

Anna Følstad Sæter  
Marius Flaaten Olsen

# Produksjon og bruk av ørrethydrolysat for utvikling av funksjonelle matvarer

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon  
Januar 2022



Anna Følstad Sæter  
Marius Flaaten Olsen

# **Produksjon og bruk av ørrehydrolysat for utvikling av funksjonelle matvarer**

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon  
Januar 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet



# Takk!

Vi ønsker å rette en stor takk til våre veiledere Janna Crobotova og Egidijus Dauksas for deres innspill og støtte med denne oppgaven. Takk også til Kristine Kvangarsnes, for hennes kunnskap og veiledning på laboratoriet.

Og til slutt, takk til NTNU i Ålesund for tre lærerike år!

# Sammendrag

I Norge produseres det årlig 83.489 tonn regnbueørret. En konsekvens av denne produksjonen er restråstoffet som oppstår, og mye av dette restråstoffet blir ikke brukt. Restråstoff fra regnbueørret og andre fiskearter inneholder viktige bioaktive peptider og aminosyrer som har helsefremmende effekter, og bør derfor bli brukt i produksjon av funksjonell mat til menneskelig konsum.

Hensikten med vårt arbeid har vært bidra til å komme ett skritt nærmere en mer bærekraftig næring, ved å se på mulighetene for å utnytte dette restråstoffet til å produsere hydrolysat, og utvikle funksjonelle matvarer med bruk av dette. Vi valgte denne løsningen fordi det i verden i dag også er mange problemer knyttet til ernæring. I en verden med en stadig økende befolkning, ser vi også et stadig økende behov for fullt protein. Det vil si protein som inneholder alle essensielle aminosyrer. Disse kommer fra animalske produkter som egg, kjøtt og fisk. Det er også viktig å bruke hele fisken for å minimere restråstoff. Vi vet at fiskeproteinhydrolysat har en rekke helsebringende effekter, og det er derfor viktig å tilrettelegge for et økt konsum av dette. Ved å utvikle funksjonelle matvarer, kan vi gjøre produkter med fiskeproteinhydrolysat mer tilgjengelig for befolkningen. Den største utfordringen ligger i å kamuflere hydrolysatet i maten, og det er blant annet dette vi har sett nærmere på i denne oppgaven. Gjennom arbeid i laboratorium har vi produsert et fiskeproteinhydrolysat av ørret, og gjennomført både fysiske og kjemiske analyser av dette. I tillegg har vi gjennomført en sensorisk analyse av to ulike produkter; fiskekake og smoothie, tilsatt hydrolysat.

# Innholdsfortegnelse

## Innhold

Takk! .....	0
Sammendrag .....	1
1.0 Innledning .....	4
1.1 Problemstillingen og formålet .....	4
1.2 Bakgrunn .....	5
1.2.1 Regnbueørret .....	5
1.2.2 Ekstraksjon av marine proteiner ved enzymatisk hydrolyse .....	6
1.2.3 Fiskehydrolysat som ingrediens i matindustri .....	8
1.2.4 Bioaktive peptider og helseeffekter av fiskehydrolysat .....	8
2.0 Materialer og metoder .....	9
2.1 Marint råstoff og ingredienser .....	9
2.2 Utstyr og instrumenter .....	10
2.3 Hydrolysemetode .....	10
2.4 Tilvirking av produktene .....	12
2.4.1 Produksjon av fiskekaker .....	12
2.4.2 Produksjon av smoothie .....	13
2.5 Kjemiske analysemetoder .....	13
2.5.1 Aminosyrebestemmelse .....	14
2.5.2 Hydrolysegrad og frie aminosyrer .....	14
2.5.3 Proteinløselighet .....	15
2.6 Fysiske analysemetoder .....	16
2.6.1 Tørrstoffanalyse .....	16
2.6.2 Fargeanalyse .....	17
2.7 Sensorisk analyse .....	18
3.0 Resultater og diskusjon .....	20
3.1 Kjemiske og fysiske analyser .....	20
3.2 Fargeparameter til ørrehydrolysat .....	21
3.3 Aminosyresammensetning .....	21
3.4 Sensorisk analyse .....	24
4.0 Konklusjon .....	30
5.0 Referanser .....	31

6.0 Vedlegg ..... 33



# 1.0 Innledning

I befolkningen er det en stadig økende interesse for produkter som ivaretar forbrukernes interesser om et sunnere kosthold (*God Og Riktig Mat Hele Livet*, n.d.). Vi har i vår oppgave benyttet ørrehydrolysat. Årsaken til dette er at ørrehydrolysat har gjennom tidligere forskning vist seg å ha helsebringende effekter (Zanutto-Elgui et al., 2019). I tillegg vil utnyttelse av hele fisken bidra til mer bærekraftig bruk av ressurser i en verden med stadig økende befolkning og matmangel.

Vi har i vår oppgave produsert ørrehydrolysat, og benyttet dette i produksjon av to ulike matvarer; fiskekaker og smoothie, med innhold av henholdsvis 0%, 5%, 10% og 15% ørrehydrolysat, for så å gjennomføre en sensorisk kontroll med produktene våre.

## 1.1 Problemstillingen og formålet

Formålet denne oppgaven er å analysere proteinhydrolysat og produsere smakfulle produkter med proteinhydrolysat fra ørret.

I prosessen av å finne ut av hvilke produkter som vi skulle forsøke å produsere var vi innom en rekke alternativer. Vi bestemte oss tidlig for at vi ønsket å produsere et fiskeprodukt, men vi ønsket også å produsere et ikke-fiskebasert produkt. Fiskeproduktene som ble vurdert var blant annet fiskeboller, fiskepudding og fiskegrateng, men det endelige valget falt på fiskekaker. Fiskekaker er et enkelt produkt å produsere, og å tilsette hydrolysat til, samtidig som det er noe de aller fleste liker.

Når det kom til det andre produktet ønsket vi å tenke litt utenfor boksen. Vi var også her innom en rekke ulike alternativer. Fordi vi visste at den største utfordringen ville være å kamuflere den bitre smaken av hydrolysatet tenkte vi hovedsakelig på produkter som inneholder andre ingredienser med dominerende smaker, for eksempel bitter smak (som kakao og kaffe) eller syrlig smak (som sitrus). Noen av alternativene vi tenkte på var sjokolademousse, sjokoladeis og kaffeyoghurt. Valget falt til slutt på smoothie, da det er et

produkt som er enkelt å produsere, mange liker, og et produkt hvor man enkelt kan gjøre tilpasninger. Vår smoothie var basert på bær, yoghurt og appelsinjuice.

## 1.2 Bakgrunn

Oppdrett har lenge vært en viktig næring for Norge, både laks og ørret er arter det blir produsert mye av. Det ble produsert 83.489 tonn regnbueørret i 2019 (fiskeoppdrett, SSB). Et stort problem har lenge vært manglende bruk av restråstoffet som oppstår fra den enorme mengden fisk. I 2016 ble det produsert 914.000 tonn restråstoff fra fisk og skalldyr (Richardsen & Nystøyl, 2017). Cirka 25% av restråstoffet ble ikke tatt i bruk. Dette betyr at omkring 228.500 tonn restråstoff ikke ble utnyttet. Dette råstoffet inneholder en rekke sunne næringsstoffer som kan brukes til humant konsum. For å øke bærekraftsgraden i oppdrettsnæringa er det derfor viktig at det ubrukte restråstoffet tas i bruk. Med økende fokus på å oppnå FNs bærekraftsmål har en løsning på problemer som dette blitt en prioritet. Bærekraftsmålet “ansvarlig forbruk og produksjon” omfatter matsvinn fra produksjon.

### 1.2.1 Regnbueørret

Regnbueørreten (*Oncorhynchus mykiss*) er en fisk tilhørende laksefamilien. Arten har sin naturlige utbredelse i de vestlige delene av Nord-Amerika, fra Alaska i nord til Mexico i sør. Arten har siden år 1874 blitt introdusert til alle kontinenter med unntak av Antarktis. I 2020 ble det i Norge produsert 96.663 tonn regnbueørret (Tabell 1, Alimentari, 2021). Regnbueørreten er med det den viktigste oppdrettsfisken i Norge etter atlantisk laks (Alimentari, 2021).

Regnbueørret er en hardfør art som er enkel å avle, vokser raskt og tåler godt håndtering og miljøforandringer. Normalt sett spiser regnbueørret zooplankton, men den kan enkelt tilvennes en kunstig diett. Regnbueørreten takler mange ulike leveområder, fra et anadromt levesett til å tilbringe hele livet i innsjøer (Alimentari, 2021).

Dersom en fisk er anadrom, kan den tilpasse seg og leve i både ferskvann og saltvann.

Anadrome fisk er i utgangspunktet ferskvannsfisk som har evne til å vandre til havet senere i livet. I regnbueørretens tilfelle vandrer den fra elver til havet, og returnerer til elven sent i livet for å gyte. Den anadrome varianten er spesielt kjent for sin raske vekst, og kan oppnå en

vekt på 7-10 kg i løpet av 3 år, mens ferskvannsvarianten kun vil oppnå en vekt på 4,5 kg i løpet av den samme tidsperioden (Alimentari, 2021).

