale mengden aminosyrer økte signifikant ($p < 0,05$) fra 0 til 6 måneder for PH tilsatt askorbinsyre. I kontrollprøven og PH tilsatt sitronsyre, propylgallat og BHT, var den totale mengden aminosyrer ikke signifikant ($p > 0,05$) forskjellig fra 0 til 6 måneder. PH tilsatt sitronsyre med lagringstid én måned ble bare målt på én prøve, og det er derfor ikke gitt noe standardavvik.

Tabell 3.5: Innholdet av totale aminosyrer [mg/g FPH] og standardavviket (n = 3) til proteinhydrolysatene. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

Antioksidant	0 md. [mg/g]	1 md. [mg/g]	2 md. [mg/g]	4 md. [mg/g]	6 md [mg/g]
Askorbinsyre	464 ± 10 ^a	455 ± 23 ^{a,b}	455 ± 10 ^a	502 ± 13 ^{b,c}	523 ± 18 ^c
Sitronsyre	445 ± 0 ^b	412	424 ± 10 ^a	449 ± 17 ^{a,b}	452 ± 5 ^b
Propylgallat	463 ± 14 ^a	473 ± 11 ^a	480 ± 15 ^a	471 ± 49 ^a	460 ± 36 ^a
BHT	466 ± 5 ^{d,e}	464 ± 31 ^{c,d,e}	419 ± 9 ^{a,b,c}	480 ± 24 ^e	463 ± 44 ^{b,e}
Kontroll	468 ± 12 ^{c,e}	435 ± 28 ^{a,b,d,e}	441 ± 2 ^{b,d}	479 ± 58 ^{d,e}	483 ± 10 ^e

Det er ønskelig med et høyt proteinnivå hvis hydrolysatene skal tilsettes i mat (Chalamaiah et al., 2012). I en studie utført av Sathivel et al. (2005) var TAAC i hydrolysater av hoder fra rød laks (*O. nerka*) mellom 987 og 990 mg/g protein (avhengig av type enzym brukt under hydrolysen). Proteininnholdet i hydrolysater fra rød laks var ca. 500 mg/g høyere enn proteininnholdet i hydrolysatene fra laks (tabell 3.5). Det kan skyldes at Sathivel et al. (2005) detekterte flere aminosyrer (deriblant hydroksypolin og Pro), eller at innholdet av aske var lavere i hydrolysatene fra rød laks (ca. 6,9-7,7%) sammenlignet med hydrolysatene fra laks (ca. 9%).

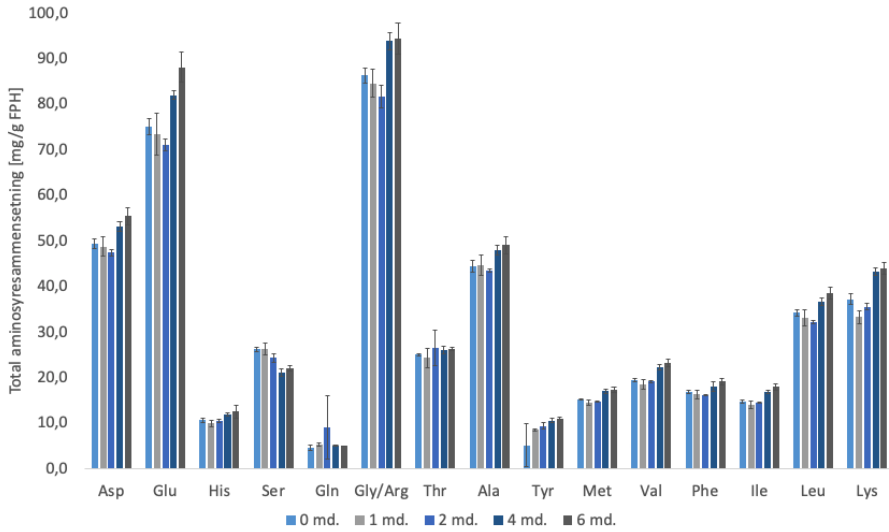
Proteinhydrolysat - total aminosyresammensetning

Figur 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 og 3.9 viser total aminosyresammensetning i hydrolysatene. I alle hydrolysatene var det størst mengde av Gly/Arg, Glu og Asp. Samme resultat ble også funnet av Idowu et al. (2019), Kendler (2019), Sathivel et al. (2005) og Stensen (2019). Ved syrehydrolyse vil Asn og Gln hydrolyseres, noe som resulterer i dannelsen av Asp og Glu (European Pharmacopoeia, 2005). Trp og Cys ble ødelagt ved syrehydrolyse (European Pharmacopoeia, 2005; Friedman & Finley, 1971).

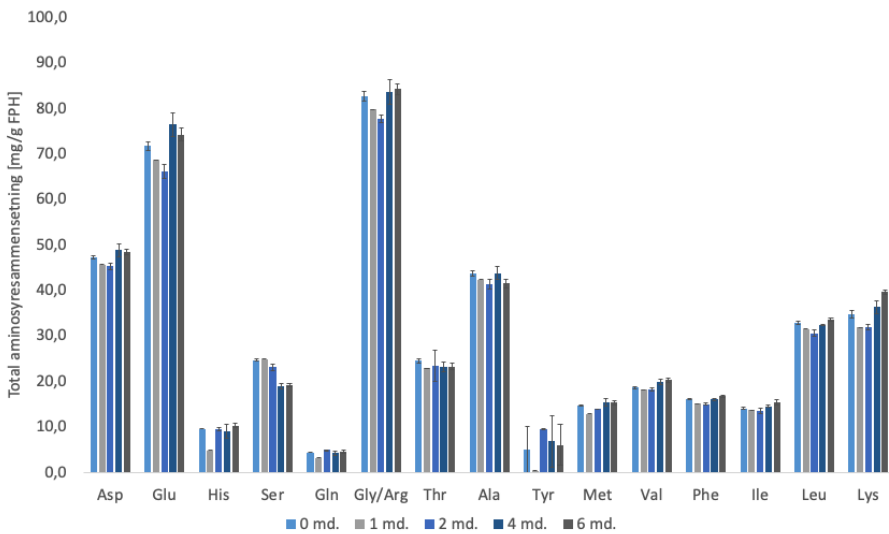
Kvaliteten til et protein er avhengig av innholdet og konsentrasjonen av de essensielle aminosyrene His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp og Val (Friedman, 1996; Jensen et al., 2013). PH tilsatt antioksidanter og kontrollprøven inneholdt Ile, Leu, Lys, Thr og Val i en slik mengde at det kan regnes som et fullverdig protein (FAO/WHO, 1991). Aminosyren Met ble funnet i liten grad, noe som kan skyldes at forbindelsen kan oksidere til metionin sulfoksid (MetO) ved syrehydrolyse (Choe & Min, 2005).

I alle hydrolysatene ble Gln detektert, noe som kan skyldes at ikke alt ble omdannet til Glu under hydrolysen. Videre observeres det at innholdet av Tyr var ustabil i PH tilsatt sitronsyre, propylgallat, BHT og kontrollprøven. Dette gir en indikasjon på at Tyr oksiderte til dityrosin. I PH tilsatt askorbinsyre var innholdet av Tyr relativt stabilt ved økende lagringstid, noe som antyder at askorbinsyre forhindret oksidasjon av Tyr. Samme resultat ble også observert i et forsøk utført på fibroblaster som ble utsatt for hydrogenperoksid (Geotek et al., 2017). Ved å behandle fibroblastene med askorbinsyre ble det dannet mindre reaktive oksygenforbindelser, som igjen resulterte i en lavere mengde dityrosin.

Kapittel 3. Resultater og diskusjon

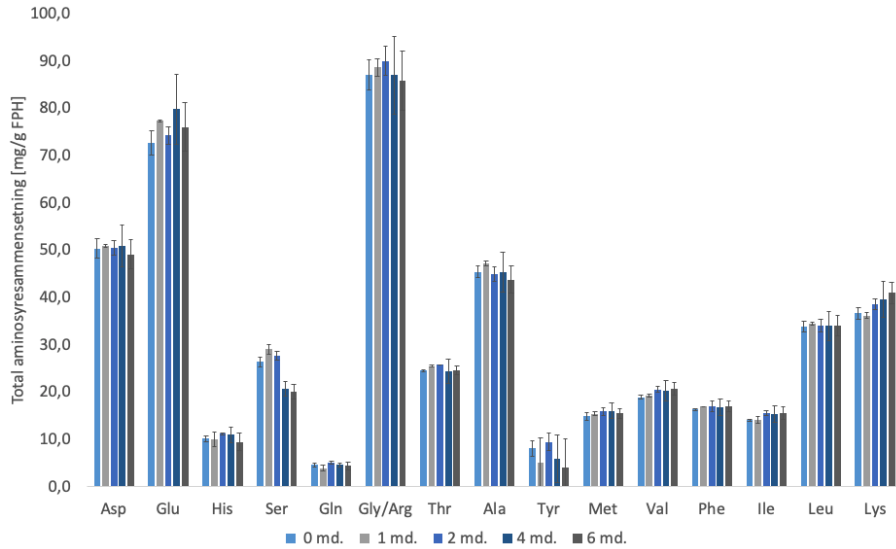


Figur 3.5: Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt askorbinsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.

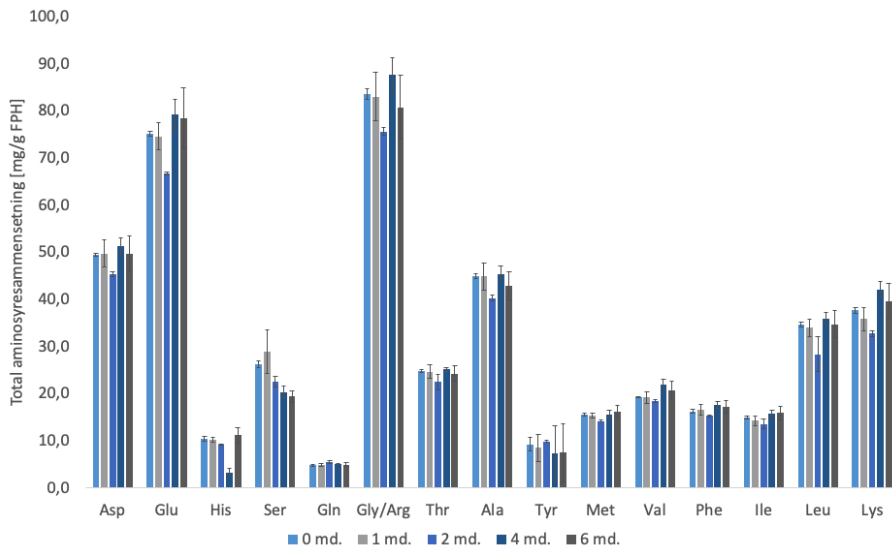


Figur 3.6: Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt sitronsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.

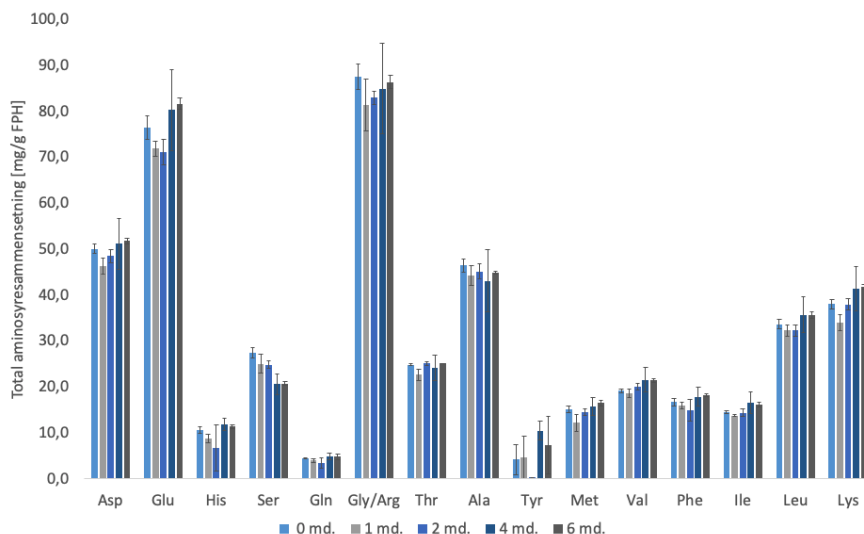
3.6 Aminosyresammensetning



Figur 3.7: Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt propylgallat etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.



Figur 3.8: Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for PH tilsatt BHT etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.



Figur 3.9: Total aminosyresammensetning [mg/g FPH] for kontrollprøven etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for n = 3.

3.6.2 Mengde og sammensetning av frie aminosyrer

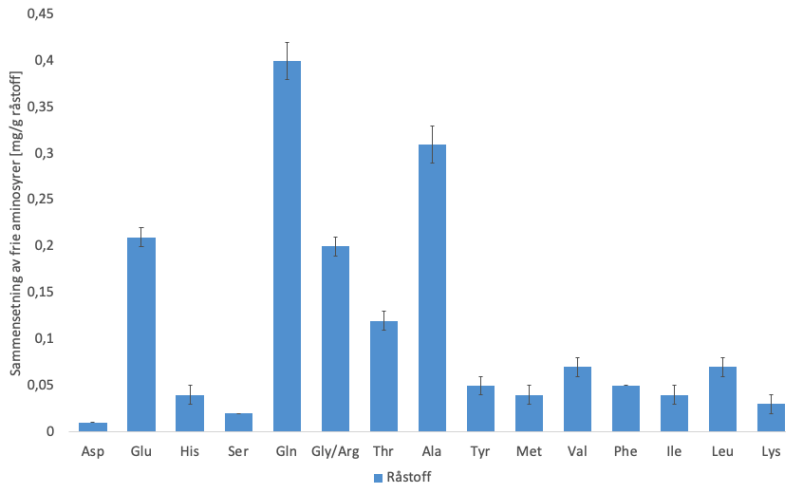
Mengde frie aminosyrer (FAA) ble bestemt i henhold til Osnes & Mohr (1985). Sammensetningen av frie aminosyrer i råstoffet er gitt i figur 3.10, mens resultatet for proteinhydrolysatene er gitt i tabell 3.6. Mengde og sammensetning av frie aminosyrer i hydrolysatene med ingen lagringstid (0 md.), og i hydrolysatene med lagringstid 1 og 2 måneder, ble analysert og diskutert i prosjektoppgaven (Gjermstad, 2019). Beregningene er gitt i vedlegg F.

Råstoff

Det totale innholdet av frie aminosyrer i råstoffet ble funnet å være $1,66 \pm 0,09$ mg/g råstoff. Innholdet av frie aminosyrer i råstoffet var ca. 30 ganger mindre sammenlignet med mengden frie aminosyrer i hydrolysatet uten antioksidanter (0 md., $45,1 \pm 1,0$ mg/g FPH). Det kan forklares med at råstoffet ikke ble hydrolysert ($DH = 7,85 \pm 0,05\%$), og dermed bestod av større proteiner enn PH uten antioksidanter ($DH = 15,92 \pm 0,14\%$). En høyere hydrolysegrad vil resultere i at flere proteiner brytes ned. Som en konsekvens av dette vil flere frie aminosyrer frigjøres (Abdelhedi et al., 2016; Bezerra et al., 2020). Innholdet av frie aminosyrer i hoder av laks og regnbueørret ($1,78 \pm 0,24$ mg/g) var tilnærmet like (Kendler, 2019).

I råstoffet var det størst konsentrasjon av de frie aminosyrene Gln ($0,40 \pm 0,02$ mg/g råstoff), Ala ($0,31 \pm 0,02$ mg/g råstoff) og Glu ($0,21 \pm 0,01$ mg/g råstoff) (figur 3.10). Aminosyrene Asp, His, Ser, Met og Ile ble funnet i lave konsentrasjoner (< 5 mg/g råstoff). Det høye innholdet av Gln og Glu skyldes at disse aminosyrene er vanlige i fiskehjerter

(Levi et al., 1974). Gln kan syntetiseres som en del av fiskens forsvarsmekanisme mot ammoniakk og skader på sentralnervesystemet (Singer, 2007). Ved enzymatisk hydrolyse kan sammensetningen av frie aminosyrer endres, siden enzymene kan spalte spesifikke peptidbindinger og frigjøre aminosyrer (Lee, 2007). Sammenligning av figur 3.10 og 3.15 viser at sammensetningen av frie aminosyrer er forskjellig i råstoffet og PH uten antioksidanter. For eksempel var det lite Leu i råstoffet, mens i hydrolysatet var det nest størst mengde av fritt Leu.



Figur 3.10: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g råstoff] for laksehodene. Standardavvik er gitt for $n = 4$.

Proteinhydrolysat - mengde frie aminosyrer

Ved ingen lagringstid (0 md.) var det størst mengde frie aminosyrer i PH tilsatt propylgallat ($46,6 \pm 0,9$ mg/g FPH), mens det var lavest mengde i PH tilsatt sitronsyre ($39,4 \pm 0,3$ mg/g FPH). Ved økende lagringstid endret mengden frie aminosyrer seg relativt lite i alle hydrolysatene. Etter seks måneder var det høyest innhold av frie aminosyrer i PH uten antioksidanter ($44,3 \pm 1,0$ mg/g FPH). Reduksjon i mengde frie aminosyrer kan skyldes aggregering ved lagring. På den annen side kan kjedebrudd gi en økning i frie aminosyrer. Dette må undersøkes nærmere for å trekke en endelig konklusjon.

Tabell 3.6: Mengde frie aminosyrer [mg/g FPH] og standardavvik ($n = 2$) til proteinhydrolysatene. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell ($p < 0,05$).

Antioksidant	0 md. [mg/g]	1 md. [mg/g]	2 md. [mg/g]	4 md. [mg/g]	6 md. [mg/g]
Askorbinsyre	$40,1 \pm 2,1^{a,b}$	$38,74 \pm 0,05^b$	$36,8 \pm 1,8^{a,b}$	$38,0 \pm 0,4^{a,b}$	$36,7 \pm 0,6^a$
Sitronsyre	$39,4 \pm 0,3^b$	$38,2 \pm 0,7^{a,b}$	$37,7 \pm 2,1^{a,b}$	$37,2 \pm 1,0^a$	$40,6 \pm 1,1^b$
Propylgallat	$46,6 \pm 0,9^{b,d}$	$39,9 \pm 3,6^{a,b,c,d}$	$43,3 \pm 0,8^c$	$43,9 \pm 1,1^{c,d}$	$39,6 \pm 1,1^a$
BHT	$43,9 \pm 1,5^a$	$40,2 \pm 0,2^b$	$40,1 \pm 1,5^{a,b}$	$42,0 \pm 1,3^{a,b}$	$41,0 \pm 2,0^{a,b}$
Kontroll	$45,1 \pm 1,0^{c,d}$	$40,5 \pm 1,3^{a,b}$	$42,4 \pm 1,3^{a,c,e}$	$41,4 \pm 0,4^{a,b}$	$44,3 \pm 1,0^{d,e}$

Ved å sammenligne det totale aminosyreinnholdet (tabell 3.5) og innholdet av frie aminosyrer (tabell 3.6) i hydrolysaten, kan prosentvis nedbryting av proteinene bestemmes. Ved ingen lagringstid (0 md.) var innholdet av totale aminosyrer 464 mg/g FPH i PH tilsatt askorbinsyre, 445 mg/g FPH i PH tilsatt sitronsyre, 463 mg/g FPH i PH tilsatt propylgallat, 466 mg/g FPH i PH tilsatt BHT og 468 mg/g FPH i kontrollprøven. Tilsvarende var innholdet av FAA i hydrolysaten med ingen lagringstid ca. 40 mg/g FPH. Det vil si at cirka 8% av proteinene ble brutt ned til frie aminosyrer.

Hvis hydrolysater skal tilsettes i mat er det ønskelig at de består av peptider med lav molekylvekt og så liten mengde frie aminosyrer som mulig (Guerard, 2007). Innholdet av frie aminosyrer i PH fra laksehoder utgjorde en relativt liten del av det totale proteininnholdet (ca. 8%). Studier har vist at små peptider (di- og tripeptider) tas lettere opp i tarmen sammenlignet med det intakte proteinet og frie aminosyrer (Mashima et al., 1984; Silk et al., 1980). Derfor kan små peptider være en god kilde til nitrogen for spedbarn og idrettsutøvere (Kodera et al., 2006). I tillegg kan peptidene tilsettes i dietten til pasienter med tarmsykdommer (Fairclough et al., 1980).

I hydrolysater av hoder av regnbueørret som var hydrolysert med papain, bromelain og BHT, var innholdet av frie aminosyrer $36,8 \pm 4,4$ mg/g FPH (Kendler, 2019). I PH fra torskehoder (*G. morhua*), som var hydrolysert med tilsvarende enzymer og sitronsyre, var innholdet av FAA $25,9 \pm 6,1$ mg/g FPH (Stensen, 2019). Sammenlignet med tabell 3.6, var mengde frie aminosyrer i hydrolysater av torskehoder 13,5 mg/g FPH lavere enn mengde frie aminosyrer i PH tilsatt sitronsyre. Grunnen kan være at hydrolysegraden til PH fra torskehoder (ca. 13%) var lavere enn hydrolysegraden til PH tilsatt sitronsyre (17,06%).

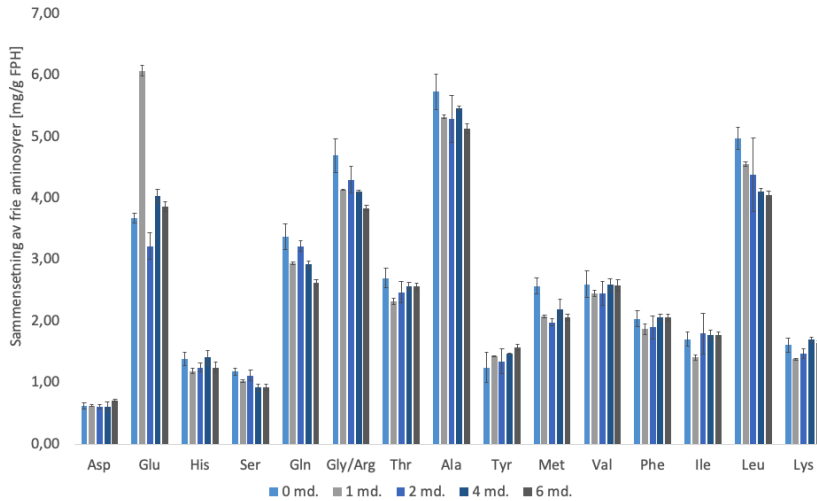
Proteinhydrolysat - sammensetning av frie aminosyrer

Figur 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 og 3.15 viser sammensetningen av frie aminosyrer i hhv. PH tilsatt askorbinsyre, sitronsyre, propylgallat, BHT og kontrollprøven. Ved ingen lagringstid (0 md.) var Ala, Leu og Gly/Arg de dominerende aminosyrene. Det høye innholdet av fritt Ala og Gly kan forklares med at disse aminosyrene er funnet i relativt høye mengder i fisk (Gunlu & Gunlu, 2014). Fra 0 til 6 måneder reduseres innholdet av de dominerende aminosyrene i alle hydrolysaten. Aminosyren som er detektert i lavest mengde, Asp, er relativt stabil ved økende lagringstid.

