

Victoria Wikdahl
Andreas Bull

Effekten av ultralydbehandling før enzymatisk hydrolyse på protein i silderestråstoff

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Janna Cropotova
Medveileder: Kristine Kvangarsnes
Mai 2023

Victoria Wikdahl
Andreas Bull

Effekten av ultralydbehandling før enzymatisk hydrolyse på protein i silderestråstoff

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Janna Crobotova
Medveileder: Kristine Kvangarsnes
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Bacheloroppgaven er skrevet våren 2023. Gjennom studieløpet har vi opparbeidet en interesse for havets ressurser og måter disse kan bedre utnyttes på. Vi var begeistret over muligheten til å se på utnyttelsen og delta i utviklingen av metodikk rundt ekstrahering av komponenter fra restråstoff. Oppgaven er tilknyttet ERA-NET Blue Bio prosjektet “IMPRESSIVE – Improved Processing to Enhance Seaood Sidestream Valorization and Exploration”. Prosjektet har som mål å legge til rette for full utnyttelse av pelagisk fiskerestråstoff i næringsmiddelindustrien ved å bruke innovative teknologier. Utbytte og kvalitet av pelagisk fiskerestråstoff er i fokus og sees i sammenheng med fysiske, kjemiske, funksjonelle og bioaktive egenskaper (Cropotova, 2022)

Tusen takk til vår veileder Janna Cropotova og bi-veileder Kristine Kvangarsnes for god akademisk veiledning og bistand med labarbeid. Vi vil også takke Lars C. Gansel for gode råd i forbindelse med oppgaveskrivingen.

Sammendrag

Våren 2023 ble det gjennomført diverse analyser av to forskjellige fiskeproteinhydrolysater ekstrahert fra restråstoff fra norsk vårgytende sild (*Clupea harengus L.*). Det ene fiskeproteinhydrolysatet var ekstrahert med tradisjonell enzymatisk hydrolyse og det andre var ekstrahert med bruk av ultralydbehandling som forberedende metode til den enzymatiske hydrolysen. Analysene skulle belyse hvorvidt ultralydbehandling kan ha positiv påvirkning på fiskeproteinhydrolysater ekstrahert ved enzymatisk hydrolyse. Kvalitetsparameterne som ble vurdert for å analysere ultralydens effekt var tørrstoff, aske, proteininnhold, vann, fett, proteinløselighet, frie aminogrupeer, hydrolysegrad, proteinoksidasjon (tioler og karbonylgrupper), total aminosyresammensetning og farge. Resultatene fra disse analysene viste hvordan ultralydbehandlingen har eller ikke har, påvirket utbytte og kvaliteten i forhold til de fysiske, kjemiske og funksjonelle egenskapene til proteinene i fiskeproteinhydrolysatet. Hensikten med analysene var å se hvorvidt man kan forbedre ekstraksjon av verdifulle komponenter, hovedsakelig høyverdige proteiner, fra silderestråstoff. I lys av dette ble forskningsspørsmålet *“Hvordan vil bruk av ultralyd som forberedende metode til enzymatisk hydrolyse av silderestråstoff påvirke utbytte og kvalitet i forhold til de fysiske, kjemiske og funksjonelle egenskapene til proteinene i hydrolysatet?”* formulert. Da dette er første gang disse metodikkene benyttes i kombinasjon med dette restråstoffet var prosjektet noe uforutsigbart. Videreutvikling av metodikken, samt mer forskning vil være nødvendig, men dette prosjektet har fungert som et godt første steg og videre forskning vil ha et godt grunnlag å basere seg på.

Abstract

Throughout the spring of 2023, various analyses were conducted on two different fish protein hydrolysates extracted from by-products of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus L.*). The difference between the fish protein hydrolysates was that one was extracted using traditional enzymatic hydrolysis. The other was extracted by using ultrasonic treatment as a preparatory method for enzymatic hydrolysis. The analyses aimed to shed light on whether ultrasonic treatment possesses positive effects on the fish protein hydrolysate extracted by enzymatic hydrolysis. The analyses used to examine the effects of ultrasound included dry matter, ash, protein contents, moisture, fat, protein solubility, free amino groups, protein oxidation (thiols and carbonyl groups), total amino acid composition, and color. The results of these analyses demonstrated whether ultrasonic treatment has influenced the yield and quality of the physical, chemical, and functional properties of the fish protein hydrolysate. The purpose of this study was to evaluate whether the extraction of valuable components, especially high value protein from by-products of herring, could be improved by ultrasonic treatment. Considering this, the research question “How will the use of ultrasound as a preparatory method for enzymatic hydrolysis of herring by-products affect the yield and quality of the physical, chemical and functional properties of the proteins in the hydrolysate?” was formulated. Since this was the first time these methodologies were used in combination with this by-product, the project had some unpredictability. Further development of the method, as well as more research, will be necessary, but this project has served as a good initial step, providing a solid foundation for future research.

Forord.....	1
Sammendrag.....	2
Abstract.....	3
Forkortelser	7
1. Innledning	8
2. Teoretisk bakgrunn	11
2.1 Norsk vårgytende sild (<i>Clupea harengus L</i>) som råstoff	11
2.2 Enzymatisk hydrolyse av fiskerestråstoff	11
2.3 Tradisjonell og innovativ utnyttelse av restråstoff fra sild.....	12
2.4 Innovative teknologier brukt for å ekstrahere ingredienser fra fiskerestråstoff	12
2.4.1. Ultralyd.....	13
2.4.2. Pulserende elektrisk felt (PEF)	14
2.4.3. Høytrykksprosessering	14
2.5 Funksjonelle og bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat	15
2.5.1 Funksjonelle egenskaper til fiskeproteinhydrolysat	15
2.5.2 Bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat	16
2.6 Proteinoksidasjon	16
2.6.1 Tioler:	17
2.6.2 Karbonylgrupper:.....	18
3. Materialer & metoder.....	18
3.1 Silderestråstoff	18
3.2 Ultralyd behandling & enzymatisk hydrolyse.....	18
3.2.1 Tradisjonell enzymatisk hydrolyse	18
3.3.2 Enzymatisk hydrolyse med ultralydbehandling	21
3.4 Fysiske & kjemiske analysemetoder	21
3.4.1 Tørrstoff- & askeinnhold	21

3.4.2 Proteinløselighet ved Lowrymetoden	22
3.4.3 Frie aminogrupeer & hydrolysegrad ved formoltitrering.....	23
3.4.4 Proteinoksidasjon.....	24
3.4.5 Tioler	24
3.4.6 Karbonylgrupper.....	25
3.4.7 Fargemåling ved kolorimetri	26
3.4.8 Total aminosyrebestemmelse med HPLC	27
3.5 Statistiske analyser	28
4. Resultater	28
4.1 Utbytte fra enzymatisk hydrolyse & ultralydbehandling	28
4.2 Kjemisk sammensetning av fiskeproteinhydrolysat.....	28
4.3 Kjemiske kvalitetsparametere	29
4.4 Fysiske kvalitetsparametere	30
4.5 Total aminosyresammensetning	31
5. Diskusjon.....	32
5.1 Utbytte fra enzymatisk hydrolyse & ultralydbehandling	32
5.2 Kjemisk sammensetning av FPH	33
5.3 Kjemiske kvalitetsparametere	34
5.3.1 Proteinløselighet	34
5.3.2 Frie aminogrupeer & hydrolysegrad	35
5.3.3 Proteinoksidasjon.....	36
5.4 Fysiske kvalitetsparametere	37
5.5 Total aminosyresammensetning	38
6. Konklusjon.....	39
6.1 Negative effekter av ultralyd.....	39
6.2 Positive effekter av ultralyd	40
6.3 Veien videre	41

7. Referanser	42
8. Vedlegg	47

Forkortelser

Ala = Alanin

Arg = Arginin

BSA = Bovine Serum Albumin

Cys = Cystein

Cyx = Cystin

DNPH = Dinitrophenylhydrazine

EAS = Essensielle aminosyrer

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FPH = Fiskeproteinhydrolysat

Glu = Glutaminsyre

Gly = Glycin

His = Histidin

HPLC = High pressure liquid chromatography

KP = Kontrollprøve

Ile = Isoleucin

Leu = Leucine

Lys = Lysin

Met = Metionin

Phe = Fenylalanin

Pro = Prolin

ROS = Reaktive oksygenforbindelser

RNS = Reaktive nitrogenforbindelser

Ser = Serin

TAS = Total aminosyresammensetning

Thr = Treonin

Tyr = Tyrosin

UL = Ultralyd

ULP = Ultralydbehandlet prøve

Val = Valin

1. Innledning

I forbindelse med den voksende verdensbefolkningen er det nødvendig å finne nye og alternative kilder til matvarer rike på høyverdig protein. Tilgang på matvarer som dette er noe alle burde kunne benytte seg av (FAO, 2022). I hvert ledd i næringskjeden går det med et energitap på 90% og de største matkildene vi har i dag ligger høyt oppe i næringskjeden. Eksempelvis om en ser for seg en næringskjede bestående av plankton, sild, torsk og menneske, vil energitapet som forekommer mellom plankton og menneske være relativt høyt da det har gått tapt 90% energi i tre ledd. For å legge på seg 1kg som menneske, trengs det 10kg torsk, som igjen vil kreve 100kg sild som dernest trenger 1000kg plankton. Å livnære seg av lavere trofisknivå anses derfor som bærekraftig. Skal vi ha nok mat til å kunne møte den befolkningsveksten som er i dag og fremover, er vi nødt til å se til havet. Havet byr på et mangfold av næringsrik, trygg og sunn mat (FAO, 2022). Potensialet til å høste fra havet er stort og vil være en sikker tilgang på næring for fremtiden. For å utnytte dette best mulig bør det tas hensyn til havets økosystemer og deres begrensninger (FAO, 2022). Ved å inngå et “symbiotisk forhold” med havet og næringsnettene her vil vi sikre både planeten og menneskene en best mulig fremtid. Her finner man bærekraftige kilder til mat, som ligger lengre nede på næringskjeden. Sild, som vi tar for oss i denne bacheloroppgaven, regnes som en sekundærkonsument da de livnærer seg av plankton. De utgjør ledd nr. 2 og ligger da relativt lavt på næringskjeden, som betyr at det ikke har gått tapt like mye energi som det ville gjort i videre ledd oppover i kjeden (Semb-Johansson et al., 2023).

Som en av de ledende fiskeri- og akvakulturnasjonene i verden, produserer Norge store mengder marine produkter i form av ulike marine arter. I 2021 ble det fisket 2.59 mill. tonn fisk og skalldyr, som tilsvarte en førstehåndsverdi på 23.9 mrd. NOK (Iversen et al., 2022). Sjømatnæringen skapte i 2022 arbeidsplasser til hele 105 900 ansatte, hvor om lag halvparten er sysselsatt i fangst, oppdrett, industri og spesialiserte leverandører. De ulike driftene og produksjonene i sjømatnæringen genererte til sammen 120 mrd. NOK i verdiskapning. Av disse 120 mrd. NOK ble 34 mrd. NOK innbetalt i skatt (Johnsen et al., 2022). Disse tallene viser viktigheten av næringenes tilstedeværelse og videre utvikling i Norge.

I produksjon vil det alltid oppstå noe svinn og restråstoff. Når produksjonen er på så stor skala som nevnt ovenfor er det viktig å være bevisst på utnyttelsen av råstoffet, da noen gram

pr. fisk fort blir flere tonn årlig. Utnyttelse av restråstoff og biprodukter, samt videre behandling av dette, sier noe om hvor godt man utnytter en art i produksjon. Restråstoff omfatter alt som ikke kategoriseres som det primære hovedproduktet knyttet til anvendelse av et råstoff (Myhre et al., 2022). Marint restråstoff deles inn i kategori II og III materiale. Materiale som faller under kategori II er eksempelvis dødfisk som kan forklares som oppdrettsfisk som dør for eksempel som følge av sykdom før slakting. Kategori II materiale er ikke egnet til humant konsum eller som fôr til matproduserende dyr. Det brukes unntaksvis til fôr for pelsdyr, samt produksjon av gjødsel, bioenergi og jordforbedringsmiddel. Kategori III materiale oppstår ved fiskemottak, fiskeslakteri og fiskeforedlingsanlegg og er egnet for humant konsum og som fôr til matproduserende dyr. Hva som faller inn under hvilken kategori og hvordan det skal håndteres videre, reguleres av næringsmiddelhygieneforskriften og animaliebiproduktregelverket. Det finnes tilfeller hvor fisk som ikke er slaktet for humant konsum faller under kategori III. Disse tilfellene er oppdrettsfisk som dør som følge av noe annet enn smittsom sykdom, f.eks. oksygenmangel (Myhre et al., 2022).

I 2021 publiserte SINTEF en rapport med oversikt over råstoff, restråstoff og bruk av dette fordelt sektorvis. Råstoffgrunnlaget fra sjømatnæringen utgjorde i underkant av 3,8 mill. tonn. For videre anvendelse er det beregnet 1,1 mill. tonn tilgjengelig restråstoff av råstoffgrunnlaget. Av dette tilgjengelige restråstoffet ble 83% utnyttet, noe som tilsvarer 905 600 tonn. Sektorene disse tallene bygger på er hvitfisk, pelagisk fisk, skalldyr og havbruk. Ser en på de ulike sektorene individuelt kommer det klart frem at pelagisk fisk utnyttes best med 100% av det tilgjengelige restråstoffet på 226 500 tonn. Selv om restråstoffet fra pelagisk sektor utnyttes 100% betyr ikke det at det ikke er rom for forbedring. Mulighetene for å bedre kvaliteten på disse 100%-ene er gode og de miljø- og bærekraftsmessige, samt de økonomiske gevinstene, kan potensielt være store (Myhre et al., 2022).

Den voksende fiskeriindustrien har et stort behov for å finne nye grønne videreforedlingsprosesser for å kunne for å håndtere den store mengden restråstoff som denne typen industriaktivitet produserer (Álvarez et al., 2018) For at disse videreforedlingsprosessene skal kunne omtales som grønne, er det viktig at de er bærekraftige og miljøvennlige. Innovative teknologier som benyttes for å ekstrahere ingredienser fra

fiskerestråstoff har lagt mye vekt på å være miljøvennlige. FNs bærekraftsmål nr. 12, “ansvarlig forbruk og produksjon”, har som fokus å sikre bærekraftige forbruks- og produksjonsmønstre. For at fiskeriindustrien skal kunne oppnå dette bærekraftsmålet, er det nødvendig å finne nye og grønne løsninger på hvordan en skal håndtere restråstoffet som oppstår i produksjon av primærprodukter. Spesielt punkt 12.3 i bærekraftsmålene som sier at “Innen 2030 redusere svinn i produksjons- og forsyningskjede, inkludert svinn etter innhøsting” er viktig å ha i tankene når en skal se på håndtering av restråstoff fra fiskeri- og akvakultur (FN-sambandet, 2023). Å benytte seg av ultralyd (UL) i forbindelse med håndtering av matproduksjon har vist seg å ha liten påvirkning på miljøet og har av den grunn blitt kjent som en grønn teknologi (Higuera-Barraza et al., 2016)

I tillegg til å være sentralt for miljøet, vil utvikling av nye metoder for behandling av restråstoff gi gode muligheter for ytterligere verdiskapning. Det er en rekke bruksområder for de ulike kategoriene av restråstoff og biprodukt fra fiskeri og oppdrett. Alt som ikke kategoriseres som hovedproduktet knyttet til anvendelsen av et råstoff, ansees som restråstoff. Begrepet restråstoff omfatter dermed mye biomasse både i form av rester fra primærproduktet, eksempelvis avkapp, hoder, rygg og skinn i sammenheng med filetproduksjon, men også bifangst vil ansees som restråstoff. Utnyttelse av de ulike kategoriene med restråstoff i dag er tydelig til stede i dyrefôr, kosttilskudd, hudprodukt og kremer og lignende. Høyverdi produkter som fiskeproteinhydrolysat (FPH) og lipider utvinnes også fra restråstoff.