I tillegg til å kunne tilpasse seg ulike miljøer er den også i stand til å tåle store svingninger i temperatur. Den optimale temperaturen for regnbueørretten er under 21°C, men den kan overleve i alt fra 0°C - 27°C. Klekking og vekst vil derimot kun foregå i når temperaturen er mellom 9°C - 14°C. Både temperatur og tilgang på mat påvirker modningsprosessen, men normalt sett vil fisken være moden etter 3-4 år (FAO, January 2022).

Regnbueørreten er en fet fisk med et høyt innhold av omega-3 flerumettede fettsyrer. Den er også en god kilde til proteiner, essensielle aminosyrer og andre biologisk aktive forbindelser. En regnbueørret består av 63-73% vann, rundt 11% fett (lipider) og 19-23% protein (Alimentari, 2021). De dominerende fettsyrene i regnbueørret fra oppdrett er C16:0, C18:1 og DHA, C22:6n-3 (Tabell 1.2, Alimentari, 2021).

I fisk er n-3 fettsyrer tilstede i høye konsentrasjoner i fosfolipidene til cellemembraner. Det er viktig å nevne at fisk ikke kan syntetisere n-3 flerumettede fettsyrer selv, men de leveres vanligvis gjennom kosten. Derfor er lipidsammensetningen i oppdrettsfisk mer konstant enn i villfisk. Oppdrettsfisk har også et høyere fettinnhold enn villfisk og er derfor en bedre kilde til n-3 fettsyrer (Ibrahim, 2004)

Fileten er det som regnes for å være primærproduktet på fisken, men denne alene utgjør bare 40-50% av hele fisken. Filetproduksjonen etterlater store mengder hoder, skinn og bein. Dette ansees for å være biprodukter og prosesseres ikke videre med det formål å bli human kost. Filetproduksjon fra laks og regnbueørret etterlot i 2018, 417 900 tonn med restråstoff (Of, 2020). Dette restråstoffet har også høy næringsverdi grunnet det høye innholdet av lipider og proteiner (Alimentari, 2021).

### 1.2.2 Ekstraksjon av marine proteiner ved enzymatisk hydrolyse

Hydrolyse er en prosess som spalter et molekyl etter å ha tatt til seg et vannmolekyl. Marine proteiner må gjennomgå hydrolyse for å bli fiskeproteinhydrolysat (FPH). Dette innebærer at proteinene blir modifiserte ved at peptidbindingene blir kortere og molekylene blir

ioniserbare (Nguyen et al., 2017). Enzymatisk hydrolyse tar i bruk enzymer for å akselerere de kjemiske reaksjonene som hydrolyserer et molekyl (Alimentari, 2021). Enzymatisk hydrolyse blir oftest gjennomført med bruk av proteolytiske enzymer som hydrolyserer proteinet på bestemte områder slik at peptidene blir kortere. Dette fører til at hydrolysaten får unike egenskaper som høy løselighet, skummende egenskaper, emulgerende egenskaper og stabilitet (Nguyen et al., 2017).

Enzymatisk hydrolyse har blitt brukt i mange århundrer til matproduksjon og prosessering. Nylig har kontrollert bruk av enzymer blitt en trend. Flere enzymkilder, enzymaktiviteter, forbedrede enzymoppskrifter og større krav til miljøvennlige og lavkost-prosesser har forbedret enzymbruk i sjømat, og har hatt en stor innvirkning på fiskeindustrien (Fernandes, 2016). Hydrolyse av restråstoff fra fisk er en god måte å utnytte biprodukter fra fisk som finner, hale og hode til nyttige og helsefremmende hydrolysater som kan brukes i produksjon av funksjonell mat.

Mange brukbare produkter og råstoff vil forekomme etter en enzymatisk hydrolyse (lipider, FPH, sedimenter). Det er viktig å ta i bruk alle råstoffene som en får ut av en hydrolyse. Enzymatisk hydrolyse er en miljøvennlig metode for å skille lipider og proteiner av høy kvalitet fra restråstoff fra fisk som ellers ville blitt kastet. Enzymatisk hydrolyse har evnen til å skille disse høykvalitets-råstoffene fra både hel fisk og restråstoffer samtidig (Alimentari, 2021). Ved bruk av hel fisk vil kvaliteten på fiskeproteinhydrolysatet øke.

Egenskapene til hydrolysatet vil variere med hvilken fiskeart en bruker og hvilke typer enzymer en bruker til å hydrolysere. Flere forskjellige typer enzymer kan brukes i en enzymatisk hydrolyse. Planteenzymer, mikrobielle enzymer og dyreenzymer har tidligere blitt tatt i bruk. Enzymer fra terrestriske organismer er enkle å manipulere, som gjør at disse enzymene er foretrukket over andre enzymer til bruk i en enzymatisk hydrolyse (Fernandes, 2016). Planteenzymene papain (fra papaya) og bromelain (fra ananas) blir ofte brukt sammen i en enzymatisk hydrolyse. Papain og bromelain har lenge blitt brukt i matindustrien for å mørne kjøtt. De brukes også til produksjon av kommersielle produkter som sminke og tekstiler (Alimentari, 2021).

Enzymatisk hydrolyse sørger for at hydrolysatet egner seg for humant konsum. Tradisjonelt ble fiskehydrolysater produsert med bruk av enten syre eller alkalisk virkning, noe som fører til

store mengder sodium klorid og dannelse av giftstoffer (Kristinsson & Rasco, 2000).

Enzymatisk hydrolyse skjer under mildere forhold av pH, temperatur og trykk. Giftstoffer dannes ikke ved bruk av enzymatisk hydrolyse (Alimentari, 2021).

### 1.2.3 Fiskehydrolysat som ingrediens i matindustri

En av de største utfordringene ved bruk av hydrolyserte proteiner i mat er at det oppstår en bitter smak (Himonides et al., 2011) Dette skjer fordi korte peptidbindinger har bitter smak, og en hydrolyse vil øke mengden korte peptider fordi peptidene spaltes og blir mindre og flere. Det er derfor viktig å finne en måte å kamuflere denne smaken på ved benyttelse av fiskehydrolysat i mat.

### 1.2.4 Bioaktive peptider og helseeffekter av fiskehydrolysat

Bioaktive peptider er spesifikke proteinfragmenter som har korte aminosyrekjeder fra 2 til 20 aminosyrer, disse har en rekke funksjoner. De kan ha samme funksjon som hormoner, og fungere som medisin ved å redusere de skadelige effektene av ikke-smittsomme kroniske sykdommer. Bioaktive peptider kan gjennomføre mange biologiske aktiviteter som antimikrobielle, antihypersensitive, anticancer, antioxidante, antidiabetiske og immunmodulerende aktiviteter (Zanutto-Elgui et al., 2019). Bioaktive peptider kan produseres gjennom enzymatisk hydrolyse ved at enzymene spalter peptidbindingene til bioaktive peptider, og kan bli hentet fra både animalske- og planteproteiner (Cruz-Casas et al., 2021). De positive helseeffektene til bioaktive peptider gjør de gunstige for tilsetning i funksjonell mat. For å bli tilsatt funksjonell mat må de bioaktive peptidene oppnå visse krav som lav eller ingen giftighet for konsumenten, de må beholde sin bioaktivitet, ha evnen til å bli absorbert, være innenfor nasjonale lovverk og må ha en akseptabel smak (Cruz-Casas et al., 2021).

De positive egenskapene ved bioaktive peptider kan forekomme på to måter. 1) De blir tatt opp i epitelvevet i øvre del av tynntarmen eller, 2) ved å aktivere metabolske og sensoriske signalveier (Cruz-Casas et al., 2021). Dersom de blir tatt opp i tynntarmen må de være resistente mot enzymene i fordøyelsesprosessen som pepsin og gastricin som befinner seg i

magesekken. Når de absorberes blir de transportert gjennom epitelvevet i tynntarmen, inn til blodet (Cruz-Casas et al., 2021). Ved å aktivere metabolske og sensoriske signalveier kan de bioaktive enzymene for eksempel bidra til en antidiabetisk effekt ved å binde seg til kalsiumreseptorer eller GPCRer (G-proteinkoblede reseptorer) for å fremme gentranskripsjon og dermed utløse stoffer som regulerer glukose og energihomeostase, lipider, aminosyrer m.m (Cruz-Casas et al., 2021).