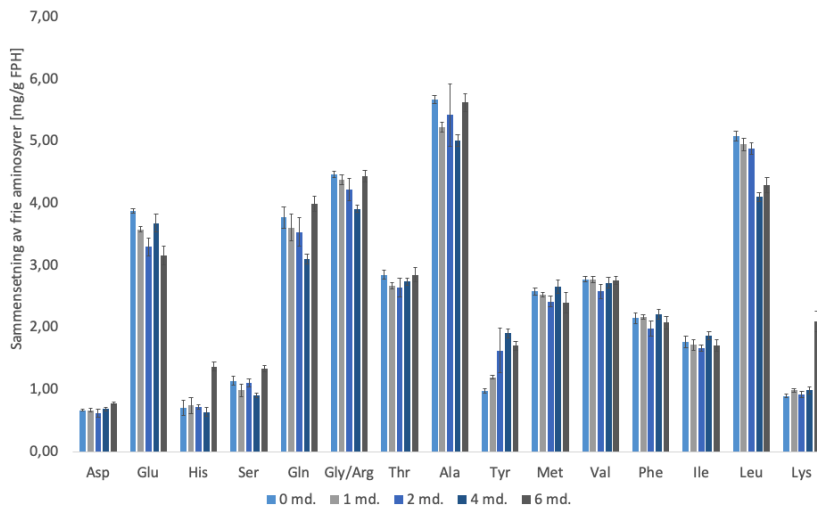
Etter lagringstid 1 måned ble det detektert en høy topp av Glu ($6,07 \pm 0,09$ mg/g FPH) i PH tilsatt askorbinsyre. Det kan skyldes en feil ved HPLC-analysen, siden en tilsvarende topp ikke ble observert i de andre hydrolysaten ved lagringstid 1 måned. I PH tilsatt sitronsyre var innholdet av fritt His og Lys ved lagringstid 6 måneder dobbelt så høyt som ved 4 måneder. Dette kan også skyldes en feil ved HPLC-analysen, siden det ikke ble sett noen sammenheng med det totale innholdet av His og Lys i hydrolysatet (figur 3.6).

Sammensetningen av frie aminosyrer påvirker hydrolysatets antioksidative aktivitet. Et høyere innhold av de hydrofobe aminosyrene Ala, Leu, Pro, Trp og Phe vil øke aktiviteten (Prihanto et al., 2019). Det høye innholdet av Ala og Leu i hydrolysaten indikerer at de kan fungere som antioksidanter. I det videre arbeidet kan den antioksidative effekten til

PH fra laksehoder analyseres, siden det i dag er en økende interesse i å finne naturlige antioksidanter uten skadelige bivirkninger (Pérez-Gálvez et al., 2018).

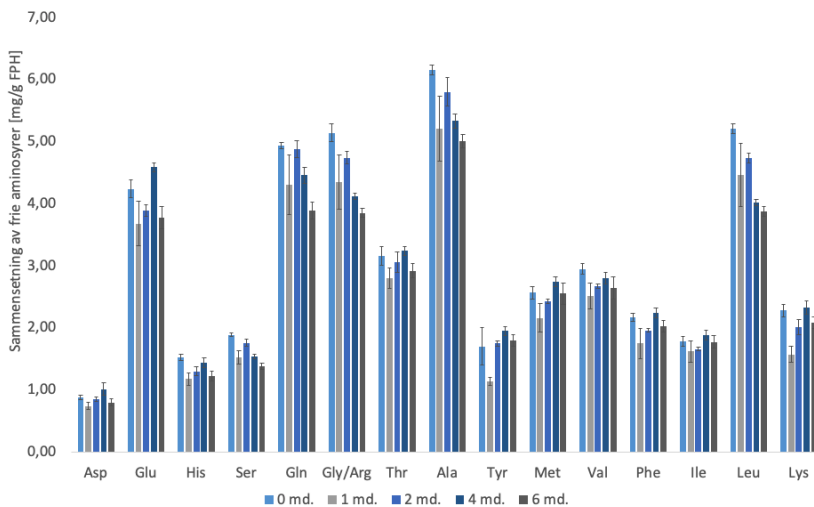


Figur 3.11: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt askorbinsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 2$.

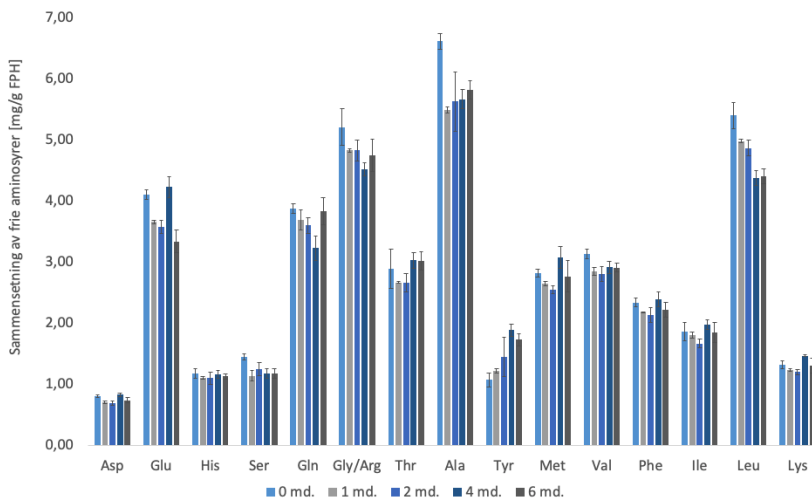


Figur 3.12: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt sitronsyre etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 2$.

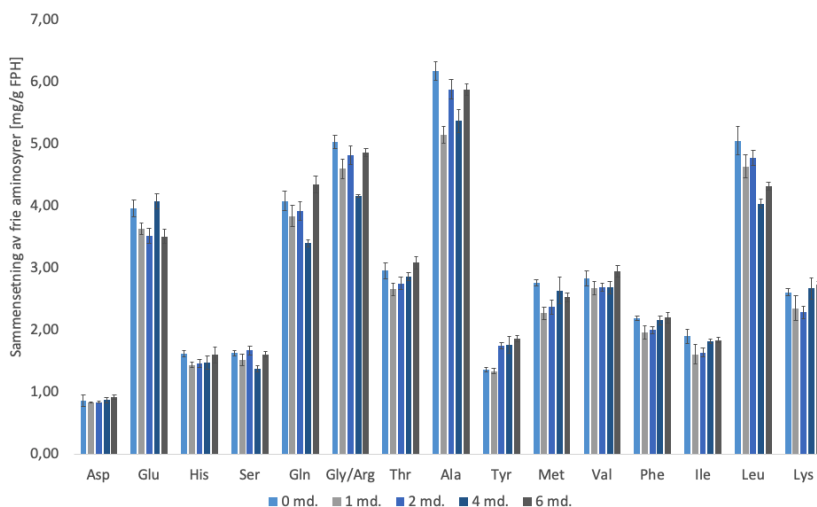
Kapittel 3. Resultater og diskusjon



Figur 3.13: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt propylgallat etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 2$.



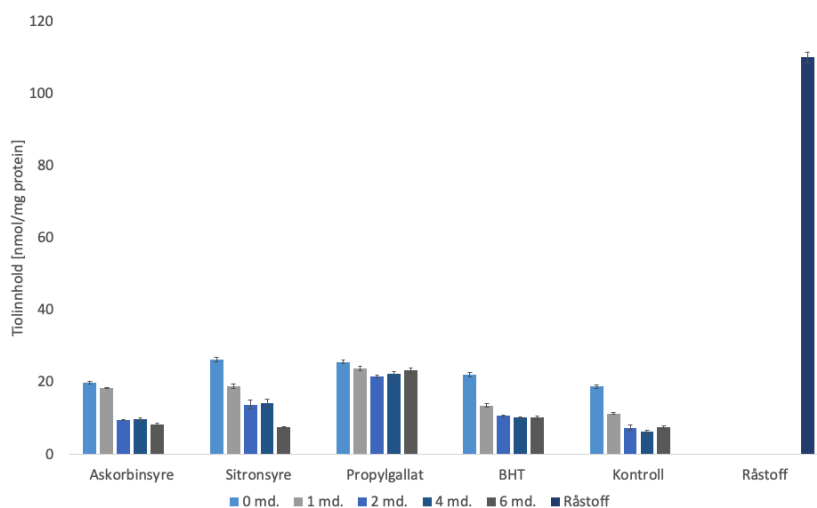
Figur 3.14: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for PH tilsatt BHT etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 2$.



Figur 3.15: Sammensetning av frie aminosyrer [mg/g FPH] for kontrollprøven etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Standardavvik er gitt for $n = 2$.

3.7 SH-grupper

I denne studien ble oksidasjon i hydrolysater og råstoff undersøkt ved kvantifisering av SH-grupper (Ellman, 1959). Innholdet av tioler er gitt som nmol/mg protein, og resultatene kan ses i figur 3.16. Verdiene for vannløselige proteiner ved Lowrys metode (figur 3.1) ble brukt som utgangspunkt i beregningene, som er gitt i vedlegg G.



Figur 3.16: Mengde tioler [nmol/mg protein] i hydrolysaterne etter 0, 1, 2, 4 og 6 måneder og råstoffet. Standardavvik er gitt for $n = 3$.

Ved ingen lagringstid (0 md.) var innholdet av tioler relativt høyt i alle hydrolysatenes. PH tilsatt sitronsyre hadde det høyeste innholdet ($26,2 \pm 0,7$ nmol/mg protein), mens kontrollprøven hadde det laveste ($18,8 \pm 0,5$ nmol/mg protein). Et høyere innhold av tioler i PH tilsatt antioksidanter (0 md.) sammenlignet med kontrollprøven (0 md.), indikerer at antioksidantene beskyttet mot oksidasjon av Cys under frysetørkingen.

Innholdet av tioler i råstoffet var ca. 5 ganger høyere enn i hydrolysatenes med ingen lagringstid. Grunnen til det kan være at råstoffet ikke hadde oksidert, siden det ble frosset ned rett etter at laksehodene var kvernet. Hydrolysatenes kan derimot ha oksidert under hydrolysen og tørkingen. I tillegg ser det ut til at peptidene som frigjøres ved hydrolyse har et lavere innhold av tioler sammenlignet med de vannløselige proteinene i råstoffet.

Endring i tiolinnhold med økende lagringstid for PH tilsatt askorbinsyre, sitronsyre og BHT og kontrollprøven, indikerte oksidasjon av Cys. Hydrolysatenes tilsatt propylgallat hadde lavest differanse i tiolinnhold fra 0 til 6 måneder. Propylgallat var dermed den antioksidanten som beskyttet best mot oksidasjon av Cys, som hovedsakelig skjer i nærvær av reaktive oksygenforbindelser (Ying et al., 2007). Medina et al. (2013) viste at propylgallat hovedsakelig beskytter mot peroksyldradikaler ved hydrogendonasjon. Dette samsvarer med resultatene for PH tilsatt propylgallat i figur 3.16.

Innholdet av tioler i PH tilsatt askorbinsyre, sank med $11,5$ nmol/mg protein fra 0 til 6 måneder. Askorbinsyre kan fjerne frie radikaler ved elektrononasjon (Duarte & Lunec, 2005). Etter donasjonen kan askorbinsyre oksideres til et semi-dehydroaskorbat-radikal, som igjen kan omformes til dehydroaskorbat (Barbosa et al., 2012). Barbosa et al. (2012) foreslo at askorbinsyre oksiderte tioler ved autooksidering til dehydroaskorbat og ved nærvær av jern. I denne studien kan også dette være grunnen til det lave tiolinnholdet i PH tilsatt askorbinsyre ved 2, 4 og 6 måneder. Hydrolysatenes kan inneholde jern som stammer fra blodet i laksehodene, og som vil fungere som en prooksidant. Tabell 3.7, som viser at PH tilsatt askorbinsyre blir rødbrun ved økt lagringstid, styrker denne antagelsen.

Figur 3.16 viser at tiolinnholdet i PH tilsatt BHT sank fra $22,1 \pm 0,6$ nmol/mg protein (0 md.) til $10,1 \pm 0,4$ nmol/mg protein. BHT hindret derfor ikke oksidasjon av tioler ved økende lagringstid. Samme observasjon ble også gjort av Zahid et al. (2019), som undersøkte tiolinnholdet i biffburgere tilsatt BHT. I det videre arbeidet kan innholdet av karbonylgrupper bestemmes, for å se om hydrolysater med et lavt tiolinnhold, også har et høyt innhold av karbonylgrupper.

3.8 Molektsfordeling

Størrelsen til peptidene i råstoffet og hydrolysatenes ble undersøkt ved gelfiltrering. Tre standarder med kjent molekylvekt, vitamin B₁₂ ($M_w = 1,36$ kDa), aprotinin ($M_w = 6,5$ kDa) og cytokrom c ($M_w = 12,4$ kDa), ble analysert for å finne sammenhengen mellom molekylvekt og elueringsvolum. For å beregne molekylvekten til toppene ble det laget en standardkurve (figur H.1) basert på elueringsvolumet og molekylvekten til standardene. Ligning 3.1 viser trendlinjen mellom de tre standardene. Standardkurven og beregningene

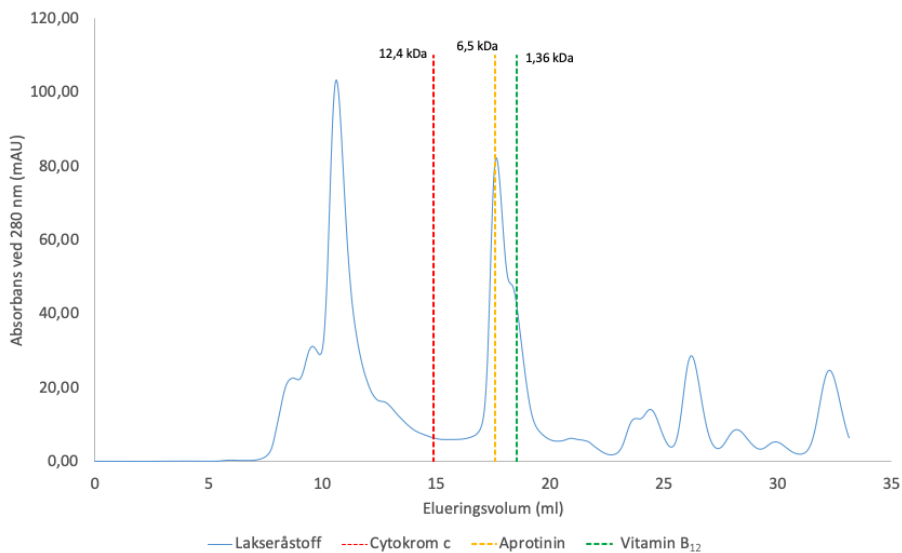
er gitt i vedlegg H.

$$\log(M_w) = -3,6334 \cdot K_{av} + 5,7181. \quad (3.1)$$

K_{av} indikerer forholdet mellom elueringsvolumet til et molekyl og det totale volumet i kolonnen, mens M_w er molvekten. SUPERDEX PEPTIDE 10/300-kolonnen som ble brukt i dette eksperimentet separerer peptider i området 100 - 7000 Da (Sigma-Aldrich, 2020). Basert på ligning 3.1 gir dette et elueringsvolum i området 16,25 - 24,37 ml. Figur 3.17 viser molvektfordelingen i råstoffet, mens figur 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 og 3.22 viser molvektfordelingen til FPH etter henholdsvis 0, 1, 2, 4 og 6 måneder. Fra disse figurene observeres det flere toppe utenfor området (16,25 - 24,37 ml). Toppen ved ca. 8 ml er molekyler som ikke bindes (void-volumet), mens toppene etter 24,14 ml er hovedsakelig frie aminosyrer.

3.8.1 Råstoff

Figur 3.17 viser to distinkte toppe; én ved ca. 11 ml (molekylvekt > 12,4 kDa) og én ved ca. 17,5 ml (~ 6,5 kDa). Råstoffet ble ikke hydrolysert, og har derfor en stor mengde molekyler med større molekylvekt enn 12,4 kDa. Kromatogrammet gir et bilde på de vannløselige proteinene i råstoffet før hydrolysen, og det forventes derfor ikke så høye toppe. Molekylvektfordelingen til laksehodene er i samsvar med molekylvektfordelingen som ble funnet i hoder fra regnbueørret (Kendler, 2019).



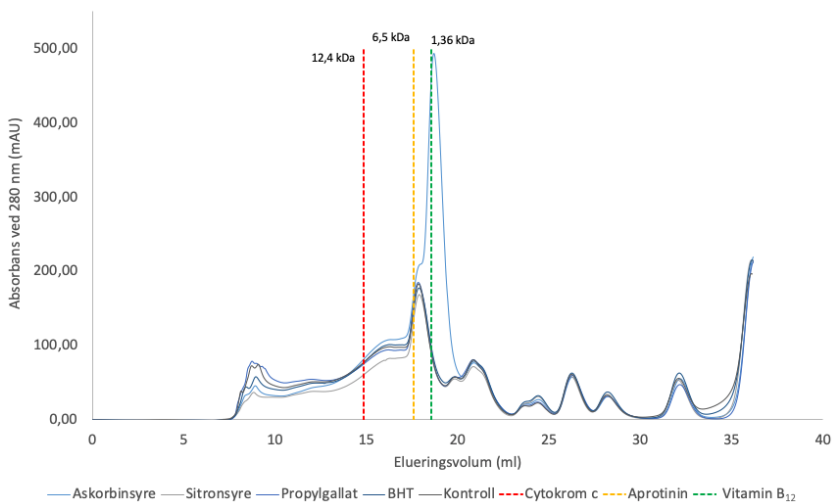
Figur 3.17: Kromatogrammet for lakseråstoffet. De stiplede linjene indikerer molvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.

3.8.2 Proteinhydrolysater

Ved ingen lagringstid (0 md.) hadde PH tilsatt sitronsyre, propylgallat og BHT og kontrollprøven en høy topp ved 17,84 ml ($\sim 6,5$ kDa). PH tilsatt askorbinsyre hadde en topp ved mindre molekylvekt enn vitamin B₁₂ ($M_w = 1,36$ kDa), som indikerte en høy konsentrasjon av mindre peptider med lavere molekylvekt sammenlignet med de andre hydrolysate-ene. Absorbansen til den høyeste toppen til PH tilsatt askorbinsyre var ca. 300 mAU høyere enn absorbansen til de andre hydrolysate-ene. I en studie utført av Almajidi & Algubury (2016) ble det funnet at en høyere konsentrasjon av askorbinsyre resulterte i en høyere absorbans ved 280 nm.

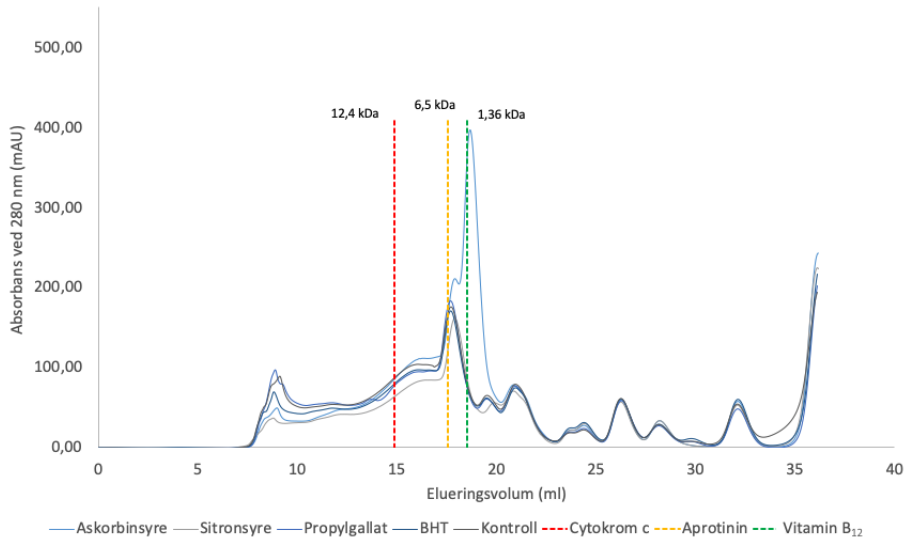
Siden molekylvekt er relatert til hydrolysegrad (Adler-Nissen, 1986), ville det vært rimelig å anta at hydrolysegraden til PH tilsatt askorbinsyre var høyere enn hydrolysegraden til de andre hydrolysate-ene. Dette var imidlertid ikke tilfellet. I studien til Kendler (2019) ble den høyeste toppen til PH fra regnbueørret funnet å ha større molekylvekt enn aprotinin ($M_w = 6,5$ kDa). Figur 3.18 viser at kontrollprøven hadde sin høyeste topp ved mindre molekylvekt enn aprotinin. Dette indikerer at PH fra regnbueørret hadde en høyere konsentrasjon av peptider med høyere molekylvekt.

Bitterhet er relatert til hydrofobisitet og molekylvekt, og er vanligvis størst hos små peptider med molekylvekt mellom 1 og 6 kDa (González-Tello et al., 1994). Dette er i samsvar med studien til Aspevik (2016), som rapporterte om at høy bitterhet i PH fra restråstoff fra laks (*S. salar*) korrelerte med høy DH ($\geq 25\%$) og peptider med molekylvekt < 2 kDa. I denne studien var molekylvekten til hydrolysate-ene < 6 kDa, og det er derfor sannsynlig at de har en bitter smak. Bitterhet kan måles i det videre arbeidet, siden dette er en viktig faktor hvis FPH skal anvendes som ingrediens i mat (Dauksas et al., 2004).