På bakgrunn av den gode utnyttelsen av pelagisk fisk, vil det være interessant å se på hvordan en mindre kartlagt art, som sild, responderer på innovative og teknologiske behandlingsmetoder. Behandlingsmetoden enzymatisk hydrolyse er godt kartlagt, og effekten på restråstoff er forutsigbar. Til tross for at restråstoffet fra pelagisk fisk er 100% utnyttet, har ikke arten sild blitt forsket på i forbindelse med UL i kombinasjon med enzymatisk hydrolyse. Derav er det ønskelig å se hvordan en kan påvirke høykvalitetsnæringsstoffer fra restråstoffet ved å legge til en forberedende behandling i prosessen. I belysning av dette har vi kommet frem til følgende forskningsspørsmål:

Hvordan vil bruk av ultralyd som forberedende metode til enzymatisk hydrolyse av silderestråstoff påvirke utbytte og kvalitet i forhold til de fysiske, kjemiske og funksjonelle egenskapene til proteinene i hydrolysatet?

I dette prosjektet ble det gjennomført to hydrolyseforsøk der det ene var tradisjonelt, altså en standard enzymatisk hydrolyse av silderestråstoff. I det andre ble det benyttet UL-behandling som forberedende metode før den enzymatiske hydrolysen ble gjennomført på tradisjonelt vis. For å kunne validere forskningsspørsmålet ble det gjennomført ulike kjemiske analyser for å se på påvirkningen UL-behandling kan ha på utbytte og kvaliteten. Analysene tok for seg proteinløselighet, frie aminogrupeer, hydrolysegrad, aminosyresammensetning, tørrstoff, aske, proteininnhold, fargemålinger og proteinoksidasjon (tioler og karbonylgrupper).

2. Teoretisk bakgrunn

2.1 Norsk vårgytende sild (*Clupea harengus L*) som råstoff

Sild er en fet fisk med høyt innhold av flerumettet fett og derfor regnes den som en sunn fisk. Historisk sett er sild mye fisket gjennom tidene i Norge og ansees som det viktigste fiskeriet i perioder (Johnsen, 2022). Sildefisket har gjennom historien vært preget av periodevis intensivitet. Sild var en god mat- og inntektskilde for den norske befolkningen, og var blant de viktigste næringskildene i den daglige kosten til nordmenn i denne epoken. 1800-tallet i Norge var eksempelvis preget av stor befolkningsvekst som følge av næringen sildefisket produserte under disse puljene med fiskeri. Eksempelvis ble folketallet i Stavanger nesten doblet mellom 1815 og 1875 (Løseth, 2020). Salting var eneste foredlingsmetoden som ble benyttet på sild frem til om lag 1880 (Løseth, 2020). For 2023 er Norges fangstkvote på norsk vårgytende sild på 383 704 tonn (Regjeringen, 2022).

2.2 Enzymatisk hydrolyse av fiskerestråstoff

Enzymatisk hydrolyse av fiskerestråstoff er en prosess hvor man benytter seg av vann og enzymer for å splitte proteinene i restråstoffet til mindre bestanddeler (Johansen, 2023). På denne måten kan man få tak i høykvalitetsproteiner som ellers ville vært vanskelig å løse ut fra eksempelvis avskjær fra fisk (Johansen, 2023). Enzymene i enzymatisk hydrolyse kan sammenlignes med sakser som klipper opp peptidkjeder, som altså er aminosyrene som

utgjør protein. Ulike enzym har ulike “klippepreferanser” og vil splitte proteinene på forskjellige måter. Teoretisk sett kan man ved nøye utvelgelse av enzym kunne skreddersy peptidene man ønsker å utvinne (Johansen, 2023). Videre kan disse endrede og “klippede” proteinkjedene ha fordelaktige helse- og fordøyelseeffekter. Eksempler på enzymer som benyttes i enzymatisk hydrolyse er pepsin, alkalase, bromelain og neutrase.

2.3 Tradisjonell og innovativ utnyttelse av restråstoff fra sild

Å utnytte både primærprodukt og restråstoff av marine arter bedre, er i stadig økende fokus i sjømatnæringen. Silden er ikke et unntak og å finne nye måter å foredle fisken på for å utvikle nye produkter av høy kvalitet står sentralt. Det finnes en rekke ulike metoder som tidligere er benyttet for å modifisere struktur og egenskaper hos proteiner. De tradisjonelle metodene er endring av pH, kjemisk modifikasjon og enzymmodifikasjon (Lin et al., 2021). Av disse tradisjonelle teknologiske metodene er det eksempelvis enzymmodifikasjon i form av enzymatisk hydrolyse som er mye anvendt på fiskerestråstoff. Det er flere aktører som driver med enzymatisk hydrolyse av fiskerestråstoff i Norge i dag. Eksempelvis Nutrimar og Hofseth BioCare, men de respektive aktørene driver kun med hydrolyse av laks. Derfor er det interessant å se på hvordan bruk av UL i forbindelse med enzymatisk hydrolyse vil påvirke proteinene og utbytte av silderestråstoff. Stadig videre utvikling og forskning på hvordan en kan bedre prosessene og øke nytten av restråstoff er viktig for fremtiden og vil være både miljøvennlig og økonomisk.

2.4 Innovative teknologier brukt for å ekstrahere ingredienser fra fiskerestråstoff

Det finnes en rekke innovative teknologier som brukes for å ekstrahere ingredienser fra fiske- og restråstoff generelt sett. Å utvikle bedre teknikker for å ekstrahere næringsstoffer på, er en lønnsom og viktig tilnærming til viderebehandling av alt annet enn primærproduktet i en produksjon. Som nevnt tidligere kan slike teknologier være et viktig steg for å nå FNs bærekraftsmål.

Eksempler på noen innovative teknologier som kan benyttes for å ekstrahere ingredienser fra fiskerestråstoffer er UL-behandling, pulserende elektrisk felt (PEF) og høytrykksprosessering. Dette er teknologier som forskes på og videreutvikles enda for å

optimalisere teknologien slik at man får utnyttet mest mulig av det tilgjengelige restråstoffet. Hovedformålet med disse teknologiene er å forbedre ekstraksjon av verdifulle ingredienser og komponenter, samt fremme mer skånsom prosessering. I tillegg sikre god kvalitet og trygghet i produkter fra marint restråstoff, så vel som andre matvareprodukter med høyt næringsinnhold (Shokri et al., 2022).

2.4.1. Ultralyd

UL er en høy frekvent lyd på over 20kHz som er utenfor menneskers hørselsområde (Yu et al., 2018). Metoden baserer seg på å sende ut bølger som danner områder med høyt og lavt trykk. Denne variasjonen i akustisk trykk er direkte proporsjonal med mengden energi som har blitt tilført systemet. UL kan deles inn i to kategorier, lav intensitet (5-10MHz) og høy intensitet (20-100kHz) (Awad et al., 2012). Som behandlingsmetode er UL en relativt ny prosesseringsmetode som blir benyttet for optimalisering av proteiner og lipider. Metoden brukes ofte i kombinasjon med andre teknologier og fjerner mikroorganismer effektivt (Innovative Food Processing, 2023). I tillegg kan UL bidra til raskere tining samtidig som kvaliteten bevares. UL er en energisparende teknologi og anses som bærekraftig (Innovative Food Processing, 2023).

Videre har forskning i forbindelse med bruk av UL vist at ved å utsette protein for korte ultrasoniske mekaniske bølger kan man indusere ulike sono-kjemiske og sono-mekaniske effekter. Sono-mekanisk omhandler prosesser som involverer både lydbølger og mekanisk bevegelse som eksempelvis omrøring. Videre vil sono-kjemisk handle om kjemiske prosesser som utsettes for lydbølger eller aukustiske felt. Disse sono-kjemiske effektene på protein er oppbrytning av aminosyrekjeder og modifisering av sidegruppene til aminosyrer. Det kan forekomme både midlertidige og permanente endringer i 3D-strukturene til det sammenfoldete proteinet som følge av økt molekylær bevegelse. Proteiners biologiske funksjon avhenger av og er direkte knyttet til deres 3D-struktur. Dermed kan både sono-kjemiske og sono-mekaniske prosesser direkte påvirke og endre proteinenes egenskaper (Su & Cavaco-Paulo, 2021). UL kan med andre ord bidra til å endre 3D-strukturen til proteinet, som igjen gjør at det får nye funksjonelle egenskaper som kan komme til nytte i produksjon av høyverdi produkter. UL-behandling av proteiner anses som en effektiv metode for å forbedre de funksjonelle egenskapene til proteinhydrolysater (Su & Cavaco-Paulo, 2021).

UL-bølger bidrar til å åpne opp overflaten av substratet og øker enzym aktiviteten (Misir & Koral, 2019)

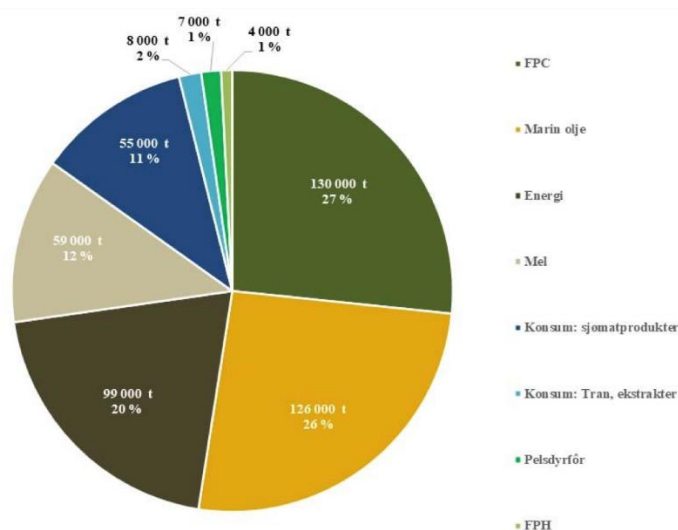
2.4.2. Pulserende elektrisk felt (PEF)

Pulserende elektriske felt, eller PEF, “er en av de mest lovende teknologiene for skånsom prosessering uten varme” (Innovative Food Processing, 2023). Det dannes små porer, eller hull, i celleveggene i råvaren når den utsettes for PEF. Slike hull i celleveggen gjør at molekyler enklere kan bevege seg inn og ut av cellen. Dette gjør metoden relevant for arbeid som “ekstraksjon av komponenter, forbedring av tørkeprosesser og/eller teksturendring” (Innovative Food Processing, 2023). Ytterligere vil PEF kunne bidra til å konservere mat bedre og forbedre enkelte prosesser i kjøtt- og fiskeindustrien. Istedenfor pasteurisering ved høy temperatur bidrar PEF til at prosessen kan gjennomføres ved lavere temperatur, samtidig som de ønskende egenskapene bevares. Styrkegraden til PEF vil kunne gjøre alt fra å inaktivere og drepe mikroorganismer, til å endre på cellestrukturene i råvaren slik at de blir mest mulig gunstige. Kort oppsummert kan PEF i matindustrien bidra til å “forlenge holdbarhet, ekstrahere komponenter, forbedre tørkeprosesser og endre tekstur på matprodukter” (Innovative Food Processing, 2023).

2.4.3. Høytrykksprosessering

Høytrykksprosessering er en metode å behandle råvarer og produkter på som gjør at disse kan behandles med lave temperaturer, noe som bidrar til god kvalitet. Metoden brukes “for å forlenge holdbarhet og inaktivere en rekke bakterier og andre mikroorganismer” (Innovative Food Processing, 2023). Eksempelvis går prosesseringen ut på at man tar en flaske med jus inn i en høytrykkstank. Denne tanken fylles så opp med vann, som øker trykket i tanken. Dette forhøyede trykket er det som inaktiverer og dreper mikroorganismer, samtidig som det bevarer næringsstoffene og ikke påvirker smak. Høytrykksprosessering anvendes på produkter som egg, meieri, kjøtt som kylling og grønnsaker som blomkål (Innovative Food Processing, 2023).

2.5 Funksjonelle og bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat



Figur 1: FPH utgjør i dag ca. 6% av det tilgjengelige restråstoffet. Kilde: (Myhre et al., 2022)

Det er fra forskning kjent at FPH har gode funksjonelle egenskaper så vel som høy næringsverdi (Bourseau et al., 2009). Noen høykvalitets proteinfragmenter slik som bioaktive peptider, er funksjonelle næringsingredienser som har vist sterkere biologisk aktivitet og absorberes lettere av kroppen, sammenlignet med protein. Derfor er en forbedring av den biologiske aktiviteten til proteiner eller peptider viktig i forbindelse med prosessering av mat (Zhang et al., 2021)

FPH besitter som ingrediens og komponent i matvarer diverse ulike egenskaper. For at FPH skal kunne benyttes som ingrediens i mat, er det viktig at fiskeproteinene har de egenskapene som kreves. Disse egenskapene kategoriseres etter deres kvaliteter, effekt og virkning. De egenskapene som har innvirkning på produktet, faller under kategorien funksjonelle egenskaper. Dersom egenskapene til FPH virker helsefremmende anses de som bioaktive.

2.5.1 Funksjonelle egenskaper til fiskeproteinhydrolysat

Funksjonelle egenskaper som proteiner kan tilføre produkter er smak, binding, skumdanning, vannbinding, geldanning eller proteintilskudd (Damodaran & Parkin, 2017). Faktorer som påvirker de funksjonelle egenskapene til proteiner er pH, temperatur, ionestyrke og fysiske, kjemiske og enzymatiske modifikasjoner (Shokri et al., 2022). Ytterligere er det ønskelig

med lav molekylvekt i peptidene i FPH da de funksjonelle egenskapene løselighet, vannholdningskapasitet, emulgeringsevne og skummingsegenskaper påvirkes av dette (Shokri et al., 2022). Egenskapene smak, farge og aroma kan i tillegg kategoriseres som sensoriske. Bruk av funksjonelle proteiner gjør det enklere å tilpasse produkter og deres kvalitet etter eget ønske.

2.5.2 Bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat

Proteiner med bioaktive egenskaper brukes for å tilføre produktet ønskelige helseeffekter. Bioaktive peptider som finnes i FPH har mange positive effekter på menneskers fysiologiske helse. De bidrar blant annet til å redusere blodtrykket og kolesterolet, i tillegg til at de har en anti-oksidativ, - inflammatorisk og – trombotisk virkning. På musklene bidrar de til å øke vekst og styrke (Rønning et al., 2016). FPH er en god kilde på høykvalitets protein og tilbyr en rekke helsefremmende effekter. Sild har et naturlig høyt innhold av ketolinsyre som stimulerer cellene våre til å omdanne korte omega-3 fettsyrer til de sunne, lange marine omega-3 fettsyrene (Kraugerud, 2022).