Bioaktive peptider har en karakteristisk fiskelukt og bitter smak (Opheim, 2015), noe som har ført til at de har blitt tatt lite i bruk i kommersielle funksjonelle matvarer. Bitterheten i bioaktive peptider har en sammenheng med den hydrofobiske egenskapen i peptidene (Cruz-Casas et al., 2021). Metoder for å fjerne den bitre smaken har blitt utviklet, som å bruke enzymer for å redusere mengden bitre peptider, fjerne de bitre peptidene, eller skjule smaken (Cruz-Casas et al., 2021). Til bruk av bioaktive peptider i produksjon av funksjonell mat er det mulig å bruke forskjellige smaker for å skjule den bitre smaken. Dette kan gjennomføres med sterke smaker som overdøver den bitre smaken i peptidene som for eksempel sitrusfrukter. Det kan også tenkes at produkter som allerede har en bitter smak ikke vil få de samme ulempene ved å få bitre hydrolysater tilsatt, eventuelt at bitterheten i peptidene vil komplementere den allerede bitre smaken i produktet.

## 2.0 Materialer og metoder

### 2.1 Marint råstoff og ingredienser

Fiskearten som ble brukt var regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) fra Hofseth i Ålesund kommune. Hele fisken med unntak av innmat ble brukt.

Til produksjon av fiskekaker til sensorisk analyse ble følgende ingredienser brukt (med unntak av ørrethydrolysat):

Tine smør, fersk torskefilet fra ferskvaredisk, fersk hysefilet fra ferskvaredisk, Tine lettmeik, egg, krydder fra Hindu (hvitløkspulver, sort pepper, muskat, salt), potetmel fra Hoff.

Til produksjon av smoothie til sensorisk analyse ble følgende ingredienser brukt (med unntak av ørrethydrolysat):

Rød smoothieblanding (banan, jordbær og blåbær) fra Coop, Tine vanilje-yogurt, appelsinjuice fra Coop, frosne blåbær fra Coop.

Planteenzymene bromelain (Sigma-Aldrich) og papain (Sigma-Aldrich) ble tatt i bruk for å gjennomføre enzymatisk hydrolyse.

## 2.2 Utstyr og instrumenter

Hydrolyse: Bioreaktor (VWR, 4L VOLUM)

Fargemåling: Konica Minolta CR-400

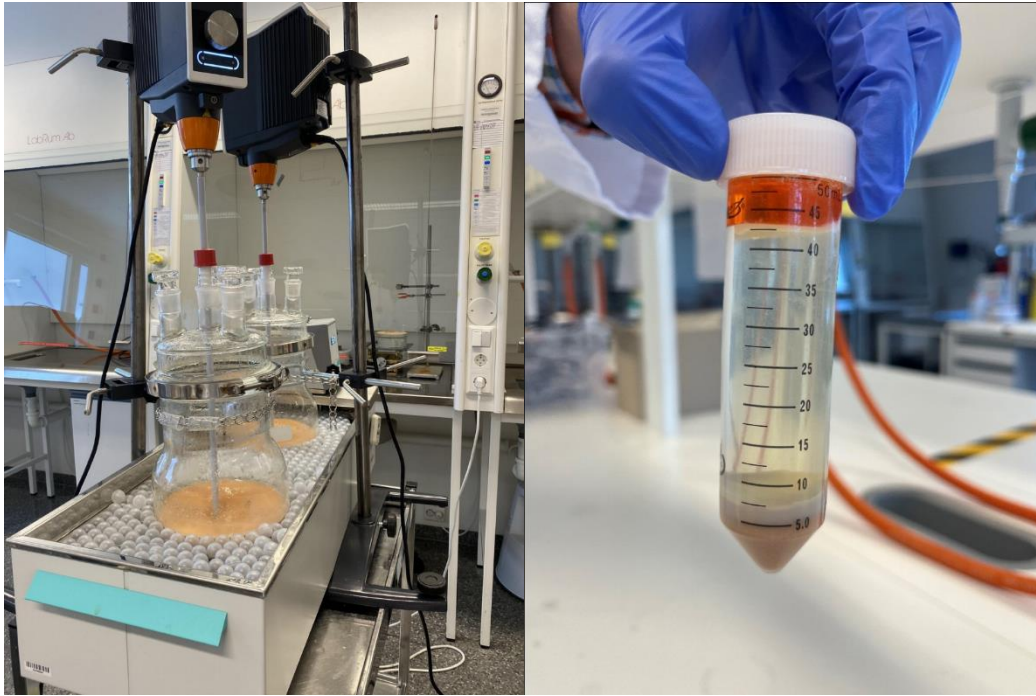
Titring (Hydrolysegrad): Titroline

Proteinløselighet: SpectraMax i3X

## 2.3 Hydrolysemetode

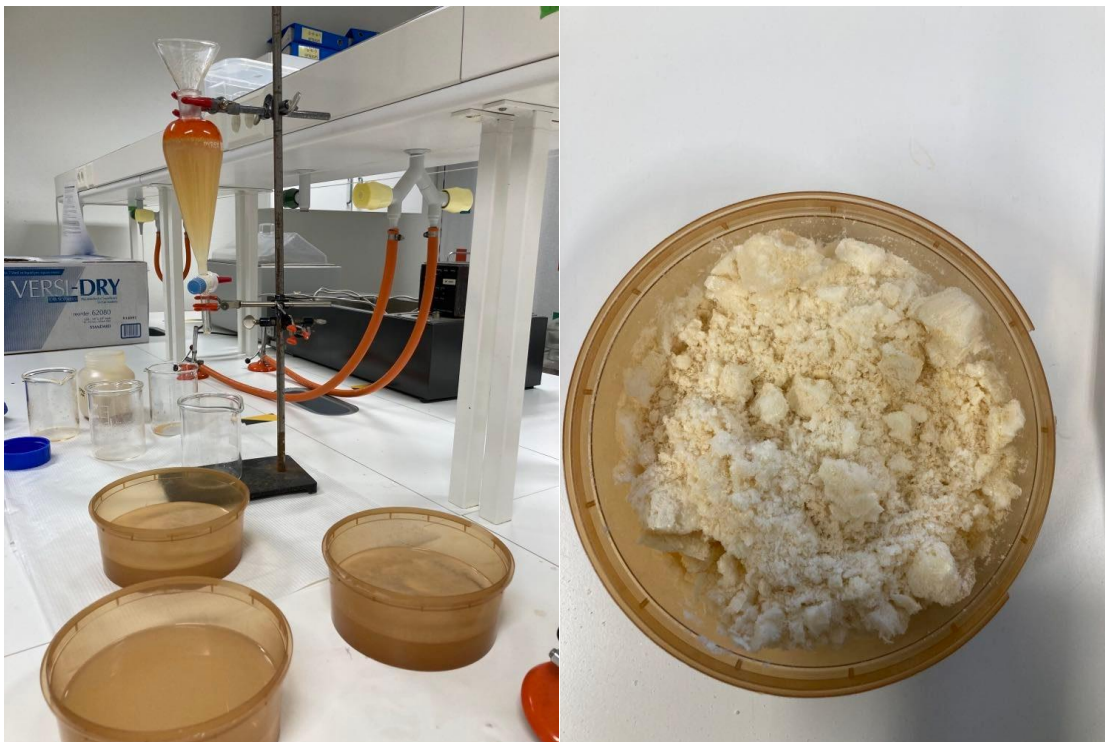
Enzymatisk hydrolyse ble benyttet for å ekstrahere proteiner fra ørreten. Hele ørreten uten innmat ble brukt. Den ble kvernet og lagt i poser på 1 kg, deretter ble den fryst på  $-80^{\circ}\text{C}$  frem til bruk.

Ørreten ble tint over natten før den ble tatt i bruk i enzymatisk hydrolyse. Det ble veid opp 0,5 gram hver av planteenzymene bromelain (Sigma-Aldrich) og papain (Sigma-Aldrich.) Det ble så veid opp 1 kg ørret og 1 kg varmt vann ( $53^{\circ}\text{C}$ ) og lagt i en beholder. Beholderen ble deretter lagt i vannbad ( $53^{\circ}\text{C}$ ). Da vannbadet hadde nådd en temperatur på  $50^{\circ}\text{C}$  ble bromelain og papain tilsatt (1 gram av hvert enzym.) En stoppeklokke ble satt til 60 minutter mens hydrolyseringen tok sted. Innholdet ble så silt for å fjerne de største partiklene fra blandingen. For å inaktivere enzymene ble blandingen varmet 10 minutter i mikrobølgeovn ved 750W, til blandingen hadde temperatur på  $90^{\circ}\text{C}$ . Blandingens ble deretter sentrifugert i 30 minutter ved 4100G. De vannløselige hydrolysatene ble deretter separert fra lipider og sedimenter med en skilletrakt. Hydrolysatet ble til slutt frysetørket. Det produsert totalt 648,75 gram ørrethydrolysat.



*Bilde 1: Bioreaktor*

*Bilde 2: Hydrolysat etter hydrolyse*



*Bilde 3: Separering av hydrolysat fra lipider og sedimenter*

*Bilde 4: Hydrolysat etter frysetørking*



## 2.4 Tilvirking av produktene

### 2.4.1 Produksjon av fiskekaker

For å produsere fiskekakene ble følgende grunnoppskrift og fremgangsmåte benyttet:

- 600 g fersk torsk, 600 g fersk hyse og 16 g salt ble tilsatt i en food-prosessor og blandet sammen til fiskekjøttet var grovkuttet.
- 30 g potetmel, 8 g pepper, 5 g hvitløkspulver, 4 g muskat, 2 egg (totalt 113 g egg uten skall) og 200 g lettmelk tilsettes.