Figur 3.18: Kromatogrammet for PH med ingen lagringstid (0 md.). De stiplede linjene indikerer molekylvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.

Kromatogrammet for prøvene med ingen lagringstid og lagringstid 1 måned (figur 3.19) var relativt like. Den eneste forskjellen var at absorpsjonen til PH tilsatt askorbinsyre sank med ca. 100 mAU. Dette kan skyldes aggregering, men må undersøkes nærmere for å trekke sikre konklusjoner. Proteinhydrolysater med høy næringsverdi bør ha et høyt innhold av peptider med lav molekylvekt (Bhaskar et al., 2008). PH fra restråstoff av laks hadde stor andel peptider med lav molekylvekt, og kan derfor fungere som ingrediens i funksjonell mat.



Figur 3.19: Kromatogrammet for PH ved lagringstid 1 måned. De stiplede linjene indikerer molekylvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.

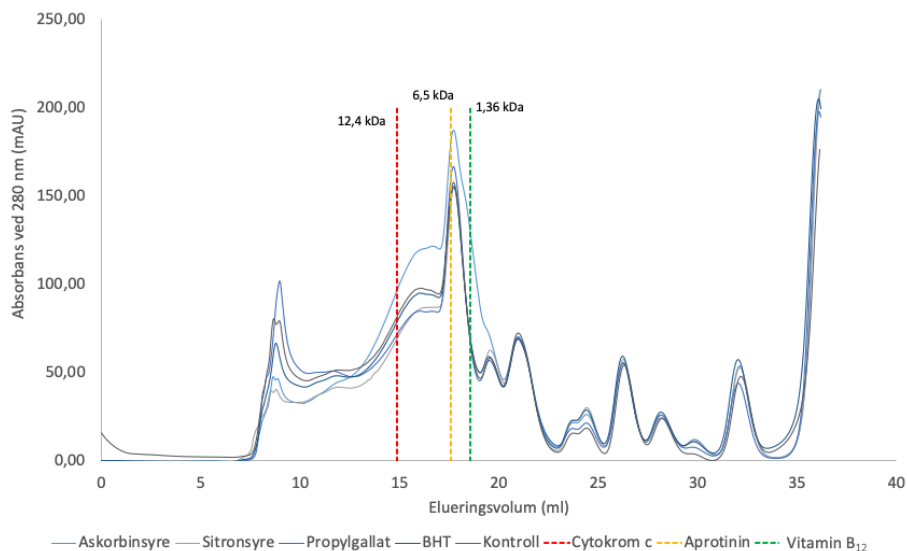
Etter to måneders lagring var absorpsjonen til PH tilsatt askorbinsyre relativt lik (ca. 30 mAU høyere) absorpsjonen til de andre hydrolysaten (figur 3.20), sammenlignet med ingen (figur 3.18) og én måned lagringstid (figur 3.19). Askorbinsyre er en ustabil forbindelse som kan oksideres eller ødelegges av lys, høye temperaturer eller fuktighet (Yussif, 2018). Ved lagring kan den derfor ha degradert til andre forbindelser, slik som dehydroaskorbat. Sett i lys av innhold av tioler (figur 3.16) og fargeendringen til PH tilsatt askorbinsyre (tabell 3.7), kan denne hypotesen stemme. Fra 2 til 6 måneders lagring var både innholdet av tioler og absorpsjonen stabil, samtidig som hydrolysatet hadde en relativt liten fargeendring i denne perioden.

Ved lagringstid 2 måneder viser grafen til PH tilsatt askorbinsyre at den høyeste toppen ligger nærmere aprotinin (6,5 kDa) sammenlignet med figur 3.18 og 3.19. Dette kan skyldes aggregering, dvs. at peptidene klumper seg sammen til større bestanddeler bestående av flere polypeptidkjeder (Zapadka et al., 2017). To hypoteser kan forklare aggregeringen til PH tilsatt askorbinsyre; dannelsen av disulfidbindinger (1) eller Maillard-reaksjon (2).

1. Zhou et al. (2008) fant at dannelsen av intermolekylære disulfidbindinger var den

viktigste drivkraften bak proteinaggregering av myseproteiner ved lagring (35 °C i tre uker). Figur 3.16 viser at innholdet av tioler ble halvert fra 1 til 2 måneder i PH tilsatt askorbinsyre, noe som indikerer dannelse av disulfidbindinger. Innholdet av tioler holdt seg relativt stabilt fra 2 til 6 måneder, og det samme gjorde molekylvekten til PH tilsatt askorbinsyre (figur 3.21 og 3.22).

2. Ved høy fuktighet kan tørre proteinhydrolysater ta opp vann, noe som resulterer i strukturendringer (Netto et al., 1998). Dette kan resultere i dannelse av disulfidbindinger eller Maillard-induserte aggregater (Rao et al., 2016). Rao & Labuza (2012) viste at slike kovalente interaksjoner førte til aggregater (som var fremkalt av fuktighet) i PH fra egg. PH tilsatt askorbinsyre ble signifikant ($p < 0,05$) brunere fra 1 til 2 måneder (tabell 3.7), noe som kan skyldes Maillard-reaksjon av karbonyler produsert ved lipidoksidasjon. Ueda et al. (1986) viste at tilsats av askorbinsyre i et system med høyt vanninnhold førte til økt autooksidering.

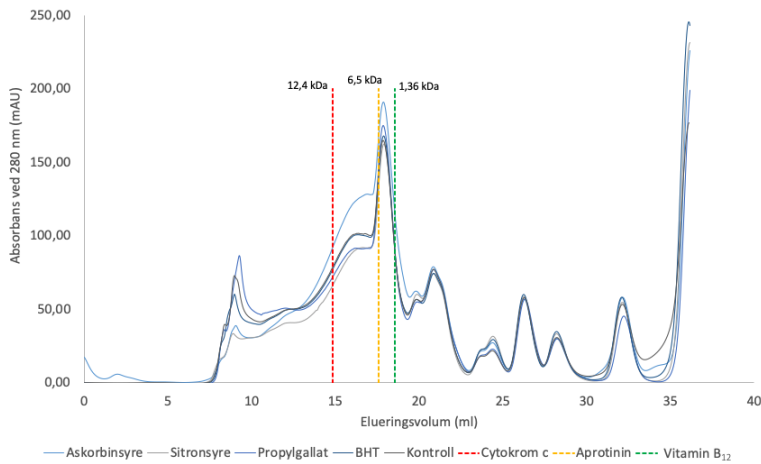


Figur 3.20: Kromatogrammet for PH ved lagringstid 2 måneder. De stiplede linjene indikerer molekylvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.

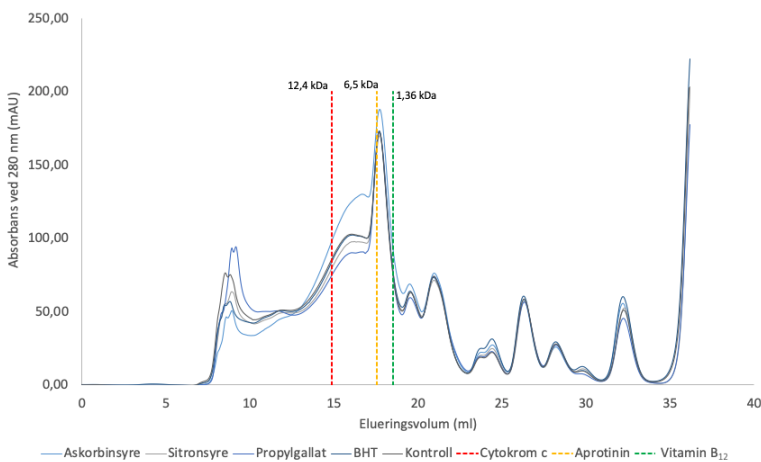
Kromatogrammene til hydrolysatenes etter 4 (figur 3.21) og 6 måneders lagring (figur 3.22) var relativt like kromatogrammet ved 2 måneders lagring (figur 3.20). De høyeste toppene til alle hydrolysatenes lå mellom aprotinin (~ 6,5 kDa) og vitamin B₁₂ (~ 1,36 kDa), men noe nærmere aprotinin. Toppen til PH tilsatt askorbinsyre var noe bredere sammenlignet med de andre hydrolysatenes. Dette kan skyldes kjedebrudd eller oksidasjon. For å kunne trekke en sikker konklusjon må dette undersøkes nærmere.

Proteinhydrolysatenes fra laksehoder kan ha bioaktive egenskaper, siden de inneholder peptider med molekylvekt < 6 kDa (Sun et al., 2004). Jo et al. (2008) rapporterte om peptider

($M_w = 3344$ Da) fra marine pølseormer (*Urechis unicinctus*) som viste antitrombotisk aktivitet, mens Qian et al. (2007) isolerte ACE-inhiberende peptider fra PH av storøyd tunfisk-muskel (*Thunnus obesus*) med molekylvekt lik 1581 Da. I studien til Ahn et al. (2012) ble det funnet peptider fra restråstoff (brystfinne) fra laks med molekylvekt i området 1-2 kDa som viste høy antioksidativ aktivitet. I det videre arbeidet kan bioaktiviteten til proteinhydrolysatene undersøkes, siden det i dag er knyttet stor interesse rundt helsefordelene til bioaktive peptider avledet fra marine kilder (Zamora-Sillero et al., 2018).



Figur 3.21: Kromatogrammet for PH ved lagringstid 4 måneder. De stiplede linjene indikerer molekylvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.



Figur 3.22: Kromatogrammet for PH ved lagringstid 6 måneder. De stiplede linjene indikerer molekylvekten til cytokrom c, aprotinin og vitamin B₁₂.

3.9 Fargeendring ved lagring

Tabell 3.7 viser fargeendringen til hydrolysatene basert på CIE-systemet. Hydrolysatene er visuelt fremstilt i figur 3.23. Alle hydrolysatene var relativt gule ved ingen lagringstid, og ble signifikant ($p < 0,05$) gulere etter seks måneder. PH tilsatt askorbinsyre var det mørkeste ($L^* = 80,79 \pm 0,15$), røde (ste ($a^* = 6,54 \pm 0,06$) og guleste ($b^* = 25,02 \pm 0,13$) hydrolysatet etter seks måneder. Farge er en viktig kvalitetsparameter som kan påvirke forbrukernes valg (Bueno-Solano et al., 2009). FPH med mørkere farge kan fremstå som mindre attraktiv for forbrukerne (Kristinsson & Rasco, 2000).

PH tilsatt askorbinsyre ble signifikant ($p < 0,05$) mørkere fra 0 til 4 måneder, mens det ikke ble observert noen endring fra 4 til 6 måneder. Den mørke fargen kan skyldes oksidasjon av myoglobin i råstoffet (Benjakul & Morrissey, 1997). Askorbinsyre kan fungere som en prooksidant, og oksidere oksymyoglobin til metmyoglobin (Giulvi & Cadenas, 1993), som har en karakteristisk brunfarge (Coulter, 2016). PH tilsatt askorbinsyre ble signifikant ($p < 0,05$) rødere ved økende lagringstid sammenlignet med de andre hydrolysatene. Dette kan også observeres i figur 3.23.

Tabell 3.7: Fargen til hydrolysatene ved økende lagringstid. P: parameter, AO: antioksidant, AA: askorbinsyre, CA: sitronsyre, PG: propylgallat, K: kontroll. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell ($p < 0,05$).

P	AO	Lagringstid (md.)				
		0	1	2	4	6
L*	AA	87,40 ± 0,15 ^d	84,7 ± 0,5 ^c	81,5 ± 0,2 ^b	80,3 ± 0,2 ^a	80,79 ± 0,15 ^a
	CA	84,90 ± 0,08 ^e	82,69 ± 0,11 ^c	82,01 ± 0,07 ^b	80,2 ± 0,3 ^a	83,4 ± 0,3 ^d
	PG	87,08 ± 0,11 ^a	87,0 ± 0,3 ^a	86,8 ± 0,3 ^a	87,7 ± 0,4 ^a	86,9 ± 0,3 ^a
	BHT	87,8 ± 0,3 ^b	86,5 ± 0,4 ^a	87,0 ± 0,3 ^{a,b}	87,41 ± 0,13 ^b	87,4 ± 0,2 ^b
	K	87,2 ± 0,3 ^c	85,5 ± 0,5 ^b	84,2 ± 0,2 ^a	84,9 ± 0,4 ^{a,b}	84,49 ± 0,03 ^a
a*	AA	0,25 ± 0,05 ^a	3,08 ± 0,10 ^b	6,32 ± 0,03 ^c	6,4 ± 0,2 ^{c,d}	6,54 ± 0,06 ^d
	CA	0,19 ± 0,08 ^{b,c}	0,12 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,01 ^c	0,40 ± 0,02 ^d	-0,25 ± 0,12 ^a
	PG	0,73 ± 0,05 ^c	0,59 ± 0,07 ^{b,c}	0,43 ± 0,04 ^{a,b}	0,29 ± 0,10 ^a	0,36 ± 0,04 ^a
	BHT	-0,57 ± 0,05 ^a	-0,59 ± 0,12 ^a	-0,63 ± 0,13 ^a	-0,69 ± 0,08 ^a	-0,5 ± 0,3 ^a
	K	-0,79 ± 0,05 ^a	-0,6 ± 0,2 ^{a,b,c}	-0,35 ± 0,02 ^{b,d}	-0,48 ± 0,08 ^b	-0,23 ± 0,06 ^{c,d}
b*	AA	16,0 ± 0,4 ^a	18,8 ± 0,8 ^b	22,1 ± 0,3 ^c	23,1 ± 0,2 ^d	25,02 ± 0,13 ^e
	CA	14,9 ± 0,2 ^a	17,2 ± 0,3 ^b	19,0 ± 0,3 ^c	19,25 ± 0,11 ^c	22,8 ± 0,5 ^d
	PG	12,6 ± 0,2 ^a	12,8 ± 0,2 ^a	12,8 ± 0,3 ^a	13,3 ± 0,3 ^{a,b}	14,0 ± 0,3 ^b
	BHT	15,7 ± 0,2 ^a	17,7 ± 0,2 ^b	18,2 ± 0,4 ^b	19,3 ± 0,1 ^c	19,4 ± 0,4 ^c
	K	16,9 ± 0,2 ^a	19,6 ± 0,3 ^b	19,9 ± 0,3 ^b	22,0 ± 0,3 ^d	21,1 ± 0,3 ^c

L*- og a*- verdien til PH tilsatt sitronsyre endret seg relativt lite ved økende lagringstid. Derimot ble hydrolysatet signifikant ($p < 0,05$) gulere fra 0 til 2 måneder, før b*-verdien igjen økte signifikant ($p < 0,05$) fra 4 til 6 måneder. Det er kjent at lipidoksidasjon kan påvirke gul misfarging. Dette skjer ved at karbonylgrupper dannet ved lipidoksidasjon kan reagere med aminogrupeer i Maillard-reaksjonen (Yarnpakdee et al., 2014). Hemoglobin og myoglobin fra blodet i laksehodene kan også føre til en sterkere gulfarge (Taheri et al., 2013). Resultatene fra tabell 3.7 er i samsvar med Hoyle & Merritt (1994), Klompong et

al. (2012) og Thiansilakul et al. (2007), som rapporterte om FPH med gulere farge ved økende lagringstid.

Tabell 3.7 viser at propylgallat var den antioksidanten som bevarte fargen best. Etter seks måneder fremsto PH tilsatt propylgallat som tilnærmet uendret (figur 3.23). L^* -verdien endret seg ikke signifikant ($p > 0,05$) med økende lagringstid, mens b^* -verdien økte relativt lite sammenlignet med de andre hydrolysatene. Hydrolysater med lys farge har høy aksept (Yarnpakdee et al., 2015), og kan derfor anvendes som en ingrediens i hvite produkter, som f.eks. fiskeboller.

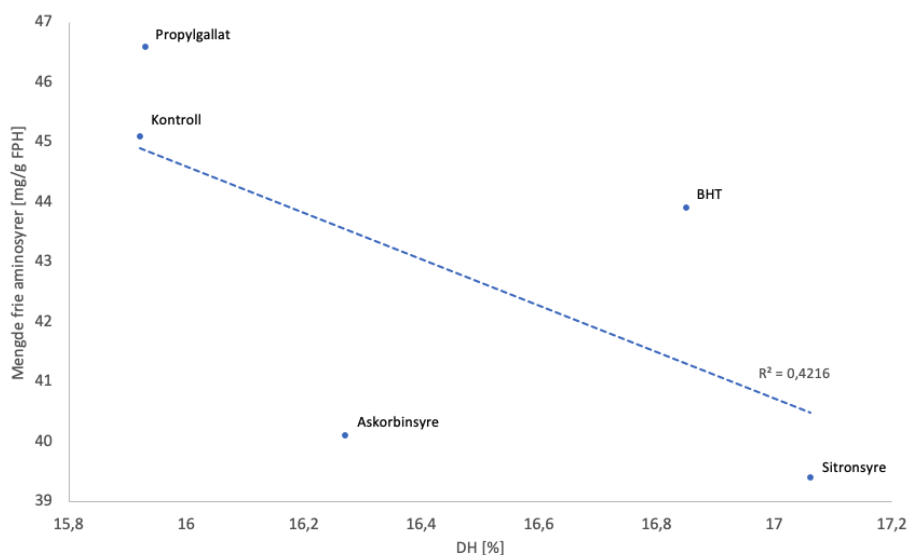
PH tilsatt BHT, som var det lyseste hydrolysatet ($L^* = 87,4 \pm 0,2$), endret ikke L^* - og a^* -verdi fra 0 til 6 måneder. I studien til Kendler (2019) ble det funnet at PH tilsatt BHT var lysere enn både PH uten antioksidant og PH produsert av oksiderte hoder av regnbueørret. I denne studien var kontrollprøven mørkere og gulere enn med PH tilsatt BHT og PH tilsatt propylgallat.



Figur 3.23: Visuell fremstilling av hydrolysatene ved økende lagringstid.

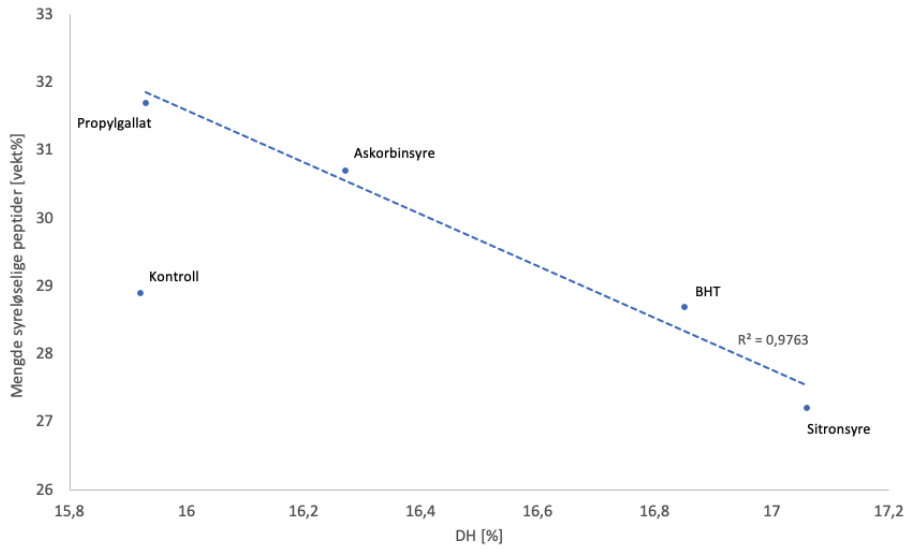
3.10 Korrelasjon

Figur 3.24 viser sammenhengen mellom hydrolysegrad og mengde frie aminosyrer i hydrolysatene med ingen lagringstid (0 md.). Ifølge Adler-Nissen (1986) vil en høyere hydrolysegrad indikere flere brutte peptidbindinger, noe som igjen gir flere frie aminosyrer. Figuren viser derimot en negativ korrelasjon og en svak sammenheng mellom hydrolysegrad og mengde frie aminosyrer (Pearsons korrelasjonskoeffisient, $r = -0,649$). Dette betyr at en høyere DH førte til en lavere mengde frie aminosyrer i hydrolysatene. I tillegg ble det funnet at en høyere hydrolysegrad resulterte i en lavere mengde vannløselige proteiner ($r = -0,793$ for 1:100-fortynningen med ingen lagringstid). Denne figuren er gitt i vedlegg I. For å trekke sikre konklusjoner må det analyseres flere prøver over et større intervall for hydrolysegrad.



Figur 3.24: Sammenheng mellom DH og mengde frie aminosyrer i hydrolysatene (0 md.).

Figur 3.25 viser en sterk, negativ korrelasjon ($r = -0,988$) mellom hydrolysegrad og mengde syreløselige peptider i PH tilsatt antioksidanter med ingen lagringstid (0 md.). Kontrollprøven korrelerte ikke med de andre hydrolysatene, og ble derfor ikke tatt med i beregningene. Trendlinjen indikerer at en høyere hydrolysegrad førte til en lavere mengde syreløselige peptider. Imidlertid ville det vært naturlig å anta at en høy hydrolysegrad ville føre til flere syreløselige peptider. En mulig forklaring er at tilsats av antioksidanter kan påvirke hvordan proteinene brytes ned, og dermed gi større peptider som ikke er løselige i 10% TCA. På den annen side er grafene for PH tilsatt sitronsyre, propylgallat og BHT tilnærmet like grafen for kontrollprøven (figur 3.18), noe som indikerer at hydrolysatene består av peptider med omtrent samme molekylvekt. Med bare fire punkter er det derfor vanskelig å trekke en sikker konklusjon.



Figur 3.25: Sammenheng mellom DH og konsentrasjon av syreløselige peptider i hydrolysatene tilsatt antioksidanter (0 md.).

Kapittel 4

Konklusjon

Målet med masteroppgaven var å undersøke hvordan tilsats av ulike antioksidanter påvirker fiskeproteinhydrolysater ved lagring i romtemperatur. Dette ble gjort ved å analysere hydrolysegrad, mengde vannløselige proteiner og syreløselige peptider, aminosyresammensetning, oksidasjonsnivå, molekylvektsfordeling og farge ved ulike lagringstider. Hvis proteinhydrolysater skal tilsettes som ingrediens i mat er det viktig at de opprettholder sine kjemiske og sensoriske egenskaper, og ikke påvirker produktet de tilsettes i.