Strukturelle endringer i peptidkjedesammensetningene bidrar til bioaktive egenskaper som proteinfordøyelighet. Proteinfordøyelighet sier noe om hvor lett kroppen klarer å fordøye og nyttiggjøre seg av proteinene. Lange peptidkjeder har lavere proteinfordøyelighet, mens kortere kjeder har høyere proteinfordøyelighet. Ved å bryte ned og klippe opp lengre peptidkjeder får man et høyere antall korte peptidkjeder som er lettere for kroppen å ta opp (Damodaran & Parkin, 2017).

2.6 Proteinoksidasjon

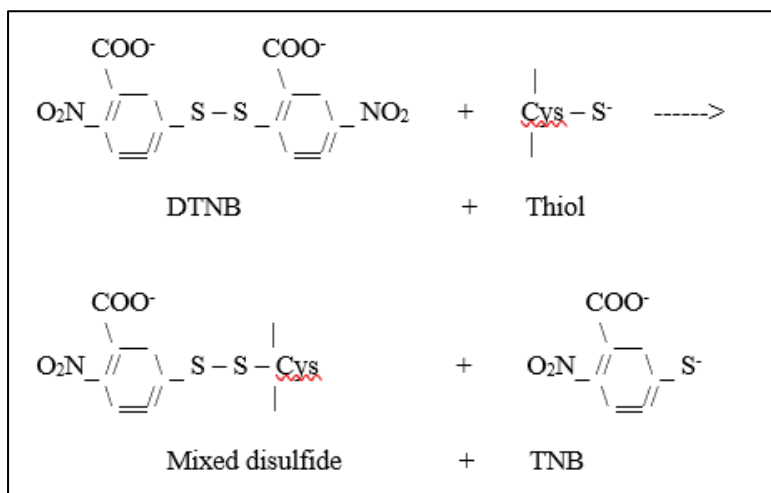
Det er kjent at under hydrolyse kan det skje proteinoksidasjon, som enkelt forklart innebærer at proteiner oksideres ved at de gir fra seg ett eller flere elektroner (Pedersen, 2023).

Konsekvensen av proteinoksidasjonen er at proteinets struktur endres og dens opprinnelige funksjon forsvinner. Dermed er det interessant å se på om UL-behandling vil ha en påvirkning på dette. For å avgjøre om det har skjedd oksidasjon av proteinene, kan tiol- og karbonylgrupper bestemmes (Hematyar et al., 2019). Reaktive oksygenforbindelse (ROS) eller nitrogenforbindelser (RNS) vil ved oksidasjon reagere med proteiner og peptider. ROS

eller RNS vil så reagere med peptid- og sidegruppene som resulterer i at det dannes karbonylgrupper og hydrogenperoksider. Det kan også dannes kryssbinder slik som disulfid- og ditrosinbindinger, som gjenspeiles gjennom tiolene. Ved proteinoksidasjon vil konsentrasjonen av tioler synke, mens mengden karbonylgrupper vil øke (Lund et al., 2011).

2.6.1 Tioler

Kvantifisering av tioler sier noe om hvor mye proteinoksidasjon som FPH eventuelt har vært utsatt for. Som nevnt tidligere vil konsentrasjonen av tioler synke ved oksidasjon. I metoden som benyttes for å estimere mengde tioler, blir det tilsatt Ellmans reagens, også kjent som 5,5 ditiobis (2-nitrobenzoat) (DTNB). DTNB gjennomgår lett en tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon når en eller flere tioler er til stede. Dette skyldes at DTNB er et symmetrisk aryl disulfid som er ekstra utsatt for slike reaksjoner (Ellman, 1959; Riddles, 1983).



Figur 2: Tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon. Kilde: (Ellman, 1959; Riddles, 1983)

TNB-di-anoniet har en intens absorpsjon ved 412 nm sammenlignet med begge disulfidene. Dannelse av TNB kan benyttes til å vurdere antall tioler som er til stede i FPH, fordi støkiometrien til protein-tiol: dannet TNB er 1:1. Ved tilstedeværelsen av denatureringsmidler vil kun tilgjengelige tioler reagere, mens i nærvær av kaotrope midler kan det totale antallet Cystein (Cys) rester som er til stede måles. Reduksjon av proteinet etterfulgt av behandling med kaotroper og DTNB kan gi et estimat på den totale mengden Cys (Cys-SH og Cys-S-S-Cys). I dette prosjektet vil urea benyttes som et

denaturering/kaotropisk middel i metoden for kvantifisering av tioler (Ellman, 1959; Riddles, 1983).

2.6.2 Karbonylgrupper

Karbonylgrupper er funksjonelle grupper som er sammensatt av et oksygenatom bundet til et karbonatom ved dobbeltbinding. Disse gruppene kan fungere som indikator på proteinoksidasjon, som forekommer når proteiner utsettes for skade fra ROS og RNS.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) er en immunologisk teknikk for å bestemme kvantifisering av mengden karbonylgrupper i protein (Cell Biolabs, 2022). Ved å benytte med ELISA kit kan karbonylgruppene i proteinprøvene kvantifiseres og spesifikke proteiner og peptider kan kvantifiseres (Cell Biolabs, 2022).

3. Materialer & metoder

3.1 Silderestråstoff

Restråstoffet som ble benyttet i dette prosjektet kommer direkte fra fileteringsfabrikken til Fosnavåg Pelagic. Råstoffet består hovedsakelig av bein, filetavskjær, hoder og rygger.

Restråstoffet ble vakuumpakket på fabrikken, fraktet til NTNU, kvernet til en farse ved hjelp av en Hobart A 200 N kvern. Det ble så pakket i 1kg poser, og frosset ned til -80°C frem til enzymatisk hydrolyse.

3.2 Ultralyd behandling & enzymatisk hydrolyse

I denne oppgaven vil vi sette opp to forsøk hvor vi gjennomfører enzymatisk hydrolyse. I det ene forsøket vil vi benytte UL før enzymatisk hydrolyse.

3.2.1 Tradisjonell enzymatisk hydrolyse

Kontrollprøven (KP) ble gjennomført ved tradisjonell enzymatisk hydrolyse. Her ble silderestråstoff (1000g) blandet med destillert vann (1000g) i en glassbeholder.

Glassbeholderen ble montert i et kar med vann med temperatur på 53°C , og mekanisk omrøring på 160 rpm. Løsningen ble så varmet opp i 20-30 min til løsningen i

glassbeholderen nådde en temperatur på 50°C. Enzymet alkalase (1g) ble tilsatt, tilsvarende 0,1% av restråstoff massen. Hydrolyseprosessen pågikk i 60 minutter.



Figur 3: Bilde 3-6 viser oppveid restråstoff som ble tilsatt enzym før hydrolyseprosessen foregikk med mekanisk omrøring i glassbeholder

Etter hydrolyse ble løsningen filtrert med sil og fordelt over i begerglass, før de ble satt i en mikrobølgeovn av typen Panasonic. Beinrestene som var igjen i silen ble så veid og satt til side.



Figur 4: Bilde 7-11 viser løsningen som filtreres og beinrester som blir målt

Mikrobølgeovnen ble så stilt på 850W i 10min for å varme opp væsken til 90°C. Etter oppvarmingen ble mikrobølgeovnen stilt til 250W og satt på i 10min for å sikre at væsken holdt 90°C. Dette ble gjort for å nøytralisere enzymene og stoppe den enzymatiske hydrolysen. Begerglassene ble kjølt ned og sentrifugert ved 3928G i 20 min.



Figur 5: Bilde 12-15 viser nedkjøling og sentrifugering av restråstoffet

Lipid, emulsjon, vannløselige protein og grakse ble skilt fra hverandre ved hjelp av en skilletrakt og hver av fraksjonene ble veid for å måle utbyttet. Den vannløselige proteinfasen ble deretter filtrert gjennom glassull.



Figur 6: Bilde 16-18 viser separering av fraksjoner, lipidfraksjon og filtering av hydrolysat gjennom glassull

Hydrolysatet ble fordelt i plastbokser og frosset ned til -80°C . Dagen etter ble prøvene flyttet fra fryseren og inn til tørrfrysing. Prøvene stod til frysetørring i vakuum i 3 dager.

3.3.2 Enzymatisk hydrolyse med ultralydbehandling



Figur 7: Bilde 19-21 viser maskinen som ble benyttet til ultralyd, restråstoffløsning før og etter ultralyd og temperaturmåling etter ultralydbehandling

Det ble blandet restråstoff (500g) med destillert vann (500g) i et begerglass for hver av de to omgangene. Begerglassene med restråstoffløsning ble utsatt for UL-bølger. Det ble benyttet et UL-skap av modell VCX1500 fra Sonic & Materials INC. UL var innstilt til å kjøre intervaller som var fem sekunder på, fem sekunder av, for å forhindre overoppheting. UL var stilt til amplifikasjon på 80% som tilsvarte 1200W. Temperaturen var stilt til 20°C. Aktiv tid med UL var 10min. Rett etter UL-prosessen var gjennomført ble temperaturen målt til 63°C i løsningen. Etter 15 min var temperaturen gått ned til 50°C. Da UL var gjennomført ble innholdet i de to begerglassene overført til en stor glassbeholder. Videre ble det gjennomført en tradisjonell enzymatisk hydrolyse av restråstoffet ved bruk av samme metode som under punkt 3.3.1. Da fraksjonene skulle skilles fra hverandre etter sentrifugeringen, skulle egentlig skilletrakt benyttes. Separeringen bød derimot på utfordringer som førte til at metoden ikke kunne benyttes. Derfor ble ultralydbehandlet prøve (ULP) fordelt over i rør og sentrifugert ved 3928G i 20 min på nytt, før de ble fryst over natten. Lipid, emulsjon, vannløselige protein og grakse ble skilt fra hverandre i frossen tilstand med en spatel, og hver av fraksjonene ble veid for å måle utbyttet.

3.4 Fysiske & kjemiske analysemetoder

3.4.1 Tørrstoff- & askeinnhold

Estimering av tørrstoff og askeinnhold ble gjennomført i henhold til protokoll (AOAC, 1990).

Det ble klargjort tre digeler til både KP og ULP. Digelene veid før de ble tilsatt FPH (3g). Prøvene ble overført til varmeskap og ble stående i 105°C i 24 timer. Da prøvene hadde stått til tork i 24 timer, ble de så veid på ny for å finne tørrvekt.

De samme diglene med prøvene fra tørrstoff ble benyttet videre i askeanalysen. Diglene ble satt i en kald muffelovn som ble lukket og satt til 550°C i 5 timer. Her ble de stående over natten. Etter 24 timer ble ovnen slått av og døren åpnet. Deretter ble diglene tatt ut av ovnen etter avkjøling og mengde aske ble veid.

Dermed var både verdiene for aske og tørrstoff funnet. Disse ble så brukt til å finne mengden vann og fett i FPH fra KP og ULP. Proteininnhold ble funnet ved å sende inn en prøve til Eurofins Food & Feed Testing Norway AS som analyserte dette ved bruk av Kjeldahl metoden (AOAC, 1990). Resultater ligger i vedlegg 5 og 6. Således ble verdiene på aske, protein og tørrstoff benyttet for å regne ut og estimere vann og fett i FPH-prøvene.

$$Vann = 100\% - tørrstoff$$

$$Fett = 100\% - vann - aske - protein$$

3.4.2 Proteinløselighet ved Lowrymetoden

For å kvantifisere proteinløseligheten i FPH-ene ble Lowry-metoden benyttet (Lowry et al., 1951). Lowry er en metode som baserer seg på at kopperioner reagerer med peptidbindingene i proteiner. Denne reaksjonen fører til at det dannes en blåfarge som videre måles ved bruk av et spektrofometer. Resultatet sammenlignes med en kjent proteinstandardkurve som i dette prosjektet består av Bovine Serum Albumin (BSA)

Det ble målt opp FPH (0.116g) av ULP og tilsatt desiltet vann opp til 10 ml streken i plastrøret. ULP ble homogenisert (10s) ved bruk av Ultra Turrax homogenisator. ULP sentrifugert i 10 min på 3421G i en EBA 20 sentrifuge og dekantert gjennom glassull over i en liten glasskolbe. ULP ble fortynnet 1:50 ved å pipetere ut 100µl av ULP fra glasskolben over i et plastrør og tilsatt destillert vann (4.9ml). Steget ovenfor ble repetert for KP. Her ble det målt opp FPH (0.114 g).

I denne metoden ble det benyttet ulike løsninger benevnt A til F. Disse beskrives under.

Løsning A besto av 2% Na₂CO₃ i 0.1 M NaOH. Denne ble laget ved å løse opp 20g Na₂CO₃ i 1000 ml 0.1 NaOH.

Løsning B besto av 1% CuSO₄.

Løsning C besto av 2% Kalium Natrium Tartrat.

Løsning D ble laget ved å legge sammen løsning B (1ml) + løsning C (1ml) + løsning A (100ml).

Løsning E var en fortynnet folin reagent

Løsning F besto av protein standarder av BSA. Det ble laget en standard serie med konsentrasjoner 12.5 µg/ml til 300 µg/ml. I tillegg ble det laget en blank prøve til standardkurvene bestående av destillert vann (0.5 ml).

Proteinekstrakt (10ml) ble tilsatt koppperagens (2.5ml) og mikset med vortex. Prøvene ble stående i 10 min i romtemperatur. Det ble tilsatt Folin-Ciocalteu (0.25 ml) i prøvene som ble mikset med vortex. Prøvene ble stående i 30 minutter før absorbans ble lest av på 750 nm ved bruk av SpectraMax i3x.

3.4.3 Frie aminogrupeer & hydrolysegrad ved formoltitrering

Under er det beskrevet en metode som tar utgangspunkt i Taylor, W.H sin "*Formol titration: An evaluation of its various modification*" (Taylor, 1957). Ved formoltitrering beregnes den prosentvise mengden med frie aminogrupeer og hydrolysegrad ved å betrakte totalt nitrogeninnhold i FPH. Metoden baserer seg på reaksjonen som oppstår mellom aminogrupeene og formaldehyd i en aminosyre ved basisk eller nøytral pH.

Det ble veid inn FPH (1.5g) av KP som ble plassert i begerglass og tilsatt destillert vann (48.5ml), slik at den totale vekten av prøven ble 50g. Steget ble repetert for FPH av ULP. Nøyaktig vekt som ble innveid og utregninger er vist i vedlegg 9, 10 og 11. Prøvene ble satt til magnetisk omrøring for å sikre at tørrstoffet i prøvene var fullstendig oppløst. Slik stod de

i 5min før pH-verdien ble målt. Det ble benyttet titrering og magnetisk omrøring for å øke pH verdien til 7 ved å tilsette mer NaOH i prøven. Ved en pH-verdi på 7 ble det tilsatt formaldehyd (10ml) med pH-verdi 8.5. Prøven stod 5min i et avtrekkskap. Det ble benyttet titrering og omrøring i maskin TitroLine7000. Tilsatte mer NaOH (0.1M) til prøven nådde en pH-verdi på 8.5. Dette ble repetert for hver av de tre parallellene av både KP og ULP.