1200 gram av fiskefarsen ble brukt til produksjon av fiskekaker til sensorisk analyse.

Fiskefarsen ble delt inn i fire batcher á 300 gram. Det blir 5 fiskekaker per batch som ble delt inn i fire biter hver. Dette ga oss 20 smaksprøver per batch, en batch pr mengde hydrolysatinnhold.

I en stekepanne ble det tilsatt 23g smør, og fiskekakene ble så stekt ved middels varme til gjennomstekt.

Batch 1 - 0% hydrolysat (Kontrollbatch)	Ørrehydrolysat ble ikke tilsatt.
Batch 2 - 5% hydrolysat	5% av farsen. Altså 15 gram farse ble erstattet med 15 gram ørrehydrolysat
Batch 3 - 10% hydrolysat	10% av farsen. Altså 30 gram farse ble erstattet med 30 gram ørrehydrolysat
Batch 4 - 15% hydrolysat	15% av farsen. Altså 45 gram farse ble erstattet med 45 gram ørrehydrolysat

Ved å bytte ut fiskefarse med hydrolysater sikrer man at hver enkelt batch har samme vekt, og at fiskekakene blir like tunge.

## 2.4.2 Produksjon av smoothie

I motsetning til produksjon av fiskekaker, hvor vi lagde all farsen først, for så å dele den inn i fire batcher, ble hver enkelt batch smoothie laget hver for seg.

Grunnopskriften og fremgangsmåten pr batch smoothie var som følgende:

150 g smoothieblanding (banan, jordbær, blåbær), 100 g frosne blåbær, 250 g appelsinjuice og 100 g vaniljeyogurt blendes sammen i en blender

Dette ga 600 gram smoothie per batch. Denne prosessen ble gjennomført 4 ganger, og hydrolysatfordelignen ble som følgende:

Batch 1 - 0% hydrolysat (Kontrollbatch)	Hydrolysat ble ikke tilsatt.
Batch 2 - 5% hydrolysat	30 gram ørrehydrolysat ble tilsatt. Dette tilsvarer et hydrolysatinnhold på 5%
Batch 3 - 10% hydrolysat	60 gram ørrehydrolysat ble tilsatt. Dette tilsvarer et hydrolysatinnhold på 10%
Batch 4 - 15% hydrolysat	90 gram ørrehydrolysat ble tilsatt. Dette tilsvarer et hydrolysatinnhold på 15%

Selv om vekten ble forskjellig på de 4 batchene, blir prosentandel hydrolysat som det skal. Smoothie, i motsetning til fiskekake er ikke like avhengig av at vekten fordeles likt fordi serveringsmetoden er ulik.

## 2.5 Kjemiske analysemetoder

Kjemiske analyser ble gjennomført på laboratoriet på campus i Ålesund.

## 2.5.1 Aminosyrebestemmelse

Det ble veid opp 0,1 gram frystørket hydrolysat i to forskjellige glassrør. Deretter ble 2 ml HCl (hydrogenoksid 6 mol) blandet oppi hvert av glassene med hydrolysatet. Glassene ble stående i varmeskap (105 grader celsius) i 24 timer. 0,5 gram av HCl-blandingen ble fortynnet i 4,5 gram destillert vann for å gi forholdet 1:10. Deretter ble denne nye blandingen fortynnet på nytt med forholdet 1:5 (1 gram av HCl-blandingen (1:10) ble fortynnet med 4 gram destillert vann). Dette ga fortynningen 1:50. Den fortynnede prøven ble filtrert gjennom et sprøytefilter på 0,22µm.

Det ble overført 300 µl til glassrør. Det ble tilsatt 600µl 0,4M borat-buffer med pH 9, deretter ble det tilsatt 600 µl FMOC (15 mM, løst i acetonitrile). Etter 5 minutter ble det tilsatt 600 µl ADAM (600mM, løst i H<sub>2</sub>O:acetonitrile(50% av hver)). Dette ble filtrert gjennom sprøytefilter og ble plassert i HPLC-vial.

HPLC-maskin (High-Performance Liquid Chromatography maskin) ble tatt i bruk.

Kolonnetemperaturen var 35 grader Celsius. 0,5 µl av prøven ble brukt i HPLC-metoden.

Mobilfase A: 20 millimolar ammoniumfosfat i H<sub>2</sub>O

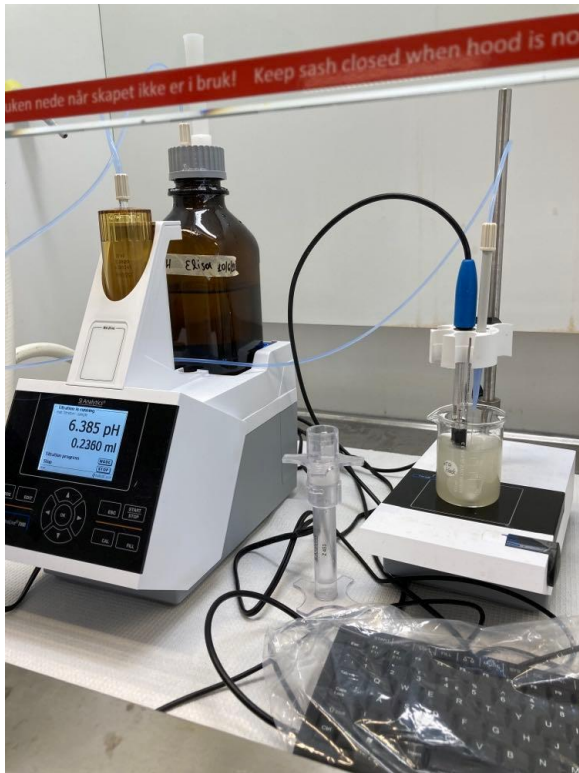
Mobilfase B: 10 millimolar ammoniumfosfat i acetonitril:H<sub>2</sub>O, 90:10

Analyse tok 35 minutter. Flow-farten var 0,65 ml/min de første 12 minuttene deretter var flow-farten 0,225 ml/min. Gradientmetode ble tatt i bruk der vi startet med 20% mobilfase B, og sluttet med 100% mobilfase B.

## 2.5.2 Hydrolysegrad og frie aminosyrer

To prøver ble tatt. 1,5 gram hydrolysat og 48,5 gram destillert vann ble veid opp og blandet i glass. Vekt (0,0001g) ble benyttet. Nøyaktig mengde benyttet hydrolysat ble notert for beregning senere (se vedlegg). Blandingen måtte ha 7 pH, derfor ble titran (NaOH 0,1M) tilsatt. Ph-måler ble benyttet.

10 ml formaldehyd ble tilsatt i hver prøve. Etter 5 minutter ble NaOH (0,1M) titrert prøvene til pH-verdien er 8,5. Det var viktig å notere ned nøyaktig mengde NaOH brukt for beregning av frie aminosyrer og hydrolysegrad (se vedlegg 2).



Bilde 5: titrering

### 2.5.3 Proteinløselighet

0,5 gram hydrolysat ble blandet sammen med 5,0 milliliter 0,05 M fosfatbuffer og vortexes i 60 sekunder. Blandingen ble deretter filtrert med glassull. 1 milliliter av denne væsken ble blandet med 9 milliliter fortynningsvæske (fosfatbuffer) slik at forholdet blir 1:100. Dette ble blandingen det ble kjørt tester av.

Det ble pipettert etter følgende tabell med tre paralleller for hver prøve:

Standard	Blank	1	2	3	4	5
µl standard	0	20	40	60	80	100
µl vann	100	80	60	40	20	0

Det ble tilsatt 5 milliliter fortynnet fargereagens i hvert reagensrør, disse ble deretter vortexet. Prøvene plasseres i spektrofotometer (595 nm). Etter 5 minutter var det mulig å lese av absorbans.



Bilde 6: Filtrering med glassull

Bilde 7: Tillaging av prøver

## 2.6 Fysiske analysemetoder

Fysiske analyser av FPH (fiskeproteinhydrolysat) ble gjennomført på laboratoriet på campus i Ålesund.

### 2.6.1 Tørrstoffanalyse

Tre prøver ble tatt. Først veies tre porselenskåler individuelt, vekten ble notert på papir. Deretter ble det veid opp 5 gram hydrolyse i hver av skålene. En vekt på 0,0001g ble benyttet ved oppveingen av hydrolysatet. Skålene med hydrolysatet ble plassert i tørkeskap på 105 grader celsius over 24 timer, og hydrolysatet ble deretter veid på nytt. Vekten av skålene ble subtrahert fra resultatet på vekten.



Bilde 8: Veiting av skål før tørking

## 2.6.2 Fargeanalyse

$L^*a^*b^*$  er et standard fargeparameter som måles for å bestemme farge på FPH (fiskeproteinhydrolysat) og andre matprodukt (Simavik, 2020). For å måle  $L^*a^*b^*$  ble et kolorimeter (Konica Minolta CR-400) benyttet til å måle absorbansen av bølgelengder fra lys ved en spesifikk frekvens i en prøve (Simavik, 2020).