Proteinhydrolysaten hadde et relativt høyt innhold av vannløselige proteiner (ca. 65 vekt%), noe som er ønskelig siden de lett tas opp i kroppen. Dette gjør også at proteinhydrolysaten blir enklere å blande inn i produkter, som f.eks. supper og sauser. Mengde vannløselige proteiner endret seg relativt lite ved økende lagringstid, samtidig som tilsats av antioksidanter påvirket hydrolysaten i liten grad.

Både hydrolysaten tilsatt antioksidanter og kontrollprøven inneholdt de essensielle aminosyrene Ile, Leu, Lys, Thr og Val i en slik mengde at det kan regnes som et fullverdig protein. Aminosyren Met ble funnet i liten grad, noe som indikerer oksidasjon til metionin sulfoksid. Tap av Tyr i alle hydrolysaten, bortsett fra i PH tilsatt askorbinsyre, indikerer oksidasjon. Nitrogeninnholdet, hydrolysegraden og sammensetningen av frie og totale aminosyrer ble i liten grad påvirket av lagring og tilsats av antioksidanter.

Hydrolysegraden var tilnærmet lik for alle hydrolysaten (ca. 16%), og økte med ca. 0,5% fra 0 til 6 måneders lagringstid. Det var en negativ korrelasjon mellom hydrolysegrad og løselige proteiner, syreløselige peptider og frie aminosyrer. Dette indikerer at en høyere hydrolysegrad resulterte i en lavere mengde vannløselige proteiner, syreløselige peptider og frie aminosyrer. Det kan skyldes aggregering ved lagring. Molekylvektsfordelingen for PH tilsatt askorbinsyre, som viste en høyere konsentrasjon av peptider med større molekylvekt ved økt lagringstid, styrker denne antagelsen.

Reduksjon i innhold av tioler ved økende lagringstid i PH tilsatt askorbinsyre, sitronsyre, BHT og kontrollprøven, indikerte oksidasjon av Cys og dannelse av disulfidbindinger. Oksiderte proteinhydrolysater kan selv indusere oksidasjon i matvarer de tilsettes i, noe som kan resultere i uønsket smak og lukt. Tiolinnholdet i PH tilsatt propylgallat var relativt stabilt, og propylgallat var dermed den antioksidanten som beskyttet best mot oksidasjon av Cys.

Propylgallat beskyttet også best mot misfarging. Etter seks måneders lagring fremsto PH tilsatt propylgallat som tilnærmet uendret. Farge er en viktig kvalitetsparameter, og FPH med mørkere farge kan oppfattes som mindre attraktiv blant forbrukerne. PH tilsatt propylgallat hadde også høyest innhold av nitrogen, samt et relativt lavt innhold av frie aminosyrer. Dette gjør at de tas lett opp i kroppen, noe som er ønskelig hvis hydrolysatene skal brukes i sportsernæring. Totalt sett kan det konkluderes med at propylgallat var antioksidanten som bevarte hydrolysatene best under lagring.

Kapittel 5

Videre arbeid

I denne studien ble det vist at PH tilsatt propylgallat hadde et relativt høyt innhold av vannløselige proteiner og nitrogen, i tillegg til at antioksidanten beskyttet best mot misfarging og oksidasjon av Cys. Hydrolysater fra laksehoder kan derfor fungere som en ingrediens i matindustrien. Dette vil bidra til å øke andelen restråstoff til humant konsum. I det videre arbeidet bør derfor følgende egenskaper undersøkes:

- Fiskeproteinhydrolysater smaker ofte bittert, noe som er en av grunnene til at de er lite utbredt i matindustrien. Hydrolysegraden til PH tilsatt propylgallat var ca. 16%, mens størrelsen på peptidene lå i området 1 - 6 kDa. Det ville derfor vært naturlig å anta at de smakte bittert. I det videre arbeidet kan det undersøkes hvilke reaksjonsbetingelser som gir lavere hydrolysegrad, samt hvilke teknikker som forhindrer bitter smak (f.eks. bruk av eksopeptidaser, kapselteknologi eller Maillard-reaksjon).
- PH tilsatt propylgallat hadde et stabilt innhold av tioler ved økende lagringstid. Ved å reagere hydrolysatet med DNP, og deretter måle bundet DNP kolorimetrisk, kan det undersøkes om dette hydrolysatet også har et lavt innhold av karbonylgrupper.
- PH tilsatt propylgallat hadde en høy konsentrasjon av peptider med lavere molekylvekt enn 6 kDa. Det er derfor rimelig å anta at hydrolysatene har høy bioaktivitet. Videre studier bør derfor undersøke hydrolysatets antihypertensive, antitrombotiske, immunmodulerende og antioksidative egenskaper.
- Det er et økende behov for proteinhydrolysater med funksjonelle egenskaper i matindustrien. I det videre arbeidet kan derfor løselighet, emulgeringsegenskaper og oljebindingsevne til PH tilsatt propylgallat bestemmes.

Bibliografi

- Abdelhedi, O., Jridi, M., Jemil, I., Mora, L., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Boualga, A., Nasri, M. & Nasri, R., 2016. Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Research International* 86, 9–23. doi:10.1016/j.foodres.2016.05.013.
- Adler-Nissen, J., 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem.* 24 (6), 1090–1093. doi:10.1021/jf60208a021.
- Adler-Nissen, J., 1984. Control of the Proteolytic Reaction and of the Level of Bitterness in Protein Hydrolysis Processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34 (3), 215–222. doi:10.1002/jctb.280340311.
- Adler-Nissen, J., 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins.* Elsevier Applied Science. London, England.
- Aeschbach, R., Amadoò, R. & Neukom, H., 1976. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 439 (2), 292–301. doi:10.1016/0005-2795(76)90064-7.
- Agyei, D., Pan, S., Acquah, C., Bekhit, A. E. A. & Danquah, M.K., 2019. Structure-informed detection and quantification of peptides in food and biological fluids. *J Food Biochem.* 43 (1), e12482. doi:10.1111/jfbc.12482.
- Ahn, C.B., Je, J. Y. & Cho, Y.S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International* 49 (1), 92–98. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.002.
- Akpambang, V., 2015. Proximate composition of some tropical fish species. *Der Chimica Sinica* 6, 125–129.
- Al-Karbawi, Z., 2019. ACE-hemmere. <https://sml.snl.no/ACE-hemmere>. (Hentet: 19.3.2020).

-
- Almajidi, M. & Algubury, H., 2016. Determination of Vitamin C (ascorbic acid) Contents in various fruit and vegetable by UV-spectrophotometry and titration methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 9, 2972–2974.
- Animaliebiproduktforskriften, 2016. Forskrift om animalske biprodukter som ikke er beregnet på konsum (FOR-2016-09-14-1064). https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-09-14-1064/*#*.
- AOAC, 2000. *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemist International. (Ikke sett, referert fra He et al., 2011).
- Asfour, A., 2018. Fish protein powders - characterisation of composition and properties (Masteroppgave). NTNU, Trondheim.
- Aspevik, T., 2016. Fish protein hydrolysates based on Atlantic salmon by-products - Enzyme cost-efficiency and characterization of sensory, surface-active and nutritional properties (Doktoravhandling). Universitetet i Bergen, Bergen.
- Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S.B., Altintzoglou, T., Wubshet, S.G., Gildberg, A., Afseth, N.K., Whitaker, R. D. & Lindberg, D., 2017. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. *Topics in Current Chemistry* 375 (3), 53. doi:10.1007/s41061-017-0143-6.
- Barbosa, N.B.V., Lissner, L.A., Klimaczewski, C.V., Colpo, E. & Rocha, J.B.T., 2012. Ascorbic acid oxidation of thiol groups from dithiotreitol is mediated by its conversion to dehydroascorbic acid. *EXCLI J.* 11, 604–612.
- Baron, C. P. & Kjærsgård, I.V.H., 2007. Determination of free thiol groups R-SH. Protein Oxidation Training Workshop, Danish Institute for Fisheries Research, Lyngby, Danmark.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M. & Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry* 45 (1), 18–24. doi:10.1016/j.procbio.2009.07.019.
- Bechtel, P.J., 2003. Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *Journal of Food Processing Preservation* 27 (2), 101–116. doi:10.1111/j.1745-4549.2003.tb00505.x.
- Bekkevold, S. & Olafsen, T., 2007. Råvarer med muligheter. RUBIN AS. Trondheim.
- Belghit, I., Liland, N.S., Waagbø, R., Biancarosa, I., Pelusio, N., Li, Y., Krogdahl, Å. & Lock, E.J., 2018. Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 491, 72–81. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.016.
- Benjakul, S. & Morrissey, M.T., 1997. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45 (9), 3423–3430. doi:10.1021/jf970294g.

-
- Bezerra, T., Estévez, M., Lacerda, J.T., Dias, M., Juliano, M., Mendes, M.A., Morgano, M., Pacheco, M. T. & Madruga, M., 2020. Chicken Combs and Wattles as Sources of Bioactive Peptides: Optimization of Hydrolysis, Identification by LC-ESI-MS2 and Bioactivity Assessment. *Molecules* 25, 1698. doi:10.3390/molecules25071698.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. & Lalitha, R.G., 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysates using a commercial protease. *Bioresource Technology* 99 (2), 335–343. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.015.
- Blackburn, S., 1978. Amino Acid Determination: Methods and Techniques. Marcel Dekker (2. utg.), 7–37. New York.
- Bligh, E. G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem.* 37, 911–917.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. & Nasri, M., 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118 (3), 559–565. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.021.
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O.N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N. P. & Sánchez-Machado, D.I., 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry* 112 (3), 671–675. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.029.
- Buettner, G.R., 1993. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300 (2), 535–543. doi:10.1006/abbi.1993.1074.
- Bærekraft i havbruk, 2018. Fôrsammensetning og opprinnelse. <https://www.barentswatch.no/havbruk/forsammensetning-og-opprinnelse>. (Hentet: 24.5.2020).
- Bærekraft i havbruk, 2020. Utnyttelse av restråstoff. <https://www.barentswatch.no/havbruk/utnyttelse-av-restrastoff>. (Hentet: 6.5.2020).
- Büchi Switzerland, 2013. Application Note No. 114/2013 - Nitrogen & protein determination in meat products.
- Celus, I., Brijs, K. & Delcour, J.A., 2007. Enzymatic Hydrolysis of Brewers' Spent Grain Proteins and Technofunctional Properties of the Resulting Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 55 (21), 8703–8710. doi:10.1021/jf071793c.
- Chakrabarti, S., Guha, S. & Majumder, K., 2018. Structure-informed detection and quantification of peptides in food and biological fluids. *Nutrients* 10 (11), 1738. doi:10.3390/nu10111738.
-

-
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. & Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry* 135 (4), 3020–3038. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
- Chalamaiah, M., Yu, W. & Wu, J., 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry* 245, 205–222. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.087.
- Chalé, F.H., Ruiz Ruiz, J.C., Ancona, D.B., Fernández, J. J. A. & Campos, M.R.S., 2016. The hypolipidemic effect and antithrombotic activity of *Mucuna pruriens* protein hydrolysates. *Food & Function* 7, 434–444. doi:10.1039/C5FO01012H.
- Cheung, I. W. & Li-Chan, E.C., 2014. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products. *Food Chemistry* 145 (2), 1076–1085. (Ikke sett, referert fra Idowu & Benjakul, 2019).
- Cheung, L.K., Aluko, R.E., Cliff, M. A. & Li-Chan, E.C., 2015. Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 13, 262–275. (Ikke sett, referert fra Fu et al., 2019).
- Choe, E. & Min, D.B., 2005. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Food. *Journal of Food Science* 70, R142–R159. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb08329.x.
- Choe, E. & Min, D.B., 2006. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 169–186. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x.
- Choe, E. & Min, D.B., 2009. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (4), 345–358. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x.
- Clemente, A., 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 11, 254–262. (Ikke sett, referert fra Fu et al., 2019).
- Cold Spring Harbor Protocols, 2006. Recipe - sodium phosphate. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8303.full>. doi:10.1101/pdb.rec8303.
- Coulter, T., 2016. *Food – The Chemistry of its Components*. The Royal Society of Chemistry (6. utg.). Cambridge.
- Dauksas, E., Slizyte, R., Rustad, T. & Storrø, I., 2004. Bitterness in fish protein hydrolysates and methods for removal. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13 (2), 101–114. doi:10.1300/J030v13n02_09.
- Decker, E.A., 1998. *Antioxidant Mechanisms. I: Food Lipids* (Akoh, C. C. & Min, D. B. (red.)). Marcel Dekker Inc. (2. utg.). New York, s. 517–542.

-
- Decker, E. A. & Hultin, H.O., 1992. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. I: Lipid Oxidation in Foods (Angelo, A. J. St. (red.)). ACS Symposium Series 500, American Chemical Society, Washington, DC, s. 33. (Ikke sett, referert fra Decker, 1998).
- Demetriades, K., Coupland, J. N. & McClements, D.J., 1997. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J. Food Sci.* 62 (2), 342. (Ikke sett, referert fra Kristinsson & Rasco, 2000).
- Dong, Y., Sheng, G., Fu, J. & Wen, K., 2005. Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. *J. Sci. Food Agric* 85, 2033–2039. doi:10.1002/jsfa.2219.
- Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdígón, G. & Matar, C., 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* 211 (5), 341–350. doi:10.1016/j.imbio.2005.12.002.
- Duarte, T. L. & Lunec, J., 2005. ReviewPart of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene ExpressionReview: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research* 39 (7), 671–686. doi:10.1080/10715760500104025.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70.
- Enzo, 2020. Protein carbonyl ELISA kit. <https://www.enzolifesciences.com/ALX-850-312/protein-carbonyl-elisa-kit/>. (Hentet: 9.4.2020).
- European Pharmacopoeia 5.0, 2005. Amino acid analysis. <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=526583ecd3df3e1d16cc0bf7&assetKey=AS%3A272155265175554%401441898279550>. (Hentet: 15.4.2020).
- Fairclough, P.D., Hegarty, J.E., Silk, D. B. & Clark, M.L., 1980. Comparison of the absorption of two protein hydrolysates and their effects on water and electrolyte movements in the human jejunum. *Gut* 21 (10), 829–834. doi:10.1136/gut.21.10.829.
- FAO/WHO, 1991. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation. Bethesda, Md., USA, 4 -8 December 1989. Roma: FAO.
- FAO/WHO, 2019. Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fisher Scientific, 2020. Chemicals. <https://www.fishersci.com/us/en/products/IC6JWG15/chemicals.html>. (Hentet: 16.5.2020).
- Franco, D., Munekata, P.E.S., Agregán, R., Bermúdez, R., López-Pedrouso, M., Pateiro, M. & Lorenzo, J.M., 2020. Application of Pulsed Electric Fields for Obtaining Antioxidant Extracts from Fish Residues. *Antioxidants* 9 (2), 90. doi:10.3390/antiox9020090.
-

-
- Frankel, E.N., 1980. Lipid Oxidation. *Prog. Lipid. Res.* 19, 1–22.
- Friedman, M. & Finley, J.W., 1971. Methods of Tryptophan Analysis. *J. Agr. Food Chem.* 19 (4), 626–631.
- Friedman, M., 1996. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 44, 6–29. doi:10.1021/jf9400167.
- Fu, X.J., Wang, Z. & Xu, S., 2009. Kinetics of lipid oxidation and off-odor formation in silver carp mince: The effect of lipoxygenase and hemoglobin. *Food Research International* 42, 85–90. doi:10.1016/j.foodres.2008.09.004.
- Fu, Y., Chen, J., Bak, K. H. & Lametsch, R., 2019. Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review. *Int J Food Sci Technol.* 54, 978–986. doi:10.1111/ijfs.14037.
- Fuchs, F. D. & Whelton, P.K., 2020. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension* 75 (2), 285–292. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240.
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot Y. & Turgeon, S., 1993. Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins. *Journal of Dairy Science* 76 (1), 321–328. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77353-1.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. & Parmentier, M., 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *Journal of Food Science* 69 (8), C615–C622. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x.
- GE Healthcare, 2010. Gel filtration - Principles and Methods.
- Gegotek, A., Bielawska, K., Biernacki, M., Zareba, I., Surazynski, A. & Skrzydlewska, E., 2017. Comparison of protective effect of ascorbic acid on redox and endocannabinoid systems interactions in in vitro cultured human skin fibroblasts exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Arch Dermatol Res.* 309 (4), 285–303. doi:10.1007/s00403-017-1729-0.
- Ghaly, A.E., Ramakrishnan, V.V., Brooks, M.S., Budge, S. M. & Dave, D., 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 5 (4), 107–129. doi:10.4172/1948-5948.1000110.
- Gildberg, A., 1993. Enzymic Processing of Marine Raw Materials. *Process Biochemistry* 28 (1), 1–15. doi:10.1016/0032-9592(94)80030-8.
- Giulvi, C. & Cadenas, E., 1993. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *FEBS Letters* 332 (3), 287–290. doi:10.1016/0014-5793(93)80651-A.
- Gjermstad, R.S., 2019. Hydrolysater av restråstoff fra laks (*Salmo salar*) - effekten av antioksidanter på kvaliteten under lagring (Prosjektoppgave). NTNU, Trondheim.

-
- Goddard, J.M., McClements, J., Decker, E.A., 2012. Innovative technologies in the control of lipid oxidation. *Lipid Technology* 24 (12), 275–277. doi:10.1002/lite.201200242.
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P. & Guadix, E.M., 1994. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: II. Molecular-Weight Range. *Biotechnology and Bioengineering* 44 (4), 529–532. doi:10.1002/bit.260440416.
- Graf E. & Eaton, J.W., 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 8 (1), 61–69. doi:10.1016/0891-5849(90)90146-A.
- Greenberg, N. A. & Shipe, W.F., 1979. Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. *Journal of Food Science* 44, 735–737. doi:10.1111/j.1365-2621.1979.tb08487.x.
- Guerard, F., 2007. Enzymatic methods for marine by-products recovery. I: Maximising the Value of Marine By-Products (Shahidi, F. (red.)). Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, s. 107-143.
- Gunlu, A. & Gunlu, N., 2014. Taste activity value, free amino acid content and proximate composition of Mountain trout (*Salmo trutta macrostigma* Dumeril, 1858) muscles. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 13 (1), 58–72.
- Gupta, R.K., Chang, A.E., Griffin, P., Rivera, R., Guo, Y. Y. & Siber, G.R., 1997. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. *Vaccine* 15 (6-7), 672–678. (Ikke sett, referert fra Ghaly et al., 2013).
- Halim, N.R.A., Yusof, H. M. & Sarbon, N.M., 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology* 51, 24–33. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.007.
- Halldorsdottir, S.M., Kristinsson, H.G., Sveinsdottir, H., Thorkelsson, G. & Hamaguchi, P.Y., 2013. The effect of natural antioxidants on haemoglobin-mediated lipid oxidation during enzymatic hydrolysis of cod protein. *Food Chemistry* 141 (2), 914–919. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.101.
- Halldorsdottir, S.M., Sveinsdottir, H., Freysdottir & Kristinsson, H.G., 2014. Oxidative processes during enzymatic hydrolysis of cod protein and their influence on antioxidant and immunomodulating ability. *Food Chemistry* 142, 201–209. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.053.
- He, S., Franco, C. & Zhang, W., 2011. Characterisation of processing wastes of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) harvested in Australia. *International Journal of Food Science and Technology* 46 (9), 1898–1904. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02699.x.
- He, S., Franco, C. & Zhang, W., 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International* 50 (1), 289–297. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.031.
-

-
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S. & Dalsgaard, T.K., 2019. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquaculture Research* 50 (5), 1393–1403. doi:10.1111/are.14012.
- Hong, P.K., Ndagijimana, M., Betti, M., 2016. Glucosamine-induced glycation of hydrolysed meat proteins in the presence or absence of transglutaminase: Chemical modifications and taste-enhancing activity. *Food Chemistry* 197 (B), 1143–1152. (Ikke sett, referert fra Fu et al., 2019).
- Hoyle, N. T. & Merritt, J.H., 1994. Quality of fish protein hydrolystes from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59 (1), 76–79. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x.
- Hultin, H., 1994. Oxidation of lipids in seafood. I Seafoods, chemistry, processing, technology and quality. (Shahidi, F. & Botta, J. (red.)) , 49–74, Blackie Academic and Professional, London. (Ikke sett, referert fra Halldorsdottir et al., 2014).
- Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sookchoo, P. & Kishimura, H., 2019. Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity. *Journal of Food Biochemistry* 43 (2). doi:10.1111/jfbc.12734.
- Idowu, A. T. & Benjakul, S., 2019. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects. *Journal of Food Chemistry* 43 (9), e12978. doi:10.1111/jfbc.12978.
- Jensen, I.J., Larsen, R., Rustad, T. & Eilertsen, K.E., 2013. Nutritional content and bioactive properties of wild and farmed cod (*Gadus morhua L.*) subjected to food preparation. *Journal of Food Composition and Analysis* 31 (2), 212–216. doi:10.1016/j.jfca.2013.05.013.
- Jo, H.Y., Jung, W. K. & Kim, S.K., 2008. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. *Process Biochemistry* 43 (2), 179–184. doi:10.1016/j.procbio.2007.11.011.
- Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W. K. & Kim, S.K., 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research Technology* 219, 20–26. doi:10.1007/s00217-004-0882-9.
- Jung, W. K. & Kim, S.K., 2009. Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chemistry* 117 (4), 687–692. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.077.
- Kanner, J., 1992. Mechanism of nonenzymic lipid peroxidation in muscle foods. I: Lipid Oxidation in Foods (Angelo, A. J. St. (red.)). ACS Symposium Series 500, American Chemical Society, Washington, DC. (Ikke sett, referert fra Decker, 1998).
- Kanner, J. & Harel, S., 1985. Initiation of membranial lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 237, 314–321. (Ikke sett, referert fra Yarnpakdee et al., 2014).
-