For å finne mengde frie aminogruener ble denne formelen benyttet til utregning:

$$\frac{A \times B \times 14.007 \times 100}{C \times 100} = \% \text{ Frie aminogruener (D)}$$

hvor A er ml NaOH brukt, B er konsentrasjonen av løsningen brukt for titrering (0.1 M NaOH) og C er mengden prøve veid opp.

For å finne hydrolysegrad ble denne formelen brukt:

$$\frac{D \times 100}{E} = \text{hydrolysegrad (\%)}$$

hvor D er % mengde frie aminogruener og E er % N (% protein /6.25)

3.4.4 Proteinoksidasjon

Som nevnt innledningsvis benyttes kvantifisering av tioler for å si noe om proteinoksidasjonen. Metoden som benyttes for tioler er basert på protokoll hentet fra Ellman og Riddels (Ellman, 1959; Riddels, 1983). Kvantifisering av karbonylgrupper ble gjennomført ved å bruke et ELISA-kit, STA-310 Oxiselect karbonyl kit, kjøpt fra Cell Biolabs (Cell Biolabs, 2022).

3.4.5 Tioler

Det ble gjennomført 3 paralleller av både ULP (U1-3) og KP (K1-3), samt en parallell med blank (B). For å gjennomføre analysen av tiolene ble det klargjort følgende løsninger og kjemikalier:

Buffer A: 0.1 M Na phosphate buffer, pH 7.4, 1mM EDTA.

Urea løsning: 8M urea (48.048 g/100mL) i buffer A, korrigert pH til 7.4

DTNB løsning: 0.1% DTNB (0.1g/100mL) i buffer A, korrigert pH til 7.4 (DTNB er temperatursensitivt og er kun stabilt i romtemperatur i noen timer.)

Først ble det pipettert 100µl med ULP og KP i tre paralleller hver i separate eppendorf rør. I tillegg til dette ble det også klargjort en blank(B) prøve bestående av 100µl destillert vann. Videre ble det tilsatt 800µl urea løsning og 100µl DTNB i alle rørene. Hvert rør ble deretter blandet ved bruk av vortex og videre inkubert i romtemperatur i 30min. Da inkubasjonstiden var omme ble alle rørene sentrifugert i 3min i en VWR Micro Star 17 sentrifuge og ble utsatt for 17000G i romtemperatur. Absorbansen ble så lest av på 412nm i en Spectramax ix3 med blank prøve som utgangspunkt og referanseverdi.

Beregninger:

$$E = \frac{A}{b * C}$$

$$C = \frac{A * tot.V \text{ i kyvette (ml)}}{b * E * prøve V \text{ i kyvette (ml)}}$$

C = Konsentrasjon (M)

A= Abs ved 412 nm

b = 1 (kyvette bredde, eller lengden på lysbanen)

E = Ekstinksjonskoeffisienten til TNB 14290 (M⁻¹ cm⁻¹)

(Ellman, 1959; Riddles, 1983).

3.4.6 Karbonylgrupper

Først ble 10µg/ml med redusert og oksidert BSA laget ved å fortynne 1mg/ml BSA standardløsning i 1X PBS. De oksiderte og reduserte BSA løsningene brukt til å blande åtte prøver med konsentrasjon på 0.375nmol/mg til 7.5nmol/mg ratio i en 96-well protein binding plate. Blandingene ble satt på kjøøl i kjøleskap på 4°C over natten. Neste dag ble brønnene vasket tre ganger med 250µl 1X PBS pr. brønn. Etter den siste vaskerunden ble brønnene tømt og dunket på tørkepapir for å sørge for at vaskeløsning var fjernet.

Dinitrophenylhydrazine (DNPH) (100µl) ble tilsatt løsningene i brønnene og satt til

inkubasjon i 45min i romtemperatur i et mørkt miljø. Da DNPH løsningen var inkubert ble brønnene vasket med 1X PBS/Etanol (1:1, v/v) (250µl) og satt til inkubasjon på en orbital shaker i 5min. Dette ble repetert 5 ganger, hver vask ble dunket ut og neste vask ble pipettert i brønnene. Etter den siste vasken ble brønnene tømt og dunket på tørkepapir for å sikre at alle rester av vaskeløsningen var fjernet. Brønnene ble så vasket 2 ganger med 1X PBS (250µl).

Videre ble hver brønn tilsatt blokkeringsløsning (200µl) og inkubert 1-2 timer i romtemperatur på en orbital shaker. Da inkubasjonen var gjort ble brettet vasket 3 ganger med 250µl 1X vaskebuffer med grundig fjerning av løsningen fra brønnene mellom hver vask. Etter den siste vasken ble brettet dunket på tørkepapir for å sikre at alle restene med løsning ble fjernet fra brønnene. Videre ble det tilsatt 100µl med fortynnet anti-DNP antistoff i alle brønnene og inkubert i 1 time i romtemperatur på orbital shaker. Brettet ble så vasket 3 ganger med 250µl vaskebuffer og dunket på tørkepapir etter siste vask. Etter dette ble det tilsatt 100µl med fortynnet HRP konjugert sekundært antistoff i alle brønnene hvor det ble inkubert i 1 time i romtemperatur på orbital shaker. Brettet ble så vasket som beskrevet over 5 ganger. Da prøvene var inkubert og substratløsningen var varmet opp til romtemperatur ble denne tilsatt (100µl) i hver brønn, inkludert de blanke. Så ble dette også inkubert i romtemperatur på en orbital shaker i 5 min. Etter inkubasjon ble det tilsatt stoppeløsning (100µl) i hver brønn og absorbansen ble lest av. Det ble benyttet en SpectraMax i3x Minimax 300 innstilt med 450nm som primær bølgelengde.

3.4.7 Fargemåling ved kolorimetri

For å bestemme farge på FPH blir det brukt L^*a^*b som standardparameter. Fargemålinger kan benyttes som en indikator på den fysiske kvaliteten til FPH-ene. L^*a^*b blir målt ved bruk av et kolorimeter som bestemmer fargeintensiteten til FPH. Kolorimeteret måler absorbansen av lys med spesifikke bølgelengder som sendes ut ved en bestemt frekvens eller farge i en prøve. L^* er en verdi som indikerer lysheten til FPH-ene. Verdier mellom 0-51 tilsier mørk/svart farge, mens 51-100 antyder hvit farge. a^* er symbolet for rødhet. Er verdien positiv betyr det at FPH er rød og negativ verdi betyr grønn. Positiv b^* gir graden av fargen gul og negativ b^* viser blåfarge (Crobotova et al., 2020).

Det ble klargjort 2 prøver av FPH fra KP og ULP. Konica Minolta 400 ble kalibrert og benyttet til å måle fargeintensiteten på FPH. Apparatet ble presset mot prøvene 3 ganger hver og fargeverdiene ble lest av.

3.4.8 Total aminosyrebestemmelse med HPLC

High pressure liquid chromatography (HPLC) metoden ble benyttet for å måle total aminosyrebestemmelse (TAS). Spesifikt ble Shimadzu Nexera XR HPLC systemet utstyrt med en PDA-detektor med 263nm benyttet.

Det ble veid inn 3 paralleller med FPH (50mg) av både KP og ULP. Tilsatte 2 ml med 6M HCl i hvert av glassrørene. Glassrørene ble satt til hydrolysering i 24 timer ved 105°C i et varmeskap av typen BINDER.

Etter at prøvene hadde stått 24 timer i varmeskapet, ble de kjølt ned før videre prosess. Prøvene ble så fortynnet 1:50 med bruk av en vortex. Fra den fortynnede prøven ble det tatt ut 300 µl over i et nytt reagensrør, som ble tilsatt 600 µl av 0.4M Borate buffer (pH 9). Deretter ble alle prøvene mikset ved bruk av vortex, før det ble tilsatt 600 µl med FMOC (9 – Fluorenylmethoxycarbonyl chloride, 15mM, in acetonitrile). Etter dette ble de plassert på en orbital shaker for 10min.

Da prøvene hadde stått 10min på orbital shakeren, ble de tilsatt 600 µl ADAM (1-adamantanamine, 60 millimolar, in acetonitrile:water 1:4). Etter ADAM var tilsatt ble prøvene filtrert gjennom 0.22 µm sprøytefilter til HPLC-vial. Deretter ble prøven analysert på HPLC. Det relative området ble benyttet for å kvantifisere aminosyrene.

Utregningen ble gjennomført slik:

$$\frac{\text{Areal \% aminosyre}}{\text{Areal \% total aminosyrer}} \times 100\%$$

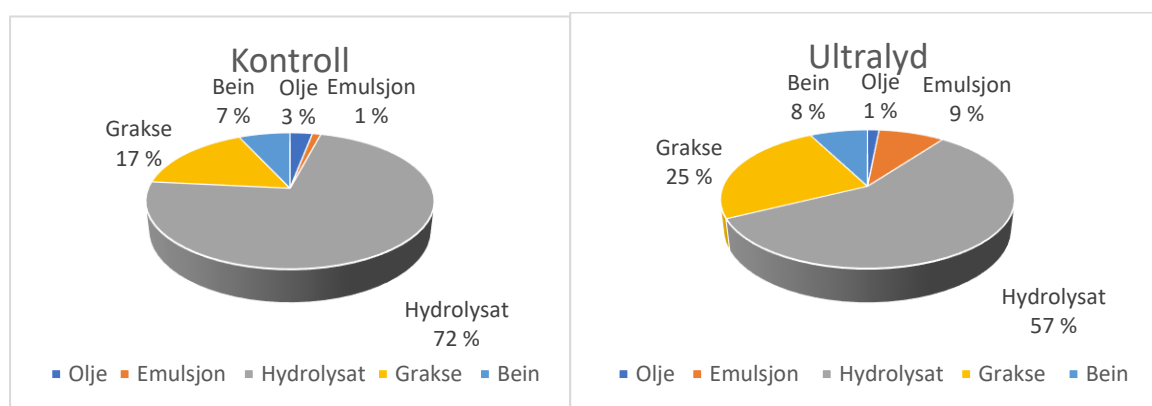
Tallene som ble benyttet i utregningen av aminosyrene finnes i vedlegg 18, 19, 20 og 21.

3.5 Statistiske analyser

T-test ble brukt for å finne signifikante forskjeller mellom hydrolysatene. Et signifikansnivå på 95% ble valgt i alle de statistiske analysene. Microsoft Excel ble brukt i alle beregninger og statistiske tester.

4. Resultater

4.1 Utbytte fra enzymatisk hydrolyse & ultralydbehandling



Figur 8: Figur A viser utbytte av KP og figur B viser utbytte av ULP

Utbyttet fra prosessene forteller hvordan fordelingen av de ulike fraksjonene ble. KP inneholdt mest hydrolysat (72%) og olje (3%), se figur 8A. ULP inneholdt kun hydrolysat (57%) og olje (1%), se figur 8B. ULP besto av mer grakse (25%), emulsjon (9%) og bein (8%), enn KP med grakse (17%), emulsjon (1%) og bein (7%), se figur 8A og 8B.

4.2 Kjemisk sammensetning av fiskeproteinhydrolysat

Tabell 1: Viser resultater av tørrstoff, aske, vann, protein og fett oppgitt i prosent av KP og ULP

Resultater	KP	ULP
Tørrstoff (%)	95.54 ± 0.87	96.05 ± 0.53
Aske (%)	12.54 ± 0.23	12.83 ± 0.19
Vann (%)	4.46 ± 0.87	3.95 ± 0.53
Protein (%)	82.10	83.30
Fett (%)	0.90	0.00

FPH fra ULP hadde høyest tørrstoff innhold (96.05%), mens KP hadde noe lavere verdi (95.54%). Innholdet av aske var litt høyere i ULP (12.83%) enn i KP (12.54%). Det var ikke signifikante forskjeller i verdier for tørrstoff eller aske. Vanninnholdet var høyere i FPH fra kontroll (4.46%) enn i prøven behandlet med UL (3.95%). Protein utgjorde den største andelen av både KP (82.10%) og ULP (83.30%) Mengden fett var høyere i KP (0.90%), enn ULP (0.00%)

4.3 Kjemiske kvalitetsparametere

Tabell 2: Viser resultater av proteinløselighet, frie aminogrupeer, hydrolysegrad, proteinoksidasjon (tioler og karbonylgrupper), oppgitt i prosent. * markerer signifikante forskjeller mellom KP og ULP

Resultater	KP	ULP
Proteinløselighet (%)	80.11 ± 3.09*	86.04 ± 2.33*
Frie aminogrupeer (%)	3.47 ± 0.21*	5.69 ± 1.45*
Hydrolysegrad (%)	26.39*	42.73*
Proteinoksidasjon		
Tioler	9.78 ± 1.48	7.38 ± 0.15
Karbonylgrupper	3.81 ± 0.14	4.78 ± 0.68

Proteinløseligheten var høyest i FPH av ULP med (>86%) sammenlignet med KP (>80%). Forskjellen mellom løseligheten i prøvene var signifikant ($p < 0.05$). Mengde frie aminogrupeer var høyere i ULP (5.69) enn i KP (3.47) og forskjellen mellom de var signifikant ($p < 0.05$). Hydrolysegraden var signifikant ($p < 0.05$) høyere i ULP (42.73) enn i KP (26.39). Konsentrasjonen av tioler var høyest i KP (9.78) og lavest i ULP (7.38), men ikke en signifikant forskjell. For karbonylgrupper var det motsatt, her var det høyest mengde karbonylgrupper i ULP (4.78) og lavest i ULP (3.81), men ingen signifikant forskjell. At ULP hadde lavest konsentrasjon av tioler og størst mengde karbonylgrupper indikerer at ULP er mer oksidert enn KP.

4.4 Fysiske kvalitetsparametere

Tabell 3: Viser resultater av fysiske kvalitetsparametere oppgitt i L^*a^*b for KP og ULP. * markerer signifikante forskjeller mellom KP og ULP

Resultater (farge)	KP	ULP
L* lyshet	74.74 ± 0.47*	72.38 ± 0.71*
a* rødhet	1.49 ± 0.06	1.91 ± 0.26
b* gulhet	23.44 ± 0.65*	17.51 ± 0.34*



Figur 9: Bilde 22-23 viser farge av KP og ULP. Bilde 24 viser fargemåling av FPH

Høyest verdi for L* har KP (74.74), mens ULP hadde noe lavere gjennomsnitt (72.38). Forskjellene i L* var signifikante ($p < 0.05$). For parameteren a* var rødheten høyere på FPH fra ULP (1.91) enn i KP (1.49), men forskjellene var ikke signifikante. b* var signifikant ($p < 0.05$) høyere i KP (23.44) enn i ULP (17.51). På bildene 22-23 kan man også se forskjeller i lyshet og gulhet av FPH fra KP kontra ULP.

4.5 Total aminosyresammensetning

Tabell 4: Viser resultat av andel aminosyrer i FPH av KP og ULP. Gjennomsnitt og standardavvik er vist. N=2. *markerer essensielle aminosyrer

Aminosyrer (%)	KP	ULP
Arginin	0.50 ± 0.21	1.03 ± 0.26
Serin	9.10 ± 0.34	9.09 ± 0.21
Asparaginsyre	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Glutaminsyre	7.46 ± 0.12	7.00 ± 0.29
Treonin*	3.53 ± 0.15	3.61 ± 0.19
Glysin	17.54 ± 1.64	20.09 ± 1.03
Alanin	7.84 ± 0.16	7.37 ± 0.42
Prolin	6.66 ± 0.73	7.20 ± 0.18
Valin*	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.05
Fenylalanin*	3.17 ± 0.51	3.40 ± 0.32
Isoleucin*	3.09 ± 0.09	3.19 ± 0.12
Leucin*	16.87 ± 2.31	15.83 ± 0.86
Cystine	2.67 ± 1.11	2.82 ± 0.50
Histidin/Cystein/Tyrosin*	21.34 ± 0.72	19.21 ± 0.80

Total aminosyresammensetning (TAS) i begge prøvene besto av Arginin (Arg), Serin (Ser), Asparaginsyre (Asp), Glutaminsyre (Glu), Treonin (Thr), Glysin (Gly), Alanin (Ala), Prolin (Pro), Valin (Val), Fenylalanin (Phe), Isoleucine (Ile), Leucin (Leu), Cystine (Cyx) og Histidin/Cystein/Tyrosin (His/Cys/Tyr). Resultatet viser at det ble funnet størst andel His/Cys/Tyr i KP (>21%) og Gly i ULP (>20%). Større andel His/Cys/Tyr i KP enn Gly i ULP. Den minste andelen i både ULP og KP var Asp. Det ble funnet seks av åtte essensielle aminosyrer i både FPH med og uten UL. De essensielle aminosyrene (EAS) som ble funnet var Thr, Val, Phe, Ile og His/Cys/Tyr. I KP var det høyest andel av EAS-ene Val (0.13), Leu (16.87) og His/Cys/Tyr (21.34). I ULP var det høyest andel av EAS-ene Thr (3.61), Phe (3.40) og Ile (3.19). Det var ikke signifikant forskjell mellom EAS-ene i ULP og KP. Data som ble benyttet for beregninger av TAS finnes i vedlegg 17.

5. Diskusjon

5.1 Utbytte fra enzymatisk hydrolyse & ultralydbehandling

Det større innholdet av bein i ULP kontra KP kan komme av variasjoner i restråstoffet som ble benyttet, se figur 8. Diverse avskjær, hoder og rygger av fisk vil variere i kjøtt- og beinmengde. I tillegg vil forholdet mellom mengden bein og kjøtt også variere. Dermed kan den totale mengden kjøtt ha vært høyere i KP som igjen vil føre til større mengde hydrolysat og olje. Lavere prosentvis mengde kjøtt i restråstoffet kan bety større andel bein.

Det er kjent fra tidligere forskning gjort på *“Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis.”* at proteiner med ulike strukturer har varierende grad av løselighet, emulgeringsevne, skummingsevne, geledannelse, filmdannelse, vannbindingsevne, oljebindingsevne, så vel som andre funksjonelle egenskaper (Lin et al., 2021). Emulsjonsstabiliteten kan i noen tilfeller øke som følge av økt proteinløselighet, som vil diskuteres senere under kjemiske kvalitetsparametere. Økt emulsjonsstabilitet kan skape økt dannelse av emulsjon. Andre faktorer som kan ha hatt innvirkning på emulsjonsgraden i UL-forsøket er temperatur og prosesser som mekanisk omrøring. Luftbobler vil også øke sannsynligheten for emulsjonsdannelse. Det interessante her er at UL som forberedende metode ikke krever oppvarming, omrøring eller andre prosesser som tilsvarer faktorer som påfører emulsjon. UL genererer imidlertid varme i seg selv, noe som resulterte i at restråstoffet nådde temperaturer på over 63°C. Temperaturer på over 60°C kan føre til emulsjon (Damodaran & Parkin, 2017). Ytterligere kan kanskje UL-bølgene ha forårsaket mikroskopiske bobler, kavitasjon, som kan ha påvirket resultatet.

ULP inneholdt mer grakse enn KP, se figur 8. Graksen består av vann-uløselige peptider og andre partikler som ikke blir oppløst under de forskjellige prosessene. En mulig forklaring på det større innholdet av grakse i ULP kontra KP er effekten UL har på proteinstrukturen. Sekundærstrukturen til proteiner endres under eksponering for UL, og disse strukturelle endringene fører til aggregering og denaturering av protein. Dette kan resultere i at noen vannløselige proteiner, altså peptider, blir vann-uløselige, og noen vann-uløselige blir vannløselige (Damodaran & Parkin, 2017). Emulsjon oppstår når vann og olje blandes sammen og kan påvirkes av fosfolipider og vannløselige peptider (Helseth, 2021).

KP og ULP var begge 2000g, 1000g restråstoff og 1000g destillert vann ved start av prosessering. Den totale vekten til KP var 1860.00g ved fullført prosessering og ULP var litt lettere på 1821.30g. Det vil si at total vekt i KP er redusert med 140g og ULP 179.70g. Dette vekttapet skyldes trolig fordamping i løpet av prosessene. I tillegg vil overføring av prøvene gjennom de ulike prosessstegene også ha en innvirkning da det blir liggende igjen rester i beholdere og søl kan oppstå.

5.2 Kjemisk sammensetning av FPH

Tabell 1 viser at sammensetningen av FPH med og uten UL-behandling er relativt lik, med de samme komponentene og uten store variasjoner. Det som er interessant er at det er mer av alle komponentene utenom vann og fett i ULP, enn i KP. De større andelene tørrstoff, aske og ikke minst protein er en god indikator på UL-behandlingens potensiale. Det er ønskelig å kunne øke utbytte og kvaliteten på proteiner i én og samme behandlingsprosess. På sikt kan potensielt UL-behandling bidra til nettopp dette.

I en lignende studie, *Functional Properties of FPH from herring (Clupea harengus)* gjort av A.M. Liceaga og E.C.Y. Li-Chan ble det også sett på det kjemiske utbytte av FPH fra silderestråstoff (Liceaga & Li-Chan, 1999). Her ble det sett på utbytte ved KP utsatt for tradisjonell hydrolyse uten enzym og en prøve utsatt for tradisjonell enzymatisk hydrolyse. Prøven som var utsatt for tradisjonell enzymatisk hydrolyse fra det lignende studiet, tilsvarer KP i dette prosjektet. Protein i KP (82.1) var høyere enn i den andre studien (77.0). I vårt prosjekt var mengden protein høyere i ULP (83.3) sammenlignet med den andre studien, hvor andelen protein for FPH fra tradisjonell hydrolyse uten enzym (62.0) var lavere. Dermed kan mengden proteinutbytte rangeres i stigende rekkefølge: tradisjonell hydrolyse uten enzym (62.0), enzymatisk hydrolyse (77.0) i den andre studien, enzymatisk hydrolyse (82.1) og så enzymatisk hydrolyse med UL-behandling (83.3). Videre er det også en tydelig forskjell på fettinnhold. Det var (20.5) ved tradisjonell hydrolyse, (0.9) i KP fra vårt prosjekt, (0.77) i enzymatisk hydrolyse fra det andre studiet og minst (0.0) i ULP (Liceaga & Li-Chan, 1999).

5.3 Kjemiske kvalitetsparametere

Det er kjent at UL-behandling besitter potensiale til å modifisere proteiners funksjonalitet og struktur (Shokri et al., 2022). For de kjemiske kvalitetsparametere er det signifikante forskjeller i løselighet, frie aminogrupeer og hydrolysegrad mellom proteinene ekstrahert i KP kontra ULP, se tabell 2. Det er også forskjeller i mengden proteinoksidasjon ved tioler og karbonylgrupper, men ikke av signifikant verdi. Dette indikerer at UL har påvirket og endret strukturen på proteinene i FPH. En tidligere forskningsartikkel, *Effects of ultrasound on the technofunctional properties of milk protein: A systematic overview*, viser at mindre partikkelstørrelse på proteinene er direkte knyttet til deres funksjonelle egenskaper da de mindre strukturene vil ha et større overflateareale. Dette vil kunne vise høyere tendens til proteinløselighet, som videre påvirker egenskaper som emulsjon-, gele- og skumdannelse, som diskutert tidligere (Shokri et al., 2022).

5.3.1 Proteinløselighet

Resultatene fra tabell 2 viser at proteinløseligheten har økt ved bruk av UL (86.04) sammenlignet med kontroll (80.11). Tidligere forskning gjort på “*Effects of ultrasound on structure and functional properties of mussel (Mytilus edulis) protein isolates*” har vist at UL-behandling har forbedret løseligheten til proteiner så disse resultatene var forventet (Yu et al., 2018). Løselighet er en av de viktigste funksjonelle egenskapene til proteiner og de har vanligvis bedre gele-, skum- og emulgerende egenskaper (Pelegrine & Gasparetto, 2005). Det er flere faktorer som påvirker løseligheten til proteiner, blant annet proteinstruktur og molekylstørrelse. Den høye løseligheten til protein fra UL (86.04) kan skyldes at molekylstørrelsen har blitt mindre og at de eksponerte ioniserende aminosyre- og karboksylgruppene, som kan danne sterkere hydrogenbindinger med vann og derfor er mer løselig i vannholdige løsninger (Liu et al., 2010) UL kan anses som en nyttig metode for å forbedre proteinløselighet og andre funksjonelle egenskaper, som avhenger av de “iboende” egenskapene til proteinene. Likevel er det viktig å huske at tid og intensitet som blir benyttet kan skade proteinet så mye at det denatureres og mister sin funksjonalitet (Higuera-Barraza et al., 2016).

Ytterligere er det bevist at ULs forbedrende effekt på proteiners løselighet skyldes endringer som delvis utfoldelse av proteinstrukturen som følge av ULs kavitasjonseffekt (Shokri et al.,

2022). På denne måten eksponeres hydrofile grupper som ellers ville vært begravet, til det omkringliggende vannet. Således økes interaksjonen mellom protein og vann, som igjen øker proteinløseligheten (Shokri et al., 2022). Ikke bare vil løseligheten forbedres, men 3D-strukturen vil også endres. UL splitter opp lengre peptidkjeder til flere frie og kortere kjeder.

5.3.2 Frie aminogrunder & hydrolysegrad

Antallet frie aminogrunder er tydelig høyere ved UL-behandling (5.69), sammenlignet med KP (3.47). Dette indikerer tydelig økning av frie aminogrunder som følge av UL-behandlingen. Høyere antall frie aminogrunder betyr at aminosyrestrukturen er blitt delt opp og endret. Strukturen er opprinnelig én aminogruppe (NH_2) bundet til et karbonatom og én karboksylgruppe (COOH), samt én sidegruppe (R-gruppe) som sier noe om hvilken aminosyre det er. Det er ønskelig med et høyt antall frie aminogrunder i FPH og behandlingene av dette, eksempelvis hydrolyse og UL, sikter derfor på å frigjøre NH_2 -gruppen fra resten av aminosyrestrukturen. UL-ens sono-mekaniske effekt på proteinene har vært av betydelighet, se forskjellene i tabell 2.

Hydrolysegraden er, som de frie aminogrunderne, større i ULP (42.73), enn i KP (26.39). Stor hydrolysegrad er positivt i denne sammenhengen da det betyr at proteinene er godt nedbrutt. Større hydrolysegrad tilsvarer større fragmentering av proteinstrukturen, som fremmer proteinfordøyeligheten. Strukturelt mindre proteinmolekyler har økt fordøyelighet hos mennesker. Ved inntak av protein vil kroppen starte å bryte ned proteinmolekylene som en del av fordøyelsesprosessen. Denne delen av fordøyelsen kalles proteinfordøyelsen og er en avansert og krevende prosess for kroppen. Her sekreterer kroppen ut et stort antall enzymer som jobber sammen for å bryte opp peptidbindingene i proteinet (Aabakken, 2023). Det vil være optimalt å splitte flest mulig peptidbindinger i proteiner før de inntas for å redusere arbeidsmengden for kroppen. Større hydrolysegrad var forventet da en større mengde frie aminogrunder kan ha innvirkning på hydrolysegraden. Aminogrunder som er bundet til en aminosyre er mindre reaktive enn de frie som igjen kan bety at økt antall frie aminogrunder kan bidra til å øke tilgjengeligheten for hydrolytiske reaksjoner. I tillegg kan frie aminogrunder påvirke hydrofiliteten, ved å eksponere hydrofile grupper til det omkringende vannet. Det ser dermed ut til at UL-behandlingen har vesentlig påvirkning på peptidkjedenes lengder, da både hydrolysegraden og mengden frie aminogrunder har økt.

På samme måte som proteinfordøyeligheten forbedres, vil også andre funksjonelle egenskaper også påvirkes positivt. Innledningsvis ble det stadfestet at funksjonelle egenskaper som løselighet, emulgeringsevne og gel- og skumdannelse kan forbedres av kortere strukturer.

5.3.3 Proteinoksidasjon

For å måle proteinoksidasjon har det blitt gjennomført kjemiske analyser av tioler og karbonylgrupper. Oksidasjon av proteiner kan føre til endringer i kvaliteten til FPH (Hematyar et al., 2019). Konsentrasjonen av tioler vil synke ved oksidasjon og antall karbonylgrupper øke. Dette gjenspeiles i resultatene som indikerer at det har skjedd en oksidasjon i ULP, se tabell 2. Mengde karbonylgrupper har økt, noe som kan komme av at ROS og RNS har reagert med peptid- og sidegruppene.

Det kan tenkes at den lavere mengden av tioler i ULP kan være forårsaket av et lavere innhold av Cys. Cys består av en tiolgruppe (-SH) som er et hydrogenatom bundet til et svovelatom. Under enzymatisk hydrolyse kan Cys-molekylene bli spaltet, som igjen kan bidra til at tioler oksideres. Ved oksidasjon kan det dannes kryssbinder hvor to Cys-molekyler bindes sammen gjennom svovelgruppene sine. Slike bindinger kalles disulfidbindinger (-S-S-) og er viktige for strukturen til proteiner (Barbuti, 2023). I utgangspunktet er disulfidbindinger positivt for foldingen og stabilisering av proteinet, men ved oksidasjon kan det dannes disulfidbindinger som er negative for proteinet. Det kan føre til uønskede endringer i proteinstruktur og ønskede funksjonelle egenskaper kan gå tapt. I KP ble det funnet en høyere andel Cys (>21.34) enn i ULP (>19.21). Det kan være årsaken til at mengden tioler er høyere i KP fordi det har blitt dannet flere bindinger mellom Cys som gjør at tiolgruppene forsvinner. Lavere mengde tioler i ULP er da en konsekvens av at UL har bidratt til oksidasjon av noen av tiolene som igjen har ført til færre tioler.

En høyere mengde karbonylgrupper i ULP kan skyldes flere faktorer. Karbonylgrupper oppstår når ROS eller RNS reagerer med peptid- og sidegrupper som følge av oksidasjon. UL-behandlingen genererte relativt høye temperaturer (>63°C) som kan føre til at oksidative reaksjoner kan skje som følge av tilstedeværelsen av oksygen. Slike reaksjoner fører til at det dannes oksidanter som kan ødelegge aminosyrekjedene i proteinene og karbonylgrupper lages. ULP har et høyere innhold av aminosyrene Arg, Phe og His/Cys/Tyr, som er mer utsatt

for oksidasjon, som også kan være en årsak til at antall karbonylgrupper er høyere i ULP (Hawkins & Davies, 2001). Som ved tioler, kan også dannelse av karbonylgrupper påvirke struktur, funksjonalitet og sensoriske egenskaper til proteiner. Selv om resultatene av tioler og karbonylgrupper indikerer at det har skjedd en oksidasjon, er ikke forskjellene signifikante. Det vil si at dersom det har skjedd oksidasjon har det ikke vært av betydning.

Ved oksidasjon ville man forventet lavere løselighet, noe som ikke har vært tilfellet i ULP, så dersom det har skjedd oksidasjon vil denne ha hatt lite påvirkning på de andre funksjonelle egenskapene.

5.4 Fysiske kvalitetsparametere

For å kunne si noe om den fysiske kvaliteten til hydrolysatet har det blitt gjort en fargemåling ved kolorimetri. L^*a^*b viser verdier for lyshet, rødhet og gulhet hos FPH fra KP og ULP. Verdien for lyshet er høyere i KP (74.74) enn i ULP (72.38), som vil si at ULP er mørkere, se tabell 3. Dette kan skyldes at FPH har gjennomgått en sterk UL-behandling som kan føre til oksidasjon hos heme-proteiner. Heme-molekyler er organiske forbindelser som inneholder jern, som hemoglobin og myoglobin. Slike forbindelser kan oksideres ved UL som fører til en mørkere farge. Når heme-forbindelser oksideres, mister de evnen til å binde oksygen som fører til at proteiner mister sin funksjon og kvaliteten blir lavere (Cropotova et al., 2021). En må likevel ta i betraktning at forskjellene mellom lysheten i ULP og KP ikke er vesentlig store og det kan være flere faktorer som spiller inn. Har heme-forbindelser blitt oksidert skulle man forventet en mørkere farge og dermed høyere verdi for rødhet a^* . Resultatene indikerer relativt lave verdier for a^* hos både KP (1.49) og ULP (1.91), men som nevnt i resultat, er det ingen signifikant forskjell mellom verdiene. Dette tyder på at dersom det har skjedd oksidering har denne hatt lite innvirkning på rødheten til FPH. UL-behandling kan også føre til denaturering av proteiner som gir mindre gulhet noe som gjenspeiles i resultatene for b^* . FPH fra KP har en høyere verdi (23.44) for gulhet sammenlignet med FPH fra ULP (17.51).

Det er flere faktorer som påvirker fargen på FPH, eksempelvis oksidasjon, hydrolyse, temperatur, pH og mengde hemoglobin/myoglobin i blodet (Cropotova et al., 2021). Verdier fra analyse av tioler og karbonylgrupper indikerer at det har skjedd mer proteinoksidasjon i

ULP enn i KP. Dette kan også være en begrunnelse på hvorfor fargeparameterne har gitt de respektive utslagene som er beskrevet over.

5.5 Total aminosyresammensetning

Hvilke aminosyrer som er til stede og mengden av disse, kan si noe om næringsinnholdet og funksjonaliteten til FPH-ene (Simavik et al., 2020). Fra TAS er det mest aktuelt å se på utbyttet av EAS da mennesker ikke kan produsere disse selv og må få tilført de gjennom kosten (Kristensen, 2021). Det er ønskelig å oppnå et høyt innhold av EAS i FPH slik at produktene som eventuelt produseres, inneholder så mye høyverdig protein som mulig. Av resultatene kan man se at det er variasjon mellom Gly i KP kontra ULP. Her kan de tenkes at UL-behandling har bidratt til at andelen av Gly i FPH har økt. Andelen av aminosyrene Arg, Pro og Cyx er også litt høyere i ULP enn i KP. UL-behandling kan ha hatt en positiv innvirkning slik at man får hentet ut mer av disse fra FPH. Det motsatte kan man se hos aminosyrene Ser, Asp, Glu og Ala, hvor andelen er høyere i KP enn i ULP. Her kan UL-behandling ha hatt en negativ påvirkning som har ført til at andelen har sunket.

Som tabell 4 viser har det blitt funnet 6 av 8 EAS i FPH. I KP var det høyest andel av EAS-ene Val, Leu og His/Cys/Tyr, men i ULP var det høyest andel av Thr, Phe og Ile. Ut ifra disse forskjellene, kan de virke som at UL-behandling har hatt en positiv påvirkning på EAS-ene Thr, Phe og Ile, og en negativ påvirkning på Val, Leu og His/Cys/Tyr. Siden det ikke var noen signifikante forskjeller mellom de EAS-ene, kan forskjellene av EAS komme av forskjeller i restråstoffet som ble benyttet. Hadde disse forskjellene vært signifikante, ville det bidratt til høyere proteinfordøyelighet og biologisk verdi.

Siden fisk er “fullstendig protein”, ville man forventet å finne alle EAS-ene i FPH, men i KP og ULP mangler EAS-ene metionin (Met) og lysin (Lys). Met kan ha blitt degradert på grunn av syrehydrolyse da prøvene til aminosyresammensetningsanalysen ble laget. Med degradert menes det at Met har oksidert til Met sulfoxid og Met sulfon (Mustăţea et al., 2019). Lys kan også ha degradert som følge av syrehydrolysen (Mustăţea et al., 2019).

KP inneholder en høyere andel Cys (>21.34) enn ULP (>19.21) som kan indikere at det har skjedd en oksidasjon som følge av UL-behandling, se tabell 4. ULP har også en høyere andel av aminosyrene Arg, His, Tyr og Phe som er mer utsatt for oksidasjon (Hawkins & Davies, 2001). Dette kan være en årsak til at man ser en antydning til oksidasjon i ULP.

6. Konklusjon

Forskningsspørsmålet som dette prosjektet har belyst er “Hvordan vil bruk av ultralyd som forberedende metode til enzymatisk hydrolyse av silderestråstoff påvirke utbytte og kvalitet i forhold til de fysiske, kjemiske og funksjonelle egenskapene til proteinene i hydrolysatet?”

Det har blitt gjennomført analyse av utbytte fra fraksjoner som bein, grakse, emulsjon, olje og hydrolysat. Hydrolysatet har så blitt analysert videre for tørrstoff, aske, proteininnhold, vann, fett, proteinløselighet, frie aminogrupeer, hydrolysegrad, proteinoksidasjon (tioler og karbonylgrupper), total aminosyresammensetning og farge. Resultatene fra disse analysene viser hvordan UL har eller ikke har, påvirket utbyttet og kvalitet i forhold til de fysiske, kjemiske og funksjonelle egenskapene til proteinene i FPH. Gjennom analysene som har blitt gjort, har man underveis sett både negative og positive effekter ved bruk av UL-behandling.

6.1 Negative effekter av ultralyd

UL kan ha hatt en negativ påvirkning på forskjellene i utbyttet ettersom mengden olje er lavere og bein høyere. Likevel kan det tenkes at det er forskjeller i restråstoffet som er årsaken til variasjonene. Den større mengden emulsjon kan allikevel være en konsekvens av UL-behandlingen. Både høyere temperatur og mulig kavitasjonseffekt kan ha ført til økt andel emulsjon. Mengden grakse i ULP kontra KP kan være forårsaket av ULs effekt på sekundærstrukturen til proteinene. Disse strukturelle endringene ved eksponering for UL kan omdanne enkelte peptider fra vannløselige til vann-uløselige som følge av aggregering og denaturering. Graksen består av nettopp vann-uløselige peptider og andre partikler som ikke løses opp. Både større mengde emulsjon og grakse er uønskelig og anses derfor som negative effekter.

Resultatene fra tioler og karbonyl indikerer at det har skjedd proteinoksidasjon i FPH som følge av UL-behandling, noe som er negativt. Oksidasjonen kan nemlig resultere i at proteinstrukturen endres og ønskede funksjonelle egenskaper kan gå tapt. Det var i sammenheng med oksidasjon forventet lavere løselighet. Dette var imidlertid ikke tilfellet og dermed har en mulig oksidasjon vært av ingen eller liten betydning.

ULP viste ved kolorimetri mørkere farge, enn KP, se tabell 3. Dette kan forklares med oksidasjon av heme-forbindelser i FPH. Når oksidasjon oppstår her, mister heme-forbindelsene evnen til å binde oksygen. Dette medfører tap av funksjon og at kvaliteten på FPH blir lavere. UL-behandling kan medføre denaturering av proteiner som gir mindre gulhet, se tabell 3.

6.2 Positive effekter av ultralyd

UL-behandling som forberedende metode har hatt flere positive effekter på de fysiske, kjemiske- og funksjonelle egenskapene til proteinene i FPH. Proteinløseligheten har blitt signifikant høyere etter UL-behandling. Økt løselighet er bra for de funksjonelle egenskapene til proteiner og kan føre til bedre gele-, skum- og emulgerende egenskaper. Molekylstørrelsen blir mindre og strukturen til proteinet endres som følge av økt løselighet, noe som igjen kan forbedre de funksjonelle egenskapene. UL har også hatt en positiv påvirkning på mengden frie aminogruupper, hvor antall frie aminogruupper er signifikant høyere i ULP enn i KP. Økt antall aminogruupper kan bidra til å øke tilgjengeligheten for hydrolytiske reaksjoner. I sammenheng med økt antall frie aminogruupper, har også hydrolysegraden økt signifikant som følge av UL. Høyere antall frie aminogruupper og økt hydrolysegrad fremmer proteinfordøyeligheten.

I ULP er det også litt høyere andel tørrstoff, aske og protein som indikerer at UL-behandling har hatt en positiv effekt på utbyttet. Sammenlignet med et annet studie, er proteininnholdet i FPH relativt mye høyere etter UL-behandling enn uten. Likevel er det utfordrende å utdype mer om dette da UL-behandling som forberedende metode til enzymatisk hydrolyse på silderestråstoff, ikke har blitt gjennomført tidligere.

Selv om det ikke var signifikante forskjeller mellom mengden EAS i ULP kontra KP, kan de små forskjellene indikere at man er på riktig vei. Det var også noe større andel av

aminosyrene Arg, Thr, Ala og Cyx, som kan tyde på at UL-behandling har hatt en positiv effekt på utbyttet.

6.3 Veien videre

Bruk av UL for videreforedling av silderestråstoff er en ny og innovativ måte å anvende UL-metodikken på. Da dette ikke er gjort på silderestråstoff tidligere er konseptet enda i startfasen og har forbedringspotensial.

UL-behandlingen som ble benyttet i prosjektet hadde en amplitude på 80%, noe som tilsvarer en styrke på 1200W. Intensiteten var høy og genererte nok varme til at restråstoffløsningen nådde temperaturer opp til 63°C. Dette kan ha vært noe av årsaken til at det oppstod oksidasjon. Av denne grunn vil det være ønskelig å forhindre at restråstoffet utsettes for relativt høye temperaturer før hydrolysen. I videre arbeid bør dette forhindres da det trolig vil være fordelaktig. Bruk av isvann underveis i UL-behandlingen for å motvirke oppvarmingen kan muligens ha en positiv effekt på FPH (Yu et al., 2018). I så fall er det viktig å ikke tilsette isvannet direkte til råstoffet da dette kan påvirke massebalansen. Isvannet kan eksempelvis tilsettes rundt beholderen med råstoff slik at det ikke kommer i direkte kontakt med råstoffet. I tillegg vil eksponeringstiden også kunne justeres for mer gunstige resultater. I stedet for 10min aktiv UL, kan det kanskje reduseres til 5min, eventuelt kan trolig kortere tidsintervaller eller lengre pauser også virke positivt. Effekten av 5 sek på, 10 sek av, eventuelt 2 sek på, 5 sek av er ikke kartlagt, men kan kanskje medføre gode resultater i videre prosjekter.

Da lipid, vannløselige protein/hydrolysat, emulsjon og grakse skulle separeres fra ULP, bød dette på utfordringer da løsningen ikke gikk gjennom skilletrakten som tenkt. I videre arbeid bør man derfor se på andre metoder for å effektivisere separasjonen av fraksjonene. Slik kan man trolig hente ut mer av de ønskede komponentene vannløselige protein og lipid, og forhindre at noe går tapt underveis i separeringen.

Bruk av antioksidanter ble ikke brukt i dette prosjektet, men bør vurderes i videre forsøk. Ved å tilsette antioksidanter før UL-behandling kan en potensielt bidra til å forhindre blant annet oksidasjon.

7. Referanser

Aabakken, Lars: *pepsin* i *Store medisinske leksikon* på snl.no. Hentet 21. mai 2023 fra <https://sml.snl.no/pepsin>

Álvarez, C., Lélou, P., Lynch, S. A., & Tiwari, B. K. (2018). Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. *LWT*, 88, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.045>

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytic Chemists. Washington, DC, USA

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. In *Food Research International* (Vol. 48, Issue 2, pp. 410–427). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>

Barbuti, M. D. (2023, January 3). *Cystein*. Store Norske Leksikon. Hentet 21.mai 2023 fra <https://snl.no/cystein>

Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Péron, M., Le Gal, Y., Ravallec-Plé, R., Bergé, J.-P., Picot, L., Piot, J.-M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., & Johansson, I. (2009). Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *DES*, 244, 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.06.004>

Cell Biolabs. (2022). *OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit*.

Cropotova, J. (2022). *Improved Processing to Enhance Seafood Sidestream Valorization and Exploration*. Bluebioeconomy. <https://bluebioeconomy.eu/improved-processing-to-enhance-seafood-sidestream-valorization-and-exploration/>

Cropotova, J., Mozuraityte, R., Standal, I. B., Ojha, S., Rustad, T., & Tiwari, B. (2020). Influence of high-pressure processing on quality attributes of haddock and mackerel minces during frozen storage, and fishcakes prepared thereof. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102236>

- Cropotova, J., Tappi, S., Genovese, J., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., & Rustad, T. (2021). The combined effect of pulsed electric field treatment and brine salting on changes in the oxidative stability of lipids and proteins and color characteristics of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Heliyon*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05947>
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). *Fennema's Food Chemistry* (S. Damodaran & K. L. Parkin, Eds.; Fifth).
- Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups (1959) *Arch. Biochem. Biophys*, **82**, 70
- FAO. 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- FN-sambandet. (2023, April 4). *FNs bærekraftsmål*. <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2001). *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. www.bba-direct.com
- Helseth, Lars Egil: *emulsjon* i *Store norske leksikon* på snl.no. Hentet 21. mai 2023 fra <https://snl.no/emulsjon>
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., & Kastrup Dalsgaard, T. (2019). *Relationship between lipid and protein oxidation in fish: A Review*. https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/2602506/system_appendPDF_proof_hi.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Higuera-Barraza, O. A., Del Toro-Sanchez, C. L., Ruiz-Cruz, S., & Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 31, pp. 558–562). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.007>
- Innovative Food Processing*. (2023). <https://www.innovativefoodprocessing.no>
- Iversen, A., Nyrud, T., Robertsen, R., & Erraia, J. (2022). *Verdiskaping og ringvirkninger fra fiskeflåten i 2021* .
- Johansen, A.-M. (2023, February 13). *Verdt å vite om enzymatisk proteinhydrolyse*. Nofima. <https://nofima.no/fakta/verdt-a-vite-om-enzymatisk-proteinhydrolyse/>

- Johnsen, F. F., Rognsås, L. L., Erraia, J., Grønvik, O., Fjose, S., Blomgren, A., Fjelldal, Ø., Robertsen, R., Iversen, A., & Nyrud, T. (2022). *Ringvirkninger av norsk sjømatnæring i 2021*.
- Johnsen, J. P. (2022, February 14). *Sildefiske*. <https://snl.no/sildefiske>
- Kraugerud, R. L. (2022, August 11). *Silda er sunnere enn vi trodde*. Nofima. <https://nofima.no/resultater/silda-er-sunnere-enn-vi-trodde/>
- Kristensen, T. (2021, November 7). *Essensielle aminosyrer*. Store Norske Leksikon. https://snl.no/essensielle_aminosyrer
- Liceaga-Gesualdo, A.M. and Li-Chan, E.C.Y. (1999), Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64: 1000-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x>
- Lin, D., Zhang, Q., Xiao, L., Huang, Y., Yang, Z., Wu, Z., Tu, Z., Qin, W., Chen, H., Wu, D., Zhang, Q., & Li, S. (2021). Effects of ultrasound on functional properties, structure and glycation properties of proteins: a review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 61, Issue 15, pp. 2471–2481). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1778632>
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.013>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 55, Issue 1, pp. 83–95). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- Løseth, A. (2020). *Den lunefulle silda*. <https://www.norgeshistorie.no/bygging-av-stat-og-nasjon/1437-Den-lunefulle-silda-sildefisket-på-1800-tallet.html>
- Misir, G. B., & Koral, S. (2019). EFFECTS OF ULTRASOUND TREATMENT ON STRUCTURAL, CHEMICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN

HYDROLYSATE OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) BY-PRODUCTS. In *Ital. J. Food Sci* (Vol. 31).

Mustăţea, G., Ungureanu, E. L., & Iorga, E. (2019). *PROTEIN ACIDIC HYDROLYSIS FOR AMINO ACIDS ANALYSIS IN FOOD-PROGRESS OVER TIME: A SHORT REVIEW* (Vol. 388).

Myhre, M., Richardsen, R., Nystøl, R., & Strandheim, G. (2022). *Analyse marint restråstoff 2021*.

Pedersen, Bjørn: *oksidasjon i Store norske leksikon* på snl.no. Hentet 21. mai 2023 fra <https://snl.no/oksidasjon>

Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Food Science and Technology*, 38, 77–80.

Regjeringen. (2022, December 17). *Regulering av fisket etter norsk vårgytande sild i 2023*.

Riddles, R.W., Blakeley, R.L., Zerner, B., Reassessment of Ellman's reagent (1983) *Methods in enzymology*, 91, 8

Rønning, S., Pedersen, M. E., Kirkhus, B., Rødbotten, R., & Lindberg, D. (2016). *Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoff-fremstilling, funksjon og markedsmuligheter*. www.nofima.no

Semb-Johansson, A., Hjermann, D. Ø., & Lee, A. M. (2023, May 8). *Næringskjede*. Store Norske Leksikon. <https://snl.no/n%C3%A6ringskjede>

Shokri, S., Javanmardi, F., Mohammadi, M., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Effects of ultrasound on the techno-functional properties of milk proteins: A systematic review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 83). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105938>

Simavik, Kristina Ryeng: *Hydrolyse av regnbueørret (Oncorhynchus mykiss). Effekten av antioksidanter på kvalitet under lagring*. (2020)

Su, J., & Cavaco-Paulo, A. (2021). Effect of ultrasound on protein functionality. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 76). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105653>

Taylor, W., *Formol titration: an evaluation of its various modifications*. Analyst, 1957. 82(976): p. 488-498.

Yu, C., Wu, F., Cha, Y., Qin, Y., & Du, M. (2018). Effects of ultrasound on structure and functional properties of mussel (*Mytilus edulis*) protein isolates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(8). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13690>

Zhang, S., Sun, L., Ju, H., Bao, Z., Zeng, X. an, & Lin, S. (2021). Research advances and application of pulsed electric field on proteins and peptides in food. In *Food Research International* (Vol. 139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109914>

8.Vedlegg

Vedlegg 1 – Resultater av utbyttet fra enzymatisk hydrolyse med og uten ultralydbehandling

Resultat av:	KP	ULP
Olje (g)	55.6	27.7
Emulsjon (g)	21.0	157.6
Hydrolysat (g)	1347.9	1047.2
Grakse (g)	308.0	450.8
Bein (g)	127.5	138.2
Total	1860.0	1821.3

Vedlegg 2 – Tørrstoff- og askeutregning

SAMPLE	Kontroll													
CUP NUMBER	WEIGHT EMPTY	WEIGHT WITH SAMPLE	SAMPLE WEIGHT	DRY WEIGHT	DRY SAMPLE WEIGHT	DRY MATTER %	AVERAGE	ASH + CUP	ASH	ASH %	AVERAGE ASH	DEV ST ASH	DEV ST DRY MATTER	
B3	43,86	45,88	2,02	45,78	1,92	95,05	95,54	44,11	0,2500	12,38	12,54	0,233473897	0,874503238	
B5	46,61	48,62	2,0100	48,52	1,91	95,02		46,86	0,2500	12,44				
B7	45,46	47,49	2,0300	47,42	1,96	96,55		45,72	0,2600	12,81				
SAMPLE	Ultralyd													
CUP NUMBER	WEIGHT EMPTY	WEIGHT WITH SAMPLE	SAMPLE WEIGHT	DRY WEIGHT	DRY SAMPLE WEIGHT	DRY MATTER %	AVERAGE	ASH + CUP	ASH	ASH %	AVERAGE ASH	DEV ST ASH	DEV ST DRY MATTER	
C0	46,54	48,54	2	48,46	1,92	96,00	96,05	46,8	0,2600	13,00	12,83	0,192526967	0,530382314	
B0	44,78	46,8	2,02	46,71	1,93	95,54		45,04	0,2600	12,87				
A8	45,57	47,63	2,06	47,56	1,99	96,60		45,83	0,2600	12,62				

Vedlegg 3 – Tørrstoff

Resultater av tørrstoff	KP	ULP
1.Parallell (%)	95.05	96.00
2.Parallell (%)	95.02	95.54
3.Parallell (%)	96.55	96.60
Gjennomsnitt	95.54	96.05
Standardavvik ±	0.87	0.53

Vedlegg 3 – Aske

Resultater av aske	KP	ULP
1.Parallell (%)	12.38	13.00
2.Parallell (%)	12.44	12.87
3.Parallell (%)	12.81	12.62
Gjennomsnitt	12.54	12.83

Standardavvik ±	0.23	0.19
-----------------	------	------

Vedlegg 4 - Vann

Resultater av tørrstoff	KP	ULP
1.Parallell (%)	4.95	4.00
2.Parallell (%)	4.98	4.46
3.Parallell (%)	3.45	3.40
Gjennomsnitt	4.46	3.95
Standardavvik ±	0.87	0.53

Vedlegg 5 – Proteininnhold fra Eurofins (KP)



Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet NTNU
avd Ålesund
Fakturamottak
Postboks 381 Alnabru
0814 Oslo
Attn: **Janna Cropotova**

Eurofins Food & Feed Testing Norway AS
(Chemistry)
F. reg. NO9 825 711 46
Møllebakken 40
NO-1538 Moss

Tlf: +47 09450
mailto:mal@eurofins.no

AR-23-MO-008610-01



EUNOMO2-00128100

Prøvemottak: 05.05.2023
Temperatur: 05.05.2023-11.05.2023
Analyseperiode: 05.05.2023-11.05.2023
Referanse: Hast! Impressive
prosjektnr 979707100

ANALYSERAPPORT

Prøvenr.:	440-2023-0505-076	Prøvetakingsdato:			
Prøvetype:	Fiskeprotein hydrolysat	Prøvetaker:			
Prøvemerking:	1 - Sild FPH kontroll	Analysestartdato:	05.05.2023		
Analyse	Resultat	Enhet	LOQ	MU	Metode
a) Protein (Nx6.25) (Kjeldahl)					
a) LWD3S Protein (Nx6.25)	82.1	g/100 g	0.3	10%	2009/152/EU

Utløsende laboratorium/Underisører/ander:

a) Eurofins Food & Feed Testing Sweden (Lidköping), Sockerbrukslg 3, port 2, 531 40, Lidköping ISO/IEC 17025:2017 SWEDAC 1977,

Moss 11.05.2023

Merete Meum
Kundevelleleder (ASM)

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Målesikkerhet
< Mindre enn >: Større enn nå: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <-1, <-50 e.l. betyr ikke påvist.

Målesikkerhet er angitt med dekningsfaktor k=2. Målesikkerhet er ikke tatt hensyn til ved vurdering av om resultatet er utenfor grenseverdi/-området.
For mikrobiologiske analyser oppgis konfidensintervall. Ytterligere opplysninger om målesikkerhet fås ved henvendelse til laboratoriet.
Rapporten må ikke gjengis, uavkortet i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).
Resultater gjelder prøven slik den ble mottatt hos laboratoriet.

Side 1 av 1

AP-001 v. 098

Vedlegg 6 – Proteininnhold fra Eurofins (ULP)



Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet NTNU
avd Ålesund
Fakturamottak
Postboks 381 Alnabru
0814 Oslo
Attn: **Janna Cropotova**

Eurofins Food & Feed Testing Norway AS
(Chemistry)
F. reg. NO9 825 711 46
Møllebakken 40
NO-1538 Moss

Tlf: +47 09450
mailto:mal@eurofins.no

AR-23-MO-008613-01



EUNOMO2-00128100

Prøvemottak: 05.05.2023
Temperatur: 05.05.2023-11.05.2023
Analyseperiode: 05.05.2023-11.05.2023
Referanse: Hast! Impressive
prosjektnr 979707100

ANALYSERAPPORT

Prøvenr.:	440-2023-0505-079	Prøvetakingsdato:			
Prøvetype:	Fiskeprotein hydrolysat	Prøvetaker:			
Prøvemerking:	4 - Sild FPH 80%	Analysestartdato:	05.05.2023		
Analyse	Resultat	Enhet	LOQ	MU	Metode
a) Protein (Nx6.25) (Kjeldahl)					
a) LWD3S Protein (Nx6.25)	83.3	g/100 g	0.3	10%	2009/152/EU

Utløsende laboratorium/Underleverandør:

a) Eurofins Food & Feed Testing Sweden (Lidköping), Sockerbrukslg 3, port 2, 531 40, Lidköping ISO/IEC 17025:2017 SWEDAC 1977,

Moss 11.05.2023


.....
Merete Meum
Kundevilleleder (ASM)

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
< Mindre enn >: Større enn nå: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <-1, <-50 e.l. betyr ikke påvist.

Måleusikkerhet er angitt med dekningsfaktor k=2. Måleusikkerhet er ikke tatt hensyn til ved vurdering av om resultatet er utenfor grenseverdi/-område.
For mikrobiologiske analyser oppgis konfidensintervall. Ytterligere opplysninger om måleusikkerhet fås ved henvendelse til laboratoriet.
Rapporten må ikke gjengis, uansett i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).
Resultater gjelder prøven slik den ble mottatt hos laboratoriet.

Side 1 av 1

AP-001 v.08

Vedlegg 7 – Fortynninger av BSA benyttet i Lowry

Nummer (LOWRY)	Slutt konsentrasjon	Målekolbe	µl BSA løsning (1000µg/ml)	Fortynninger
1	12.5 µg/ml	10ml	125 µl	987
2	25 µg/ml	10ml	250 µl	975
3	50 µg/ml	10ml	500 µl	950
4	100 µg/ml	10ml	1000 µl	900
5	150 µg/ml	10ml	1500 µl	850
6	200 µg/ml	10ml	2000 µl	800
7	300 µg/ml	10ml	3000 µl	700

Vedlegg 8 – Resultater av proteinløselighet (Lowry)

Resultater av proteinløselighet (Lowry)	KP	ULP
1.Parallell	185.12	195.62
2.Parallell	186.29	193.28
3.Parallell	190.95	197.95
Gjennomsnitt	187.45	195.62
Standardavvik ±	3.09	2.33

Vedlegg 9 – Resultater av frie aminogrupeer

Resultater av frie aminogrupeer	KP	ULP
1. Parallell (%)	3.31	4.76
2. Parallell (%)	3.49	5.52
3. Parallell (%)	3.60	6.81
Gjennomsnitt	3.47	5.69
Standardavvik ±	0.21	1.45

Vedlegg 10 – Utregning av frie aminosyrer fra kontroll og ultralyd parallellene

Resultat fra KP

1. $\frac{3.55\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1.5026 \cdot 1000} = 3.31\%$
2. $\frac{3.74\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1.5012 \cdot 1000} = 3.49\%$
3. $\frac{3.89\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1.5133 \cdot 1000} = 3.60\%$

Resultat fra ULP

1. $\frac{5.11\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1,5034\text{g} \cdot 1000} = 4.76\%$
2. $\frac{6.23\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1.5813\text{g} \cdot 1000} = 5.52\%$
3. $\frac{7.30\text{ml} \cdot 1\text{M} \cdot 14.007 \cdot 100}{1,5025\text{g} \cdot 1000} = 6.81\%$

Vedlegg 11 – Utregning av hydrolysegrad fra kontroll og ultralyd parallellene

Resultat fra KP – Hydrolysegrad

$$\frac{3.47 \cdot 100}{\frac{82.1}{6.25}} = 26.39\%$$

Resultat fra ULP – Hydrolysegrad

$$\frac{5.69 \cdot 100}{\frac{83.3}{6.25}} = 42.73\%$$

Vedlegg 12 – Absorbans hos tioler

Absorbans hos tioler	KP	ULP
1.Parallell	0.013	0.039
2.Parallell	0.011	0.030
3.Parallell	0.023	0.030

Vedlegg 13 – Oksidert og redusert BSA blandinger benyttet i analyse av karbonyl

Standard rør Karbonyl	10µg/ml oksidert BSA (µl)	10µg/mL redusert BSA (µl)	[Protein Karbonyl] (nmol/mg)
1	400	0	7.5
2	320	80	6.0
3	240	160	4.5
4	160	240	3.0
5	80	320	1.5
6	40	360	0.75
7	20	380	0.375
8	0	400	0

Vedlegg 14 – Resultater av karbonyl

	OD ss	OD ss	Dilution (in redB ^s	Protein Carbonyl ss	Protein Carbonyl	avg Prot. Carbonyl	st.dev.
con	0,49	0,51	1,00	4,56	4,87	4,72	0,22
conax	0,52	0,41	1,00	4,91	3,58	4,24	0,94
vp	0,37	0,38	1,00	3,04	3,13	3,08	0,06
vpax	0,32	0,30	1,00	2,37	2,10	2,24	0,19
map	0,32	0,30	1,00	2,41	2,14	2,27	0,19
mapax	0,36	0,30	1,00	2,91	2,18	2,54	0,52
300W	0,38	0,40	1,00	3,17	3,38	3,27	0,15
450W	0,44	0,47	1,00	3,95	4,32	4,13	0,26
600W	0,41	0,51	1,00	3,60	4,77	4,19	0,83
sild con	0,42	0,44	1,00	3,72	3,91	3,81	0,14
sild 40%	0,45	0,45	1,00	4,06	4,08	4,07	0,01
sild60%	0,52	0,53	1,00	4,97	5,06	5,02	0,06
sild 80%	0,47	0,54	1,00	4,29	5,26	4,78	0,68

Vedlegg 15 – Fargeanalyse

Farge	Kontroll	Ultralyd
L1	74,93	73,20
L2	75,08	72,02
L3	74,21	71,93
Gjennomsnitt	74,74	72,38
Standardavvik	0,47	0,71
a1	1,43	1,65
a2	1,50	1,92
a3	1,55	2,17
Gjennomsnitt	1,49	1,91
Standardavvik	0,06	0,26
b1	23,90	17,24
b2	23,72	17,39
b3	22,70	17,89
Gjennomsnitt	23,44	17,51
Standardavvik	0,65	0,34

Vedlegg 16 – Oppveid mengde til total aminosyrebestemmelse

Aminosyrebestemmelse	KP	ULP
Oppveide mengder		
1.Parallell (g)	1.5026	1.5034
2.Parallell (g)	1.5012	1.5813
3.Parallell (g)	1.5133	1.5025

Vedlegg 17 - Total aminosyresammensetning

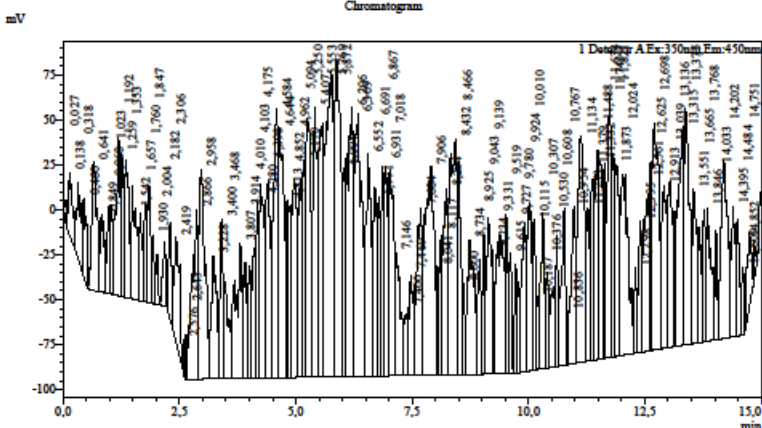
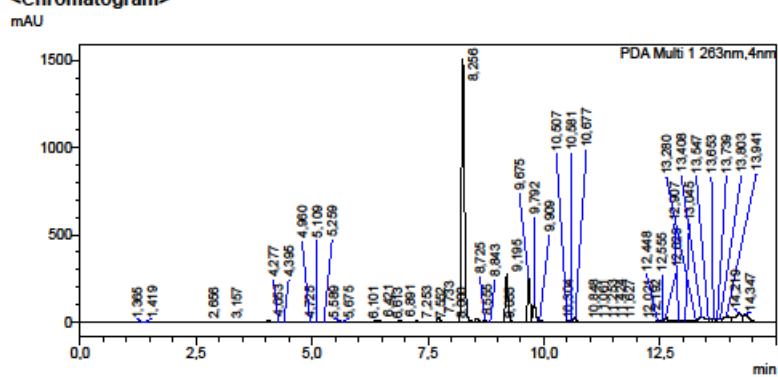
Aminosyrer	Kontroll GJ.snitt	SD	Ultralyd GJ.snitt	SD
Arginin	0,50	0,21	1,03	0,26
Serin	9,10	0,34	9,09	0,21
Asparaginsyre	0,08	0,01	0,06	0,01
Glutaminsyre	7,46	0,12	7,00	0,29
Treonin*	3,53	0,15	3,61	0,19
Glysin	17,54	1,64	20,09	1,03
Alanin	7,84	0,16	7,37	0,42
Prolin	6,66	0,73	7,20	0,18
Valin*	0,13	0,04	0,12	0,05
Fenylalanin*	3,17	0,51	3,40	0,32
Isoleucin*	3,09	0,09	3,19	0,12
Leucin*	16,87	2,31	15,83	0,86
Cystine	2,67	1,11	2,82	0,50
Histidin/Cystein/Tyrosin*	21,34	0,72	19,21	0,80

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: SK	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: SK	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: SK.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: Original_30C_75_navn.lcm		
Batch Filename	: AA Impressive makrell sild.lcb		
Vial #	: 1-4		
Injection Volume	: 2 uL		
Date Acquired	: 20.04.2023 13.54.24		
Date Processed	: 26.04.2023 18.21.34		

<Chromatogram>



C:\Users\WNTNU\Documents\HPLC\Evis\Impressive sild makrell\SK.lcd

Peak Table

PDA Ch1 263nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Area%
13	5,675	2755	Arginine	0,022
15	6,421	68508	Serine	0,551
16	6,613	633	Aspartic acid	0,005
17	6,891	57038	Glutamic acid	0,459
18	7,253	26450	Threonine	0,213
20	7,733	126710	Glycine	1,019
23	8,555	59747	Alanine	0,481
24	8,725	47532	Proline	0,382
25	8,843	1269	Valine	0,010
32	10,507	27391	Phenylalanine	0,220
33	10,581	24376	Isoleucine	0,196
34	10,677	143075	Leucine	1,151
36	11,061	26677	Cystine	0,215
44	12,629	161058	Histidine/Cysteine/Tyrosine	1,296
Total		773218		6,221

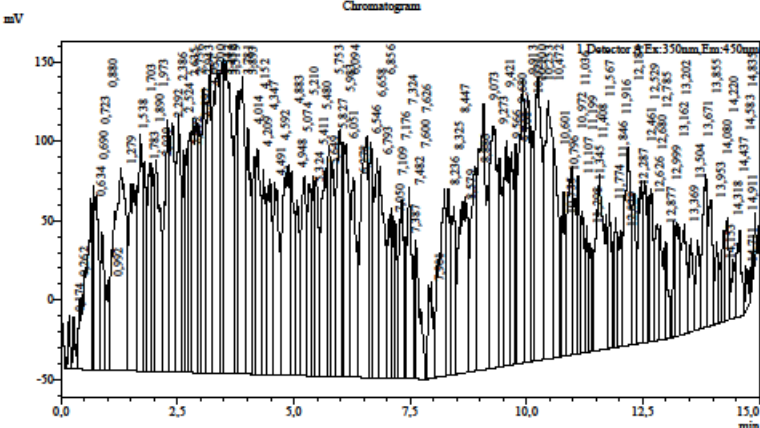
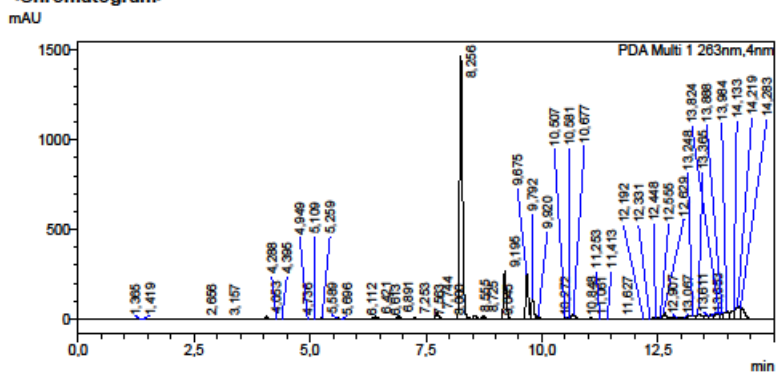
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : SK II
 Sample ID : SK II
 Data Filename : SK_2.lcd
 Method Filename : Original_30C_75_navn.lcm
 Batch Filename : AA Impressive makrell sild.lcb
 Vial # : 1-11
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 20.04.2023 15.51.51
 Date Processed : 20.04.2023 16.06.53

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



C:\Users\INTNU\Documents\HPLC\EIvis\Impressive sild makrell\SK_2.lcd

Peak Table

PDA Ch1 263nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Area%
13	5,696	5655	Arginine	0,045
15	6,421	82659	Serine	0,651
16	6,613	759	Aspartic acid	0,006
17	6,891	66844	Glutamic acid	0,526
18	7,253	32126	Threonine	0,253
20	7,744	165490	Glycine	1,303
23	8,555	70318	Alanine	0,554
24	8,725	63513	Proline	0,500
25	9,045	924	Valine	0,007
31	10,507	24930	Phenylalanine	0,196
32	10,581	26849	Isoleucine	0,211
33	10,677	134747	Leucine	1,061
35	11,061	16633	Cystine	0,131
43	12,629	193275	Histidine/Cysteine/Tyrosine	1,522
Total		884721		6,967

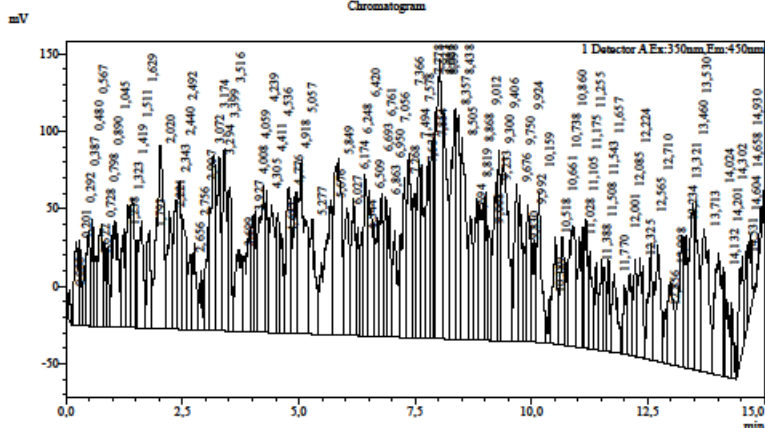
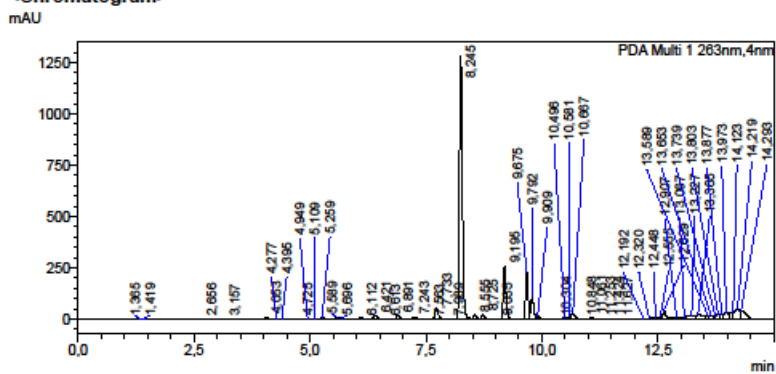
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : SU
 Sample ID : SU
 Data Filename : SU.lcd
 Method Filename : Original_30C_75_navn.lcm
 Batch Filename : AA Impressive makrell sild.lcb
 Vial # : 1-5
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 20.04.2023 14.09.57
 Date Processed : 20.04.2023 14.24.59

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



C:\Users\INTNU\Documents\HPLC\Elvis\Impressive sild makrell\SU.lcd

Peak Table

PDA Ch1 263nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Area%
13	5,696	13132	Arginine	0,114
15	6,421	96299	Serine	0,834
16	6,613	715	Aspartic acid	0,006
17	6,891	73228	Glutamic acid	0,634
18	7,243	40307	Threonine	0,349
20	7,733	224262	Glycine	1,942
23	8,555	76232	Alanine	0,660
24	8,725	78917	Proline	0,683
25	9,035	957	Valine	0,008
31	10,496	39025	Phenylalanine	0,338
32	10,581	35365	Isoleucine	0,306
33	10,667	164049	Leucine	1,420
35	11,061	34170	Cystine	0,296
43	12,629	200863	Histidine/Cysteine/Tyrosine	1,739
Total		1077523		9,329

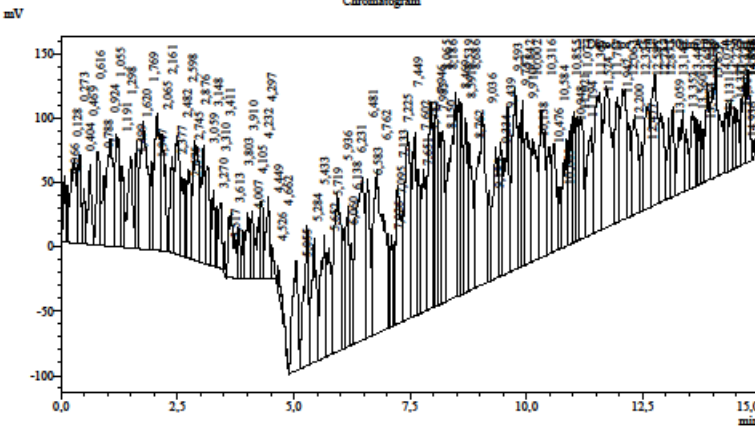
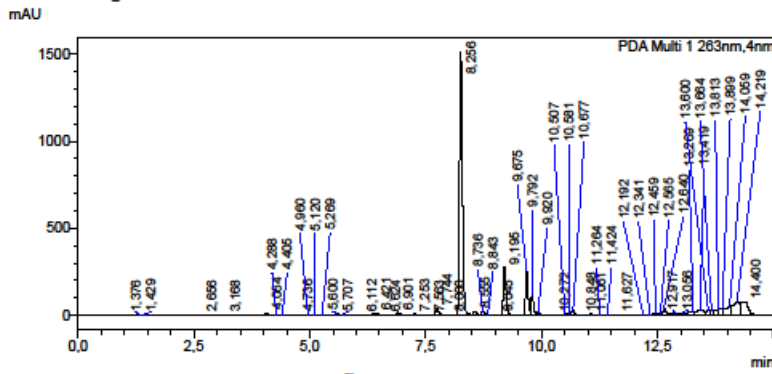
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : SU II
 Sample ID : SU II
 Data Filename : SU_2.lcd
 Method Filename : Original_30C_75_navn.lcm
 Batch Filename : AA Impressive makrell sild.lcb
 Vial # : 1-12
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 20.04.2023 16.07.23
 Date Processed : 20.04.2023 16.22.26

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



C:\Users\NTNU\Documents\HPLC\EIvis\Impressive sild makrell\SU_2.lcd

Peak Table

PDA Ch1 263nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Area%
13	5,707	7300	Arginine	0,053
15	6,421	79153	Serine	0,577
16	6,624	616	Aspartic acid	0,004
17	6,901	61669	Glutamic acid	0,450
18	7,253	29703	Threonine	0,217
20	7,744	166019	Glycine	1,210
23	8,555	65683	Alanine	0,479
24	8,736	60623	Proline	0,442
25	8,843	1398	Valine	0,010
32	10,507	27105	Phenylalanine	0,198
33	10,581	26546	Isoleucine	0,194
34	10,677	140798	Leucine	1,027
36	11,061	21183	Cystine	0,154
44	12,640	169524	Histidine/Cysteine/Tyrosine	1,236
Total		857320		6,250