$L^*$  indikerer lys der 0-50 indikerer svart farge og 50-100 indikerer hvit farge. En positiv  $a^*$  indikerer rød farge, mens en negativ  $a^*$  indikerer grønn farge. Positiv  $b^*$  indikerer gult mens negativ  $b^*$  viser blått (Simavik, 2020).

50 g hydrolysat ble veid opp og lagt i en gjennomsiktig ziplock-pose. Deretter ble det tatt tre ulike målinger fra tre ulike steder på posen.



Bilde 9: Fargemåling

## 2.7 Sensorisk analyse

Den sensoriske analysen ble gjennomført som en blindtest og tok sted i fellesområdet på Campus ved NTNU i Ålesund. Sensorisk analyse ble gjennomført på fiskekaker og smoothie. Det var fire varianter med henholdsvis 0%, 5%, 10% og 15% ørrehydrolysat av fiskekaker og smoothie. Det ble servert 20 smaksprøver fra hver av de fire batchene med fiskekake og smoothie, til sammen 80 smaksprøver med fiskekake og 80 smaksprøver med smoothie. Fiskekakeprøvene ble plassert på tallerken og satt frem på et bord i fellesområdet på campus, og samme antall prøver smoothie ble satt frem i plastglass på 2cl. Til sammen deltok 20 personer i blindtesten. Hver av deltakerne smakte på en fiskekakebit for hvert hydrolysatinnhold, og ett glass med smoothie per hydrolysatinnhold. Alle deltakerne fikk utdelt et skjema hvor de skulle score de forskjellige prøvene fra 1 til 10 på forskjellige egenskaper, der 1 var dårligste karakter, og 10 var beste. Disse var utseende, konsistens, smak, bitterhet og ettersmak.



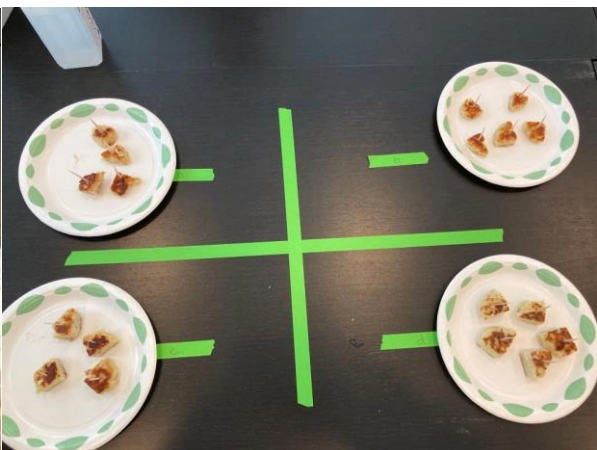
Bilde 10: Servering av smoothie og fiskekaker under sensorisk analyse



Bilde 11: Smoothie under sensorisk analyse



Bilde 12: Servering av smoothie under sensorisk analyse



Bilde 13: Servering av fiskekaker under sensorisk analyse



## 3.0 Resultater og diskusjon

Resultatene fra material og metode skal bli presentert og diskutert i denne delen av oppgaven.

### 3.1 Kjemiske og fysiske analyser

Tabell 1: Kjemiske og fysiske analyser

Vanninnhold %	Tørrstoff %	Frie aminosyrer %	Hydrolysegrad %	Proteinløselighet %
4,9 ± 0,15	95,1 ± 0,15	2,74 ± 0,22	43,13 ± 3,43	64,98 ± 3,45

Hydrolysatet hadde et vanninnhold på 4,9% ± 0,15% og inneholdt 95,1% ± 0,15% tørrstoff. Som vi ser i Tabell 1 er hydrolysegraden i hydrolysatet relativt høyt med en konsentrasjon på 43,13% ± 3,43%. Dette vil si at 43,13% ± 3,43% av aminosyrene i hydrolysatet har blitt delt opp gjennom hydrolyse. En høy hydrolysegrad gir en mer bitter smak (Opheim, 2015), det er derfor vanligvis mer ønsket med en lavere hydrolysegrad i hydrolysat som skal brukes i funksjonell mat. Vårt hydrolysat vil trolig ha en svært bitter smak som vil påvirke resultatene i sensorisk analyse.

Konsentrasjonen av frie aminosyrer i hydrolysatet er 2,74% ± 0,22%. Frie aminosyrer er aminosyrer som frigjøres gjennom hydrolysen.

Konsentrasjonen vannløselige proteiner i hydrolysatet er 64,98% ± 3,45%. Vannløselige proteiner kommer til under den enzymatiske hydrolysen. Høyere hydrolysegrad fører til høyere vannløselighet (Simavik, 2020). Høy proteinløselighet betyr at det er mange hydrofile aminosyrer som bidrar til høy løselighet, og færre hydrofobe aminosyrer (Simavik, 2020). En tidligere undersøkelse (Simavik, 2020) målte vannløseligheten til hydrolysat fra ørrethoder, og fant at konsentrasjonen av vannløselige proteiner var 80-90%. Dette er mye mer enn hydrolysatet vi produserte fra hel ørret. En høyere vannløselighet vil være gunstig til produksjon av funksjonell mat.

## 3.2 Fargeparameter til ørrethydrolysat

Tabell 2: Fargeanalyse

Lyshet (L*)	Rødhets (a*)	Gulhet (b*)
84,86 ± 0,39	1,14 ± 0,08	17,72 ± 0,46

Resultatene fra fargeanalysen i Tabell 2 viser at hydrolysatet fikk en gjennomsnittlig score på 84,86 L\* (lyshet), 1,14 a\* (rødhets) og 17,72 b\* (gulhet). Disse resultatene sier oss at pulveret vårt er lyst, ganske gult og noe rødt. Den gule og røde fargen i hydrolysatet kan forklares ved at fisken som ble benyttet, regnbueørret, er en rød fisk som inneholder astaxantin (Simavik, 2020). Hydrolysatet ble lagret i fryseskap over en kort periode. Lagring er noe som kan ha ført til oksidasjon av aminosyrer via påvirkning av lipidoksidasjon, men siden hydrolysatet ble fryselagret vil det trolig motvirke oksidasjon. Oksidasjon av aminosyrene er en faktor som bidrar til bruning i hydrolysatet, spesielt aminosyrene lysin, metionin, cystein, tyrosin og alanin (Simavik, 2020). Vårt hydrolysat har som vist i Tabell 2, en lav mengde alanin (0,65%) og en middels til lav mengde metionin (2,59%), mengden tyrosin er middels med 4,77%. Mengden lysin er derimot svært høy, med hele 20,81% av konsentrasjonen i hydrolysatet. Denne aminosyresammensetningen kan ha ført til en mild oksidasjon av hydrolysatet dersom hydrolysatet ikke hadde blitt fryselagret. Dersom hydrolysatet var lagret over lengre tid, kan oksidasjon av aminosyrene ha ført til en lavere L\* score i fargeanalysen. For bruk i funksjonell mat er det foretrukket at hydrolysatet har en høy L\*-verdi, altså at hydrolysatet er lyst, for å gi et mer appellerende utseende for konsum. Med L\*-scoren 84,86 kan vi regne med at hydrolysatet som ble produsert er har en farge som er godt egnet tilsetning i funksjonell mat. Dersom fargeparameteret til hydrolysatet hadde blitt analysert umiddelbart etter produksjonen kunne hydrolysatet trolig unngått aminosyreoksidasjon slik at L\*-verdien hadde vært noe høyere, altså at hydrolysatet hadde vært lysere.

## 3.3 Aminosyresammensetning

Tabell 3: Sammenligning av aminosyresammensetning fra hydrolysat fra hel ørret, og hydrolysat fra ørrethoder fra tidligere forsøk

Aminosyrer	% av hydrolysat fra hel ørret i vårt forsøk	% av hydrolysat fra fiskehoder (Simavik, 2020)	Essensiell eller ikke-essensiell
Arginin	3,67	9,5 ± 0,1 (Gly/Arg)	Essensiell
Treonin	3,45	6,3 ± 0,5	Essensiell
Metionin	2,59	2,1 ± 0,1	Essensiell
Valin	0,99	3,9 ± 0,1	Essensiell
Fenylalanin	5,37	3,1 ± 0,1	Essensiell
Isoleucin	5,07	1,8 ± 0,0	Essensiell
Leucin	10,78	3,6 ± 0,1	Essensiell
Histidin	2,17	8,4 ± 0,5	Essensiell
Lysin	20,81	10,6 ± 0,3	Essensiell
Serin	3,99	4,7 ± 0,4	Ikke-essensiell
Asparaginsyre	5,99	2,4 ± 0,1	Ikke-essensiell
Glutaminsyre	9,66	13,7 ± 0,4	Ikke-essensiell
Glycin	13,44	9,5 ± 0,1 (Gly/Arg)	Ikke-essensiell
Alanin	0,65	10,7 ± 0,3	Ikke-essensiell
Prolin	6,60	*	Ikke-essensiell
Tyrosin	4,77	3,7 ± 0,1	Ikke-essensiell

\* Konsentrasjon av prolin ble ikke målt i tidligere forsøk gjennomført av Kristina Simavik

Tabell 4: Prosentandel essensielle- og ikke-essensielle aminosyrer i hydrolysatet

Mengde essensielle aminosyrer i %	Mengde ikke-essensielle aminosyrer i %
54,9	45,1

I Tabell 3 kan vi se sammensetningen av aminosyrer i prosent fra ørrethydrolysatet ved bruk av HPLC-metoden. Tabellen viser oversikt over både essensielle- og ikke essensielle aminosyrer. Sammensetningen av aminosyrer spiller en rolle for hydrolysatets struktur, funksjonalitet og næringsverdi (Simavik, 2020). Vi kan se at ørrethydrolysatet i hovedsak består av den essensielle aminosyren lysin, med 20,81% av andelen. 13,44% av hydrolysatet

består av den ikke-essensielle aminosyren glycin, etterfulgt av den essensielle aminosyren leucin med 10,78% av andelen. Alanin hadde lavest konsentrasjon i hydrolysatet med kun 0,65%.