-
- Kendler, S., 2019. Effect of oxidised rest raw materials on the quality of fish protein hydrolysates (Masteroppgave). NTNU, Trondheim.
- Khantaphant, S., Benjakul, S. & Ghomi, M.R., 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *LWT - Food Science and Technology* 44, 1139–1148. doi:10.1016/j.lwt.2010.10.009.
- Khiari, Z., Rico, D., Martin-Diana, A. B. & Barry-Ryan, C., 2014. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates. *J Sci Food Agric* 94, 1663–1671. doi:10.1002/jsfa.6476.
- Kim, S.-K. & Mendis, E., 2006. Bioactive compounds from marine processing by-products – A review. *Food Research International* 39 (4), 383–393. doi:10.1016/j.foodres.2005.10.010.
- Kim, H. O. & Li-Chan, E.C.Y., 2006. Quantitative Structure - Activity Relationship Study of Bitter Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (26), 10102–10111. doi:10.1021/jf062422j.
- Kim, S.-K. & Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods* 2 (1), 1–9. doi:10.1016/j.jff.2010.01.003.
- Kjeldsen, S.E., 2018. Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacological Research* 129, 95–99. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.003.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry* 102 (4), 1317–1327. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.016.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F., 2012. Storage Stability of Protein Hydrolysate from Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *International Journal of Food Properties* 15 (5), 1042–1053. doi:10.1080/10942912.2010.513025.
- Kodera, T., Hara, H., Nishimori, Y. & Nio, N., 2006. Amino Acid Absorption in Portal Blood After Duodenal Infusions of a Soy Protein Hydrolysate Prepared by a Novel Soybean Protease D3. *Journal of Food Science* 71 (7), S517–S525. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00118.x.
- Korczyk, K., Tkaczewska, J., Migdal, W., 2018. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates in fish products – a review. *Czech J. Food Sci.* 36, 195–207. doi:10.17221/283/2017-CJFS.
- Kristinova, V., Mozuraityte, R., Storrø, I. & Rustad, T., 2009. Antioxidant Activity of Phenolic Acids in Lipid Oxidation Catalyzed by Different Prooxidants. *J. Agric. Food Chem* 57, 10377–10385. doi:10.1021/jf901072t.
-

-
- Kristinsson, H. G. & Rasco, B.A., 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (1), 43–81. doi:10.1080/10408690091189266.
- Kristinsson, H.G., 2007. Aquatic food protein hydrolysates. I: Maximising the Value of Marine By-Products (Shahidi, F. (red.)). Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, s. 229-248.
- Labuza, T.P., 1982. Shelf-life Dating of Foods. Food & Nutrition Press. Westport, CT, USA. (Ikke sett, referert fra Rao et al., 2016).
- Lahl, W. J. & Braun, S.D., 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48, 68–71. (Ikke sett, referert fra Kim & Wijesekara, 2010).
- Lalasis, G., Bostrøm, S. & Sjøberg, L.B., 1978. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive value. *J. Agric. Food Chem* 26 (3), 751–756. doi:10.1021/jf60217a045.
- Lee, C.M., 2007. Seafood flavor from processing by-products. I: Maximising the Value of Marine By-Products (Shahidi, F. (red.)). Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, s. 304-327.
- Levi, G., Morisi, G., Coletti, A. & Catanzaro, R., 1974. Free amino acids in fish brain: Normal levels and changes upon exposure to high ammonia concentrations *in vivo*, and upon incubation of brain slices. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 49 (4), 623–636. doi:10.1016/0300-9629(74)90890-1.
- Li, W., Liu, Y., Jiang, W. & Yan, X., 2019. Proximate Composition and Nutritional Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Heads and Skipjack tuna (*Katsuwonus Pelamis*) Heads. *Molecules* (Basel, Sveits) 24 (17), 3189. doi:10.3390/molecules24173189.
- Li, Z., Paulson, A. T. & Gill, T.A., 2015. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods* 19 (A), 733–743. doi:10.1016/j.jfff.2015.09.058.
- Liaset, B., Lied, E. & Espe, M., 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (5), 581–589. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<581::AID-JSFA578>3.0.CO;2-I.
- Lin, T.M., Durance, T. D. & Scaman, C.H., 1998. Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. *Food Research International* 31 (2), 111–117. doi:10.1016/S0963-9969(98)00070-2.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M. & Phan-Tan-Luu, R., 1995. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *Food Science* 60 (5), 949–952. doi:10.1111/j.1365-2621.1995.tb06268.x.

-
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G. H. & Zhang, W.G., 2016. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants (Basel)* 5 (3), 32. doi:10.3390/antiox5030032.
- Loftsson, T., 2014. Degradation pathways. Kapittel 3 i *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, 63–104. doi:10.1016/B978-0-12-411548-4.00003-9. Academic Press, San Diego, USA.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. & Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C. P. & Estévez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 83–95. doi:10.1002/mnfr.201000453.
- Mackie, I.M., 1982. General review of fish protein hydrolysates. *Animal Feed Science and Technology* 7 (2), 113–124. doi:10.1016/0377-8401(82)90045-1.
- Manninen, A.H., 2009. Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism* 6, 38. doi:10.1186/1743-7075-6-38.
- Mariotti, F., Tomé, D. & Mirand, P.P., 2008. Converting Nitrogen into Protein— Beyond 6.25 and Jones’ Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 177–184. doi:10.1080/10408390701279749.
- Mashima, Y., Horibe, K., Oshiba, I & Yamasaki, K., 1984. Studies on the absorption of ‘Small peptides’ and free amino acids in elemental diets. *Clinical Nutrition* 3 (1), 17–21. doi:10.1016/S0261-5614(84)80017-5.
- Medina, M.E., Iuga, C. & Alvarez-Idaboy, J.R., 2013. Antioxidant activity of propyl galate in aqueous and lipid media: a theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 13137–13146. doi:10.1039/C3CP51644J.
- Meisel, H. & FitzGerald, R.J., 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9 (16), 1289–1295. (Ikke sett, referert fra Sarmadi & Ismail, 2010).
- Mohan, A., Rajendran, S.R., He, Q.S., Bazinet, L. & Udenigwe, C.C., 2015. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances* 5, 79270–79278. (Ikke sett, referert fra Fu et al., 2019).
- Mohanty, B., Mahanty, A., Ganguly, S., Sankar, T.V., Chakraborty, K., Rangasamy, A. (...) & Sharma, A.P., 2014. Amino acid compositions of 27 food fishes and their importance in clinical nutrition. *Journal of Amino Acids* 2014, 269797. doi:10.1155/2014/269797.
- Moore, J.C., DeVries, J.W., Lipp, M., Griffiths, J. C. & Abernethy, D.R., 2010. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 330–357. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x.
-

-
- Mukherjee, S., Kapp, E.A., Lothian, A., Roberts, A.M., Vasilev, Y.V., Boughton, B. A. (...) & Roberts, B.R., 2017. Characterization and Identification of Dityrosine Cross-Linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 89, 6136–6145. doi:10.1021/acs.analchem.7b00941.
- Mæhre, H.K., Dalheim, L., Edvinsen, G.K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.J., 2018. Protein Determination—Method Matters. *Foods* 7 (1), 5. doi:10.3390/foods7010005.
- Nasri, M., 2017. Chapter Four - Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Application in Foods and Health Benefits. A Review. *Advances in Food and Nutrition Research* 81, 109–159. doi:10.1016/bs.afnr.2016.10.003.
- Nawar, W.W., 1996. *Lipids. I: Food Chemistry* (Fennema, O. (red.)). (3. utg.). Dekker, New York, s. 225. (Ikke sett, referert fra Decker, 1998).
- Nesse, K.O., Nagalakshmi, A.P., Marimuthu, P., Singh, M., Bhetariya, P.J., Ho, M. & Simon, R.R., 2014. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69, 1–6. doi:10.1016/j.yrtph.2014.02.009.
- Netto, F.M., Desobry, S. A. & Labuza, T.P., 1998. Effect of water content on the glass transition, caking and stickiness of protein hydrolysates. *International Journal of Food Properties* 1 (2), 141–161. doi:10.1080/10942919809524573.
- Neumann, N.P., 1972. Oxidation with hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 25, 393–400. (Ikke sett, referert fra Lund et al., 2011).
- Ney, K.H., 1979. Bitterness of peptides: Amino acid composition and chain length. I: *Food Taste Chemistry* (Boudreau, J. C. (red.)). American Chemical Society, Washington, DC, USA, Symposium Series No. 15, s. 150–173 (Ikke sett, referert fra Mackie, 1982).
- Nofima, 2016. Restråstoff. https://nofima.no/wp-content/uploads/2015/03/Restr%C3%A5stoff-brosjyre_2016.pdf. (Hentet: 23.5.2020).
- Norges Astma- og Allergiforbund, 2017. Useful facts on milk allergy (melk). <https://www.naaf.no/en/fokusomrader/allergi-og-overfolsomhet/mat-og-matoverfolsomhet/useful-facts-on-milk-allergy-melk/>. (Hentet: 27.5.2020).
- Norges Sjømatråd, 2019. Sjømateksport for 99 milliarder i 2018. <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018-/>. (Hentet: 21.5.2020).
- Nærings- og fiskeridepartementet, 2019a. Regjeringa sin strategi for auka verdiskaping frå marint restråstoff. <https://www.regjeringen.no/contentassets/0891087a014e4bab8bd2d9db5e88750d/no/sved/1.pdf>. (Hentet: 21.5.2020).
-

-
- Nærings- og fiskeridepartementet, 2019b. Regjeringa sin strategi for heilårige arbeidsplassar i fiskeindustrien. <https://www.regjeringen.no/contentassets/0891087a014e4bab8bd2d9db5e88750d/no/sved/2.pdf>. (Hentet: 21.5.2020).
- Oliveira, D., Bernardi, D., Drummond, F., Dieterich, F., Boscolo, W., Leivas, C., Kiatkoski, E. & Waszczynskyj, N., 2017. Potential Use of Tuna (*Thunnus albacares*) by-product: Production of Antioxidant Peptides and Recovery of Unsaturated Fatty Acids from Tuna Head. *Int. J. Food Eng.* 13. (Ikke sett, referert fra Li et al., 2019).
- Opheim, M., 2015. Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials - Influence of process conditions and evaluation of hydrolysate in diets for broiler chickens and piglets (Doktoravhandling). NMBU, Trondheim/Ås.
- Opheim, M., Slizyte, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E. & Kjos, N.P., 2015. Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry* 50 (8), 1247–1257. doi:10.1016/j.procbio.2015.04.017.
- Osnes, K. K. & Mohr, V., 1985. Peptide hydrolases of Antarctic krill *Euphasa superba*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 82B (4), 599–606.
- Overrein, I., 2010. Copepod Lipids in Aquaculture (Doktoravhandling). NTNU, Trondheim.
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suárez, J.C., 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry* 109 (4), 782–789. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.047.
- Paquette, G., Kupranycz, D. B. & van de Voort, F.R., 1985. The Mechanisms of Lipid Autoxidation I. Primary Oxidation Products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 18 (2), 112–118. doi:10.1016/S0315-5463(85)71767-1.
- Pascual, C., Esteban, M. M. & Crespo, J.F., 1992. Fish allergy: Evaluation of the importance of cross-reactivity. *The Journal of Pediatrics* 5 (2), 29–34. doi:10.1016/S0022-3476(05)81403-9.
- Pasupuleti, V. K. & Braun, S., 2008. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. I: Protein Hydrolysates in Biotechnology (Pasupuleti, V. K. & Demain, A. L. (red.)) , 11–32. doi:10.1007/978-1-4020-6674-0_2. Springer, Dordrecht.
- Pedersen, B., 1994. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.* 48 (10), 96–98. (Ikke sett, referert fra Dauksas et al., 2004).
- Peterson, G.L., 1979. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100, 201–220.
-

-
- Petrova, I., Tolstorebrov, I. & Eikevik, T.M., 2018. Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research* 10 (3), 223–241. doi:10.1007/s40071-018-0207-4.
- Philipps-Wiemann, P., 2018. Proteases — human food. I: Enzymes in Human and Animal Nutrition (Nunes, C. S. & Kumar, V. (red.)). Academic Press, s. 267-277.
- Prihanto, A.A., Nurdiani, R. & Bagus, A.D., 2019. Production and characteristics of fish protein hydrolysate from parrotfish (*Chlorurus sordidus*) head. *Peer J* 7, e8297. doi:10.7717/peerj.8297.
- PwC, 2018. Økt foredling av sjømat og restråstoff i Norge - en analyse av muligheter, barrierer og lønnsomhet. <https://www.innovasjon Norge.no/globalassets/converted-pages-shared-root/502443/sluttrapport---okt-foredling-av-sjomat-og-restrastoff-i-norge.pdf>. (Hentet: 21.5.2020).
- Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Morales-Medina, R., García-Moreno, P.J., Guadix-Escobar, A., Guadix-Escobar, E., 2018. Fish Discards as Source of Health-Promoting Biopeptides. I: Alternative and Replacement Foods (Holban, A. M. and Grumezescu, A. M. (red.)). *Handbook of Food Bioengineering*, volume 17, Academic Press: London, s. 177-199.
- Qian, Z.J., Je, J. Y. & Kim, S.K., 2007. Antihypertensive Effect of Angiotensin I Converting Enzyme-Inhibitory Peptide from Hydrolysates of Bigeye Tuna Dark Muscle, *Thunnus obesus*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8398–8403. doi:10.1021/jf0710635.
- Rajapakse, E., Mendis, E., Byun, H. G. & Kim, S.K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 562–569. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.02.005.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 597–635.
- Rao, Q., Kamdar, A. K. & Labuza, T.P., 2016. Storage Stability of Food Protein Hydrolysates – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (7), 1169–1192. doi:10.1080/10408398.2012.758085.
- Rao, Q., Labuza, T.P., 2012. Effect of moisture content on selected physicochemical properties of two commercial hen egg white powders. *Food Chemistry* 132 (1), 373–384. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.107.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y. & Xue, S.J., 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* 108 (2), 727–736. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.010.

-
- Rhee, K.C., 2001. Determination of Total Nitrogen. *Current Protocols* 00 (1), B1.2.1–B1.2.9. doi:10.1002/0471142913.fab0102s00.
- Richards, M.P., Dettmann, M. A. & Grunwald, E.W., 2005. Pro-oxidative characteristics of trout hemoglobin and myoglobin: A role for released heme in oxidation of lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10231–1023. (Ikke sett, referert fra Yarnpakdee et al., 2014).
- Richardsen, R., Myhre, M., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A., 2019. Analyse marint restråstoff 2018. SINTEF Ocean AS.
- Richardsen, R., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A., 2016. Analyse marint restråstoff, 2015. SINTEF Ocean AS.
- Richardsen, R., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A., 2017. Analyse marint restråstoff, 2016. SINTEF Ocean AS.
- Rubin, 1993. HÅNDBOK i ENSILERING. Trondheim: RUBIN.
- Rustad, T., 1998. Muscle tissue of meat and fish. Upublisert manuskript (revidert i 2005). Institutt for bioteknologi, NTNU, Trondheim.
- Rustad, T., 2007. Physical and chemical properties of protein seafood by-products. I: *Maximising the Value of Marine By-Products* (Shahidi, F. (red.)). Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, s. 3-21.
- Rustad, T., Storrø, I. & Slizyte, R., 2011. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology* 46, 2001–2014. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x.
- Rutherford, S.M., 2010. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International* 93 (5), 1515–1522. doi:10.1093/jaoac/93.5.1515.
- Saha, B. C. & Hayashi, K., 2001. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances* 19 (5), 355–370. doi:10.1016/S0734-9750(01)00070-2.
- Sandnes, K., Pedersen, K. & Hagen, H., 2003. Prosessering av fiskeråstoff ved hjelp av industrielle enzymer. Sluttrapport, RUBIN. (Ikke sett, referert fra Rustad, 2007).
- Sanmartín, E., Arbolea, J.C., Villamiel, M. & Moreno, F.J., 2009. Recent Advances in the Recovery and Improvement of Functional Proteins from Fish Processing By-Products: Use of Protein Glycation as an Alternative Method. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 332–344. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00083.x.
- Sarmadi, B. H. & Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31 (10), 1949–1956. doi:10.1016/j.peptides.2010.06.020.
-

-
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I. I. & Reppond, K.D., 2004. Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Clupea harengus*) Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 52 (16), 5040–5046. doi:10.1021/jf0351422.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W. & Bechtel, P.J., 2005. Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science* 70 (6), c401–c406. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb11437.x.
- Scilingo, A.A., Sabbione, A.C., Ibañez, S.M., Martínez, E.N., Añón, M.C., 2016. Anti-thrombotic and Antioxidant Activity of Amaranth Hydrolysate Obtained by Activation of an Endogenous Protease. *Plant Foods Hum Nutr.* 71, 174–182. doi:10.1007/s11130-016-0540-y.
- Sen, D.P., 2005. Proteolysed Fish Products. I: Advances in Fish Processing Technology. Allied Publishers Private Limited: New Dehli, s. 305-339.
- Shahidi, F., 2007. Maximizing the value of marine by-products: an overview. I: Maximising the Value of Marine By-Products (Shahidi, F. (red.)). Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, s. xxi-xxv.
- Shahidi, F., Han, X-Q. & Synowiecki, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53 (3), 285. doi:10.1016/0308-8146(95)93934-J.
- Shahidi, F. & Naczki, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, USA.
- Shahidi, F. & Wanasundara, P.K., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 32 (1), 67–103. doi:10.1080/10408399209527581.
- Shakila, R.J., Vijayalakshmi, K. & Jeyasekaran, G., 2003. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chemistry* 82 (3), 347–352. doi:10.1016/S0308-8146(02)00552-6.
- Shavandi, A., Hou, Y., Carne, A., McConnell, M. & Bekhit, A.A., 2019. Chapter Four - Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Advances in Food and Nutrition Research* 87, 187–254. doi:10.1016/bs.afnr.2018.08.001.
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y. & Yamamoto, J., 2009. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research* 123 (5), 753–757. doi:10.1016/j.thromres.2008.07.005.
- Sigma Aldrich, 2020. Superdex® Peptide 10/300 GL. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17517601?lang=en®ion=NO>. (Hentet: 8.5.2020).
-

-
- Sila, A. & Bougatef, A., 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods* 21, 10–26. doi:10.1016/j.jff.2015.11.007.
- Silk, D.B.A., Fairclough, P.D., Clark, M.L., Hegarty, J.E., Addison, J.M., Burston, D., Clegg, K. M. & Matthews, D.M., 1980. Use of a Peptide Rather Than Free Amino Acid Nitrogen Source in Chemically Defined “Elemental” Diets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 4, 548–553. doi:10.1177/0148607180004006548.
- Singer, M.A., 2007. *Ammonia Toxicity. I: Comparative Physiology, Natural Animal Models and Clinical Medicine - Insights into Clinical Medicine from Animal Adaptations*. Imperial College Press: London, s. 149-183.
- Sjømat Norge, 2018a. Sjømat 2030 - Et blått taktskifte. https://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/2018/03/SJOMAT2030_endelig.pdf. (Hentet: 21.5.2020).
- Sjømat Norge, 2018b. Faktaark - Et blått taktskifte. <https://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/2018/10/Faktaark-Bl%C3%A5tt-taktskifte-1.pdf>. (Hentet: 21.5.2020).
- Slizyte, R., 2004. Hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Influence of raw material composition and process conditions (Doktoravhandling). NTNU, Trondheim.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storrø, I. & Rustad, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 40 (6), 2021–2033. doi:10.1016/j.procbio.2004.07.016.
- Slizyte, R., Grimsmo, L. & Storrø, I., 2010. Prosessering av biråstoff fra sild til olje og proteinhydrolysat. Laboratorieforsøk med ulike proteaser og pilotforsøk med ultraferskt råstoff. SINTEF Fiskeri og Havbruk AS.
- Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. & Rustad, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry* 44 (6), 668–677. doi:10.1016/j.procbio.2009.02.010.
- Slizyte, R., Opheim, M., Storrø, I. & Sterten, H., 2017. Simple Technologies for Converting Rest Raw Materials of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) into High-Quality, Valuable, and Tasty Feed Ingredients. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 26 (5), 604–619. doi:10.1080/10498850.2016.1247124.
- Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K. & Rustad, T., 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports* 11, 99–109. doi:10.1016/j.btre.2016.08.003.
- Smith, J. & Hong-Shum, L., 2011. *Food additives data book*. Wiley-Blackwell (2. utg.). West Sussex, UK, s. 365–454.
-

-
- Sosulski, F. W. & Imafidon, G.I., 1990. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *J. Agric. Food Chem.* 38 (6), 1351–1356. doi:10.1021/jf00096a011.
- Spinelli, J., Koury, B. & Miller, R., 1972. Approaches to the utilization of fish for the preparation of protein isolates. *Journal of Food Science* 37, 599–603. doi:10.1111/j.1365-2621.1972.tb02702.x.
- Standal, I.B., Mozuraityte, R., Rustad, T., Alinasabhematabadi, L., Carlsson, N. G. & Undeland, I., 2018. Quality of filleted atlantic mackerel (*Scomber Scombrus*) during chilled and frozen storage: changes in lipids, vitamin D, proteins, and small metabolites, including biogenic amines. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 27 (3), 338–357. doi:10.1080/10498850.2018.1436107.
- Stensen, A., 2019. Investigation of bioactive properties of fish protein hydrolysates: Antioxidant activity and ACE inhibitory activity (Masteroppgave). NTNU, Trondheim.
- Stevens, J.R., Newton, R.W., Tlusty, M. & Little, D.C., 2018. The rise of aquaculture by-products: Increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation. *Marine Policy* 115–124, 115–124. doi:10.1016/j.marpol.2017.12.027.
- Sun, J., He, H. & Xie, B.J., 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (21), 6646–6652. doi:10.1021/jf0495136.
- Suzuki, Y.J., Carini, M. & Butterfield, D.A., 2010. Protein Carbonylation. *Antioxid Redox Signal.* 12 (3), 323–325. doi:10.1089/ars.2009.2887.
- Sáez-Plaza, P., Navas, M.J., Wybraniec, S., Michalowski, T. & Asuero, A.G., 2013. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 43 (4), 224–272. doi:10.1080/10408347.2012.751787.
- Sánchez, A. & Vázquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1 (1), 29–46.
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari, H. & Fogliano, V., 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Science* 12 (1), 154–169.
- Taylor, S. L. & Eitenmiller, R.R., 1986. Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 17 (2), 91–128. doi:10.3109/10408448609023767.
- Taylor, S.L., Stratton, J. E. & Nordlee, J.A., 1989. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *J Toxicol Clin Toxicol.* 27 (4-5), 225–240. doi:10.3109/15563658908994420.
- Taylor, W.H., 1957. Formol titration: An evaluation of its various modifications. *The Analyst* 82, 488–498.
-

-
- Thakar, P.N., Patel, J. R. & Joshi, N.S., 1991. Protein hydrolysates: a review. *Indian J. Dairy Sci.* 44 (9), 557. (Ikke sett, referert fra Kristinsson & Rasco, 2000).
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F., 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decaptes maruadsii*). *Food Chemistry* 103 (4), 1385–1394. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.055.
- Tietze, I. N. & Pedersen, E.B., 1991. Effect of fish protein supplementation on aminoacid profile and nutritional status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 6 (12), 948–954. doi:10.1093/ndt/6.12.948.
- Ueda, S., Hayashi, T. & Namiki, M., 1986. Effect of Ascorbic Acid on Lipid Autoxidation in a Model Food System. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (1), 1–7. doi:10.1080/00021369.1986.10867337.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R. & Suzzi, G., 2014. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front Microbiol.* 5, 500. doi:10.3389/fmicb.2014.00500.
- Välimaa, A.L., Mäkinen, S., Mattila, P., Marnila, P., Pihlanto, A., Mäki, M. & Hiidenhovi, J., 2020. Fish and fish side streams are valuable sources of high-value components. *Food Quality and Safety* 3, 209–226. doi:10.1093/fqsafe/fyz024.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. & Kowalska, T., 2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.* CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida.
- Wang, Y., He, H.L., Wang, G.F., Wu, H., Cheng, Z., Chen, X. L. & Zhang, Y.Z., 2010. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Marine drugs* 8, 255–268. doi:10.3390/md8020255.
- Wergedahl, H., Liasset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mørk, S. & Berge, R.K., 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J Nutr.* 134 (6), 1320–1327. doi:10.1093/jn/134.6.1320.
- Wilding, P., Lillford, P. J. & Regenstein, J.M., 1984. Functional properties of proteins in foods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology* 34 (3), 182–189. doi:10.1002/jctb.280340307.
- Wu, T.H., Nigg, J.D., Stine, J. J. & Bechtel, P.J., 2011. Nutritional and Chemical Composition of By-Product Fractions Produced from Wet Reduction of Individual Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Heads and Viscera. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20 (2), 183–195. doi:10.1080/10498850.2011.557524.
- Yang, M.P., Eoum, H.Y., Na, K.J., Araki, S., El-Abasy, M., Motobu, M. & Hirota, Y., 2001. Enhanced phagocytic activity of neutrophils caused by administration of egg white derivatives (EWD) in cats injected with cyclophosphamide (CPA). *J. Vet. Med. Sci.* 63, 269–274. (Ikke sett, referert fra Duarte et al., 2006).
-

-
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S. & Kristinsson, H.G., 2012b. Effect of pretreatments on chemical compositions of mince from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and fishy odor development in protein hydrolysate. *International Aquatic Research* 4 (7), 1–16. doi:10.1186/2008-6970-4-7.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S. & Kristinsson, H.G., 2014. Lipid oxidation and fishy odour in protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein isolate as influenced by haemoglobin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (2), 219–226. doi:10.1002/jsfa.6235.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G. & Kishimura, H., 2015. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *J Food Sci Technol.* 52 (6), 3336–3349. doi:10.1007/s13197-014-1394-7.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G. & Nalinanon, S., 2012a. Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chemistry* 132, 1781–1788. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.139.
- Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T. & Cohen, R.A., 2007. Thiol oxidation in signaling and response to stress: Detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med.* 43 (8), 1099–1108. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.014.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M. & Ren, J., 2010. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International* 43 (4), 1167–1173. doi:10.1016/j.foodres.2010.02.009.
- Yussif, N.M., 2018. Vitamin C, Vitamin C - an Update on Current Uses and Functions (LeBlanc, J. G. (red.)). <https://www.intechopen.com/books/vitamin-c-an-update-on-current-uses-and-functions/vitamin-c>. doi:10.5772/intechopen.81783.
- Yvon, M., Chabanet, C. & Pélissier, J.P., 1989. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research* 34, 166–176.
- Zahid, M.A., Seo, J.K., Parvin, R., Ko, J. & Yang, H.S., 2019. Comparison of Butylated Hydroxytoluene, Ascorbic Acid, and Clove Extract as Antioxidants in Fresh Beef Patties at Refrigerated Storage. *Food Sci Anim Resour.* 39 (5), 768–779. doi:10.5851/kosfa.2019.e67.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A. & Prentice, C., 2018. Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Marine Biotechnology* 20, 118–130. doi:10.1007/s10126-018-9799-3.

-
- Zapadka, K.L., Becher, F.J., Gomes dos Santos, A. L. & Jackson, S.E., 2017. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus* 7 (6), 20170030. doi:10.1098/rsfs.2017.0030.
- Zhou, P., Liu, X. & Labuza, T.P., 2008. Moisture-Induced Aggregation of Whey Proteins in a Protein/Buffer Model System. *J. Agric. Food Chem.* 56 (6), 2048–2054. doi:10.1021/jf073151v.
- Özen, B. Ö. & Soyer, A., 2018. Effect of plant extracts on lipid and protein oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince during frozen storage. *Journal of food science and technology* 55 (1), 120–127. doi:10.1007/s13197-017-2847-6.
- Özyurt, G. & Serhat Özkütük, A., 2019. *Advances in Discard and By-product Processing. I: Innovative Technologies in Seafood Processing* (Özogul, Y. (red.)). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, s. 323-350.

Tørrstoff, aske og lipidinnhold

A.1 Tørrstoff

Etter 22 timer ved 105 °C ble mengde tørrstoff beregnet slik:

$$DM = b - D. \quad (A.1)$$

DM er tørrstoff, b er vekt av digel og tørrstoff og D er vekt av tom digel. Deretter ble % tørrstoff i prøven beregnet.

$$\%Tørrstoff = \frac{DM}{\text{Innveid prøve}} \cdot 100\%. \quad (A.2)$$

For eksempel ble mengde tørrstoff i PH uten tilsatt antioksidant med ingen lagringstid (0 md.) beregnet slik (første parallell):

$$DM = 10,8458 \text{ g} - 9,9337 \text{ g} = 0,9121 \text{ g}.$$

$$\%Tørrstoff = \frac{0,9121 \text{ g}}{1,0032 \text{ g}} \cdot 100\% = 90,9\%.$$

A.2 Aske

Etter 24 timer ved 550 °C ble mengde aske beregnet slik:

$$A = b - D. \quad (A.3)$$

A er aske, b er vekt av digel og aske og D er vekt av tom digel. Deretter ble % aske i prøven beregnet.

$$\%Aske = \frac{A}{\text{Innveid prøve}} \cdot 100\%. \quad (A.4)$$

For eksempel ble mengde aske i PH uten tilsatt antioksidant med ingen lagringstid (0 md.) beregnet slik (første parallell):

$$A = 20,7238 \text{ g} - 20,6340 \text{ g} = 0,0898 \text{ g.}$$

$$\% \text{Aske} = \frac{0,0898 \text{ g}}{1,0048 \text{ g}} \cdot 100\% = 8,9\%.$$

A.3 Lipider

Totalt lipidinnholdet i råstoffet ble beregnet ved denne ligningen:

$$\% \text{Lipider} = \frac{a \cdot b}{c \cdot v} \cdot 100\%. \quad (\text{A.5})$$

a er inndampet fett (g), b er tilsatt kloroform (ml), c er inndampet kloroform (ml) og v er innveid prøve (g). For eksempel ble andelen lipider i første parallell beregnet slik:

$$\% \text{Lipider} = \frac{0,13 \cdot 40}{2 \cdot 9,99} \cdot 100\% = 26,03\%.$$

Hydrolysegrad

Hydrolysegrad ble bestemt ved formoltitrering (Taylor, 1957), og mengde NaOH titrert ble brukt til å beregne konsentrasjonen av frie aminogrupeer:

$$\%D = \frac{A \cdot B \cdot 14,007}{C \cdot 1000} \cdot 100\%. \quad (\text{B.1})$$

D er frie aminogrupeer, A er ml NaOH brukt, B er konsentrasjonen av titranten (0,1 M NaOH) og C er innveid prøve (g). Deretter ble hydrolysegraden (DH) beregnet ved følgende ligning:

$$\%DH = \frac{\%D}{E} \cdot 100\%. \quad (\text{B.2})$$

E er % nitrogen i prøven som ble bestemt ved Kjeldahl-metoden.

For eksempel ble hydrolysegrad til PH uten tilsatt antioksidant med ingen lagringstid (0 md.) beregnet slik (første parallell):

$$\%D = \frac{22,7171 \cdot 0,1 \cdot 14,007}{1,4994 \cdot 1000} \cdot 100\% = 2,1222\%.$$

$$\%DH = \frac{2,1222}{13,416} \cdot 100\% = 15,8\%.$$

Protein- og nitrogeninnhold

Resultatene fra Kjeldahl-metoden ble beregnet som prosentvis nitrogen (Büchi Switzerland, 2013). For å beregne proteininnholdet i prøvene ble nitrogeninnholdet multiplisert med 6,25 (omregningsfaktor for kjøttprodukter). Resultatene ble utregnet automatisk ut ifra ligning C.1 og C.2:

$$\%N = \frac{(V_{\text{Sample}} - V_{\text{Blank}}) \cdot z \cdot c \cdot f \cdot M_N}{m_{\text{Sample}} \cdot 1000} \cdot 100\% \quad (\text{C.1})$$

$$\%P = \%N \cdot \text{PF} \quad (\text{C.2})$$

V_{Sample} = mengde titrant for prøven [ml]

V_{Blank} = gjennomsnittlig mengde titrant for blank prøve [ml]

z = molar valensfaktor (2 for H_2SO_4)

c = titrantkonsentrasjon [mol/l]

f = titrantfaktor (1)

M_N = molekylvekt til nitrogen (14,007 g/mol)

m_{Sample} = innveid prøve [g]

1000 = omregningsfaktor (fra ml til l)

PF = proteinfaktor (6,25)

%N = vektprosent av nitrogen

%P = vektprosent av protein

Glycin ble brukt som internkontroll (IK), og den lå innenfor de satte akseptansegrensene for IK. I hver analyse vil det være måleusikkerhet. Siden IK er godkjent, ble ikke resultatene for %N og %P korrigert.

For eksempel ble protein- og nitrogeninnholdet i PH uten tilsatt antioksidant med ingen lagringstid (0 md.) beregnet slik (første parallell):

$$\%N = \frac{(10,184 \text{ ml} - 0,3375 \text{ ml}) \cdot 2 \cdot 0,1 \cdot 1 \cdot 14,007}{0,2056 \text{ g} \cdot 1000} \cdot 100\% = 13,42\%.$$

$$\%P = 13,42 \cdot 6,25 = 83,89\%.$$

Vannløselige proteiner og syreløselige peptider

D.1 Vannløselige proteiner

Mengde vannløselige proteiner ble bestemt ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951). Tabell D.1 viser den målte absorbansen til BSA-fortynningene ved 750 nm.

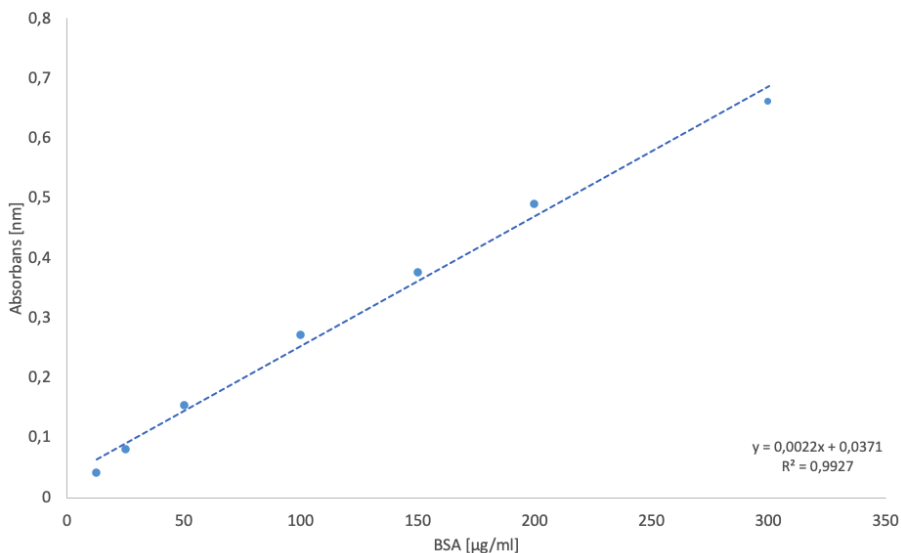
Tabell D.1: Absorbans for BSA-fortynningene.

BSA [$\mu\text{g/ml}$]	12,5	25	50	100	150	200	300
Absorbans [750 nm]	0,042	0,089	0,153	0,273	0,384	0,486	0,675
	0,040	0,076	0,158	0,264	0,376	0,504	0,644
	0,040	0,077	0,147	0,277	0,369	0,481	0,663
Gjennomsnitt	0,041	0,081	0,153	0,271	0,376	0,490	0,661

Den gjennomsnittlige absorbansen ble brukt til å lage en standardkurve (figur D.1). Ligning D.1 viser trendlinjen mellom de sju punktene i figur D.1, som ble brukt til å beregne mengde vannløselige proteiner (%) i PH tilsatt askorbinsyre (6 md.).

$$y = 0,0022 \cdot x + 0,0371. \quad (\text{D.1})$$

y er absorbansen og x er konsentrasjonen av BSA.



Figur D.1: Standardkurve til BSA-fortynningene.

Mengde vannløselige proteiner (%) i hydrolysatene og råstoffet ble bestemt ved bruk av følgende ligninger:

$$\text{Protein } \mu\text{g/ml TCA} = \frac{1}{0,0022} \cdot (A - 0,0371). \quad (\text{D.2})$$

A er absorbansen til prøven ved 750 nm. Protein $\mu\text{g/ml TCA}$ ble bestemt for alle parallellene ($n = 3$). Gjennomsnittet ble derfor brukt i de videre beregningene.

$$\mu\text{g/ml uforynnet filtrat} = (\text{Protein } \mu\text{g/ml TCA}) \cdot F. \quad (\text{D.3})$$

F er hvor mye prøven er fortynt.

$$\text{Protein\% våtvekt} = \frac{(\mu\text{g/ml uforynnet filtrat}) \cdot V}{m_s \cdot 1000 \cdot 1000} \cdot 100\%. \quad (\text{D.4})$$

m_s er innveid prøve (g) og V er volumet destillert vann tilsatt prøven.

Her vises utregningen til mengde vannløselige proteiner i PH tilsatt askorbinsyre etter lagringstid 6 måneder (parallell 1, fortynting 1:100). Tabell D.2 viser den målte absorbansen til hydrolysatet ved fortynting 1:100 og 1:200.

Tabell D.2: Absorbans for 1:100- og 1:200-fortynningene.

Fortynning	1:100 (I)	1:200 (I)	1:100 (II)	1:200 (II)
Absorbans [750 nm]	0,624	0,384	0,624	0,387
	0,627	0,385	0,630	0,388
	0,634	0,376	0,636	0,377

I og II indikerer henholdsvis parallell 1 og 2.

$$\text{Protein } \mu\text{g/ml TCA} = \frac{1}{0,0022} \cdot (0,624 - 0,0371) = 266,773.$$

For $n = 3$ blir gjennomsnittet 268,742 protein $\mu\text{g/ml}$ TCA.

$$\mu\text{g/ml ufortynnet filtrat} = 268,742 \cdot 100 = 26874,2 \mu\text{g/ml}.$$

Til slutt beregnes mengde vannløselige proteiner (%).

$$\text{Protein\% våtvekt} = \frac{26874,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 10 \text{ ml}}{0,5004 \text{ g} \cdot 1000 \cdot 1000} \cdot 100\% = 53,7\%.$$

Samme fremgangsmetode ble brukt til å beregne mengde vannløselige proteiner (%) i PH tilsatt askorbinsyre ved lagringstid 6 måneder (parallell 2, fortytning 1:100). Resultatet for parallell 2 ble 53,9%. Dermed blir gjennomsnittet 53,8%.

Usikkerhet

Microsoft Excel 2020 (Microsoft, USA) ble brukt til å bestemme usikkerheten til protein $\mu\text{g/ml}$ TCA ($n = 3$). STDAV.S-funksjonen beregnet usikkerheten til å være 2,3325 $\mu\text{g/ml}$ TCA i PH tilsatt askorbinsyre (parallell 1, 1:100, 6 md.).

$$\text{Usikkerhet til } \mu\text{g/ml ufortynnet filtrat} = 2,3325 \cdot 100 = 233,25 \mu\text{g/ml}.$$

Til slutt ble usikkerheten i mengde vannløselige proteiner bestemt:

$$\frac{233,25 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 10 \text{ ml}}{0,5004 \text{ g} \cdot 1000 \cdot 1000} \cdot 100\% = 0,5\%.$$

Samme fremgangsmetode ble brukt til å beregne usikkerheten i mengde vannløselige proteiner (%) i PH tilsatt askorbinsyre ved lagringstid 6 måneder (parallell 2, fortytning 1:100). Usikkerheten til parallell 2 ble også 0,5%.

Tabell D.3 viser gjennomsnittlig mengde vannløselig proteiner i hydrolysatene med for-
tynning 1:200, mens tabell D.4 viser gjennomsnittlig mengde vannløselig protein i hydro-
lysatene med fortynning 1:100.

Tabell D.3: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon i FPH (fortynnet 1:200) og råstoffet (fortynnet 1:50).

Antioksidant	Vannløselige proteiner [vekt%]				
	0 md.	1 md.	2 md.	4 md.	6 md.
Askorbinsyre	65,1 ± 0,4	62,5 ± 0,5	66,7 ± 1,6	64,7 ± 0,8	63,2 ± 1,0
Sitronsyre	61,3 ± 1,1	60,9 ± 1,1	62,8 ± 0,6	59,7 ± 1,4	67,5 ± 3,2
Propylgallat	63,5 ± 1,5	65,3 ± 1,1	67,9 ± 1,2	66,1 ± 2,1	67,4 ± 3,1
BHT	64,2 ± 0,8	63,3 ± 0,9	64,6 ± 0,8	61,6 ± 1,4	65,7 ± 2,0
Kontroll	62,9 ± 1,7	64,7 ± 1,6	68,9 ± 1,1	68,7 ± 2,3	64,7 ± 1,9
Råstoff	2,5 ± 0,0				

Tabell D.4: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon i FPH (fortynnet 1:100).

Antioksidant	Vannløselige proteiner [vekt%]				
	0 md.	1 md.	2 md.	4 md.	6 md.
Askorbinsyre	54,1 ± 0,3	51,2 ± 0,4	51,9 ± 0,8	52,6 ± 0,5	53,8 ± 0,5
Sitronsyre	50,6 ± 0,7	49,7 ± 0,3	51,7 ± 0,7	50,8 ± 0,2	56,0 ± 0,8
Propylgallat	56,7 ± 0,4	55,6 ± 0,3	56,0 ± 0,6	53,6 ± 0,5	55,2 ± 0,6
BHT	54,8 ± 0,5	53,4 ± 0,3	53,5 ± 0,6	52,5 ± 0,6	53,4 ± 0,5
Kontroll	55,3 ± 0,2	53,5 ± 0,7	56,5 ± 0,7	56,2 ± 0,6	56,2 ± 0,8

D.2 Syreløselige peptider

Mengde syreløselige peptider i hydrolysatene og råstoffet ble bestemt i henhold til Hoyle & Merritt (1994), og til slutt analysert ved Lowrys metode (Lowry et al., 1951). Her vises utregningen for mengde syreløselige peptider i PH tilsatt askorbinsyre ved lagringstid 6 måneder. For å bestemme innholdet ble ligning D.1, D.2 og D.4 brukt, i tillegg til en modifisert versjon av ligning D.3. Ligning D.3 ble multiplisert med 2 fordi 2 ml av proteinekstraktet ble blandet med 2 ml 20% TCA. Tabell D.5 viser den målte absorbansen til proteinekstraktet (fortynning 1:100) som var tilsatt 20% TCA.

Tabell D.5: Absorbans for proteinekstrakt (1:100) tilsatt 20% TCA.

Fortynning	1:100 (I)	1:100 (II)
Absorbans [750 nm]	0,207	0,205
	0,206	0,207
	0,207	0,209

I og II indikerer henholdsvis parallell 1 og 2.

$$\text{Protein } \mu\text{g/ml TCA} = \frac{1}{0,0022} \cdot (0,207 - 0,0371) = 77,227.$$

For $n = 3$ blir gjennomsnittet 77,076 protein $\mu\text{g/ml TCA}$.

$$\mu\text{g/ml ufortynnet filtrat} = 77,076 \cdot 100 \cdot 2 = 15415,2 \mu\text{g/ml}.$$

Til slutt beregnes mengde syreløselige peptider (%).

$$\text{Syreløselige peptider [\% våtvekt]} = \frac{15415,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 10 \text{ ml}}{0,5004 \text{ g} \cdot 1000 \cdot 1000} \cdot 100\% = 30,8\%.$$

Samme fremgangsmetode ble brukt til å beregne mengde syreløselige peptider (%) i PH tilsatt askorbinsyre ved lagringstid 6 måneder (parallell 2, fortynning 1:100). Resultatet for parallell 2 ble 30,9%.

Usikkerhet

Microsoft Excel 2020 (Microsoft, USA) ble brukt til å bestemme usikkerheten til protein $\mu\text{g/ml TCA}$ ($n = 3$). STDAV.S-funksjonen beregnet usikkerheten til å være 0,2624 $\mu\text{g/ml TCA}$ i PH tilsatt askorbinsyre (parallell 1, 1:100, 6 md.).

$$\text{Usikkerhet til } \mu\text{g/ml ufortynnet filtrat} = 0,2624 \cdot 100 \cdot 2 = 52,48 \mu\text{g/ml}.$$

Til slutt ble usikkerheten i mengde syreløselige peptider bestemt:

$$\frac{52,48 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 10 \text{ ml}}{0,5004 \text{ g} \cdot 1000 \cdot 1000} \cdot 100\% = 0,10\%.$$

Samme fremgangsmetode ble brukt til å beregne usikkerheten i mengde syreløselige peptider (%) i PH tilsatt askorbinsyre ved lagringstid 6 måneder (parallell 2, fortynning 1:100). Usikkerheten til parallell 2 ble 0,4%.

Tabell D.6 viser gjennomsnittlig mengde syreløselige peptider i hydrolysatene med fortynning 1:100.

Tabell D.6: Gjennomsnittlig konsentrasjon av syreløselige peptider i FPH (fortynnet 1:100) og råstoffet (fortynnet 1:10).

Antioksidant	Syreløselige peptider [vekt%]				
	0 md.	1 md.	2 md.	4 md.	6 md.
Askorbinsyre	30,7 ± 0,4	27,9 ± 0,3	27,7 ± 0,5	23,4 ± 0,4	30,9 ± 0,3
Sitronsyre	27,21 ± 0,10	26,9 ± 0,2	27,6 ± 0,3	25,6 ± 0,7	33,6 ± 0,3
Propylgallat	31,7 ± 0,3	31,0 ± 0,5	29,3 ± 0,4	24,4 ± 1,4	31,0 ± 0,2
BHT	28,7 ± 0,3	31,3 ± 0,6	28,6 ± 0,5	27,2 ± 0,4	29,8 ± 0,4
Kontroll	28,9 ± 0,3	29,9 ± 0,3	30,5 ± 0,2	31,2 ± 0,4	30,00 ± 0,10
Råstoff	0,2 ± 0,0				

Total aminosyresammensetning

Total aminosyresammensetning ble bestemt i henhold til Blackburn (1978) og analysert ved HPLC. Først ble $\mu\text{g/ml}$ for hver aminosyre bestemt (ligning E.1), og deretter ble mg/g innveid prøve for hver aminosyre funnet (ligning E.2).

$$AA_1 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{M_w \cdot M_{\text{HPLC}}}{1000}. \quad (\text{E.1})$$

AA_1 er aminosyren ($\mu\text{g/ml}$), M_w er molekylvekten og M_{HPLC} er mengden aminosyre ($\mu\text{mol/l}$) funnet ved HPLC.

$$AA_1 \left(\frac{\text{mg}}{\text{g FPH}} \right) = \frac{AA_1 \cdot V \cdot F}{1000 \cdot m_s}. \quad (\text{E.2})$$

V er mengden ionefritt vann filtratet ble fylt opp til (20 ml), F er fortynningen (1:500) og m_s er innveid prøve (g). Rådata for kontrollprøven (6 md., parallell 1) fra HPLC er gitt i tabell E.1. Verdiene i den siste kolonna ble brukt for å beregne total aminosyresammensetning.

Tabell E.1: Rådata fra HPLC for kontrollprøven ved lagringstid 6 måneder.

Nr.	Aminosyre	Retensjonstid [min]	Areal [mV · min]	Høyde [mV]	Relativt areal [%]	Relativ høyde [%]	Mengde [µmol/l]
1	Asp	1,493	24,697	219,583	9,25	15,06	4,4486
2	Glu	2,258	31,593	88,767	11,83	6,09	6,2423
3	Asn	3,315	0,014	0,139	0,01	0,01	0,0029
4	His	4,193	2,877	18,009	1,08	1,23	0,7917
5	Ser	4,457	13,926	76,071	5,21	5,22	2,3713
6	Gln	4,808	2,17	8,7	0,81	0,6	0,4023
7	Gly/Arg	7,6063	86,244	342,139	32,29	23,46	8,7911
8	Thr	8,205	10,81	39,594	4,05	2,71	2,4821
9	Ala	12,81	27,602	129,393	10,33	8,87	6,3372
10	Tyr	14,395	3,033	19,945	1,14	1,37	0,6606
11	Met	18,002	6,567	52,642	2,46	3,61	1,27
12	Val	18,3	12,447	99,711	4,66	6,84	2,1657
13	Phe	18,82	5,857	47,904	2,19	3,28	1,2096
14	Ile	19,788	8,302	67,808	3,11	4,65	1,4655
15	Leu	20,14	16,362	123,033	6,13	8,44	3,1718
16	Lys	21,872	13,998	120,992	5,24	8,3	3,2489

For eksempel ble Glu-innholdet i kontrollprøven etter 6 måneder beregnet slik:

$$\text{Glu}\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \frac{129 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 6,2423 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}}{1000} = 0,8053 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$\text{Glu}\left(\frac{\text{mg}}{\text{g FPH}}\right) = \frac{0,8053 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 20 \text{ ml} \cdot 500}{1000 \cdot 0,0999 \text{ g}} = 80,61 \frac{\text{mg}}{\text{g FPH}}$$

Innholdet av Glu i parallell 2 og 3 ble henholdsvis 82,91 mg/g FPH og 81,13 mg/g FPH. Dette ga et gjennomsnitt på 81,6 mg/g FPH. Standardavviket ble beregnet til å være 1,2 mg/g FPH ved hjelp av STDAV.S-funksjonen i Microsoft Excel 2020 (Microsoft, USA).

Tabell E.2, E.3, E.4, E.5 og E.6 viser total aminosyresammensetning i hydrolysatene. Tabell E.7 viser total aminosyresammensetning i råstoffet.

Tabell E.2: Total aminosyresammensetning i PH tilsatt askorbinsyre.

Aminosyre	Innhold av aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	49,4 ± 1,1	48,7 ± 2,1	47,4 ± 0,7	53,1 ± 1,1	55,4 ± 1,8
Glu	75,1 ± 1,7	73,3 ± 4,6	71,0 ± 1,3	82,0 ± 0,9	88,1 ± 3,3
His	10,6 ± 0,4	9,9 ± 0,8	10,5 ± 0,3	11,9 ± 0,4	12,5 ± 1,5
Ser	26,2 ± 0,5	26,3 ± 1,3	24,3 ± 1,0	21,0 ± 0,8	22,0 ± 0,5
Gln	4,6 ± 0,5	5,3 ± 0,3	9,1 ± 6,9	5,10 ± 0,10	5,0 ± 0,0
Gly/Arg	86,3 ± 1,6	84,6 ± 3,0	81,7 ± 2,4	93,8 ± 1,9	94,4 ± 3,5
Thr	25,0 ± 0,2	24,3 ± 2,1	26,4 ± 3,9	26,0 ± 0,8	26,2 ± 0,3
Ala	44,4 ± 1,3	44,7 ± 2,3	43,4 ± 0,4	48,0 ± 1,1	49,1 ± 1,9
Tyr	5,1 ± 4,7	8,5 ± 0,3	9,4 ± 0,7	10,5 ± 0,5	11,0 ± 0,2
Met	15,2 ± 0,2	14,5 ± 0,6	14,80 ± 0,10	17,0 ± 0,5	17,3 ± 0,5
Val	19,4 ± 0,4	18,5 ± 1,1	19,1 ± 0,3	22,2 ± 0,6	23,2 ± 0,9
Phe	16,8 ± 0,3	16,3 ± 0,9	16,1 ± 0,2	18,0 ± 1,0	19,1 ± 0,7
Ile	14,7 ± 0,3	14,0 ± 0,8	14,5 ± 0,2	16,9 ± 0,4	17,9 ± 0,7
Leu	34,2 ± 0,7	33,1 ± 1,8	32,2 ± 0,4	36,7 ± 0,8	38,5 ± 1,3
Lys	37,2 ± 1,1	33,3 ± 1,4	35,5 ± 0,7	43,2 ± 0,9	43,9 ± 1,3

Tabell E.3: Total aminosyresammensetning i PH tilsatt sitronsyre.

Aminosyre	Innhold av aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	47,2 ± 0,4	45,7	45,3 ± 0,7	46,8 ± 1,5	48,4 ± 0,6
Glu	71,7 ± 1,0	68,6	66,1 ± 1,5	76,5 ± 2,6	74,2 ± 1,4
His	9,5 ± 0,0	4,8	9,5 ± 0,3	9,1 ± 1,5	10,3 ± 0,4
Ser	24,7 ± 0,2	24,9	23,1 ± 0,7	18,9 ± 0,6	19,2 ± 0,3
Gln	4,4 ± 0,0	3,2	4,90 ± 0,10	4,2 ± 0,4	4,6 ± 0,3
Gly/Arg	82,7 ± 1,1	79,8	77,7 ± 0,8	83,6 ± 2,6	84,2 ± 1,1
Thr	24,5 ± 0,5	22,8	23,4 ± 3,5	23,2 ± 1,0	23,3 ± 0,7
Ala	43,8 ± 0,6	42,4	41,3 ± 1,1	43,8 ± 1,4	41,5 ± 0,9
Tyr	5,0 ± 5,0	0,4	9,60 ± 0,10	6,8 ± 5,7	6,0 ± 4,5
Met	14,60 ± 0,10	12,9	13,9 ± 0,0	15,4 ± 0,8	15,3 ± 0,4
Val	18,6 ± 0,3	18,2	18,2 ± 0,3	19,9 ± 0,5	20,3 ± 0,5
Phe	16,10 ± 0,10	15,1	15,0 ± 0,2	16,0 ± 0,3	16,7 ± 0,3
Ile	14,1 ± 0,2	13,7	13,5 ± 0,5	14,5 ± 0,2	15,3 ± 0,6
Leu	32,9 ± 0,4	31,5	30,6 ± 0,8	32,40 ± 0,10	33,5 ± 0,4
Lys	34,8 ± 0,8	31,8	31,9 ± 0,6	36,3 ± 1,4	39,6 ± 0,5

Tabell E.4: Total aminosyresammensetning i PH tilsatt propylgallat.

Aminosyre	Innhold av aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	50,3 ± 2,1	50,8 ± 0,3	50,5 ± 1,5	50,8 ± 4,4	49,1 ± 3,1
Glu	72,6 ± 2,6	77,3 ± 0,2	74,2 ± 1,9	79,8 ± 7,4	76,0 ± 5,1
His	10,1 ± 0,6	9,9 ± 1,5	11,1 ± 0,2	10,9 ± 1,6	9,4 ± 1,9
Ser	26,3 ± 1,0	29,0 ± 1,0	27,6 ± 1,0	20,6 ± 1,6	20,0 ± 1,5
Gln	4,5 ± 0,4	3,8 ± 0,6	5,0 ± 0,4	4,5 ± 0,5	4,3 ± 0,8
Gly/Arg	87,0 ± 3,2	88,6 ± 1,8	90,0 ± 3,1	87,0 ± 8,2	85,8 ± 6,2
Thr	24,5 ± 0,2	25,4 ± 0,2	25,7 ± 0,0	24,3 ± 2,5	24,6 ± 0,9
Ala	45,4 ± 1,3	47,1 ± 0,5	44,9 ± 1,6	45,3 ± 4,2	43,7 ± 2,9
Tyr	8,0 ± 1,6	5,1 ± 5,1	9,4 ± 1,8	5,8 ± 5,1	3,9 ± 6,1
Met	14,8 ± 0,8	15,3 ± 0,4	15,8 ± 0,8	16,0 ± 1,7	15,4 ± 1,1
Val	18,8 ± 0,4	19,1 ± 0,3	20,5 ± 0,6	20,2 ± 2,2	20,6 ± 1,3
Phe	16,3 ± 0,2	16,9 ± 0,0	16,9 ± 1,1	16,7 ± 1,7	16,9 ± 1,1
Ile	14,0 ± 0,2	14,0 ± 0,7	15,5 ± 0,5	15,3 ± 1,8	15,5 ± 1,4
Leu	33,8 ± 1,2	34,5 ± 0,3	34,0 ± 1,3	33,9 ± 3,1	34,0 ± 2,1
Lys	36,6 ± 1,2	36,1 ± 0,6	38,5 ± 1,2	39,5 ± 3,8	40,9 ± 2,3

Tabell E.5: Total aminosyresammensetning i PH tilsatt BHT.

Aminosyre	Innhold av aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	49,5 ± 0,3	49,7 ± 2,9	45,3 ± 0,6	51,2 ± 1,8	49,6 ± 3,8
Glu	75,1 ± 0,5	74,6 ± 2,9	66,6 ± 0,3	79,3 ± 3,2	78,5 ± 6,4
His	10,4 ± 0,5	10,2 ± 0,5	9,10 ± 0,10	3,1 ± 0,9	11,1 ± 1,6
Ser	26,1 ± 0,7	28,8 ± 4,6	22,5 ± 1,1	20,3 ± 1,3	19,3 ± 1,3
Gln	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,4 ± 0,3	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,5
Gly/Arg	83,6 ± 1,1	83,0 ± 5,1	75,6 ± 0,8	87,6 ± 3,7	80,7 ± 6,8
Thr	24,7 ± 0,3	24,6 ± 1,4	22,4 ± 1,7	25,1 ± 0,4	24,2 ± 1,6
Ala	44,9 ± 0,6	44,8 ± 2,8	40,2 ± 0,6	45,4 ± 1,7	42,8 ± 3,0
Tyr	9,2 ± 1,5	8,4 ± 2,9	9,8 ± 0,2	7,2 ± 5,9	7,4 ± 6,1
Met	15,4 ± 0,3	15,3 ± 0,6	14,1 ± 0,2	15,5 ± 0,9	16,1 ± 1,4
Val	19,20 ± 0,10	19,1 ± 1,3	18,4 ± 0,3	21,8 ± 1,1	20,6 ± 1,9
Phe	16,2 ± 0,4	16,5 ± 1,2	15,2 ± 0,2	17,5 ± 0,7	17,1 ± 1,4
Ile	14,8 ± 0,3	14,2 ± 1,0	13,5 ± 1,0	15,7 ± 0,7	15,8 ± 1,5
Leu	34,6 ± 0,5	33,9 ± 1,8	28,3 ± 3,7	35,8 ± 1,4	34,7 ± 2,8
Lys	37,6 ± 0,6	35,8 ± 2,5	32,7 ± 0,6	42,1 ± 1,6	39,6 ± 3,7

Tabell E.6: Total aminosyresammensetning i kontrollprøven.

Aminosyre	Innhold av aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	50,6 ± 1,0	46,3 ± 1,7	48,4 ± 1,5	51,1 ± 5,5	51,7 ± 0,6
Glu	76,4 ± 2,6	71,8 ± 1,6	71,1 ± 2,8	80,2 ± 8,9	81,6 ± 1,2
His	10,6 ± 0,7	8,7 ± 0,9	6,7 ± 5,0	11,8 ± 1,3	11,3 ± 0,4
Ser	27,4 ± 1,1	25,0 ± 2,0	24,8 ± 0,9	20,5 ± 2,3	20,7 ± 0,4
Gln	4,40 ± 0,10	3,9 ± 0,4	3,4 ± 1,1	4,8 ± 0,8	4,7 ± 0,6
Gly/Arg	87,5 ± 2,7	81,3 ± 5,6	82,9 ± 1,5	84,9 ± 9,8	86,3 ± 1,4
Thr	24,8 ± 0,3	22,6 ± 1,2	25,1 ± 0,4	24,1 ± 2,7	25,1 ± 0,0
Ala	46,4 ± 1,4	44,2 ± 2,2	45,1 ± 1,7	43,0 ± 6,8	44,8 ± 0,3
Tyr	4,1 ± 3,3	4,6 ± 4,6	0,10 ± 0,10	10,4 ± 2,0	7,3 ± 6,3
Met	15,1 ± 0,7	12,1 ± 1,8	14,5 ± 0,7	15,7 ± 1,9	16,4 ± 0,7
Val	19,1 ± 0,4	18,5 ± 0,9	20,0 ± 0,8	21,5 ± 2,7	21,4 ± 0,4
Phe	16,6 ± 0,9	15,9 ± 0,7	14,9 ± 2,4	17,8 ± 2,0	18,1 ± 0,3
Ile	14,4 ± 0,3	13,7 ± 0,2	14,3 ± 0,8	16,5 ± 2,3	16,1 ± 0,5
Leu	33,6 ± 1,1	32,2 ± 1,2	32,2 ± 1,3	35,6 ± 3,9	35,5 ± 0,7
Lys	38,0 ± 1,0	33,9 ± 1,8	37,9 ± 1,2	41,3 ± 4,9	41,8 ± 0,5

Tabell E.7: Total aminosyresammensetning i råstoffet.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g råstoff)
	Råstoff
Asp	21,9 ± 2,8
Glu	27,9 ± 3,7
His	4,4 ± 0,8
Ser	6,4 ± 0,8
Gln	1,6 ± 0,2
Gly/Arg	23,6 ± 2,5
Thr	10,0 ± 1,2
Ala	15,1 ± 1,8
Tyr	5,0 ± 4,3
Met	6,3 ± 0,8
Val	10,3 ± 1,6
Phe	9,3 ± 1,2
Ile	8,3 ± 1,3
Leu	14,2 ± 1,9
Lys	17,6 ± 2,5

Frie aminosyrer

Sammensetning av frie aminosyrer ble bestemt i henhold til Osnes & Mohr (1985) og analysert ved HPLC. Først ble $\mu\text{g/ml}$ for hver aminosyre bestemt (ligning F.1), og deretter ble mg/g innveid prøve for hver aminosyre funnet (ligning F.2).

$$AA_1 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{M_w \cdot M_{\text{HPLC}}}{1000}. \quad (\text{F.1})$$

AA_1 er aminosyren ($\mu\text{g/ml}$), M_w er molekylvekten og M_{HPLC} er mengden aminosyre ($\mu\text{mol/l}$) funnet ved HPLC.

$$AA_1 \left(\frac{\text{mg}}{\text{g FPH}} \right) = \frac{AA_1 \cdot 1,25 \cdot V \cdot F}{1 \cdot 1000 \cdot m_s}. \quad (\text{F.2})$$

V er mengden destillert vann som ble brukt til å lage proteinekstraktet (10 ml), F er for-tynningen (1:50) og m_s er innveid prøve (g). Rådata for kontrollprøven (6 md., parallell 1) fra HPLC er gitt i tabell F.1. Verdiene i den siste kolonna ble brukt for å beregne mengde frie aminosyrer.

Tabell F.1: Rådata fra HPLC for kontrollprøven ved lagringstid 6 måneder.

Nr.	Amino- syre	Retensjons- tid [min]	Areal [mV · min]	Høyde [mV]	Relativt areal [%]	Relativ høyde [%]	Mengde [µmol/l]
1	Asp	1,487	31,187	296,068	1,95	3,58	6,3218
2	Glu	2,198	109,667	355,837	6,86	4,3	21,2598
3	Asn	3,245	0,866	6,387	0,05	0,08	0,2052
4	His	4,122	26,352	156,428	1,65	1,89	9,2157
5	Ser	4,377	60,624	324,826	3,79	3,93	14,8838
6	Gln	4,717	102,408	504,756	6,41	6,1	26,4943
7	Gly/Arg	7,322	318,593	995,278	19,93	12,04	30,3036
8	Thr	8,012	88,211	312,54	5,52	3,78	24,3041
9	Ala	12,483	243,736	913,978	15,25	11,05	65,4848
10	Tyr	14,293	37,107	222,504	2,32	2,69	9,0065
11	Met	17,935	71,657	514,375	4,48	6,22	15,4735
12	Val	18,19	122,569	920,095	7,67	11,13	23,2633
13	Phe	18,763	52,487	435,111	3,28	5,26	11,8255
14	Ile	19,73	68,35	534,357	4,28	6,46	13,1086
15	Leu	20,017	146,974	879,213	9,19	10,63	30,5936
16	Lys	21,84	66,153	548,802	4,14	6,64	17,0552

For eksempel ble Glu-innholdet i kontrollprøven etter 6 måneder beregnet slik (parallell 1a):

$$\text{Glu} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{129 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 21,2598 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}}{1000} = 2,743 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$
$$\text{Glu} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g FPH}} \right) = \frac{2,743 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 1,25 \cdot 10 \text{ ml} \cdot 50}{1 \cdot 1000 \cdot 0,4998 \text{ g}} = 3,43 \frac{\text{mg}}{\text{g FPH}}$$

For hvert hydrolysat ble det laget 2 prøver og 2 paralleller per prøve. Innholdet av Glu i parallell 1b, 2a og 2b ble henholdsvis 3,67 mg/g FPH, 3,46 mg/g FPH og 3,49 mg/g FPH. Dette ga et gjennomsnitt på 3,51 mg/g FPH. Standardavviket ble beregnet til å være 0,11 mg/g FPH ved hjelp av STDAV.S-funksjonen i Microsoft Excel 2020 (Microsoft, USA).

Tabell F.2, F.3, F.4, F.5 og F.6 viser sammensetningen av frie aminosyrer i hydrolysatene. Tabell F.7 viser sammensetningen av frie aminosyrer i råstoffet.

Tabell F.2: Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt askorbinsyre.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	0,63 ± 0,05	0,63 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,61 ± 0,08	0,71 ± 0,02
Glu	3,67 ± 0,08	6,07 ± 0,09	3,2 ± 0,2	4,04 ± 0,11	3,86 ± 0,08
His	1,39 ± 0,11	1,19 ± 0,04	1,25 ± 0,07	1,41 ± 0,11	1,25 ± 0,09
Ser	1,18 ± 0,06	1,03 ± 0,02	1,12 ± 0,09	0,92 ± 0,06	0,93 ± 0,05
Gln	3,4 ± 0,2	2,94 ± 0,02	3,22 ± 0,09	2,92 ± 0,06	2,63 ± 0,05
Gly/Arg	4,7 ± 0,3	4,14 ± 0,01	4,3 ± 0,2	4,11 ± 0,02	3,84 ± 0,04
Thr	2,7 ± 0,2	2,32 ± 0,05	2,5 ± 0,2	2,57 ± 0,06	2,56 ± 0,06
Ala	5,7 ± 0,3	5,32 ± 0,03	5,3 ± 0,4	5,46 ± 0,04	5,13 ± 0,08
Tyr	1,3 ± 0,3	1,43 ± 0,01	1,4 ± 0,2	1,47 ± 0,01	1,58 ± 0,05
Met	2,57 ± 0,13	2,08 ± 0,02	1,98 ± 0,06	2,2 ± 0,2	2,06 ± 0,05
Val	2,6 ± 0,2	2,45 ± 0,05	2,5 ± 0,2	2,59 ± 0,10	2,58 ± 0,09
Phe	2,04 ± 0,13	1,87 ± 0,09	1,9 ± 0,2	2,06 ± 0,06	2,06 ± 0,06
Ile	1,71 ± 0,12	1,41 ± 0,04	1,8 ± 0,3	1,78 ± 0,08	1,77 ± 0,05
Leu	5,0 ± 0,2	4,55 ± 0,04	4,4 ± 0,6	4,11 ± 0,05	4,05 ± 0,07
Lys	1,61 ± 0,12	1,38 ± 0,01	1,47 ± 0,08	1,70 ± 0,04	1,65 ± 0,03

Tabell F.3: Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt sitronsyre.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	0,67 ± 0,01	0,67 ± 0,03	0,62 ± 0,06	0,69 ± 0,03	0,78 ± 0,02
Glu	3,88 ± 0,04	3,58 ± 0,04	3,30 ± 0,14	3,68 ± 0,14	3,2 ± 0,2
His	0,71 ± 0,12	0,75 ± 0,13	0,72 ± 0,04	0,64 ± 0,07	1,37 ± 0,07
Ser	1,14 ± 0,07	0,99 ± 0,10	1,11 ± 0,06	0,91 ± 0,03	1,34 ± 0,05
Gln	3,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,10 ± 0,08	3,99 ± 0,12
Gly/Arg	4,47 ± 0,05	4,38 ± 0,08	4,2 ± 0,2	3,91 ± 0,06	4,44 ± 0,09
Thr	2,85 ± 0,07	2,67 ± 0,05	2,6 ± 0,2	2,74 ± 0,06	2,85 ± 0,11
Ala	5,67 ± 0,06	5,22 ± 0,08	5,4 ± 0,5	5,01 ± 0,10	5,62 ± 0,14
Tyr	0,98 ± 0,04	1,20 ± 0,03	1,6 ± 0,4	1,91 ± 0,07	1,71 ± 0,07
Met	2,58 ± 0,06	2,53 ± 0,03	2,42 ± 0,09	2,66 ± 0,11	2,4 ± 0,2
Val	2,78 ± 0,04	2,77 ± 0,05	2,58 ± 0,12	2,72 ± 0,09	2,76 ± 0,07
Phe	2,15 ± 0,08	2,17 ± 0,04	1,98 ± 0,12	2,21 ± 0,08	2,08 ± 0,10
Ile	1,77 ± 0,09	1,72 ± 0,08	1,67 ± 0,05	1,87 ± 0,06	1,71 ± 0,09
Leu	5,08 ± 0,08	4,95 ± 0,10	4,88 ± 0,09	4,10 ± 0,07	4,29 ± 0,12
Lys	0,90 ± 0,03	0,99 ± 0,03	0,93 ± 0,05	0,99 ± 0,06	2,1 ± 0,2

Tabell F.4: Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt propylgallat.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	0,88 ± 0,03	0,74 ± 0,06	0,85 ± 0,03	1,01 ± 0,10	0,80 ± 0,06
Glu	4,24 ± 0,14	3,7 ± 0,4	3,89 ± 0,09	4,59 ± 0,07	3,8 ± 0,2
His	1,52 ± 0,05	1,18 ± 0,10	1,30 ± 0,07	1,44 ± 0,08	1,22 ± 0,08
Ser	1,89 ± 0,03	1,52 ± 0,11	1,76 ± 0,06	1,54 ± 0,04	1,38 ± 0,05
Gln	4,93 ± 0,05	4,3 ± 0,5	4,88 ± 0,14	4,46 ± 0,13	3,89 ± 0,14
Gly/Arg	5,14 ± 0,14	4,4 ± 0,4	4,74 ± 0,10	4,12 ± 0,05	3,85 ± 0,07
Thr	3,2 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,24 ± 0,07	2,92 ± 0,11
Ala	6,15 ± 0,08	5,2 ± 0,5	5,8 ± 0,2	5,33 ± 0,12	5,01 ± 0,11
Tyr	1,7 ± 0,3	1,14 ± 0,06	1,75 ± 0,04	1,95 ± 0,07	1,80 ± 0,09
Met	2,57 ± 0,10	2,2 ± 0,2	2,43 ± 0,04	2,74 ± 0,08	2,6 ± 0,2
Val	2,95 ± 0,09	2,5 ± 0,2	2,67 ± 0,03	2,80 ± 0,10	2,6 ± 0,2
Phe	2,17 ± 0,06	1,8 ± 0,2	1,96 ± 0,03	2,24 ± 0,08	2,03 ± 0,09
Ile	1,78 ± 0,08	1,6 ± 0,2	1,66 ± 0,03	1,88 ± 0,08	1,77 ± 0,10
Leu	5,21 ± 0,08	4,5 ± 0,5	4,73 ± 0,08	4,02 ± 0,05	3,88 ± 0,08
Lys	2,28 ± 0,10	1,57 ± 0,13	2,01 ± 0,12	2,33 ± 0,11	2,08 ± 0,09

Tabell F.5: Sammensetning av frie aminosyrer i PH tilsatt BHT.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	0,81 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,83 ± 0,03	0,74 ± 0,04
Glu	4,11 ± 0,08	3,66 ± 0,03	3,58 ± 0,11	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2
His	1,18 ± 0,08	1,10 ± 0,02	1,10 ± 0,10	1,16 ± 0,06	1,13 ± 0,04
Ser	1,45 ± 0,05	1,14 ± 0,08	1,25 ± 0,11	1,18 ± 0,08	1,18 ± 0,08
Gln	3,88 ± 0,08	3,7 ± 0,2	3,60 ± 0,13	3,2 ± 0,2	3,8 ± 0,2
Gly/Arg	5,2 ± 0,3	4,83 ± 0,03	4,8 ± 0,2	4,52 ± 0,11	4,8 ± 0,3
Thr	2,9 ± 0,3	2,67 ± 0,01	2,7 ± 0,2	3,03 ± 0,13	3,0 ± 0,2
Ala	6,62 ± 0,13	5,49 ± 0,05	5,6 ± 0,5	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,2
Tyr	1,07 ± 0,11	1,22 ± 0,03	1,5 ± 0,3	1,89 ± 0,10	1,73 ± 0,10
Met	2,82 ± 0,06	2,65 ± 0,03	2,55 ± 0,07	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3
Val	3,14 ± 0,08	2,85 ± 0,07	2,81 ± 0,12	2,92 ± 0,10	2,91 ± 0,07
Phe	2,34 ± 0,07	2,18 ± 0,01	2,13 ± 0,12	2,39 ± 0,12	2,22 ± 0,12
Ile	1,9 ± 0,2	1,80 ± 0,05	1,67 ± 0,07	1,98 ± 0,08	1,9 ± 0,2
Leu	5,4 ± 0,2	4,98 ± 0,03	4,87 ± 0,13	4,38 ± 0,12	4,41 ± 0,12
Lys	1,32 ± 0,07	1,23 ± 0,02	1,20 ± 0,04	1,47 ± 0,02	1,31 ± 0,12

Tabell F.6: Sammensetning av frie aminosyrer i kontrollprøven.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g FPH)				
	0 (md.)	1 (md.)	2 (md.)	4 (md.)	6 (md.)
Asp	0,86 ± 0,09	0,83 ± 0,01	0,84 ± 0,02	0,87 ± 0,04	0,92 ± 0,03
Glu	3,96 ± 0,14	3,63 ± 0,09	3,52 ± 0,12	4,08 ± 0,12	3,51 ± 0,11
His	1,62 ± 0,05	1,44 ± 0,04	1,46 ± 0,06	1,48 ± 0,11	1,60 ± 0,13
Ser	1,63 ± 0,04	1,52 ± 0,09	1,67 ± 0,07	1,38 ± 0,05	1,61 ± 0,04
Gln	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,40 ± 0,06	4,35 ± 0,14
Gly/Arg	5,03 ± 0,11	4,6 ± 0,2	4,8 ± 0,2	4,16 ± 0,02	4,86 ± 0,06
Thr	2,96 ± 0,13	2,66 ± 0,10	2,75 ± 0,10	2,86 ± 0,06	3,09 ± 0,10
Ala	6,2 ± 0,2	5,15 ± 0,14	5,9 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,88 ± 0,09
Tyr	1,36 ± 0,04	1,34 ± 0,04	1,75 ± 0,05	1,76 ± 0,14	1,86 ± 0,05
Met	2,76 ± 0,05	2,27 ± 0,10	2,37 ± 0,11	2,6 ± 0,2	2,53 ± 0,07
Val	2,83 ± 0,12	2,68 ± 0,11	2,69 ± 0,06	2,69 ± 0,10	2,95 ± 0,09
Phe	2,19 ± 0,04	1,96 ± 0,11	2,00 ± 0,06	2,16 ± 0,07	2,20 ± 0,09
Ile	1,90 ± 0,11	1,6 ± 0,2	1,64 ± 0,07	1,82 ± 0,04	1,84 ± 0,04
Leu	5,1 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,78 ± 0,12	4,04 ± 0,07	4,32 ± 0,07
Lys	2,61 ± 0,06	2,4 ± 0,2	2,29 ± 0,10	2,7 ± 0,2	2,73 ± 0,05

Tabell F.7: Sammensetning av frie aminosyrer i råstoffet.

Aminosyre	Innhold av frie aminosyrer (mg/g råstoff)
	Råstoff
Asp	0,01 ± 0,00
Glu	0,21 ± 0,01
His	0,04 ± 0,01
Ser	0,02 ± 0,00
Gln	0,40 ± 0,02
Gly/Arg	0,20 ± 0,01
Thr	0,12 ± 0,01
Ala	0,31 ± 0,02
Tyr	0,05 ± 0,01
Met	0,04 ± 0,01
Val	0,07 ± 0,01
Phe	0,05 ± 0,00
Ile	0,04 ± 0,01
Leu	0,07 ± 0,01
Lys	0,03 ± 0,01

SH-grupper

Innholdet av tioler ble bestemt i henhold til Ellman (1959). Først ble konsentrasjonen av tioler (C_{tiol} , mol/l) bestemt (ligning G.1), før konsentrasjonen av proteiner (vannløselige proteiner, mg/ml) ble utregnet. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt med hensyn på resultatene fra Lowrys metode (fortynning 1:200).

$$C_{\text{tiol}} \text{ (mol/l)} = \frac{A \cdot V_{\text{kyvette}}}{b \cdot E \cdot V_{\text{prøve}}} \quad (\text{G.1})$$

A er absorbansen ved 412 nm, V_{kyvette} er totalt volum i kyvetten (1 ml), b er kyvettens bredde (1 cm), E er ekstinksjonskoeffisienten for TNB ($14290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) og $V_{\text{prøve}}$ er prøvevolumet i kyvetten (0,1 ml). Følgende ligning viser hvordan proteinkonsentrasjonen, C_{protein} , ble utregnet:

$$C_{\text{protein}} \text{ (mg/ml)} = \frac{m_s \cdot p_{\text{Lowry}} \cdot 1000}{V_{\text{dv}} \cdot 100} \quad (\text{G.2})$$

m_s er innveid prøve (g), p_{Lowry} er protein% våtvekt og V_{dv} er volumet destillert vann som ble blandet med prøven (10 ml). Til slutt ble mengde tioler (nmol per mg protein) (T) bestemt:

$$T \text{ (nmol/mg protein)} = \frac{C_{\text{tiol}}}{C_{\text{protein}}} \cdot 10^6 \quad (\text{G.3})$$

Prøvene ble lagd ved å blande ca. 0,1 g FPH og 10 ml destillert vann. Tabell G.1 viser absorbansen for kontrollprøven ved lagringstid 6 måneder.

Tabell G.1: Absorbans for kontrollprøven.

Parallell	Absorbans [412 nm]
1	0,065
2	0,074
3	0,067
Gjennomsnitt	0,069

For kontrollprøven (6 md.) var $m_s = 0,0998$ g og $p_{\text{Lowry}} = 64,7\%$. Mengde tioler (T) i kontrollprøven (6 md.) ble beregnet slik:

$$C_{\text{tiol}} = \frac{0,069 \cdot 1 \text{ ml}}{1 \text{ cm} \cdot 14290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 0,1 \text{ ml}} = 4,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l.}$$

$$C_{\text{protein}} = \frac{0,0998 \text{ g} \cdot 64,7 \cdot 1000}{10 \text{ ml} \cdot 100} = 6,457 \text{ mg/ml.}$$

$$T = \frac{4,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}}{6,457 \text{ mg/ml}} \cdot 10^6 = 7,4 \text{ nmol/mg protein.}$$

Usikkerhet

Først ble usikkerheten til absorbansen funnet ved bruk av STDAV.S-funksjonen i Microsoft Excel (Microsoft, USA). Usikkerheten til absorbansen til kontrollprøven (6 md.) ble 0,0047 (n = 3). Deretter ble usikkerheten til C_{tiol} beregnet:

$$C_{\text{tiol}} = \frac{0,0047 \cdot 1 \text{ ml}}{1 \text{ cm} \cdot 14290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 0,1 \text{ ml}} = 3,30 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l.}$$

Til slutt ble usikkerheten til T beregnet.

$$T = \frac{3,30 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}}{6,457 \text{ mg/ml}} \cdot 10^6 = 0,5 \text{ nmol/mg protein.}$$

Tabell G.2 viser mengden tioler (nmol/mg protein) i hydrolysatene og råstoffet.

Tabell G.2: Innhold av tioler i hydrolysatene og råstoffet.

Antioksidant	Mengde tioler [nmol/mg protein]				
	0 md.	1 md.	2 md.	4 md.	6 md.
Askorbinsyre	19,8 ± 0,4	18,34 ± 0,13	9,49 ± 0,18	9,6 ± 0,4	8,3 ± 0,4
Sitronsyre	26,2 ± 0,7	18,8 ± 0,7	13,7 ± 1,2	14,1 ± 1,1	7,4 ± 0,3
Propylgallat	25,6 ± 0,4	23,8 ± 0,6	21,5 ± 0,4	22,3 ± 0,6	23,2 ± 0,7
BHT	22,1 ± 0,6	13,5 ± 0,5	10,6 ± 0,3	10,1 ± 0,3	10,1 ± 0,4
Kontroll	18,8 ± 0,5	11,3 ± 0,3	7,3 ± 0,7	6,2 ± 0,5	7,4 ± 0,5
Råstoff	110,1 ± 1,5				

Vedlegg **H**

Molvektsfordeling

Størrelsen til peptidene i råstoffet og hydrolysatene ble bestemt ved FPLC. Først ble K_{av} -verdien til tre standarder (vitamin B₁₂, aprotinin og cytokrom c) beregnet ved følgende ligning:

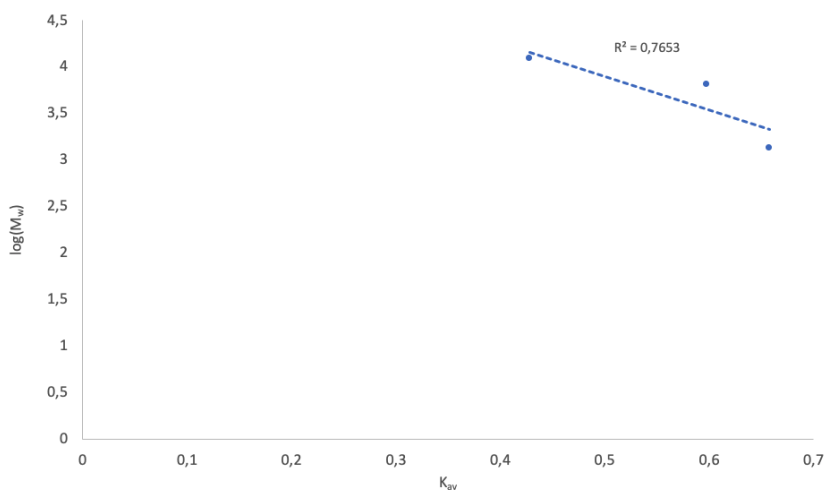
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}. \quad (\text{H.1})$$

K_{av} indikerer forholdet mellom elueringsvolumet til et molekyl og det totale volumet i kolonnen, V_e er elueringsvolumet, V_0 er void-volumet (8 ml) og V_t er kolonnevolumet (24 ml). Tabell H.1 viser molekylvekten og K_{av} -verdien til standardene.

Tabell H.1: Molekylvekt, elueringsvolum og K_{av} -verdien til vitamin B₁₂, aprotinin og cytokrom c.

Standard	Molekylvekt [Da]	V_e [ml]	K_{av}	$\log(M_w)$
Vitamin B ₁₂	1356	18,52	0,6575	3,132
Aprotinin	6511	17,56	0,5975	3,814
Cytokrom c	12384	14,85	0,4281	4,0929

Figur H.1 viser $\log(M_w)$ som en funksjon av K_{av} . Trendlinjen til standardkurven er gitt i ligning H.2.

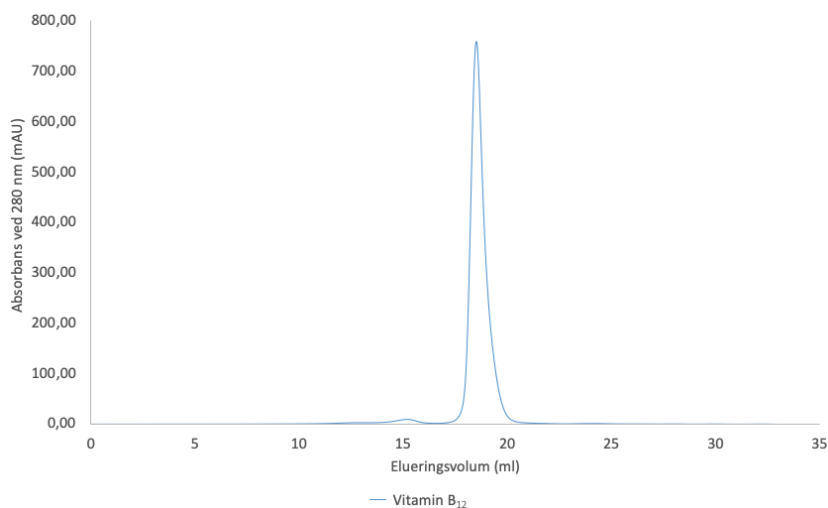


Figur H.1: Standardkurve basert på molekylvekten og elueringsvolumet til vitamin B₁₂, aprotinin og cytokrom c.

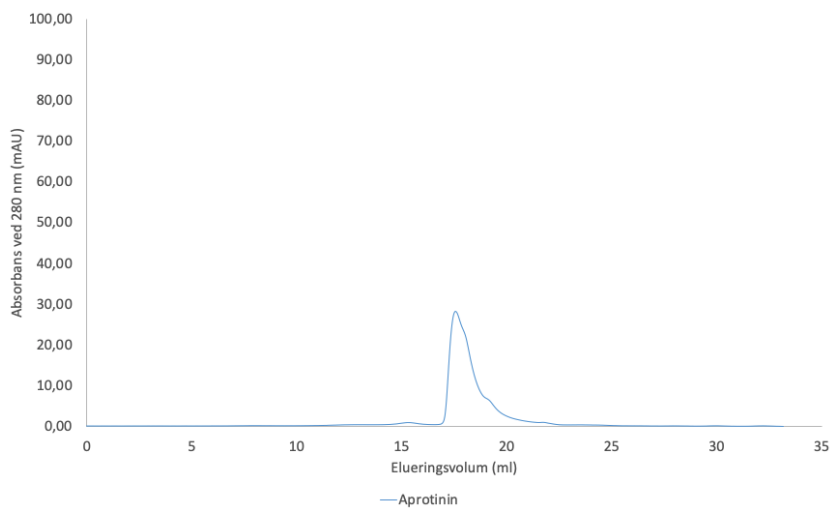
$$\log(M_w) = -3,6334 \cdot K_{av} + 5,7181. \quad (\text{H.2})$$

H.1 Kromatogram til standarder

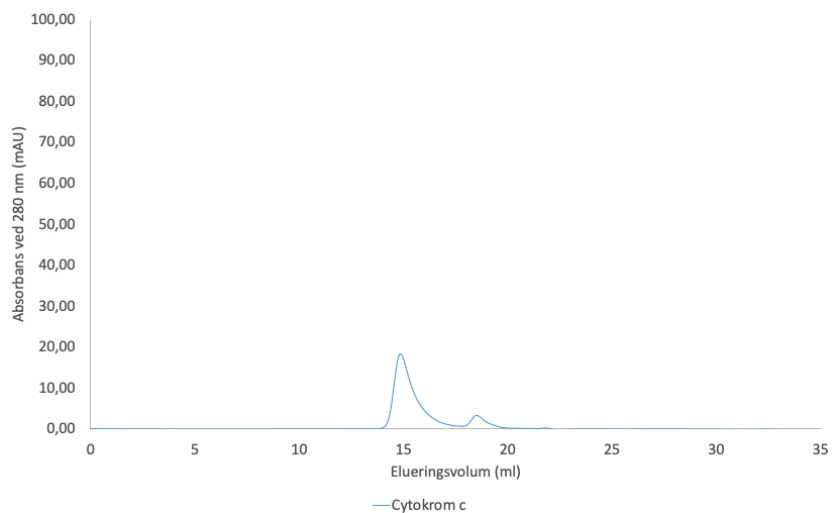
Figur H.2, H.3 og H.4 viser kromatogrammet til henholdsvis vitamin B₁₂, aprotinin og cytokrom c.



Figur H.2: Kromatogrammet til vitamin B₁₂.



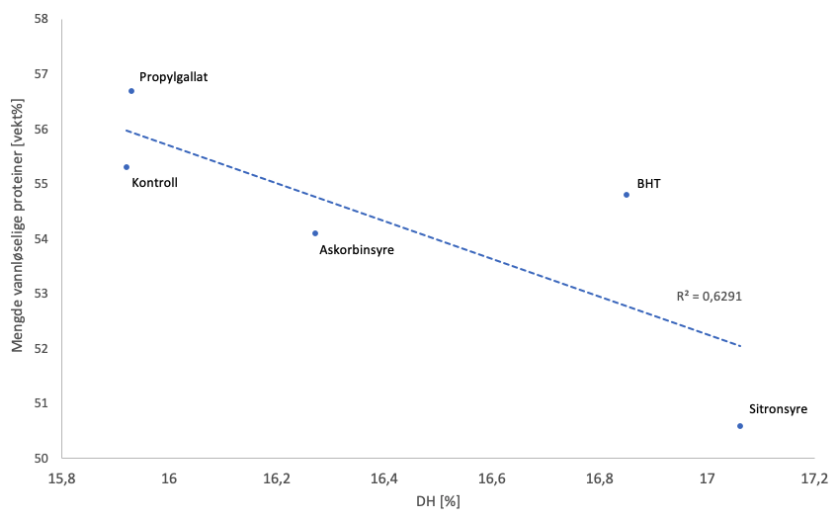
Figur H.3: Kromatogrammet til aprotinin.



Figur H.4: Kromatogrammet til cytokrom c.

Korrelasjon

Figur I.1 viser en negativ korrelasjon mellom hydrolysegrad og mengde vannløselige proteiner i hydrolysatene med uten antioksidanter (0 md., fortynnet 1:100).



Figur I.1: Sammenheng mellom hydrolysegrad og mengde vannløselige proteiner i hydrolysatene (0 md., fortynnet 1:100).

