



NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2021

20 studiepoeng

Utvikling av metoder for måling av antioksidativ kapasitet i fiskeproteinhydrolysat

utført av

Anette Isetorp Trandem

Ingunn Charlotte Ås

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matteknologi ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av oppgavens innhold skjer på eget ansvar.

Forord

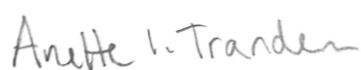
Arbeidet med denne oppgaven er utført ved studieprogram Matteknologi ved NTNU Institutt for bioteknologi og matvitenskap, og er finansiert av og utført ved NTNU Kalvskinnet i Trondheim. Arbeidet ble utført i tidsrommet januar til mai 2021. Perioden har vært svært lærerik i form av utfordringer knyttet til både det praktiske arbeidet på lab og samarbeidet i forbindelse med oppgaveskriving.

Vi vil rette en stor takk til våre veiledere Ida-Johanne Jensen og Marcin A. Kurek, som har bistått med god oppfølging og veiledning både ved laboratoriearbeid og oppgaveskriving. I tillegg er vi takknemlige for bistand fra Dat Trong Vu i forbindelse med forsøkene med ABTS-metoden.

Trondheim, 20.05.2021



Ingunn Charlotte Ås



Anette Isetorp Trandum

Sammendrag

Store mengder marint råstoff regnes i dag som svinn. Det er derfor interessant å se på hvilke antioksidative egenskaper ressursene har for å kunne benyttes i blant annet næringsmiddelindustrien i form av for eksempel tillaging av tran eller som tilsetninger. For å undersøke dette kan man benytte metoder som måler antioksidativ kapasitet. Målet med denne oppgaven var å utvikle og sammenligne metoder ved måling av antioksidativ aktivitet i to fiskeproteinhydrolysat av torskehode. Disse ble laget ved SINTEF Ocean i Trondheim i forbindelse med masteroppgaven «Marine Cod (*Gadus morhua*) Head Hydrolysates» skrevet av Margrethe Fossheim Ohnstad (Ohnstad, 2018). Fiskeproteinhydrolysatene ble analysert med metodene ABTS, DPPH og FRAP, og ble gjort for å forsøke å utvide standardkurvene til de ulike metodene. Analysen av hydrolysatene viste at de hadde en antioksidativ kapasitet på henholdsvis 20,31 μmol troloxequivalenter/g for fiskeproteinhydrolysat 1 og 19,91 μmol troloxequivalenter/g for fiskeproteinhydrolysat 2. Analyseringen av hydrolysatene var noe utfordrende da prøvene inneholdt mange partikler, som endret absorbansen i prøvene og lett sedimenterte til bunns. Sammenlignet med torskolje og hvalolje ble fiskeproteinhydrolysatene vurdert til å være noe høyere enn disse. Dette er trolig som følge av at fiskeproteinhydrolysatene er ett mer sammensatt produkt, som inneholder større deler av det som gjør torsken antioksidativ.

FRAP ble funnet å ha stabilt reagens i ett døgn, og Trolox standardkurven kan brukes med verdiene 0 μM , 31,25 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM og 1500 μM . ABTS ble vurdert til at ikke hadde stabilt nok reagens til at det bør stå over natten. Fra deg 1 til dag to endret absorbansen seg fra 0,788nm til 0,666nm, som i følge litteratur gjør at den kan brukes igjen, men dette bør analyseres videre. For standardkurven med propylgallat ble den vurdert som lineær og stabil med verdiene 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM og 70 μM . For trolox standardkurven ble den vurdert som stabil sammen med ABTS med verdiene verdiene 0 μM , 31,25 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , etter dette ble det en fullstendig reaksjon, som betyr at det er mer antioksidanter til stede enn ABTS reagenset kan måle. Felles for FRAP og ABTS analysen var at de begge holdt seg stabile over lengre inkuberingstid sammen med standardkurve, men når reagense reagerte lengre med fiskeproteinhydrolysatene så holdt ikke absorbansveriden seg stabil over tid. DPPH fikk ingen reaksjon med fiskeproteinhydrolysatet, trolig som følge av at hydrolysatet ikke var

sterkt nok til å reagere med DPPH, eller at partiklene inneholdt antioksidantene, og at disse forsvant fordi ble filtrert vekk før analysen.

Summary

Large amounts of marine by-products are considered as waste. This makes it interesting to investigate the antioxidative properties of these resources so that they can be used in the food industry as for example preparation of fish oil or food additives. To determine the antioxidative capacity, different methods can be used. In this thesis, two different fish protein hydrolysates made from cod head are used. They were made by SINTEF Ocean in Trondheim in conjunction with the master thesis

«Marine Cod (*Gadus morhua*) Head Hydrolysates» written by Margrethe Fossheim Ohnstad (Ohnstad, 2018).

The goal was to develop and compare methods of measurements of antioxidative activity in the two fish protein hydrolysates where the methods used were ABTS, DPPH and FRAP. This was done by trying to expand the standard curves in the different methods. The analyzes of the hydrolysates showed antioxidative capacity of respectively 20,31 μmol Trolox-equivalents/g in fish protein hydrolysate 1 and 19,91 μmol trolox-equivalents/g in fish protein hydrolysate 2. The analysis was a bit challenging as the samples contained a lot of particles, which had an impact on the absorbance and easily sedimented. The fish protein hydrolysates were considered to be a little higher compared with oil made from cod and whale. This is probably a result of fish protein hydrolysates being a more composite product containing bigger amounts of what makes the cod antioxidative.

FRAP were found to have a stable reagent after a day, and the Trolox standard curve can be used with the values 0 μM , 31,25 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM and 1500 μM . ABTS did not have a stable reagent after one day. The absorbance changed from 0,788 nm to 0,666 nm from the first to the second day, which in the theory makes it possible to use the reagent the next day, even though this should be analyzed further. The standard curve with propyl gallate was considered linear and stable with the values 0 μM , 31,25 μM , 62,5 μM , 125 μM and 250 μM . This made a complete reaction which shows that it was more antioxidants present than the ABTS-reagent is able to measure. Both the FRAP and ABTS analyzes retained stable with increased incubation time, while the absorbance did not keep stable over time when the fish protein hydrolysates reacted with the reagent. DPPH showed no reaction with the fish protein hydrolysate, most probably due to the hydrolysates not being strong enough to react with DPPH or due to some of the antioxidants remaining in the filter paper.

Ordliste

FPH	Fiskeproteinhydrolysat
TE	Trolox ekvivalenter
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

Innhold

Forord.....	1
Sammendrag	1
Summary	1
Ordliste.....	1
1 Innledning	1
2 Teori.....	1
2.1 Antioksidanter.....	1
2.2 Bruk av antioksidanter	2
2.3 Måling av antioksidanter og effektivisering av antioksidative metoder	3
2.4 Metoder for måling av antioksidativ kapasitet.....	3
2.4.1 ABTS	3
2.4.2 FRAP.....	4
2.4.3 DPPH	4
2.4.4 Hydrolysering	5
2.3 utfordringer med metodene	6
3 Materialer og metoder.....	7
3.1 Fiskeproteinhydrolysat som råstoff.....	7
3.2 FRAP (ferric reducing antioxidant power)	7
3.3 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))	10
3.3.1 Prosedyre for original standardkurve.....	10
3.3.2 Videre uttesting	10
3.4 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	12
4 Resultat og vurdering	13
4.1 Antioksidativ kapasitet i fiskeproteinhydrolysat	13
4.2 Utvikling av FRAP analyse	13
4.2.1 Utvidet inkuberingstid av Trolox standardkurve	13
4.2.2 Utvidet standardkurve	15
4.2.3 Stabilitet på reagens og standardkurve etter 1 døgn	16
4.3 DPPH	18
4.4 ABTS	18
4.4.1 Utvidet inkuberingstid	18
4.4.2 Utvidet standardkurve med propylgallat.....	21
4.4.3 Utvidet standardkurve med Trolox	21

4.4.4 Forandring av inkubasjonstid for «working solution» og «reaction solution»	22
4.5 Generelle problemstillinger for alle analysene	23
Konklusjon.....	
Kilder	

1 Innledning

Det blir stadig større interesse, både i Norge og globalt, for hvilke viktige verdiskapende ressurser som ligger i utnyttelse av marint restråstoff. Marint restråstoff kan defineres som alt som ikke regnes som hovedprodukt for videre utnyttelse, for eksempel rygg- og hodebein eller blod fra marine dyr (Myhre et. Al, 2020). Utnyttelse av restråstoff generelt kan bidra til en positiv utvikling sett i lys av FNs bærekraftsmål 2: utrydde sult, bærekraftsmål 9: industri, innovasjon og infrastruktur, bærekraftsmål 14: livet i havet og bærekraftsmål 12: ansvarlig forbruk og produksjon.

Målet med oppgaven var å utvikle metoder for måling av antioksidativ kapasitet, hvor hovedmålet var å teste og sammenligne metoder for måling av antioksidativ aktivitet i to fiskeproteinhydrolysat av torskehode. Herunder ble det satt delmål om å utvide standardkurvene brukt i metodene, og finne ut hvor lenge standardkurven holder seg lineær. Delmålene var å undersøke stabiliteten til reagensene som ble benyttet, og undersøke inkubasjonstiden for antioksidativ kapasitet for å kunne utvide standardkurvene og dermed gjøre de mer robuste og enklere ved analysering av prøver. For å undersøke dette ble det brukt tidsintervall og fortynninger som går utenfor oppskriftene til metodene. I tillegg ble det undersøkt hvilke konsentrasjoner av fiskeproteinhydrolysat som var egnet, og hvilke resultater høyere eller lavere konsentrasjoner ga.

Dersom man ser på måling av antioksidativ effekt i et mer langsiktig samfunnsperspektiv vil dette kunne gagne samfunnet som helhet ved bedre utnyttelse av ressursene, og for å vite hvilken nytteverdi restråstoff har er man avhengig av tilgang på metoder som kan måle egenskapene. Å eksperimentere med metoder som benyttes vil kunne bidra til at prosedyrene for å måle antioksidativ effekt blir mindre omfattende for forskere, og som en mulig ringvirkning av dette kan uttesting av restråstoff gjøres i større omfang enn i dag.

2 Teori

2.1 Antioksidanter

En oksidasjon er en kjemisk reaksjon som skjer når elektroner forflyttes eller forskyves fra et atom eller ion. Oksidasjon kan skje i metaller, mat og i menneskekroppen som

følge av naturlig metabolisme. Dette er en naturlig reaksjon, men det er ikke alltid ønsket. For eksempel vil oksidasjon bryte ned næringsmidler fortere (Finley & Given, 2002). En uønsket oksidasjon kan skje ved at frie radikaler angriper celler. Et fritt radikal er atomer med et uparet elektron. Disse er svært reaktive og oksiderer lett andre atomer og ioner (Gulcin, 2020).

Antioksidanter er en reduktant som lett gir fra seg elektroner og dermed oksideres selv for å hindre skader på celler som følge av frie radikaler. Ved reaksjon med et antioksidant vil antioksidantet donere et elektron til det frie radikalet slik at det ikke lenger er reaktivt. Dette skjer ved at antioksidantet oksideres og det frie radikalet reduseres, og kalles en redoks-reaksjon (Gulcin, 2020). Dersom et antioksidant ikke er tilgjengelig, vil det frie radikalet oksidere andre atomer eller ioner, også de som er tilstede i cellene i for eksempel menneskekroppen.

Oksidasjon som følge av frie radikaler skjer naturlig i celler, men om det blir for mye vil dette danne oksidativt stress der cellene oksideres for mye og kan føre til en rekke ulike uønskede sykdommer da det kan endre DNAet til cellene, øke sjansene for kreft og hjerte- og karsykdommer (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic & Mazur, 2005). Oksidativt stress skjer også i andre organismer som bakterier, dyr og planter, og ekstrakter og råvarer utvinnet fra disse, som for eksempel i fiskefilet eller rapsolje.

2.2 Bruk av antioksidanter

Antioksidanter er en viktig del av alle de kjemiske prosessene som foregår i biokjemiske forbindelser. I matindustrien brukes antioksidanter for å kunne produsere matvarer som har god kvalitet over lengre tid, der det brukes både kjemisk fremstilte og naturlige antioksidanter (Finley & Given, 2002). For å øke holdbarhet på for eksempel fiskekaker med høyt fettinnhold kan man tilsette antioksidanter for å hindre eller hemme harsking (Martinez et al, 2019). Harsking skjer som følge av at frie radikaler reagerer med et av hydrogenatomene i dobbeltbindingen på det umettede fett i fisken og bruker hydrogenatomene fra fett til å danne giftige aldehydforbindelser. Denne endringen av fett fører og til at fiskekaken får dårlig lukt, smak og næringsverdi (Jamrós & Kopel, 2020). Eksempler på naturlige antioksidanter er vitamin E og askorbinsyre (vitamin C), hvor den største kilden er frukt og grønnsaker. I matindustrien brukes det også kjemisk

fremstilte antioksidanter, der noen av de mest brukte er bytalated hydroksylanisol (BHA) og butylated hydroxytoulene (BHT) (Samotyja, 2019).

2.3 Måling av antioksidanter og effektivisering av antioksidative metoder

Ved å måle antioksidativ kapasitet på restråstoff kan man finne nye bruksområder på noe som i dag er en ubrukt ressurs. I dag går mye av ressursene fra fiskeindustrien til svinn, opptil 75% (Rustad, Storrø & Slizyte, 2011). Om det viser seg at det finnes en brukbar mengde antioksidanter i det som i dag regnes som svinn, som for eksempel torskehode, vil man kunne redusere det høye svinnet fra fiskeindustrien. For å kunne dokumentere at restråstoffene har antioksidative egenskaper må det foretas analyser for å finne det faktiske innholdet av antioksidanter.

Det finnes flere ulike metoder for å måle antioksidanter, blant annet FRAP, DPPH og ABTS. Disse metodene har ulike reaktanter og begrensende faktorer, som for eksempel inkuberingstid eller mengden antioksidanter de kan reagere med. Å effektivisere metodene og gjøre de mer fleksible vil kunne ha positiv virkning i form av tiden og ressursene som legges ned i bruken av disse metodene. Metoder som er enkle og effektive å bruke kan gjøre det lettere å måle flere typer restråstoff for antioksidativ aktivitet.

2.4 Metoder for måling av antioksidativ kapasitet

For å måle antioksidativ kapasitet i et næringsmiddel kan man benytte flere ulike metoder, som for eksempel ABTS, FRAP og DPPH, hvor målet er det samme mens prinsippet for metodene er ulik. Mekanismen skjer ved elektronoverføring eller overføring av hydrogenatomer, hvor reduseringspotensialet til antioksidantene måles (Xiao, Xu, Lu & Liu, 2020).

2.4.1 ABTS

ABTS er en metode for måling av antioksidativ kapasitet hvor man bruker ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) som er et reaktivt reagens som vil reduseres ved reaksjon med antioksidanter (Gulcin, 2020). ABTS brukes sammen med potassium persulfat ($K_2S_2O_8$) for å danne en blågrønn kromofor del i ABTS

sitt molekyl som gjør at ABTS-reagensets kromofor, altså fargen, endres på grunn av reduksjon som opptrer når antioksidanter er til stede (Re et al., 1998).

Siden kromoforomet endres kan det brukes et spektrofotometer for å finne verdien av antioksidanter til stede i en prøve. Absorbansverdien i en prøve uten antioksidanter er høy, og absorbansverdien vil reduseres dersom ABTS-reagenset reagerer med antioksidanter. En prøve målt til en lav absorbansverdi har høyere andel antioksidanter enn prøve målt til høy absorbansverdi. Reduksjonen av ABTS vil fortsette over tid og metoden er derfor tidssensitiv.

Den mest brukte og dokumenterte inkubasjonstiden på prøve sammen med ABTS er mellom 4-6 minutter på en refraktorverdi på maksimum 413 nm eller 734 nm (Prior, Wu & Schaich, 2005). For å finne verdi antioksidanter i prøvene man vil analysere, sammenligner man ett stoff man allerede vet antioksidantverdien på, som for eksempel Trolox (vitamin E) og Propylgallat (E310) (Garrido, Garrido & Borges, 2011).

2.4.2 FRAP

FRAP er en forkortelse for Ferric Reducing Antioxidant Power, og som navnet tilsier er dette en analyse hvor reaksjonen skjer som følge av reduksjon av jern fra Fe^{3+} til Fe^{2+} . Metoden måler antioksidanters reduksjon av komplekset ferric tripyridyltriazine (TPTZ) til et jernholdig kompleks som ved reduksjon får en blå farge. I motsetning til andre metoder som måler antioksidativ kapasitet må pH i mediet være syrlig, helst med en pH på rundt 3,6 for at elektronoverføring skal skje. Den antioksidative aktiviteten bestemmes basert på økningen i absorbans ved 593 nm (Shahidi & Ho, 2007).

2.4.3 DPPH

DPPH er et stabilt fritt radikal som vil reduseres dersom den finnes i nærvær av antioksidanter som gir fra seg et hydrogenatom eller elektron (Njoya, 2021). Delokaliseringen av elektroner er årsaken til at man får en fiolett farge i etanolløsningen, og styrken på fargen vil være proporsjonal med mengden antioksidanter. Når DPPH-løsningen tilsettes substrat som fungerer som donor ved å gi ifra seg et

hydrogenatom, vil DPPH reduseres og den fiolette fargen blir svakere. Når DPPH reduseres ved tilsetning av et substrat vil det frie radikalet nøytraliseres og ikke lenger være reaktivt (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2012).

For å kunne bestemme den antioksidative kapasiteten ser man altså på endring i optisk tetthet av DPPH-radikaler. Endringen kan man se ved å måle absorbansen i et spektrofotometer ved 517 nm både før reaksjonen starter og 30 minutter etter. Deretter kan prosentandelen av hemmede DPPH-radikaler beregnes (Kedare & Singh, 2011).

2.4.4 Hydrolysering

Proteinhydrolysat inneholder bioaktive peptider, noe som utnyttes ved bruk av enzymatisk hydrolysering. Hydrolysering av proteiner skjer hovedsakelig kjemisk eller enzymatisk. Den kjemiske metoden kan føre til blant annet tap av cystein og serin, i tillegg til dannelse av toksiske forbindelser. Dette gjør at enzymatisk hydrolysering ofte anses som et bedre alternativ, også fordi metoden er mer effektiv, og metoden benyttes derfor ofte i produksjon av hydrolysat fra blant annet bi-produkter av fisk (Yang, Hu, Jiang, Xu & Xia, 2016).

Enzymatisk hydrolysering av proteiner i restråstoff som for eksempel bein eller skinn av fisk skjer ved at proteinbindingene i råstoffet brytes ned til peptider ved hjelp av enzymer. Råstoffet tilsettes først vann og enzymer. Deretter inaktiveres enzymene ved bruk av varme før hydrolysatet sentrifugeres slik at man får en vannfase som til slutt tas ut og tørkes slik at man får et hydrolysatpulver (Ohnstad, 2018). Bioaktiviteten i hydrolysatet påvirkes av forhold som blant annet pH, tid og temperatur og type proteiner (Yang et al., 2016).

Proteinhydrolysat inneholder flere ulike proteiner som har ulike egenskaper med tanke på blant annet polaritet og størrelse, hvilket gjør at metoden som benyttes ved hydrolysering kan påvirke effekten av hydrolysen og den antioksidative aktiviteten, da det blant annet har innvirkning på løseligheten i prøven. Forsøk gjort av karpefisk har vist at finpulverisering av proteinhydrolysatet ga høyere hydrolyseeffektivitet (Yang et al., 2016). Den antioksidative aktiviteten i fiskehydrolysat kan altså påvirkes av hydrolysatets molekylærvekt, hvor antioksidativ effekt vil være sterkere desto lavere molekylærvekt. Graden av hydrolyse påvirker derfor molekylvekten, i tillegg til hvor hydrofob de er og ladningen på peptidene. (Gao et al., 2021).

2.3 Utfordringer med metodene

Metodene som benyttes har ulike styrker og svakheter. En svakhet som gjelder alle metodene er at aktiviteten vil være avhengig av typen antioksidanter og mediet som benyttes. Ulike antioksidanter vil reagere ulikt med radikaler. Dette fører til at ingen av metodene vil kunne representere reaksjonsmekanismen hos alle radikaler eller antioksidanter. Det er derfor en mulighet for at den totale kapasiteten ikke representeres i prøven siden metodene har ulike prosedyrer (Karadag, Ozcelik & Saner, 2009).

pH og reaksjonstid er faktorer som har stor innvirkning på analysene. Ved bruk av ABTS-metoden brukes ofte en inkubasjonstid på ca. 6 minutter, samtidig som det av forskere diskuteres hvilken inkuberingstid som er mest optimal. Selv om tidligere forsøk har vist at Trolox i seg selv vil nå et stabilt stadie etter 6 minutter, uavhengig av pH, vil reaksjonstiden vil være mye mer avhengig av pH ved enkelte aminosyrer til stede, hvor tilsetning av prøver med antioksidanter i noen tilfeller kan føre til at det ikke oppnås et stabilt stadie før opp til en time. Dette gjør at resultatene kan være varierte basert på inkuberingstiden (Zheng, Zhao, Xiao, Zhao & Su, 2016; Walker & Everette, 2009).

Metodene kan være vanskelige å sammenlikne mot hverandre på grunn av ulike mekanismer i hver metode, potensiale for reduksjon/oksidasjon, pH-forhold og løsningsene som er benyttet (Apak et al., 2013). Ved analysing av antioksidativ aktivitet i næringsmiddel kan FRAP-metoden være en utfordring siden prøven allerede inneholder kompleksdannere som binder Fe^{3+} . Dermed vil komplekset kunne reagere med antioksidantene i stedet for at antioksidantene reagerer med FRAP-reagenset. En annen utfordring kan være analysetiden, da reaksjonstiden mellom TPTZ og antioksidantene kan variere for de ulike antioksidantene (Shahidi & Ho, 2007).

Ved bruk av DPPH vil pH, tilgang på oksygen og spesielt eksponering for lys være avgjørende for resultatene av absorbansmålinger (Karaçelik et al., 2014). Også ABTS er sensitiv for lys og det er derfor særlig viktig å sørge for at løsningene oppbevares mørkt (Sharma & Bhat, 2008).

3 Materialer og metoder

3.1 Fiskeproteinhydrolysat som råstoff

Tabell 1: Detaljer om fiskeproteinhydrolysat FPH1 og FPH2

Fiskeproteinhydrolysat 1 (FPH1)	Fiskeproteinhydrolysat 2 (FPH2)
Torskehode, hydrolysert februar 2017	Torskehode, hydrolysert mars 2017
Oppfattelse: Mer klumpete/bløtt	Oppfattelse: Mer tørt
11,24% hydrolysert	10,87% hydrolysert
2,84 mg protein/ml	1,01 mg protein/ml
Enzymer: Papin (fra papaya) + Bromelain (fra ananas)	
0,1% enzym konsentrasjon	
300 kg vann	
Lagret ved -20°C	

I tabell 1 kan man se hvilke to fiskeproteinhydrolysat (FPH) som er brukt, kalt fiskeproteinhydrolysat 1 og fiskeproteinhydrolysat 2. Hydrolysatene ble laget i forbindelse med masteroppgaven «Marine Cod (*Gadus morhua*) Head Hydrolysates» skrevet av Margrethe Fossheim Ohnstad.

Hydrolysatene inneholder enzymene Bromelain og Papin. Bromelain er et ekstrakt som opprinnelig kommer fra ananas, og benyttes for å hydrolysere proteinene til mindre peptider. Papain har mange av de samme effektene som bromelain, men er mindre sensitiv for pH og temperaturforandringer (Choi, W, M., Lam, C, L., Mo, W, Y., & Wong M, H., 2016).

Det ble benyttet tre ulike analysemetoder; FRAP, DPPH og ABTS.

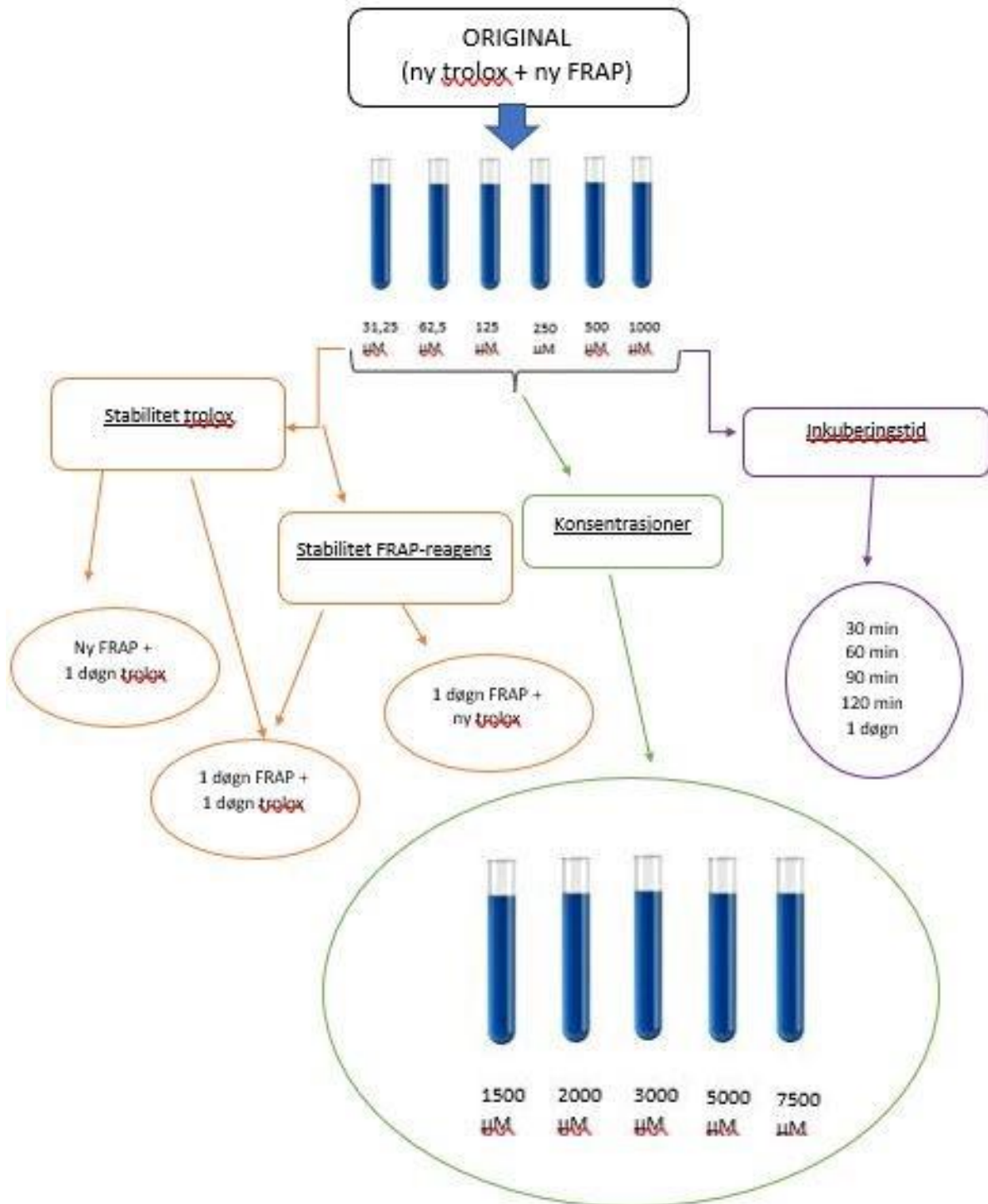
3.2 FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Det ble først tillaget FRAP-reagens som bestod av 19 mM jern-løsning (Fe 3 klorid-6-hydrat), 10 mM TPTZ-løsning (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazine) i 40 mM HCl) og acetatbuffer (1,505 g natriumacetat (C₂H₃NaO₂) + 8 mL eddiksyrer og justert opp til 500 mL med dH₂O). Figur 3.1 viser forsøksdesign for analysen. En mikroplate med 10 µL prøve ble tilsatt 30 µL dH₂O og 300 µL FRAP-reagens. Deretter ble mikroplaten inkubert i 30 minutter ved 37 °C for videre spektrofotometrisk måling ved 593 nm. Trolox ble brukt som standard med konsentrasjoner på 31,25-1000 µM. Figur 3.1.

Det ble først blandet Trolox 97 % løst i metanol til en konsentrasjon på 100000 μM . Deretter ble Trolox-løsningen og dH_2O tilsatt i reagensrør for en sluttkonsentrasjon på 1000 μM . Fra denne konsentrasjonen ble det laget en fortynningsrekke ned til 31,25 μM

Fiskehydrolysat 1 og 2 ble løst i dH_2O til konsentrasjon 10mg/mL, 25 mg/mL og 50 mg/mL. Det ble pipettert ut 3 paralleller for alle prøver unntatt nullprøven.

UTTESTING AV PARAMETRE



Figur 3.1: Forsøksdesign for utvikling av FRAP- metode med oversikt over hvilke parametere som ble analysert

3.3 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

3.3.1 Prosedyre for original standardkurve

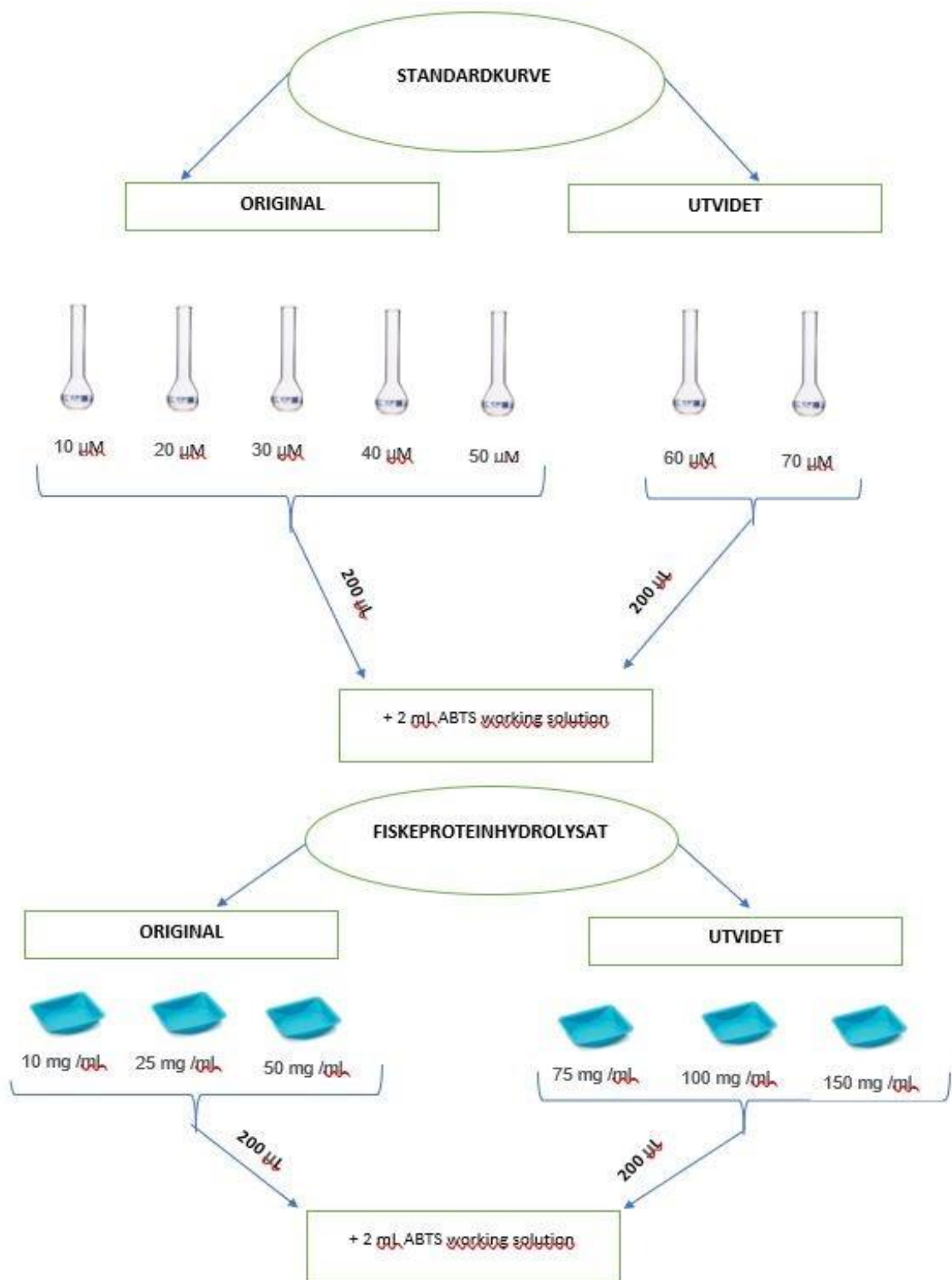
Figur 3.2 viser forsøksdesign for gjennomføring av ABTS analyse, som videre beskrives.

Ved tillaging av standardkurve ble først en ABTS working solution laget ved å fortynne ABTS reaksjonsløsning 1:90, hvor 1 mL ABTS reaksjonsløsning ble tilsatt til 89 mL 80 % metanol. Deretter ble absorbansen målt ved 734 nm og løsningen ytterligere fortynnet med metanol for å komme ned på en absorbans mellom 0,7-0,8.

Det ble laget propylgallat standardløsninger på 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM og 50 μM ved å løse 10-50 μL propylgallat stock løsning i 80 % metanol til et sluttvolum på 10 mL. 200 μL av hver konsentrasjon av propylgallat-løsningene + 2 mL ABTS working solution ble tilsatt i kyvetter og satt til inkubering i romtemperatur i 6 minutter før absorbansen ble avlest.

3.3.2 Videre uttesting

Den originale standardkurven ble utvidet med konsentrasjoner på 60 μM og 70 μM . Råstoffet, to fiskeproteinhydrolysat, ble utveid til 75 mg, 100 mg og 150 mg, i tillegg til de originale mengdene som i utgangspunktet var 10 mg, 25 mg og 50 mg.



Figur 3.2: forsøksdesign med oversikt over hva som ble analysert

3.4 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Det ble først laget en stock-løsning ved å blande metanol med to ulike fiskeproteinhydrolysat for å oppnå en løsning med 1 mg fiskeproteinhydrolysat/mL metanol. Deretter ble det laget 5 konsentrasjoner fra 50 µg/mL til 750 µg/mL. DPPH-løsningen ble laget ved å tilsette 0,1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) til metanol for et samlet volum på 250 mL. Løsningen ble satt mørkt under lagring.

0,5 mL av hydrolysatløsningene ble pipettert over til et reagensrør på 15 mL. I to av rørene ble det tilsatt 0,5 mL metanol. 3 mL DPPH-løsning ble så tilsatt alle rørene.

Videre ble rørene vortexet og satt mørkt i 30 min før avlesning av absorpsjon ved 515 nm, mot metanol som blankprøve. En kalibreringskurve av Trolox-ekvivalenter ble laget med standarder med konsentrasjoner fra 1 µg stock-løsning/mL metanol til 50 µg/mL. Stock-løsningen hadde konsentrasjon på 100 µg/mL.

4 Resultat og vurdering

4.1 Antioksidativ kapasitet i fiskeproteinhydrolysat

4.2 Utvikling av FRAP analyse

4.2.1 Utvidet inkuberingstid av Trolox standardkurve

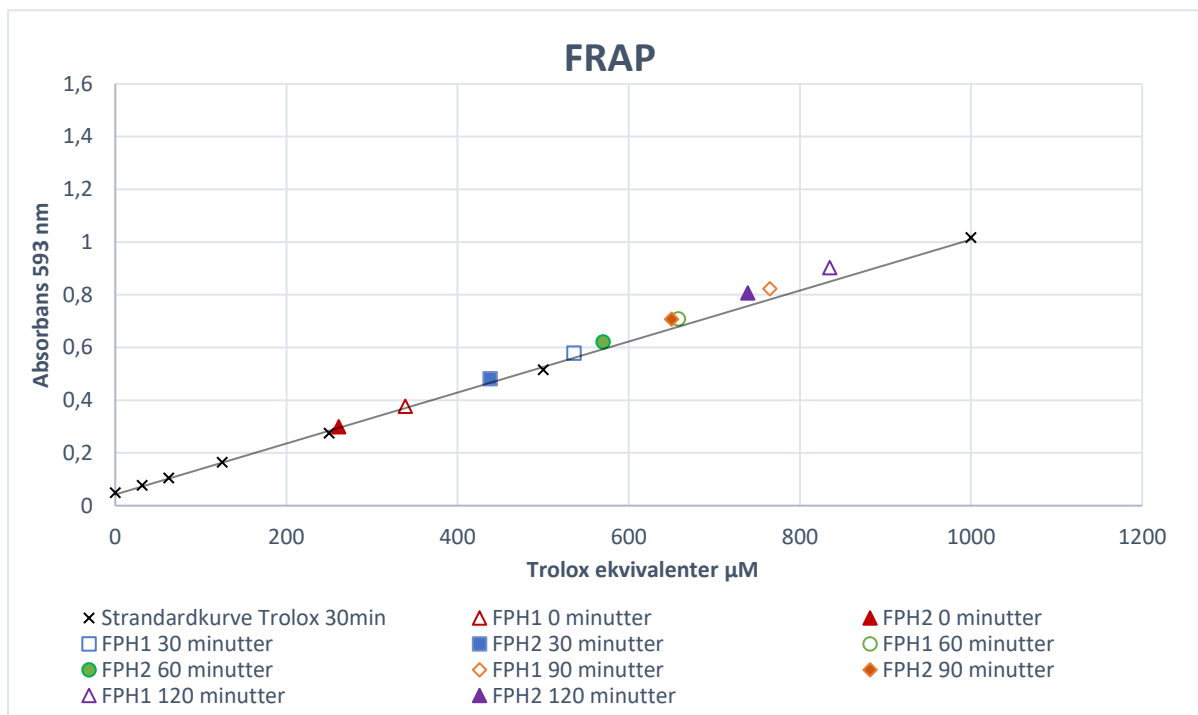
For å undersøke effekten av inkuberingstid ble Trolox og ferric reducing antioxidant power (FRAP)-reagens inkubert i 0 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter, 120 minutter og ved 1 døgn. *Tabell 4.1* viser likningene for trendlinjen for Trolox i FRAP-analysen for ulike inkuberingstidene 0 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter, 120 minutter og ved 1 døgn. Ved 0 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter og 120 minutter er R verdien og stigningstallet den samme, som indikerer absorbansverdiene for standardkurven ligger linjert. Krysningstallet på y-aksen endres noe for disse inkuberingstidene, men de ligger fortsatt linjert. Etter 1 døgn endres R-tallet, noe som indikerer at standardkurven ikke har holdt seg stabil. Veien videre kan være at standardkurven analyseres etter 120 minutter, da absorbansverdiene frem til dette har holdt seg stabile, og det er derfor ikke utenkelig at den vil holde seg stabil over lenger tidsintervall. Det er noen forskjeller i absorbansverdiene som kommer over tid selv om standardkurven er stabil, så det er viktig å notere ned tidspunkt for måling av standardkurven.

I figur 4.4 kan man se FPH ved ulike inkuberingstider. De ulike inkuberingstidene gir ulike absorbansverdi, og ettersom tiden går øker absorbansverdien for FPH. og det var tydelig at den antioksidative aktiviteten målt ved FRAP ikke holdt seg stabil med FPH. Det vil derfor være viktig å følge litteraturen ved bruk av FRAP analyse, der det vises til at inkuberingstiden skal være 30 minutter.

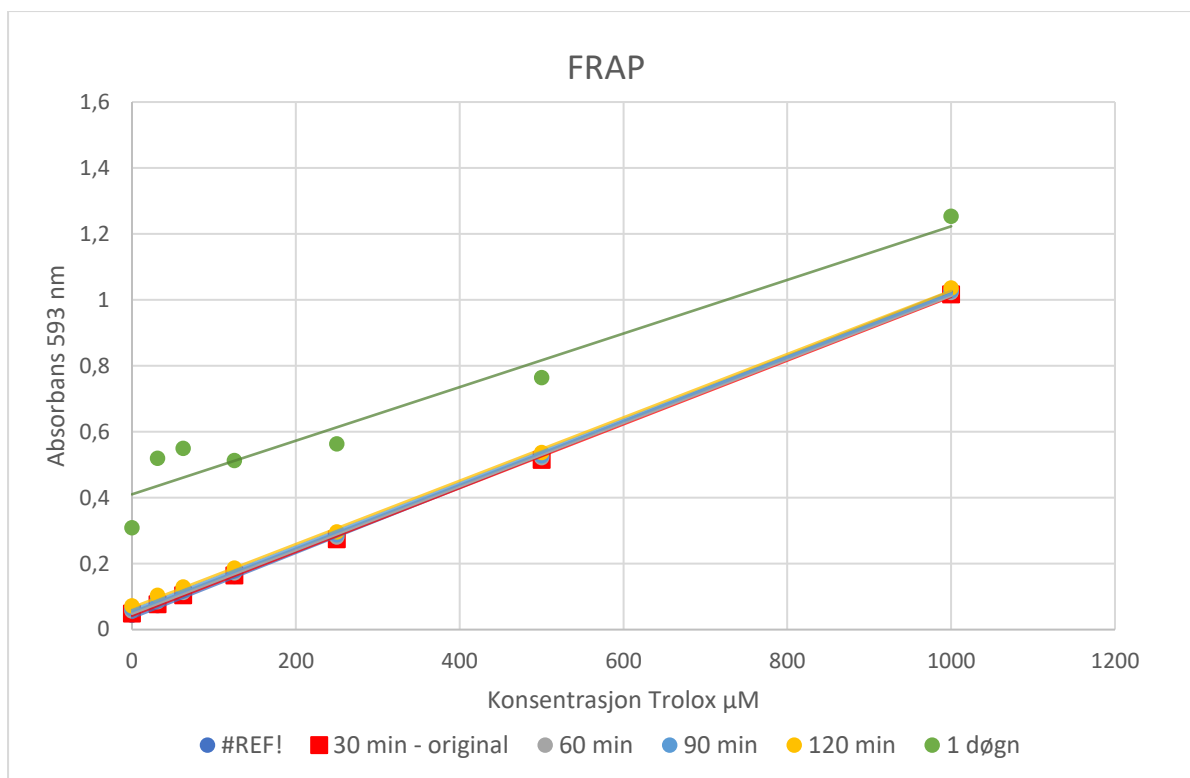
Tabell 4.1: Likning og R-Verdi for ulike inkuberingstider av Trolox standardkurve i FRAP analyse.

Inkuberingstid Trolox	Likning	R-verdi
0 minutter	$y = 0,001x + 0,0423$	0,9995
30 minutter	$y = 0,001x + 0,0374$	0,9995
60 minutter	$y = 0,001x + 0,0503$	0,9995

90 minutter	$y = 0,001x + 0,0573$	0,9995
120 minutter	$y = 0,001x + 0,0671$	0,9995
1 døgn	$y = 0,0008x + 0,4103$	0,9425



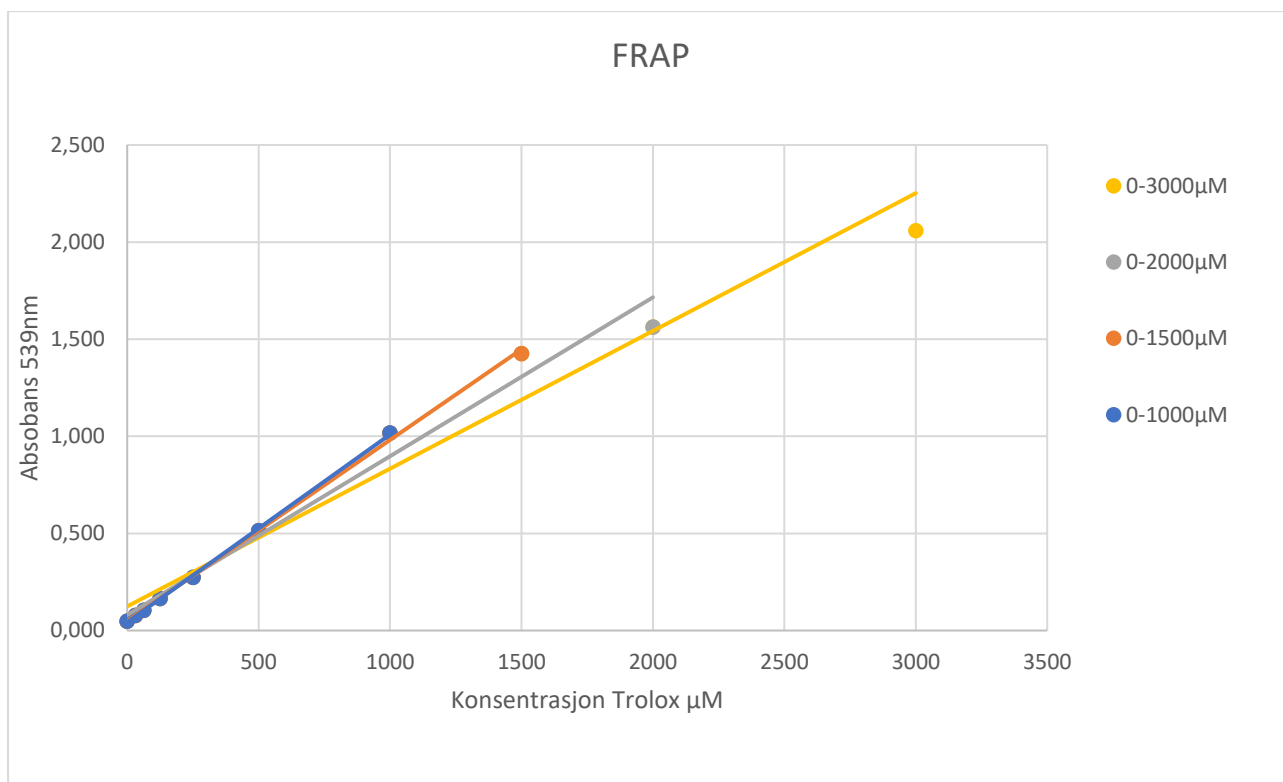
Figur 4.4: Ferric reducing antioxidant power (FRAP) analyse, stabilitet på firskeporteinhydrolysat FPH1 25 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O og FPH2 25 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O ved inkuberingstidene 0 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter og 120 minutter. Sammenlignet mot standardkurve Trolox 30 minutter. * $\mu\text{M} = \mu\text{g/ml}$ dH₂O for FPH i fremstillingen.



Figur 4.5: Ferric reducing antioxidant power (FRAP) analyse forlenget inkuberingstid, med Trolox standardkurve på 0 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter, 120 minutter og 1 døgn.

4.2.2 Utvidet standardkurve

Ved FRAP analyse ble standardkurven med Trolox analysert for å finne hvor langt standardkurven var lineær. Figur 6 viser analyse med Trolox verdiene 0 µM, 31,25 µM, 62,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM og 1000 µM viser at standardkurven er lineær med R-verdi 0,9995. Ved videre testing ble også verdien 1500µM analysert, denne lå også lineært i standardkurven med R-verdi 0,999. Det skal dermed gå fint å ta med denne verdien i en videre analyse. Ved bruk av 2000µM og 3000µM endret R-verdien seg til 0,981 og 0,9698, dette indikerer at standardkurven ikke holdt seg stabil og burde ikke brukes i videre analyser.



Figur 4.6: Ferric reducing antioxidant power (FRAP) analyse, stabilitet på Trolox standardkurve med intervallet 0µM, 31,25µM, 62,5µM, 125µM, 250µM, 500µM og 1000µM Troloxequivalenter. 0µM-1500µM, 0µM-2000µM og 0µM-3000µM Troloxequivalenter.

Tabell 4.2: Linking og R-Verdi for utvidelse av Trolox standardkurve

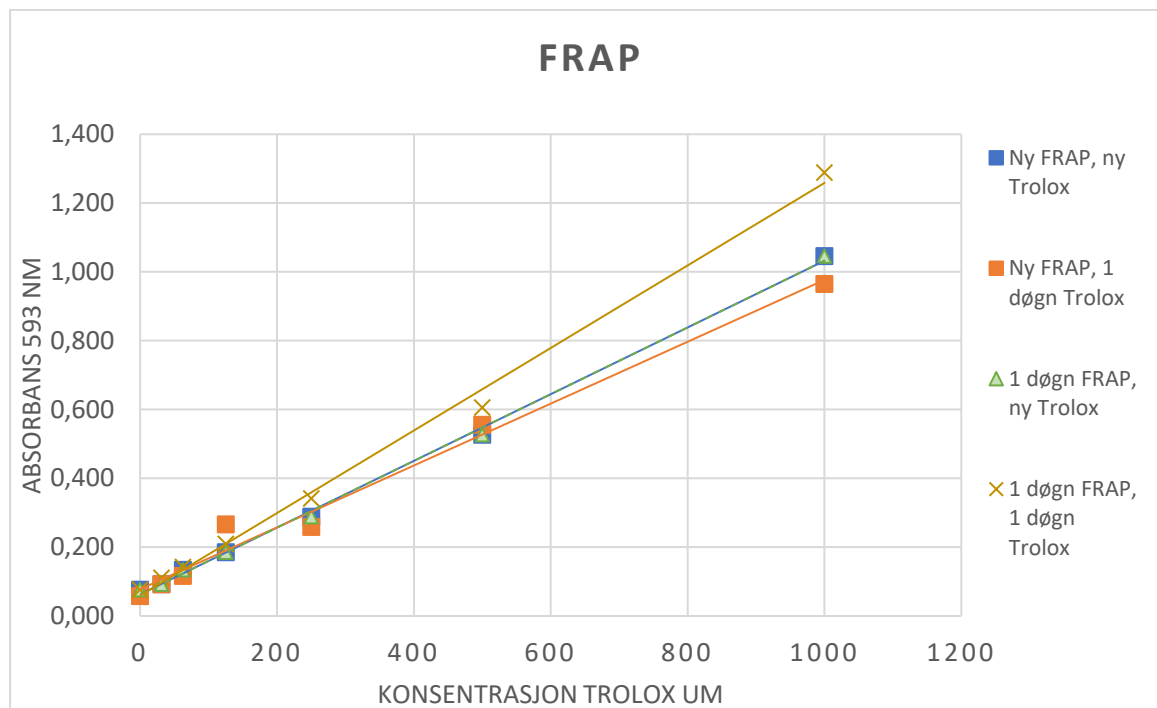
Verdier for utvidelse Trolox standardkurve	Linkning	R verdi
0-1000µM	$Y=0,0010x+0,0423$	0,9995
0-1500µM	$Y= 0,0009x+0,0489$	0,9990
0-2000µM	$Y= 0,0008x+0,0796$	0,9810
0-3000µM	$Y=0,0007x+0,1241$	0,9698

4.2.3 Stabilitet på reagens og standardkurve etter 1 døgn

I oppgaven har også stabiliteten på FRAP reagensen og Trolox standardkurven blitt analysert. Det har blitt sett på en sammenligning mellom gjenbruk av FRAP-reagens etter ett døgn og gjenbruk av Trolox etter et døgn, som kan sees i figur 4.7 og i tabell 4.3.

Standardkurven i ett døgn gammel FRAP-reagens og ny Trolox er identisk med standardkurven i ny FRAP og ny Trolox, og R-tallet for begge disse er 0,9983, og stigningstallet 0,001. Dette viser at det ikke skal være problematisk å benytte ett søgn

gammel FRAP-løsning. Ved bruk av gammel Trolox med ny FRAP-løsning følger ikke punktene en lineær trendlinje, og Trolox løsningene har tilsynelatende ikke holdt seg stabile etter ett døgn. Trolox-løsningene sto ferdig fortynnet i reagensrør med lokk over natten i kjøleskap. Stokkløsningen på 100.000 μ M ble ikke fortynnet på nytt, og det kan hende denne hadde holdt seg mer stabil enn fortynningene og er noe som kunne blitt sett videre på. 1 døgn gammel FRAP og 1 døgn gammel Trolox ble ikke lineær, sannsynligvis på grunn av den 1 døgn gamle Trolox løsningen.



Figur 4.7: FRAP analyse, måling av stabilitet på 1 døgn gammel Trolox og FRAP reagens, med sammenligning mellom de ulike punkt. Trolox har for alle analysene verdiene 0 μ M, 31,25 μ M, 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M og 1000 μ M.

Tabell 4.3: FRAP analyse, formel og R verdi for de ulike reagensene og Trolox standardkurve.

Reagens	Formel	R verdi
Ny FRAP, ny Trolox	$Y=0,001x+0,063$	0,9983
Ny FRAP, 1 døgn Trolox	$Y=0,0009x+0,0777$	0,9852
1 døgn FRAP, ny Trolox	$Y=0,001x+0,063$	0,9983
1 døgn FRAP, 1 døgn Trolox	$Y=0,0012x+0,0593$	0,9959

4.3 DPPH

Det var ingen synlig reaksjon på FPH ved bruk av DPPH, som man kan se i tabell 4.4 der alle verdiene er nærmest uendret. En grunn til dette kan være at de delene av hydrolysatet som har de antioksidative egenskapene sitter i partiklene som ble filtrert vekk. En annen årsak kan være slik som Bondet et al. og Huang et al har spekulert i om lav absorpsjon ved bruk av DPPH kan skyldes at nitrogenradikalene i DPPH er såpass stabile at antioksidantene får vanskeligheter med å redusere disse. Reaksjonen er også reversibel, slik at redusert DPPH reverseres til et radikal igjen, men dette ble ikke observert ved analysen.

Tabell 4.4 Antioksidativ kapasitet målt ved DPPH i fiskeproteinhydrolysat (FPH1 og FPH2) og % hemming.

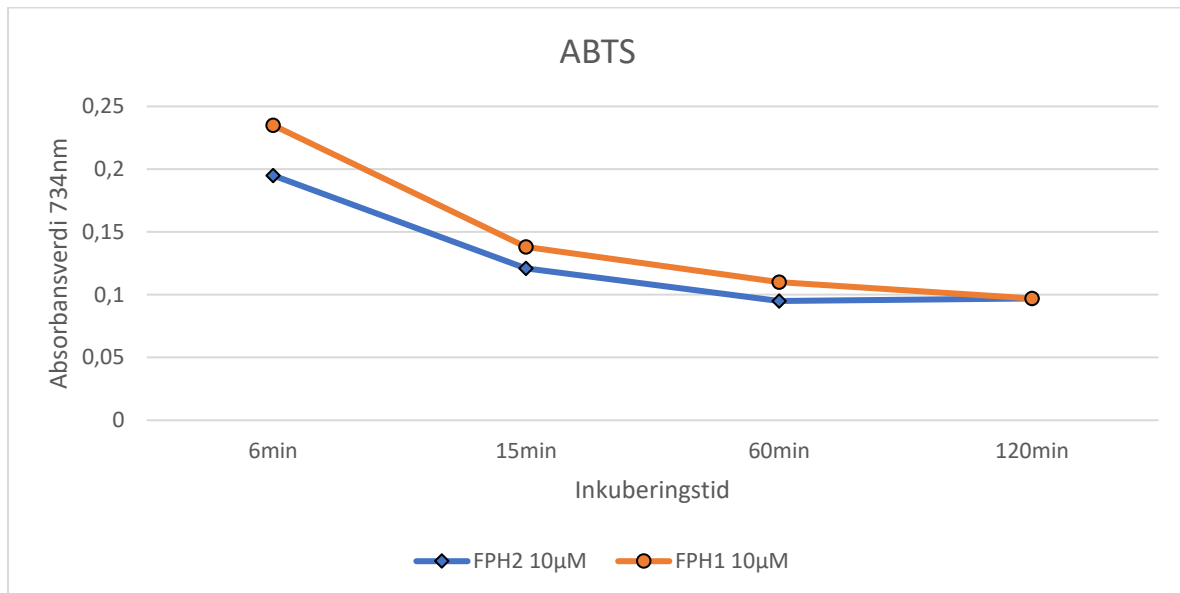
Konsentrasjon	Absorbans FPH 1	% hemming	Absorbans FPH 2	% hemming
Kontroll	0,860	-	0,872	-
50 µg/mL	0,896	-4,2	0,881	-1,0
100 µg/mL	0,877	-1,9	0,877	-0,6
250 µg/mL	0,874	-1,6	0,876	-0,5
500 µg/mL	0,874	-1,6	0,894	-2,5
750 µg/mL	0,860	0,0	0,853	2,2
10 mg/mL	0,802	6,7	0,819	6,1
5 mg/mL	0,851	1,1	0,858	1,6
2,5 mg/mL	0,878	-2,1	0,898	-3,0
1 mg/mL	0,897	-4,2	0,893	-2,4

4.4 ABTS

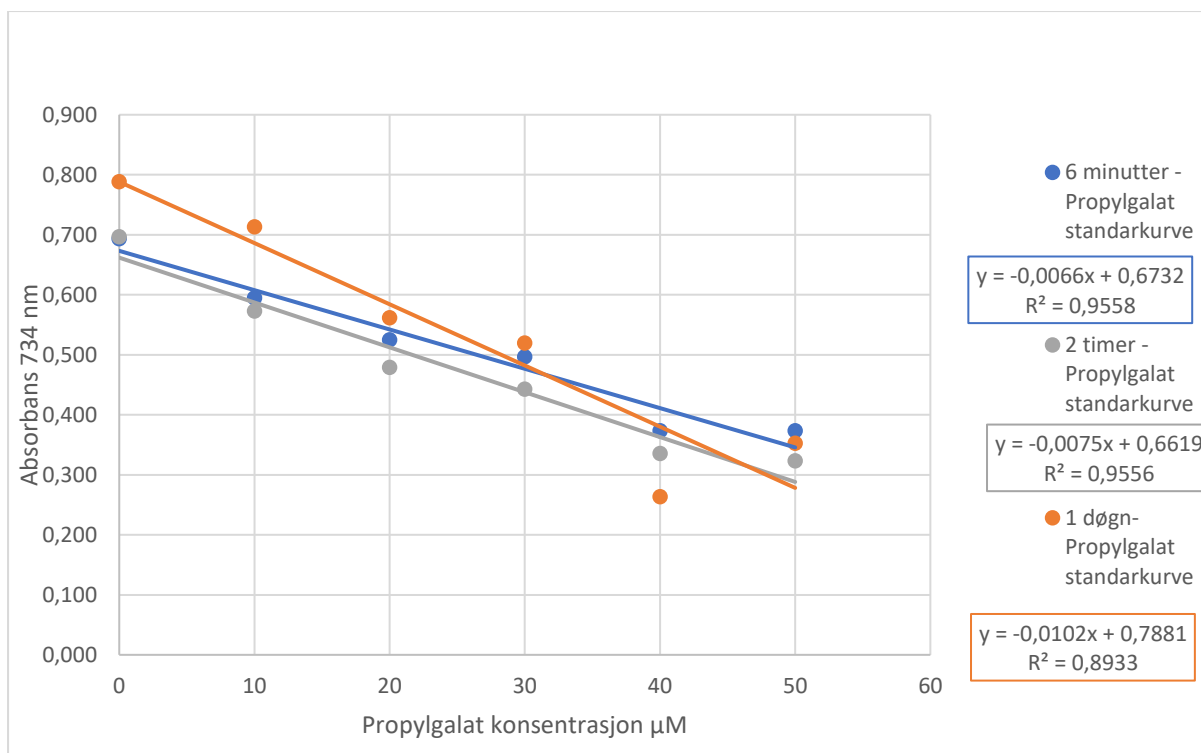
4.4.1 Utvidet inkuberingstid

På figur 4.8 kan vi se analysen av FPH1 og FPH2 etter ulik inkuberingstid med ABTS reagens. Analysen viser at fra 6 minutter til 15 minutter synker absorbansverdien fra 0,235nm for FPH1 10µM til 0,138nm, en prosentendring på 42%, for FPH2 synker absorbansverdien fra 0,195nm til 0,121nm, en prosent endring på 38%. I figur 4.7 kan man se dette grafisk fremstilt sammen med den antatte troloxverdien. Dette er en stor endring, og siden de fleste analyser ved bruk av ABTS har ett tidsintervall på 4-6 minutter, kan det derfor tenkes at dette er et viktig tidsintervall man bør holde seg innenfor når man bruker ABTS til analyse av hydrolysater. Det er en mindre forskjell fra 15 minutter, 60 minutter og 120 minutter. På figur

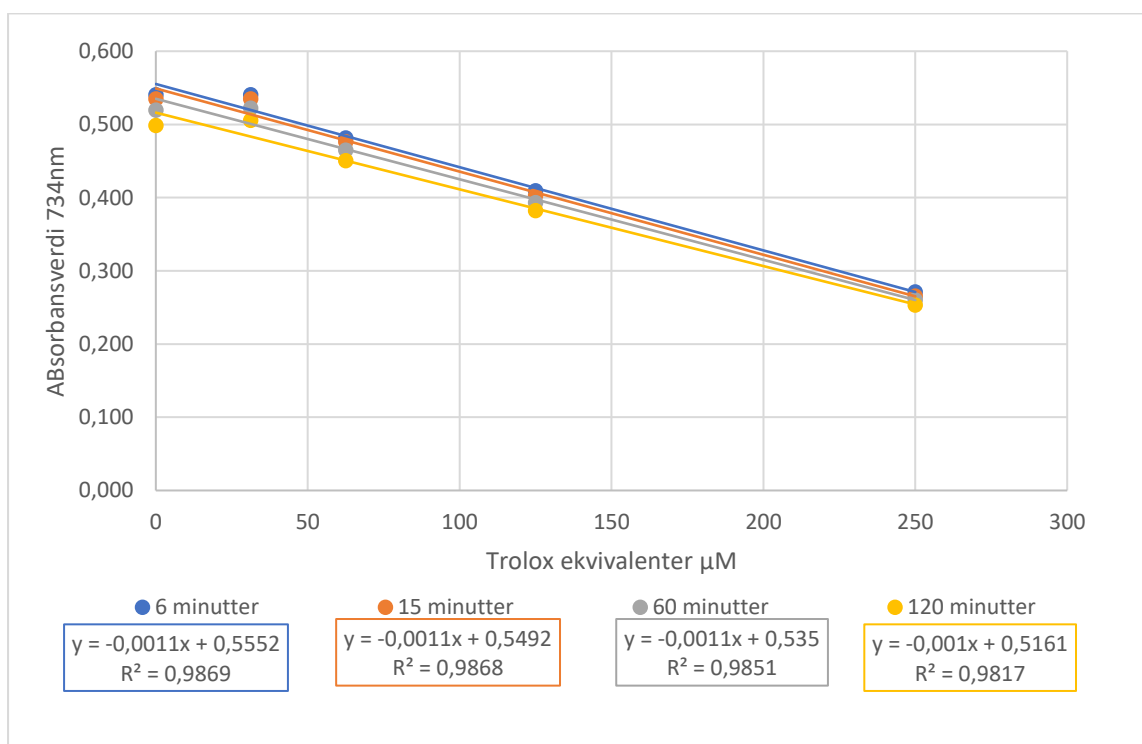
4.9 kan man se at reagenset holder seg stabilt over ulik tid, men dette er uten tilsatt prøve. Figur 4.10 viser at standarkurven med trolox holder seg stabil med ABTS reagens over ulik inkuberingstid, herunder. Figur 4.9 viser standarkurven med propylgallat, denne holder seg ganske stabil frem til 2 timer, men det bør vurderes om denne brukes, da stigningstallet er ganske ulikt.



Figur 4.8: ABTS analyse, stabilitet av FPH1 10µg/ml dH₂O og FPH2 10µg/ml dH₂O over tid med inkuberingstidene 6 minutter, 15 minutter, 60 minutter og 120 minutter. *µM=µg/ml dH₂O for FPH i fremstillingen.



Figur 4.9: ABTS: Propylgalat standarkurve sammenligning av inkuberingstid og fremstilling av likninger og R-verdi.

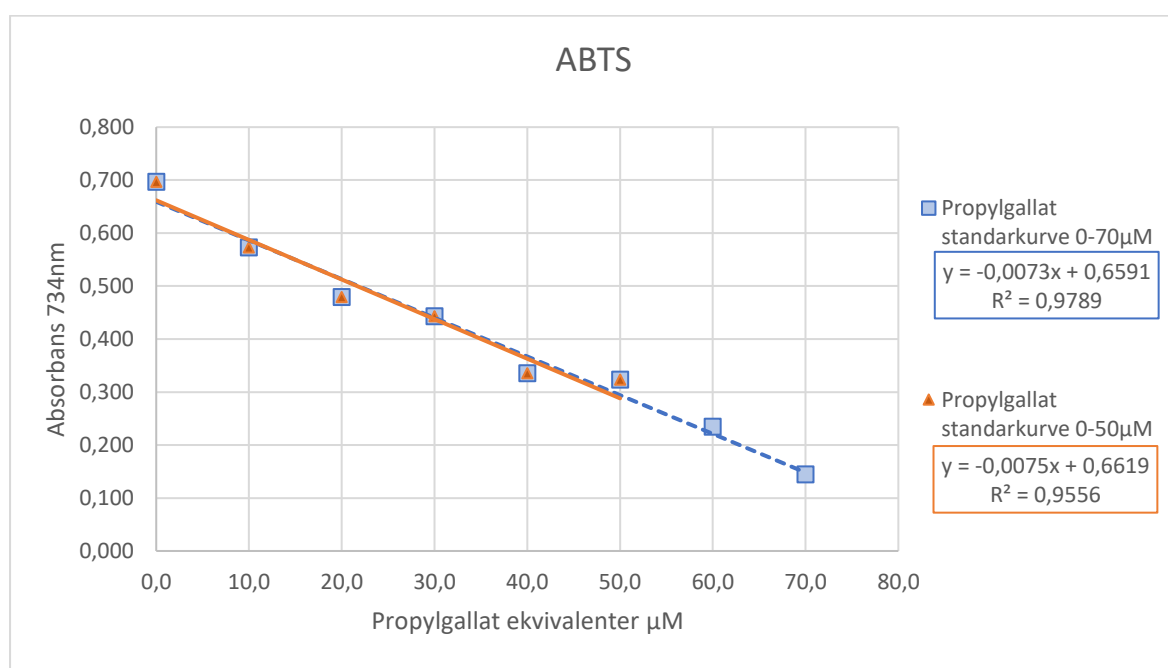


Figur 4.10: ABTS analyse, sammenligning av Trolox standarkurve målt over tid med 6

minutter, 15 minutter, 60 minutter og 120 minutter med formler og R tall for de ulike inkuberingstidene.

4.4.2 Utvidet standardkurve med propylgallat

Som fremstillingen figur 4.11 viser, er utvidelsen av standardkuven med konsentrasjonene 60 μM og 70 μM er på linje med den originale standardkurven, og det vil nok derfor være mulig å bruke en utvidet standardkurve med propylgallat standardkurveløsning. Det kan være lurt å være obs på at absorbansen begynner å bli svært lav, og dette kan gi upresise resultater om det analyseres med prøver som har mye farge.



Figur 4.11: ABTS analyse, sammenligning av standardkurve propylgallat med 0 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM og 50 μM sammenlignet mot 0 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM og 70 μM .

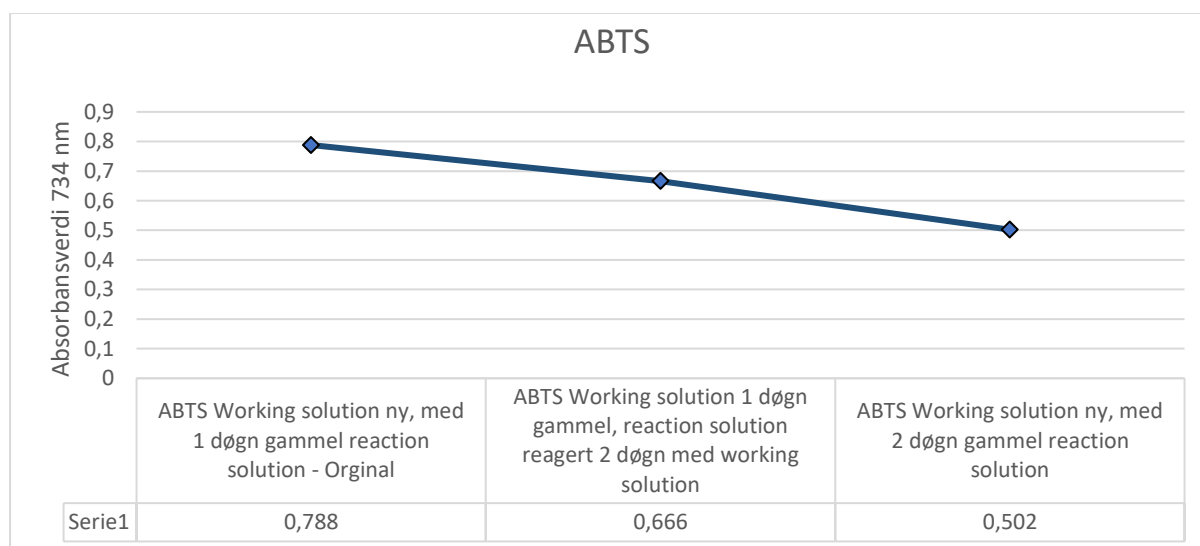
4.4.3 Utvidet standardkurve med Trolox

For ABTS analysen var det en fullstendig reaksjon fra og med 500 μM opp til 3000 μM som ble målt. Dette kunne sees ved at absorbansverdien ble 0,000nm for disse verdiene, og det betyr at ABTS reagenset ble brukt opp, siden dette er ett reagens der fargen reduseres i kontakt med antioksidanter, vil fargen til slutt forsvinne om det er mye antioksidanter til

stede, noe som var tilfellet for denne analysen. Trolox vurderes derfor som stabil med verdiene

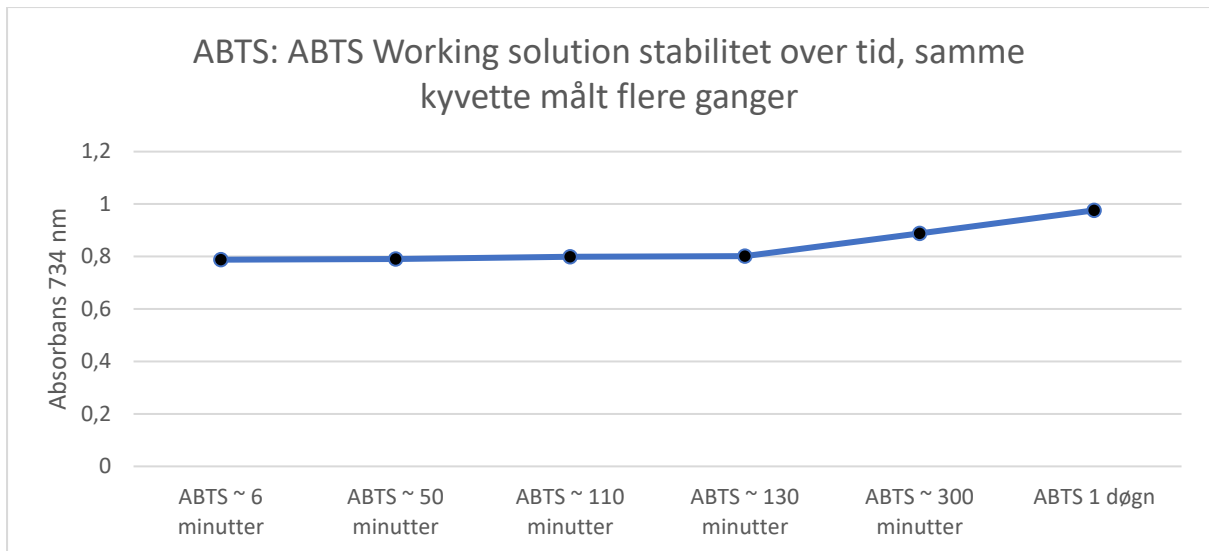
4.4.4 Forandring av inkubasjonstid for «working solution» og «reaction solution»

«Working solution» (WS) skal i følge litteraturen brukes samme dag som den tillages med en 1 døgn gammel «Reaction solution» (RS). Figur 12 viser bruk av samme WS to dager på rad forandret absorbansverdien seg fra 0,788nm til 0,666nm, en endring på 16%. Dette kan derfor ansees som stabilt. Ulike metoder har ulik absorbansintervall WS skal være innenfor. I enkelte fremgangsmåter brukes det et intervall der 0,66nm ville vært innenfor dette intervallet. Det kunne da vært aktuelt å utføre videre testing for å finne ut om denne 1 døgn gamle WS vil reagere på lik måte som en ny WS. Ved tillaging av en ny WS med en 2 døgn gammel RS ble det en stor endring, og det må derfor vurderes om dette er aktuelt å bruke.



Figur 4.12: ABTS analyse endring av reagens, sammenligning av absorbansverdi.

ABTS-reageset er forholdsvis stabilt over tid som man kan se i figur 13. Det er da samme kyvette som er målt flere ganger, og den har stått på benken på laboratoriet. I følge litteraturen skal ABTS holde seg stabilt en arbeidsdag.



Figur 4.13 ABTS analyse endring i absorbans (734nm) av ABTS working solution målt i samme kyvette etter 6 minutter, 50 minutter, 110 minutter, 130 minutter, 300 minutter og etter 1 døgn.

4.5 Generelle problemstillinger for alle analysene

Med tanke på at det er to personer som utfører analysene, er det fare for at det gjøres litt forskjellig av begge to. Det er også noe usikkerhet i inkuberingstiden, som kan være +/- 30 sekunder til 1 minutt. Dette gjelder særlig de lengre inkuberingstidene. Resultatene i analysen kan derfor være upresise, og for de lengre inkuberingstidene er ikke nødvendigvis verdiene like presise som for de kortere intervallene.

Konklusjon

Denne bacheloroppgaven viser at fiskeproteinhydrolysat fra torskehode har antioksidative egenskaper, men de faktiske antioksidantverdiene må videre analyseres med sentrifugerte prøver for å få den faktiske absorbansverdien som trengs for å utføre riktig utregninger. For FRAP kan Trolox standardkurven utvides og FRAP reagenset er så stabilt at det kan stå over natten. For ABTS kan propylgallat standardkurven utvides. Felles for begge metodene er at reagensene holder seg stabile for seg selv og med standardkuveløsninger, men fiskeproteinhydrolysat prøvenes absorbansverdi endres mye når inkuberingstiden forlenges. DPPH hadde ingen synlig reaksjon med fiskeproteinhydrolysatene

Kilder

Alam, N. M., Bristi, N. J. & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2).

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurements and evaluation of natural antioxidant capacity/activity. *Pure and Applied Chemistry*, . (IUPAC Technical Report).

<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/PAC-REP-12-07-15/html>

Carvajal, A. K., Mozuraityte, R., Standal, I. B., Storrø, I., & Aursand, M. (2014). Antioxidants in fish oil production for improved quality. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(9), 1611-1621. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11746-014-2508-0>

<https://www.proquest.com/docview/1555942043?pq-origsite=primo>

Choi, W. M., Lam, C. L., Mo, W. Y., & Wong, M. H. (2016). Upgrading food wastes by means of bromelain and papain to enhance growth and immunity of grass carp (*ctenopharyngodon idella*). *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(8), <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4863-2>

Finley, J. W. & Given, J. P. (2002). Technological necessity of antioxidants in the food industry. *Food and Chemical Toxicology* 24(10-11). [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90280-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90280-2)

Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S, ... Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food science & Technology*, 110

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>

Garrido, J., Garrido, E. M. & Borges, F. (2011). Studies on the Food Additive Propyl Gallate: Synthesis, Structural Characterization, and Evaluation of the Antioxidant Activity. *Journal of chemical education*. <https://doi.org/10.1021/ed900025s>

Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology. Archiv für Toxikologie*, 94(3). <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Jamrós, E. & Kopel, P. Polysaccharide and Protein Films with Antimicrobial/Antioxidant Activity in the Food Industry: A Review. *Polymers*, 12(6).
<http://dx.doi.org/10.3390/polym12061289>

Karaçelik, A, A., Küçük, M., Iskefiyeli, Z., Aydemir, S., Smet, D, S., Miserez, B. & Sandra, P. (2014). Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. *Food Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.085>

Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>

Kedare, S, B. & Singh, R, P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Martinez, L., Castillo, J., Ros, G., Nieto, G. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary, Pomegranate and Olive Extracts in Fish Patties. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(4) doi:<http://dx.doi.org/10.3390/antiox8040086>

Myhre, M. Richardsen, R. Nystøyl, R. Strandheim, G. SINTEF Ocean AS. Kontali Analyse AS. (2020). *Analyse marint restråstoff 2019: tilgjengelighet og anvendelse av marint restråstoff i fra norsk fiskeri- og havbruksnæring*. (Rapport 2020:00904).
https://www.sintef.no/contentassets/6b30fa1babad4d6eba0e243e08192d08/analyse-marint-restrastoff-2019_endelig.pdf

Njoya, E, M. (2021). Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer (Second Edition)*. Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819547-5.00031-6>

Ohnstad, M. F. (2018). *Marine Cod (Gadus morhua) Head Hydrolysates: in vitro ACE inhibitory activity and investigation of structure-activity relationship*. (Masteroppgave).

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, Trondheim.

Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rustad, T., Storrø, I. & Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x>

Samotyja, U. (2019). Potato Peel as a Sustainable Resource of Natural Antioxidants for the Food Industry. *Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-9419-2>

Shahidi, F. & Ho, C. T. (2007). *Antioxidant Measurement and Applications*. San Diego: American Chemical Society.

Sharma, O. P. & Bhat T, K. (2008). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

Walker, R. B. & Everette, J. D. (2009). Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8026765>

Walquist, Mari Johannessen, Stormo, Svein Kristian, Jensen, Ida-Johanne, Østerud, Bjarne, & Eilertsen, Karl-Erik. (2017). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities in Extracts from Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*) Blubber. *Mediators of Inflammation*, 2017,

3835851-9.

<https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/11844/article.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Xiao, F., Xu, T., Lu, B. & Liu, R. Guidelines for antioxidant assays for food components.

Food Frontiers, 1(1). <https://doi.org/10.1002/fft2.10>

Yang, F., Hu, F., Jiang, Q., Xu, Y. & Xia, W. (2016). Effect of Pretreatments on Hydrolysis Efficiency and Antioxidative Activity of Hydrolysates Produced from Bighead Carp

(*Aristichthys nobilis*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6).

<https://doi.org/10.1080/10498850.2014.968819>

Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q. & Su, G. (2016). Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.015>

Vedlegg 1

FRAP utregninger:

5 mL jern-løsning, 5 mL TPTZ-løsning og 50 mL acetatbuffer.

Jernløsning løst i dH₂O:

Kjemikalie: 19 mM Fe 3 Klorid-6-hydrat (M_w=312,33 g/mol)

Beregning: 19 mM = 270,33 g/mol * 19 mol/L = 5,14 g/L

5,14 g/L / (1000 mL) = 0,00514 g/mL

0,00514 g/mL * 10 mL = 0,0514 g/10 mL H₂O

TPTZ-løsning løst i 10 mL 40 mM HCl:

Kjemikalie: 10 mM 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazine i 40 mM HCl (m_w= 312,33 g/mol)

Beregning: 10 mM = 312,33 g/mol * 0,010 mol/L = 3,12 g/L

3,12 g/L / (1000 mL) = 0,00312 g/mL

0,00312 g/mL * 10 mL = 0,0312 g TPTZ/10 mL 40 mM HCl

40 mM HCl:

Kjemikalie: 37 % HCl, 12,06 M

Beregning: 12,06 M * volum = 1 M * 0,5 L

Volum = 0,0413 L -> 41,5 mL HCl + 458,5 mL dH₂O

1 M * volum = 0,04 M * 0,1 L

Volum = 0,004 L -> 4 mL 1 M HCl + 96 mL dH₂O

Acetatbuffer:

Kjemikalier: 1,505 g natriumacetat (C₂H₃NaO₂) + 8 mL eddiksyre

Fylt opp med dH₂O til samlet volum på 500 mL

Tillaging av konsentrasjoner til standardkurve ved bruk av TROLOX som standard

Konsentrasjonene 31,25 μM, 62,5 μM, 125 μM, 250 μM, 500 μM og 1000 μM ble tillaget for å lage den originale standardkurven.

Kjemikalier:

TROLOX 97 % (M_w= 250,29 g/mol), MetOH 100 %

Utførelse:

Det ble først blandet 50 mg Trolox 97 % løst i 2 mL MetOH.

Deretter ble 10 μ L TROLOX-løsning + 990 μ L dH₂O tilsatt i reagensrør= 1000 μ M.

Utregning av troloxequivalenter

FPH troloxequivalenter per gram = (konsentrasjon troloxequivalenter(μ mol/l))/(konsentrasjon FPH mg/l)

ABTS utregninger

ABTS stock solution: 25 ml 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), (0,360gram i 100 ml dH₂O)

440 μ l, 140mM K₂S₂O₈ (0,378 gram i 10 mL H₂O)

10 mM propylgallat i 80% MeOH (0,530 gram i 250 ml 80% MeOH)

DPPH utregninger

% inhibition of DPPH= $100 * \frac{(\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample})}{\text{Absorbance control}}$