Fiskehydrolysatene har som nevnt tidligere blitt delt opp i kortere peptider gjennom enzymatisk hydrolyse, noe som gjør dem lett å absorbere i forhold til proteiner som ikke har gjennomgått hydrolyse. Forskjellige typer aminosyrer med helsefremmende effekter befinner seg i FPH (Zanutto-Elgui et al., 2019). Essensielle aminosyrer er viktige for mennesker å få i seg gjennom maten vi konsumerer, ettersom dette er aminosyrer som kroppen ikke har evnen til å produsere selv. Tidligere har det blitt gjennomført forsøk som viser at aminosyrene lysin og tryptofan er viktige for å forebygge hemmet vekst hos barn, og burde bli konsumert i tilstrekkelig mengde (Chasanah et al., 2019). I land hvor underernæring er et problem hos barn kan FPH potensielt være en veldig god kilde til de essensielle aminosyrene som forebygger hemmet vekst hos barn (Chasanah et al., 2019).

Tidligere har det blitt gjennomført analyse av aminosyresammensetningen til hydrolysat fra ørrethoder undersøkt i 2020 (Simavik, 2020). Syrehydrolyse ble brukt som hydrolysemetode i denne undersøkelsen, i motsetning til enzymatisk hydrolyse som ble gjennomført av oss. Sammenliknet med denne undersøkelsen kan vi se at hydrolysatet som vi produserte fra hele ørreten har forskjellig aminosyresammensetning. Lysin, som hadde dominerende konsentrasjon i hydrolysatet fra hel ørret (20,81%), hadde kun en konsentrasjon på  $10,6\% \pm 0,3\%$  i hydrolysatet fra ørrethode. Lysin er en essensiell aminosyre som forebygger hemmet vekst hos barn, og som kan tilsettes funksjonell mat, det kan derfor diskuteres at hydrolysater fra hel ørret egner seg bedre for dette formålet enn hydrolysater fra fiskehoder.

Den høyeste verdien for hydrolysatet fra ørrethoder var glutaminsyre ( $13,7 \pm 0,4$ ), og var høyere enn hos hydrolysat fra hele ørreten. Glutaminsyre er en av de vanligste aminosyrene å finne i proteiner, så den høye konsentrasjonen er forventet. Glutaminsyre regnes ikke som en essensiell aminosyre.

Leucin hadde en høy konsentrasjon i hydrolysat fra hele ørreten (10,78%), men kun  $3,6\% \pm 0,1\%$  i hydrolysatet fra ørrethoder. Leucin er også en av de vanligste aminosyrene fra proteiner, så det gir mening at hydrolysatet fra hel ørret har større mengder leucin enn hydrolysat fra ørrethoder, ettersom hel ørret inneholder mer kjøtt enn fiskehoder.

Glycin hadde en høy konsentrasjon i begge hydrolysatene, men hadde høyere konsentrasjon i hydrolysat fra hel ørret. Glycin befinner seg i store mengder i kollagen som finnes i bein og skinn (Simavik, 2020). Konsentrasjonen av glycin var likevel høyere i hydrolysatet fra hele

ørreten, noe som overrasket, ettersom fiskehode består av store mengder bein og skinn i forhold til kjøtt.

Alanin hadde lavest konsentrasjon i hydrolysat fra hel ørret med kun 0,65%, mens det var  $10,7\% \pm 0,3\%$ . I hydrolysatet fra fiskehodene hadde isoleucin lavest konsentrasjon med  $1,8\% \pm 0,0\%$ . Fra hydrolysatet fra hel ørret var konsentrasjonen av isoleucin 5,07%.

Leucin er en aminosyre som bidrar til en bitter smak i hydrolysatet. En kan se i Tabell 5 at leucin har en høyere konsentrasjon i hydrolysatet fra hel ørret enn hydrolysatet fra fiskehoder. Dette forteller oss at hydrolysatet fra hel ørret sannsynligvis vil ha en mer bitter smak (Simavik, 2020).

### 3.4 Sensorisk analyse

Tabell 5: Viser score for egenskapene til fiskekakene som ble analysert

	Fiskekaker 0% hydrolysat	Fiskekaker 5% hydrolysat	Fiskekaker 10% hydrolysat	Fiskekaker 15% hydrolysat
Utseende (1-10)	$8,48 \pm 3,70$	$8,33 \pm 3,32$	$6,62 \pm 1,97$	$7,48 \pm 2,73$
Konsistens (1-10)	$8,52 \pm 2,89$	$7,81 \pm 2,03$	$6,67 \pm 1,60$	$5,62 \pm 1,97$
Smak (1-10)	$8,24 \pm 2,60$	$8,14 \pm 2,28$	$7,14 \pm 2,64$	$6,48 \pm 1,85$
Bitterhet (1-10)	$2 \pm 4,63$	$2,71 \pm 2,89$	$3,81 \pm 1,91$	$4,57 \pm 1,66$
Ettersmak (1-10)	$3,62 \pm 2,18$	$4,81 \pm 1,73$	$4,86 \pm 1,66$	$5,62 \pm 1,66$

Vi samlet inn tilbakemeldinger fra 20 personer, som hver smakte på de 4 ulike fiskekakevariantene og rangerte hver enkelt egenskap på en skala fra 1-10 der 1 er dårligst og 10 er best på egenskapene utseende, konsistens og smak. For egenskapene bitterhet og ettersmak tilsvarende en score på 1 at det er lite bitterhet og ettersmak, og 10 kraftig bitterhet og

ettersmak. Tabell 5 viser gjennomsnittlig score for de forskjellige egenskapene til fiskekakene som ble analysert i sensorisk analyse.

Vi ser først på utseende. Vi ser at ut i fra tabell 5 at scoren varierer lite mellom hver av de fire ulike variantene. Scoren er høyest for fiskekakene med 0% hydrolysat, med 8,48 poeng. Den laveste scoren for utseende ser vi i fiskekakene med 10% hydrolysat, som scoret 6,62. Dette utgjør en forskjell på kun 1,86 fra høyeste til laveste score for utseende.

Dette kan fortelle at hydrolysatinnhold opp til så mye som 15%, som er det meste vi tilsatte i denne testen, har lite å si for utseende til et produkt som fiskekake. Det kan være marginale forskjeller i fiskekakene ettersom produksjonen ble gjennomført i separate batcher, men faktorer som forskjeller i steking (steketid og temperatur) kan ha hatt en større påvirkning på utseende enn mengden hydrolysat i fiskekakene.

Når det kommer til fiskekakenes konsistens ser vi at scoren synker i takt med økende hydrolysatinnhold. Høyeste score for konsistens fikk fiskekakene med 0% tilsatt hydrolysat, med en score på 8,52 poeng, mens den laveste scoren var for fiskekakene med 15% tilsatt hydrolysat med 5,62 poeng. Dette utgjør en forskjell på 2,9 poeng fra høyeste til laveste score. Vi ser dermed at jo høyere innhold av hydrolysat desto mindre appellerende konsistens har produktet ved konsum.

Den synkende scoren kan forklares ved at ørrehydrolysatet skaper et tørrere produkt når prosentandelen av hydrolysat øker, ettersom hydrolysatet består av cirka 95,1% tørrstoff. Dette gir fiskekakene lavere væskeinnhold og gjør at fiskekakene får en tørrere konsistens og smuldrer lettere.

Lange peptidkjeder i hydrolysatet vil føre til nedsatt vannløselighet. Den enzymatiske hydrolysen deler disse peptidbindingene inn i kortere peptidbindinger, noe som fører til økende vannløselighet (Kristinsson & Rasco, 2000). I tabell 1 ser vi at proteinløseligheten er 64,98%, som betyr at 64,98% av hydrolysatet består av store peptidbindinger som har lav vannløselighet. Dette kan føre til at proteinene klumper seg sammen og ikke løser seg i fiskefarsen, noe som reduserer fiskekakenes bindingsevne.

Smak er kanskje den aller viktigste parameteren i testen. Vi valgte derfor å dele denne inn i tre ulike parametere. Generell smak, bitterhet og ettersmak. Årsaken til at vi har en egen score for bitterhet er at hydrolysatet, som tidligere nevnt, har en karakteristisk bitter smak og

fiskelukt som har gjort det vanskelig for bruk av funksjonell mat til humant konsum (Opheim, 2015). En score på 1 indikerer ingen bitter smak, og en score på 10 vil tilsi en svært bitter smak.

Bitterhet og ettersmak henger tett sammen. Et svært bittert produkt vil vanligvis også ha en sterk og langvarig ettersmak, og derfor har vi valgt å inkludere ettersmak i scoringen. For ettersmak betyr en score på 1 lite/mild ettersmak mens en score på 10 indikerer kraftig ettersmak.

For generell smak var høyeste score for fiskekakene med 0% tilsatt hydrolysat, med 8,24 poeng, mens laveste score fikk fiskekakene med 15% tilsatt hydrolysat, med 6,58 poeng. Dette utgjør en forskjell på 1,66 poeng fra høyeste til laveste poengscore. Dette overrasket oss. Det som også er svært interessant er at til tross for at det er en betydelig nedgang i score fra beste til verste fiskekake, kun er 0,1 poeng som skiller fiskekaken med 0% og 5% tilsatt hydrolysat. Blindtesten viser oss at disse er tilnærmet like gode på smak, noe som betyr at et hydrolysatinnhold på inntil *minst* 5% ikke forringer smaken i stor grad. Fra fiskekaken med 5% hydrolysatinnhold, til fiskekaken med 10% hydrolysatinnhold faller scoren med ett poeng, som viser en betydelig nedgang i smak ved tilsetning av inntil 10% hydrolysat.

Når det kommer til bitterhet ser vi at laveste score, altså minst bitter, fikk som forventet fiskekakene med 0% tilsatt hydrolysat, med 2 poeng. Høyeste score, altså mest bitter, fikk, også her som forventet, fiskekakene med det høyeste hydrolysatinnholdet, 15%, med 4,57 poeng. Fra laveste til høyeste score skiller det her 2,57 poeng, noe som utgjør en ganske stor forskjell. Den største forskjellen ser vi mellom fiskekakene med 5% og 10% tilsatt hydrolysat. Her skiller det 1,1 poeng. Fra fiskekakene med 0% til fiskekakene med 5% tilsatt hydrolysat, og fra fiskekakene med 10% til 15% tilsatt hydrolysat skiller henholdsvis 0,71 og 0,76 poeng. At scoren for bitterhet skulle øke i takt med økt innhold av hydrolysat var som forventet.

Ser vi på tallene for ettersmak ser vi at fiskekakene med 0% tilsatt hydrolysat hadde en score på 3,62. Vi legger denne verdien til grunn som standard for ettersmak på fiskekake, da de ikke var tilsatt andre ingredienser som skal ha stor innvirkning på denne verdien. Fra en score på 3,62 ser vi en økning på 1,19 poeng til fiskekakene som var tilsatt 5% hydrolysat. At fiskekakene ble tilsatt 5% hydrolysat hadde dermed betydelig innvirkning på fiskekakenes ettersmak. Videre ser vi at det kun skiller 0,05 poeng mellom fiskekakene med 5% tilsatt

hydrolysat og 10% tilsatt hydrolysat. Dette var for oss en overraskende lav forskjell. Videre ser vi at det er et betydelig sprang fra fiskekakene med 10% tilsatt hydrolysat, til fiskekakene med 15% tilsatt hydrolysat, med en økning på 0,76 poeng. Mellom fiskekakene med laveste (0% tilsatt hydrolysat) og høyeste (15% tilsatt hydrolysat) skiller 2 poeng.

Den sensoriske analysen viste at økende mengde hydrolysat i produktet samsvarer med synkende poengscore til egenskapene. Dette er ikke overraskende, da fiskeproteinhydrolysat lenge har blitt forsket på, og dets egenskaper godt dokumentert. Disse egenskapene inkluderer bitter smak, emulgerende evne m.m. Dette er grunnen til at hydrolysatet blir forsøkt skjult med andre smaker i dette forsøket. Det var likevel overraskende liten forskjell mellom egenskapene til produktene med 0% og 5% hydrolysat.

Tabell 6: Viser score for egenskapene til smoothie som ble analysert

	Smoothie 0% hydrolysat	Smoothie 5% hydrolysat	Smoothie 10% hydrolysat	Smoothie 15% hydrolysat
Utseende (1-10)	9,01 ± 3,74	7,90 ± 1,85	5,29 ± 1,06	4,29 ± 1,16
Konsistens (1-10)	7,63 ± 2,13	7,53 ± 1,73	4,71 ± 1,06	3,65 ± 1,57
Smak (1-10)	8,68 ± 2,89	5,32 ± 1,60	1,82 ± 2,79	1,59 ± 3,27
Bitterhet (1-10)	2,79 ± 2,79	4,47 ± 1,45	5,88 ± 1,25	8,29 ± 2,16
Ettersmak (1-10)	3,63 ± 2,08	4,16 ± 1,66	6,39 ± 1,03	8,29 ± 2,21

For den sensoriske analysen av smoothie la vi til grunn de samme kriteriene som for fiskekaker. Dette for å enklere kunne sammenligne de to alternativene i etterkant. Også her hadde vi en kontrollbatch med 0% tilsatt hydrolysat.



Først ser vi på utseende. Vi kan se at scoren på utseende reduseres etter hvor mye hydrolysat som befinner seg i produktet. Desto mer hydrolysat, desto lavere score. Scoren har også her en drastisk nedgang mellom 5% og 10%. Reduksjonen på utseende kan forklares ved at smoothien ble lysere og lysere desto mer ørrehydrolysat som var tilsatt, sammenlignet med den friske rosafargen på kontrollbatchen. Proteinene fra yogurt i smoothien binder seg med ørrehydrolysatet, noe som fører til et lysere og mer luftig, nesten skumaktig, utseende (Nguyen et al., 2017).

Kontroll-batchen scoret her 9,01 poeng. Fra kontrollbatchen til den tilsatt 5% faller scoren med 1,11 poeng. Til batchen med 10% hydrolysat faller den mer drastisk med 2,61 poeng. Den dårligste scoren fikk smoothien med 15% tilsatt hydrolysat, med 4,29. Det er ett poeng lavere enn smoothien med 10% tilsatt hydrolysat, og 4,72 poeng lavere enn beste score. Vi ser derfor at en hydrolysatinnhold på inntil 5% ikke drastisk påvirker utseendet til smoothien.

Scoren for konsistens blir også redusert jo mer hydrolysat som tilsettes produktet. Dette kan forklares med at hydrolysater har emulgerende egenskaper (Nguyen et al., 2017). Mer proteiner gir mer emulgerende egenskaper som fører til at smoothien får en tettere konsistens, noe som kan ha bidratt til trenden vi ser i tabellene. Luftigere konsistens som følger av yogurtproteiner som binder seg med ørrehydrolysatene kan på lik linje med utseende ha bidratt til mindre appellerende konsistens i produktet (Ucak et al., 2021).

Når det kommer til konsistens var beste score 7,63 poeng. Dette var for kontrollbatchen med 0 % tilsatt hydrolysat. Smoothien med 5% tilsatt hydrolysat scoret 7,53, 0,10 poeng under beste score. Fra smoothien med 5% tilsatt hydrolysat til den med 10% tilsatt hydrolysat faller scoren betydelig, til 4,71 poeng som utgjør en forskjell på 2,82 poeng. Dette kan muligens forklares ved at de emulgerende egenskapene til hydrolysatet overstyres dersom innholdet av hydrolysat blir for høyt, og at konsistensen dermed blir tykkere (Nguyen et al., 2017).

Smoothien med 15% tilsatt hydrolysat oppnår dårligste score, men 3,65 poeng. 1,06 poeng lavere enn smoothien med 10% tilsatt hydrolysat, og 3,98 poeng lavere enn beste score.

Som for fiskekakene er også her smak den mest interessante parameteren, og den er delt inn i de samme tre underkategoriene som for fiskekakene; generell smak, bitterhet og ettersmak. Økende mengde hydrolysatinnhold fører til mer bitter smak i smoothien på grunn av de mange korte peptidbindingene (Himonides et al., 2011). Den bitre smaken ble forsøkt skjult

av appelsinjuice som er syrlig, men vi ser at dette ikke ble tilstrekkelig for å kamuflere smaken av hydrolysatet.

For generell smak fikk kontrollbatchen 8,68 poeng, på en skala fra 1 - 10 der 1 er laveste og 10 høyeste mulige poengsum, og ble dermed den med høyeste poengscore også her. Allerede ved 5% tilsatt hydrolysat faller denne scoren kraftig. Denne batchen mottok en poengscore på 5,23, som utgjør en reduksjon på 3,36 poeng sammenlignet med beste score. Fra batchen med 5% tilsatt hydrolysat, til batchen med 10% tilsatt hydrolysat faller scoren ytterligere, ned til 1,82 poeng, som utgjør en reduksjon på 3,5 poeng. Dårligste score får smoothien med 15% tilsatt hydrolysat. Den scorer så lavt som 1,59 poeng, som utgjør en reduksjon på 7,09 fra beste score. Vi ser at ingrediensene i smoothien klarer å skjule smaken til en viss grad dersom det er et lavt nok innhold av hydrolysater, men at den bitre smaken til hydrolysatene overstyrer smaken dersom en større mengde tilsettes.

For parameteren bitterhet tilsier en score på 1 ingen bitterhet, mens en score på 10 tilsier at smoothien var svært bitter på smak. Kontrollbatchen fikk en score på 2,79, altså relativt lite bitter. Den smoothien som var mest bitter på smak var den med 15% tilsatt hydrolysat, som fikk en score på 8,29. Dette utgjør en forskjell på 5,5 poeng. Vi ser at at det er en jevn stigning i poengscore jo mer hydrolysat som var tilsatt smoothiene.

Siste parameter som ble målt var ettersmak, der en score på 1 tilsier lite ettersmak, mens en score på 10 tilsier kraftig ettersmak. Smoothien med minst ettersmak var kontrollbatchen, men en score på 3,63, og den med mest ettersmak var smoothien med 15% tilsatt hydrolysat, med en score på 8,29. Også her er det en jevn stigning i poengscore, jo mer hydrolysat som er tilsatt. Det største spranget ser vi i midlertidig fra smoothien med 5% tilsatt hydrolysat, til smoothien med 10% tilsatt hydrolysat, men en forskjell på 2,23 poeng.

Bitterhet og ettersmak henger tett sammen ettersom at de bitre peptidene har en langvarig ettersmak. Vi kan se at bitterhet og ettersmak øker i score desto mer hydrolysat(er) som tilsettes produktet. Dette er forventet ettersom at den bitre smaken blir vanskeligere å skjule dersom hydrolysatinnholdet er høyere.

## 4.0 Konklusjon

Bioaktive peptider og essensielle aminosyrer er viktige for mennesker å få i seg gjennom maten en spiser. Bioaktive peptider fremmer en rekke gode helseeffekter hos mennesker, og er derfor viktige å konsumere i tilstrekkelige mengder. For mange kan det av ulike årsaker være utfordrende å få i seg tilstrekkelig mengde av disse peptidene. Vi har gjennom denne oppgaven utviklet to ulike produkter som bedre vil kunne tilrettelegge for at flere vil få mulighet til å konsumere mat med økt innhold av peptider. Smoothie var en av produktene vi valgte å tilsette hydrolysat. En av grunnene er at smoothie ikke må tygges, og er derfor lett å konsumere for blant annet eldre mennesker, barn eller andre som sliter av ulike årsaker har problemer med å innta fast føde. Det andre produktet vi utviklet var fiskekaker. Fiskekaker er fast føde, men har andre fordeler, som at det er langt enklere å kunne kamuflere bitterheten i et slik produkt.

På den sensoriske analysen som ble gjennomført var det for begge produktene alltid gradvis synkende score på egenskapene utseende, smak og konsistens, og økende score for bitterhet og ettersmak jo høyere andel av hydrolysat som var tilsatt, med kun ett unntak, der fiskekaken med 15% tilsatt hydrolysat scoret noe høyere enn fiskekaken med 10% tilsatt hydrolysat på utseende. Her finnes det med andre ord fortsatt stort forbedringspotensiale og det vil derfor i fremtiden være nødvendig med ytterligere arbeid innen produktutvikling for å bedre kunne kamuflere hydrolysatet og skape et appetittelig produkt.

Gjennom arbeidet med denne oppgaven har det blitt arbeidet med produksjon av proteinhydrolysat, gjennomført flere analyser og jobbet med utvikling av funksjonelle matvarer. Gjennom forsøket har vi erfart at det er enklere å kamuflere proteinhydrolysat i et fiskebasert produkt. Vi har erfart at smakene vi brukte for å kamuflere den bitre FPH i smoothie, ikke var tilstrekkelige, og at disse ingrediensene bør byttes ut. Dersom vi skulle gjort dette forsøket om igjen ville vi prøvd å bruke andre bitre smaker i smoothie for å kamuflere smaken, som for eksempel grapefrukt. I fremtidig arbeid vil det også være interessant å se på hydrolysat av hvit fisk, og sammenligne dette med hydrolysatet fra ørret.

## 5.0 Referanser

- Alimentari, S. E. T. (2021). *STUDY OF THE EFFECT OF BHT AND NITROGEN ADDITION ON OXIDATIVE STABILITY OF RAINBOW*.
- Chasanah, E., Susilowati, R., Yuwono, P., Zilda, D. S., & Fawzya, Y. N. (2019). Amino acid profile of biologically processed fish protein hydrolysate (FPH) using local enzyme to combat stunting. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/278/1/012013>
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>
- Fernandes, P. (2016). Enzymes in fish and seafood processing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00059>
- God og riktig mat hele livet. (n.d.). 1–44.
- Himonides, A. T., Taylor, A. K. D., & Morris, A. J. (2011). A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Model Systems. *Food and Nutrition Sciences*, 02(06), 575–585. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.26081>
- Ibrahim, H. (2004). *Food Chemistry Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) living in seawater and freshwater. May 2021*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.028>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 40, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, 83(2), 317–331. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1067-3>
- Of, T. H. E. S. (2020). *WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE*.
- 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. In *1 B. (Flere Pag.)*. <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2495845>
- Richardsen, R., & Nystøyl, R. (2017). *Analyse marint restråstoff, 2016*. 55.

Simavik, K. R. (2020). *Hydrolyse av restråstoff fra regnbueørret ( Oncorhynchus mykiss ) Effekten av antioksidanter på kvalitet under lagring. June.*

Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., & Barba, F. J. (2021). Functional and Bioactive Properties of Peptides Derived from Marine Side Streams. *Marine Drugs*, 19(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md19020071>

Zanutto-Elgui, M. R., Vieira, J. C. S., Prado, D. Z. do, Buzalaf, M. A. R., Padilha, P. de M., Elgui de Oliveira, D., & Fleuri, L. F. (2019). Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*, 278(November 2018), 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119>

FAO, January 2022. FAO cultured aquatic species fact sheets, *Oncorhynchus mykiss*.

Tilgjengelig fra:

[https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/l1129m/file/en/en\\_rainbowtrout.html](https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/l1129m/file/en/en_rainbowtrout.html)

Statistisk sentralbyrå. *Fiskeoppdrett*. 2020-10-29 (hentet den 14.05.2022); Tilgjengelig fra:

<https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>

## 6.0 Vedlegg

Vedlegg 1 - Tørrstoffprøve:

A1:

Før tørking:

Skål: 101,0825 g

Hydrolysat: 5,045 g

Etter tørking:

$105,8827 \text{ g} - 101,0825 \text{ g} = 4,8002 \text{ g}$

A2:

Før tørking:

Skål: 88,9650 g

Hydrolysat: 5,0740 g

Etter tørking:

$93,7990 \text{ g} - 88,9650 \text{ g} = 4,834 \text{ g}$

A3:

Før tørking:

Skål: 74,5379 g

Hydrolysat: 5,0539 g

Etter tørking:

$79,3380 \text{ g} - 74,5379 \text{ g} = 4,8001 \text{ g}$

Vedlegg 2 - Hydrolysegrad og konsentrasjon av frie aminosyrer:

Glass 1 hadde 6,42 pH, 2,77 ml titran ble tilsatt

Konsentrasjon av frie aminosyrer:

$C = (2,77 * 1 * 14,007 * 100) / (1,5011 * 1000) = 2,58\%$

Hydrolysegrad:

$(2,58 * 98,5) / (6,25) = 40,7\%$

Glass 2 hadde 6,40 pH, 3,10 ml titran ble tilsatt

Konsentrasjon av frie aminosyrer:

$$C2 = (3,10 * 1 * 14,007 * 100) / (1,5043 * 1000) = 2,89\%$$

Hydrolysegrad:

$$(2,89 * 98,5) / (6,25) = 45,55\%$$

	Hydrolysegrad	Frie aminosyrer
Gjennomsnitt	43,13	2,74
Standardavvik	3,43	0,22

Vedlegg 3 - Aminosyrebestemmelse:

Glass 1: 0,1006 g

Glass 2: 0,1001 g

Vedlegg 4 - Fargeanalyse:

	L*	a*	b*
Måling 1	84,41	1,08	17,56
Måling 2	85,08	1,12	18,24
Måling 3	85,10	1,23	17,37
Gjennomsnitt	84,86	1,14	17,72
Standardavvik	0,39	0,08	0,46

Vedlegg 5 – Proteinløselighet:

