

## Økt utnyttelse av verpehøns (*Gallus gallus domesticus*)

Utnyttelse av utrangerte verpehøns til  
produksjon av ingredienser til humant  
konsum og dyrefôr

**Veronica Hammer Hjellnes**

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: desember 2016

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi



## Forord

Denne masteroppgaven utgjør siste del av et 5-årig masterprogram i bioteknologi (MBIOT5) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven er et samarbeid med SINTEF Fiskeri og havbruk AS i forbindelse med prosjektet Helhetlig bioØkonomisk utnyttelse av verpehøNE (HØNE). Laboratoriearbeidet ble i hovedsak utført ved SINTEF Sealab, med supplerende analyser ved Institutt for bioteknologi (IBT). Masteroppgaven utgjør 60 studiepoeng, og arbeidet ble utført i tidsperioden januar 2016 til desember 2016.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder ved NTNU, professor Turid Rustad, som har vært av ubeskrivelig verdi i arbeidet med å skrive denne oppgaven. Hennes kunnskap og engasjement har motivert meg til å yte det lille ekstra de siste to årene. Ved SINTEF Fiskeri og havbruk vil jeg rette en spesiell takk til mine co-veiledere Rasa Šližytė og Ana Karina Carvajal. Jeg vil også takke Marte Schei og Merethe Selnes ved laboratoriet på SINTEF for deres tålmodighet og assistanse vedrørende alle analyser jeg har utført. Ved laboratoriet på Institutt for bioteknologi vil jeg rette en takk til Trude Johansen og Siri Stavrum for deres bidrag til forståelse av proteinanalyser. Til slutt vil jeg takke mine fantastiske foreldre, Irene Hammer og Terje Hjellnes, og lillesøster, Therese Hjellnes, for ubetinget kjærighet og støtte. En ekstra takk til min talentfulle lillesøster, som har hjulpet meg med korrekturlesing. Uten dere tre hadde jeg ikke klart noe som helst.

Trondheim, 15.12.16

Veronica Hjellnes

## Sammendrag

I Norge destrueres 3 millioner verpehøns (*Gallus gallus domesticus*) hvert år, noe som tilsvarer 1,5 millioner kg rent hønsekjøtt. Verpehønene har i utgangspunktet høy ernæringsverdi, og det er derfor etisk problematisk at de blir sendt til forbrenning som risikoavfall. I tillegg utgjør destrueringen en stor kostnad for eggprodusentene. Restråstoff fra verpehøns er en interessant råstoffkilde, som potensielt kan utnyttes i produksjon av ingredienser til humant konsum og dyrefôr. Den globale befolkningsveksten medfører et økende behov for mat. For å dekke dette behovet er det viktig å utnytte tilgjengelige ressurser. Selv om restråstoff av estetiske årsaker oppfattes som en lite attraktiv kilde til næring, vil det bli nødvendig å utnytte denne ressursen i fremtiden.

Målet med denne oppgaven har vært å studere muligheten for utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Til dette formålet har tre ulike prosesseringsmetoder blitt brukt: varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. Metodene er opprinnelig utviklet for utnyttelse av restråstoff fra fisk, og det har derfor vært av interesse å se om de også kan brukes til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Varmebehandling ble utført på kvernet restråstoff ved 100 °C i 15 minutter (naturlig pH), enzymatisk hydrolyse ble utført på kvernet restråstoff ved 50 °C i 60 minutter (naturlig pH) og ensilering ble utført på kvernet restråstoff ved 40 °C i 24 timer (pH = 3). Prosesseringsmetodene ble evaluert med hensyn på utbytte og produktenes kvalitet.

Varmebehandling og enzymatisk hydrolyse var egnet til å separere lipid fra resten av komponentene i restråstoffet. Den separerte oljen (50,1–82,3 % av restråstoffets lipidinnhold) var av god kvalitet, basert på FFA ( $\leq 1,0$  %) og TOTOX ( $\leq 3,9$ ). Oljens fettsyresammensetning ble påvirket av restråstoffets sammensetning, men ikke av prosesseringsmetode. Varmebehandlingen ga et lavt proteinutbytte (1,9 - 2,9 %) i limvann, og slammet hadde en fordøyelighet på 42,3-58,0 %. Prosesseringsmetoden var derfor dårlig egnet til utnyttelse av restråstoffets proteininnhold. Enzymatisk hydrolyse med tilsetning av 0,1 % Protamex og 0,1 % Papain + Bromelain ga hønseproteinhydrolysat (HPH) med et signifikant høyere proteininnhold (85,1–94,6 %), og et signifikant lavere lipidinnhold (0,3–1,1 %), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (proteininnhold: 64,8-72,3 %, lipidinnhold: 1,0-2,6 %). Dette indikerer at den endogene enzymaktiviteten var lav ved pH-betingelsene for den enzymatiske hydrolysen. Peptidene i HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer hadde en bredere molvektfordeling, og en generelt høyere molvekt, sammenlignet med peptidene i HPH fra autolytisk hydrolyse. Tilsetning av 0,1 % Corolase PP ga HPH med et lavere proteininnhold (77,7-88,5 %), og et høyere lipidinnhold (0,55-3,71 %), sammenlignet

med tilsetning av 0,1 % Protamex og 0,1 % Papain + Bromelain. Oppskalering av enzymatisk hydrolyse med 0,1 % Papain + Bromelain ga et høyt tørrstoffutbytte i HPH (8,0–8,5 g/ 100 g råstoff (våtvekt)), sammenlignet med labskala (5,5 g/ 100 g råstoff (våtvekt)). Dette tyder på at prosesseringen også er egnet til bruk på større mengder restråstoff, i en industriell sammenheng. Enzymatisk hydrolyse var derfor egnet til utnyttelse av både lipid- og proteininnholdet i restråstoffet. Ensilering av restråstoff med innmat ga en bedre oljeseparasjon (53,1–65,7 % av restråstoffets lipidinnhold), sammenlignet med restråstoff uten innmat (14,0–42,5 % av restråstoffets lipidinnhold). Dette indikerer at den endogene enzymaktiviteten var høy ved pH-betingelsene for ensileringen. Den separerte oljen var av dårlig kvalitet, basert på TOTOX (13,2–72,3). Peroksidverdiene viste at sulfitt virket antioksiderende ved ensilering. Ensilasjen hadde en fordøyelighet på 63,2-79,7 %. Ensilering var derfor egnet til utnyttelse av proteininnholdet i restråstoffet.

Det kan konkluderes med at prosesseringsmetoder utviklet for utnyttelse av restråstoff fra fisk, også kan brukes til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Produkter fra varmebehandling og ensilering kan brukes som ingredienser i dyrefôr, mens produkter fra enzymatisk hydrolyse kan brukes som ingredienser i matvarer.

## Abstract

In Norway, 3 million discarded egg-laying hens (*Gallus gallus domesticus*) are destructed annually. This equates to the amount of 1,5 million kg pure hen meat. Even though the nutritional value of the laying hens is high, they are destructed as high risk waste. This handling of a potential food resource raises ethical questions. In addition, the destruction constitutes an economical burden for the egg-farmers. If processed in a suitable matter, rest raw material from laying hens can be utilized to produce ingredients for human consumption and animal feed. This makes it an interesting resource. The global increase in population leads to a higher demand for food. It is important to utilize the available resources to accommodate this increased need. Rest raw material might be little appealing as a source of food due to esthetical reasons. Despite this, it will become necessary to utilize this resource for the benefit of future generations.

The aim of this thesis has been to study the possibility of utilizing rest raw material from laying hens. For this purpose, the three different processing methods rendering, enzymatic hydrolysis and silaging have been used. These methods were originally developed for utilizing rest raw material from fish, and it has therefore been of interest to see if they can be used for the utilization of rest raw material from laying hens as well. Rendering was conducted on minced rest raw material at 100 °C for 15 minutes (natural pH), enzymatic hydrolysis was conducted on minced rest raw material at 50 °C for 60 minutes (natural pH), and silaging was conducted on minced rest raw material at 40 °C for 24 hours (pH = 3). The three different processing methods were evaluated based on the yield and quality of the products, after processing.

Rendering and enzymatic hydrolysis were both suitable for separating lipids from the rest of the components of the rest raw material. The quality of the separated oil (50,1-82,3 % of the total lipid content in the rest raw material) was good based on FFA ( $\leq 1,0$  %) and TOTOX ( $\leq 3,9$ ). The fatty acid composition of the oil was not influenced by the processing method used for separation, but rather on the composition of the rest raw material itself. The protein yield in the stickwater fraction obtained from rendering was low (1,9-2,9 %), and the digestibility of the insoluble fraction was found to be 42,3-58,0 %. This indicates that the processing method is not suitable for utilizing the proteins in the rest raw material. Enzymatic hydrolysis with addition of 0,1 % Protamex or 0,1 % Papain + Bromelain gave hen protein hydrolysates (HPH) with a significantly higher protein content (85,1-94,6 %), and a significantly lower lipid content (0,3-1,1 %), compared to autolytic hydrolysis (protein content: 64,8-72,3 %, and lipid content: 1,1-1,8 %).

lipid content: 1,0-2,6 %). This indicates that the endogenous enzyme activity, under the pH-conditions of the enzymatic hydrolysis, was low. The molecular weight distribution of the peptides in HPH from hydrolysis with commercial enzymes was more diverse compared to peptides in HPH from autolytic hydrolysis. Generally, the peptides also had a larger molecular weight. Addition of 0,1 % Corolase PP resulted in HPH with a lower protein content (77,7-85 %), and a higher lipid content (< 3,71 %), compared to addition of 0,1 % Protamex and 0,1 % Papain + Bromelain. Upscaling of the enzymatic hydrolysis, with addition of 0,1 % Papain + Bromelain, resulted in a high dry matter yield in HPH (8,0–8,5 g/ 100 g raw material (wet weight)) compared to lab scale (5,5 g/ 100 g raw material (wet weight)). This indicates that this type of processing can be used on larger amounts of rest raw material for industrial purposes as well. Enzymatic hydrolysis can therefore enable utilization of both the lipid and the protein content of the rest raw material. Silaging of rest raw material from laying hens including offal resulted in a better oil separation (53,1-65,7 % of the total lipid content in the rest raw material) compared to silaging of rest raw material not containing offal (14,0-42,5 % of the total lipid content in the rest raw material). This indicates that the endogenous enzyme activity, under the pH-conditions of the silaging, was high. The oil separated from the rest raw material by silaging was of bad quality based on TOTOX (13,2-72,3). The peroxide values showed that sulfite has an antioxidative function during silaging. The silage had a digestibility of 63,2-79,7%. These results indicate that silaging, of rest raw material including offal, can be used to utilize the protein content of the rest raw material.

In conclusion, processing methods originally developed for the utilization of rest raw material from fish, can be used for the utilization of rest raw material from egg-laying hens as well. Products from rendering and silaging can be used as ingredients in animal feed, while products from enzymatic hydrolysis can be used as ingredients in food.

## Akronymer

<b>AV</b>	<b>Anisidine Value</b> (anisidinverdi)
<b>BI</b>	Restråstoff uten tilsatt kommersielle enzym ( <b>blank</b> , endogene enzym)
<b>DH</b>	<b>Degree of Hydrolysis</b> (hydrolysegrad)
<b>E</b>	<b>Ensilering</b> (40 °C, 24 timer)
<b>Ed</b>	Restråstoff tilsatt <b>eddiksyre</b>
<b>Ed.S</b>	Restråstoff tilsatt <b>eddiksyre</b> + natriumbisulfitt (0,1 %)
<b>FFA</b>	<b>Free fatty acids</b> (frie fettsyrer)
<b>GC</b>	<b>Gas Chromatography</b> (gasskromatografi)
<b>H</b>	Enzymatisk <b>hydrolyse</b> (50 °C, 60 minutter)
<b>HPH</b>	<b>Hø</b> nseprotein <b>hydrolysat</b>
<b>HPH1</b>	<b>Hø</b> nseprotein <b>hydrolysat</b> fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff <b>H1</b>
<b>HPH2</b>	<b>Hø</b> nseprotein <b>hydrolysat</b> fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff <b>H2</b>
<b>HPLC</b>	<b>High Performance Liquid Chromatography</b>
<b>Ma</b>	Restråstoff tilsatt <b>maursyre</b>
<b>Ma.S</b>	Restråstoff tilsatt <b>maursyre</b> + natriumbisulfitt (0,1 %)
<b>O</b>	Uten hydrolyse (nullprøve)
<b>P+B</b>	Restråstoff tilsatt <b>Papain</b> + <b>Bromelain</b> (0,05 % + 0,05 %)
<b>PP</b>	Restråstoff tilsatt Corolase <b>PP</b> (0,1 %)
<b>Pr</b>	Restråstoff tilsatt <b>Protamex</b> (0,1 %)
<b>PV</b>	<b>Peroxide Value</b> (peroksidverdi)
<b>Restråstoff H1</b>	Hel høne uten innmat, hode og fjær (finkvernet)
<b>Restråstoff H2</b>	Hel høne uten innmat, hode og fjær (grovkvernet)
<b>Restråstoff M</b>	Hel høne <b>med</b> innmat, hode og fjær
<b>Restråstoff U</b>	Hel høne <b>uten</b> innmat, hode og fjær
<b>RS</b>	<b>Råstoff</b>
<b>SD</b>	Kyllingkjøttkaker tilsatt 4 % vann ( <b>standard</b> )
<b>SP</b>	Kyllingkjøttkaker tilsatt 4 % vann + 1 % <b>ScanPro</b>
<b>T</b>	Varmebehandling / <b>Termisk</b> behandling (100 °C, 15 minutter)
<b>TOTOX</b>	<b>Total Oxidation Value</b> (total oksidasjonsverdi)
<b>TS</b>	<b>Tørrstoff</b>
<b>VV</b>	<b>Våtvekt</b>



# Innhold

Forord

Sammendrag

Abstract

Akronymer

1	Innledning .....	2
1.1	Utnyttelse av animalsk restråstoff .....	2
1.2	Restråstoff fra verpehøns .....	3
1.3	Mål med oppgaven .....	4
1.4	Lipider .....	5
1.4.1	Fettsyrer og triacylglyserider .....	5
1.4.2	Oksidasjon .....	7
1.4.3	Prooksidanter og antioksidanter .....	10
1.5	Proteiner .....	11
1.5.1	Essensielle aminosyrer .....	11
1.5.2	Funksjon og funksjonelle egenskaper .....	12
1.5.3	Enzymer .....	15
1.5.3.1	Proteaser .....	18
1.5.3.2	Lipaser .....	20
1.6	Varmebehandling .....	21
1.7	Enzymatisk hydrolyse .....	23
1.7.1	Hydrolysatets egenskaper og bruksområder .....	23
1.7.2	Hydrolyseprosessen .....	24
1.7.3	Endogene proteaser .....	26
1.7.4	Eksogene proteaser .....	27
1.7.4.1	Protamex® .....	27
1.7.4.2	Corolase PP .....	28
1.7.4.3	Papain .....	28
1.7.4.4	Bromelain .....	28

1.8	Ensilering.....	29
1.8.1	Sulfitt.....	29
2	Materialer og metoder.....	32
2.1	Råstoff .....	32
2.2	Instrumenter.....	33
2.3	Screeningforsøk .....	34
2.3.1	Varmebehandling .....	35
2.3.2	Enzymatisk hydrolyse .....	35
2.3.3	Ensilering .....	37
2.4	Oppskalert enzymatisk hydrolyse.....	39
2.5	Produktutviklingsforsøk: kyllingkjøttkaker.....	40
2.6	Analysemetoder .....	41
2.6.1	Tørrvekt og aske.....	43
2.6.2	Totalt nitrogen til beregning av grovt proteininnhold.....	43
2.6.3	Totalt lipidinnhold.....	43
2.6.4	Frie fettsyrer (FFA) .....	45
2.6.5	Peroksidverdi (PV).....	45
2.6.6	Anisidiverdi (AV) .....	46
2.6.7	Total oksidasjonsverdi (TOTOX) .....	47
2.6.8	Fettsyresammensetning .....	47
2.6.9	Formoltitrering .....	49
2.6.10	Innhold og sammensetning av frie aminosyrer .....	51
2.6.11	Molvektsfordeling .....	51
2.6.12	Fordøyelighet .....	52
2.6.13	Statistiske analyser og beregninger .....	53
3	Resultat og diskusjon .....	55
3.1	Restråstoffets sammensetning .....	56
3.2	Massebalanse .....	58
3.2.1	Varmebehandling .....	58
3.2.2	Enzymatisk hydrolyse .....	61
3.2.3	Ensilering .....	65

3.2.4	Oppsummering .....	68
3.3	Oljefraksjon: kvalitet og sammensetning .....	69
3.3.1	Frie fettsyrer .....	69
3.3.2	Oksidativ status: AV, PV og TOTOX.....	71
3.3.3	Fettsyresammensetning .....	75
3.3.4	Oppsummering .....	79
3.4	Vannløselige fraksjon: kvalitet og sammensetning .....	80
3.4.1	Farge.....	80
3.4.2	Lipidinnhold .....	82
3.4.3	Proteininnhold .....	84
3.4.4	Hydrolysegrad .....	88
3.4.5	Innhold og sammensetning av frie aminosyrer .....	91
3.4.6	Peptidenes molvektsfordeling .....	93
3.4.7	Oppsummering .....	100
3.5	Uløselige fraksjon: kvalitet og sammensetning.....	101
3.5.1	Fordøyelighet .....	101
3.6	Oppskalert enzymatisk hydrolyse.....	105
3.7	Produktutviklingsforsøk: kyllingkjøttkaker.....	108
4	Konklusjon.....	111
5	Fremtidig arbeid.....	113
	Referanser.....	114
	Vedlegg A: Restråstoffets sammensetning .....	I
	Vedlegg B: Massebalanse .....	II
	Vedlegg C: Frie fettsyrer.....	VIII
	Vedlegg D: Fettsyresammensetning.....	XI
	Vedlegg E: Proteininnhold, lipidinnhold og DH.....	XXI
	Vedlegg F: Innhold og sammensetning av frie aminosyrer .....	XXIII
	Vedlegg G: Peptidenes molvektsfordeling.....	XXV
	Vedlegg H: Fordøyelighet.....	XXVII
	Vedlegg I: Oppskalert hydrolyse.....	XXIX



# 1 Innledning

## 1.1 Utnyttelse av animalsk restråstoff

Animaliebiproduktforskriften definerer animalske biprodukter som hele kropp eller deler av dyr som ikke skal brukes til humant konsum [Animaliebiproduktforskriften (2016)]. Biprodukter er ikke salgbare, og blir derfor kastet, brent eller destruert på annen måte. Like fullt utgjør animalske biprodukter en viktig biologisk ressurs som kilde til proteiner, lipider, vitaminer og mineraler. Ved riktig behandling kan disse næringsstoffene være egnet for humant konsum, så vel som produksjon av bioaktive forbindelser og dyrefôr [Rustad (2003), Lasekan et al. (2013)]. I denne oppgaven vil betegnelsen restråstoff bli brukt om biprodukter, da ordet biprodukt kan vekke negative assosiasjoner.

Ved å utnytte animalsk restråstoff som biologisk ressurs, er det mulig å øke inntjeningen på restråstoffet. Utnyttelsen vil i tillegg medføre en reduksjon av avfallets opprinnelige volum, noe som vil være gunstig for miljøet [Steffens (1994), Lasekan et al. (2013)]. Gjødning og dyrefôr har blitt produsert fra restråstoff i lengre tid, men inntjeningen på denne typen produkter lav. For å øke inntjeningen må restråstoffet utnyttes til produksjon av produkter med høyere markedsverdi, som for eksempel bioaktive forbindelser og produkter til humant konsum [Rustad (2003)]. Å utnytte restråstoff på en gunstig og effektiv måte vil derfor være fordelaktig, både med tanke på forurensning og økonomi [Jayathilakan et al. (2012)]

Helsedirektoratets anbefalinger for et sunt kosthold er en diett bestående av 10-20 % protein [Helsedirektoratet (2015)]. Den globale folkeveksten medfører derfor et økende behov for proteiner med høy ernæringsmessig verdi [Speedy (2004), - ikke sett, sitert etter Šližytė et al. (2014)]. I tillegg er det behov for nye proteinkilder til fôrproduksjon i Norge [Animalia (2015)]. Til tross for at animalsk restråstoff destrueres, er biomassen en utmerket kilde til protein [Rivera et al. (2000), - ikke sett, sitert etter Lasekan et al. (2013)]. Proteiner fra animalske kilder har dessuten vist seg å være bedre egnet til humant konsum og dyrefôr, sammenlignet med protein fra plantekilder. Dette skyldes at proteiner fra animalske kilder har en bedre ernæringsmessige verdi [Kristinsson et al. (2000)]. Foruten proteiner, er animalsk restråstoff en god kilde til verdifulle lipider. Disse kan ha flere bruksområder i næringsmiddelindustrien, blant annet som kilde til omega-3 fettsyrer med fordelaktige helseeffekter [Rustad (2003), Carvajal et al. (2015)]. I tillegg kan lipidene brukes i produksjon av matoljer, kosmetikk, farmasøytiske produkter, dyrefôr og såper [Lasekan et al. (2013), Mishra et al. (2015)].

## 1.2 Restråstoff fra verpehøns

Verpehøner (*Gallus gallus domesticus*) har en sentral plassering i tradisjonelt norsk landbruk. I følge helsedirektoratets rapport om utviklingen i norsk kosthold, har forbruket av egg økt siden 2006, og gjennomsnittlig årlig konsum ligger nå på 12,5 kg egg per innbygger [Helsedirektoratet (2015)]. Hold av 4 210 770 verpehøns var nødvendig for å imøtekomme etterspørselen av egg i 2014 [Animalia (2015)]. Verpehøner starter aktiv eggproduksjon når de er 16 uker gamle. Ved en alder på ca. 70 uker avtar eggproduksjonen, og verpehønene slaktes. I Norge blir utrangerte verpehøns behandlet som risikoavfall, noe som resulter i at 3 millioner verpehøns destrueres hvert år. Utrangerte verpehøns kan derfor anses som et biprodukt av eggeproduksjonsindustrien, og omtales i denne oppgaven som restråstoff. Destrueringen av 3 millioner verpehøns tilsvarer 1,5 millioner kilo rent hønsekjøtt. Hønsekjøttet kan ikke unyttes på lik linje med kjøtt fra slaktekylling, grunnet ulikheter i dyrenes fysiologi og kjemiske sammensetning. I utgangspunktet utgjør verpehønene en biomasse rik på proteiner og fett. Restråstoff fra verpehøns har derfor et stort potensial som råstoffkilde til produksjon av ingredienser til humant konsum og dyrefôr. I tillegg til at det er etisk problematisk knyttet til en slik behandling av en potensiell matressurs, utgjør destrueringen en stor kostnad for eggprodusentene.



**Figur 1-1:** Verpehøns (*Gallus gallus domesticus*) av typen hvit italiener [Animalia.no (2016)].

### 1.3 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven har vært å studere muligheten for utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Til dette formålet har tre ulike prosesseringsmetoder blitt benyttet: varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. Prosesseringsmetodene er opprinnelig utviklet for utnyttelse av restråstoff fra fisk, og har i den sammenheng vist å produsere høyverdige ingredienser fra restråstoffet. I denne oppgaven har det derfor vært av interesse å se om disse prosesseringsmetodene også kan brukes til utnyttelse restråstoff fra verpehøns. Ulike prosesseringsparametere har blitt utprøvd, på to ulike restråstoff, for å kartlegge hvilken kombinasjon som ga best resultat.

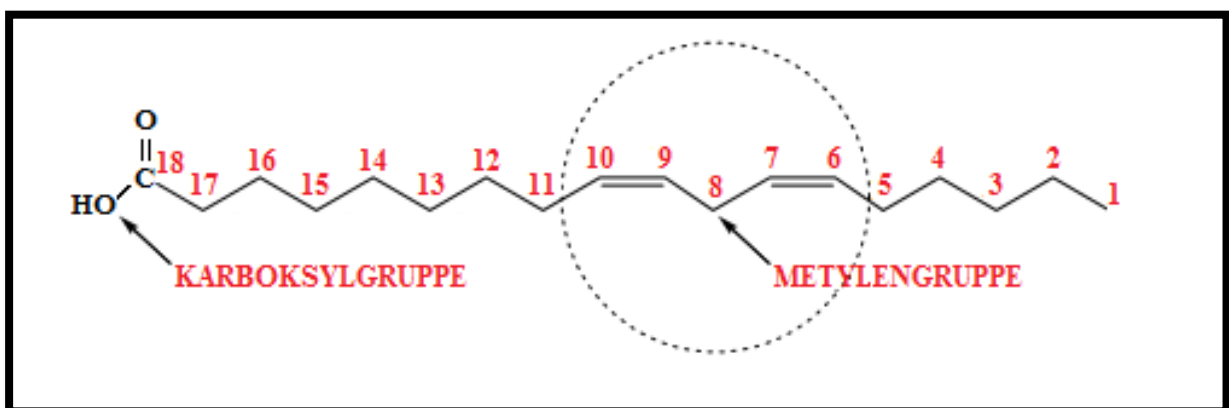
Ved å tilpasse de aktuelle prosesseringsmetodene til restråstoff fra verpehøns, er det mulig å oppnå en økt utnyttelse av biomassen. Hovedmålet med prosesseringen av restråstoffet har vært å utvinne lipider og proteiner med høy kvalitet. Disse makronæringsstoffer kan benyttes direkte i mat, eller bearbeides videre til ingredienser for humant konsum og dyrefôr. Evaluering av prosesseringsmetoder og prosesseringsparametere, med hensyn på utbytte og produktets kvalitet, har derfor vært en viktig del av denne oppgaven.

## 1.4 Lipider

Lipider er en fellesbetegnelse på en gruppe kjemiske forbindelser som er løselige i organiske løsemidler. I biologiske system fungerer lipider som et energireservoar. I tillegg er de essensielle komponenter i celleveggen, samt har funksjon i signalisering og som vitaminer. I matvarer bidrar lipider til tekstur, smak og kaloritetthet. Ulike betegnelser brukes om lipider basert på deres fysiske tilstand i omgivelsenes temperatur. Lipider i fast form omtales som fett, mens betegnelsen olje brukes om lipider i flytende form [Damodaran et al. (2008)].

### 1.4.1 Fettsyrer og triacylglyserider

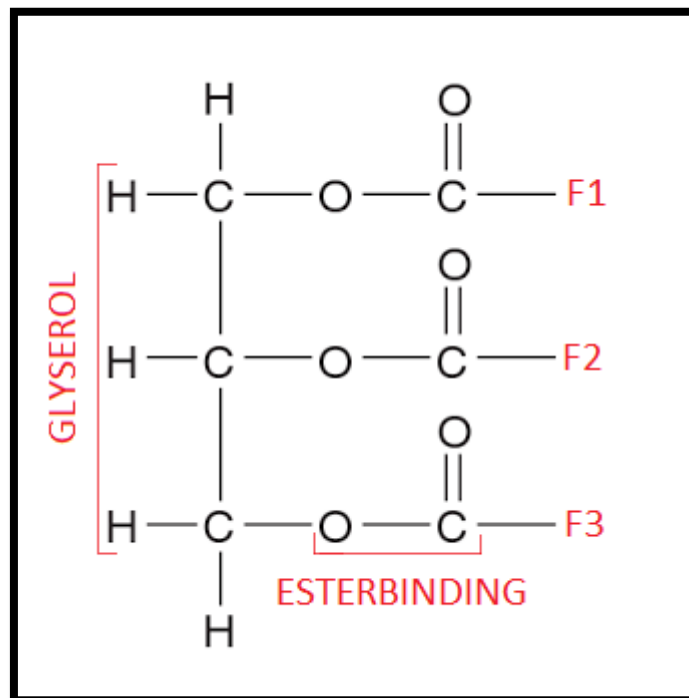
Fettsyrer er den viktigste bestanddelen i lipider. Fettsyrer består av en karboksylgruppe og en hydrokarbonkjede, hvilket medfører at de også kan betegnes som karboksylsyrer. Naturlig forekommende fettsyrer har hydrokarbonkjeder av ulik lengde, men som regel bestående av et likt antall karbonatomer (12-22) grunnet mekanismen bak deres syntese. De kan klassifiseres som mettede, umettede og flerumettede basert på antall dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. Mattede fettsyrer har maksimalt antall hydrogenatomer bundet til karbonene i hydrokarbonkjeden, enumettede fettsyrer har én dobbeltbinding mellom to karbonatomer, mens flerumettede fettsyrer har to eller flere dobbeltbindinger. I sistnevnte er dobbeltbindingene vanligvis avbrutt av en metylengruppe [Gunstone (1996)]. Linolsyre, en fettsyre bestående av 18 karbonatomer og to dobbeltbindinger, er avbildet i figur 1-2. Karbonatomene i hydrokarbonkjeden er nummerert etter omega( $\omega$ )systemet, et av to systemer brukt i systematisk navngivning av fettsyrer. Linolsyre klassifiseres som en essensiell fettsyre, hvilket betyr at den ikke kan syntetiseres av mennesker. Essensielle fettsyrer må derfor tilføres via kostholdet for normal kroppsfunksjon.



**Figur 1-2:** Illustrasjon av linolsyre ( $C_{18}:2\omega^{6,9}$ ). Karboksylgruppe, samt to dobbeltbindinger avbrutt av en metylengruppe, er markert. Karbonatomene er nummerert etter omega( $\omega$ )systemet [Fritt redigert etter Damodaran et al. (2008)].



Fettsyrer i fri form er cytotoksiske for celler. 99 % av fettsyrene i plante- og dyreceller er derfor bundet til alkoholforbindingen glyserol ved esterbinding. Esterifisering av fettsyrer til glyserol resulterer i dannelsen av mono-, di- og triacylglyserol. Triacylglyserol, med tre fettsyrer bundet til glyserol, er den vanligste lagringsformen av lipid i levende organismer [Damodaran et al. (2008)]. Figur 1-3 viser en illustrasjon av et triacylglyserolmolekyl, hvor F1, F2, og F3 symboliserer tre vilkårlige fettsyrer. Det er uvanlig at F1, F2 og F3 er samme fettsyre. I de fleste tilfeller vil derfor to eller tre ulike fettsyrer være bundet i triacylglyserolmolekylet. Frigjøring av fettsyrer fra triacylglyserol skjer ved hydrolyse av esterbindingene. Hydrolysen kan være et resultat av den enzymatiske aktiviteten til lipaser, men også høy eller lav pH. Lipaseaktivitet resulterer i en mer spesifikk hydrolyse enn syre og base, og involverer i hovedsak frigjøring av F1 og F2 ( $\alpha$ -posisjon) i figur 1-3 [Gunstone (1996)].



**Figur 1-3:** Triacylglyserolmolekyl bestående av tre vilkårlige fettsyrer (F1, F2, F3) bundet til alkoholen glyserol ved esterbinding [Fritt redigert etter Coultate (2009)].

Lipidinnholdet i restråstoff fra verpehøns vil hovedsakelig bestå av triacylglyserider. Triacylglyseridene befinner seg i spesialiserte celler, kalt adipocytter, hvor de lagres som fettdråper. Lipidlageret fungerer som et energireservoar for verpehønene. Lipidenes høye innhold av energi (39 kJ/g), sammenlignet med proteiner (23 kJ/g) og karbohydrater (18 kJ/g), gjør dem svært godt egnet til dette formålet. Energireservoaret kan mobiliseres etter

behov, ved hydrolyse av triacylglyseridene. De frigjorte fettsyrene kan deretter transporteres til ulike vev i organismen [Sturkie (2015)].

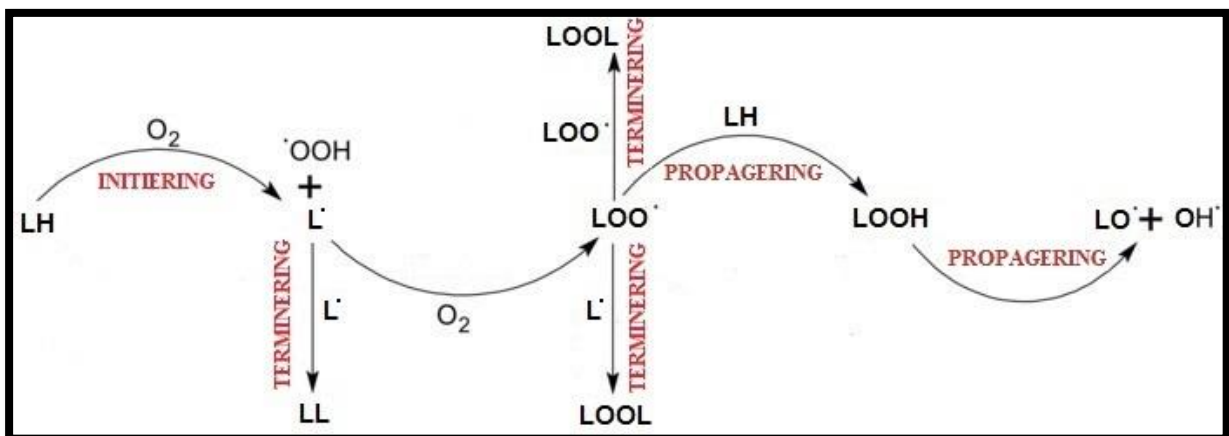
Et av målene med prosesseringen av restråstoff fra verpehøns er å separere lipid fra resten av komponentene i restråstoffet. Dette vil kreve nedbrytning av cellulære strukturer, slik at triacylglyseridene kan frigjøres. Det totale lipidinnholdet i restråstoffet vil avhenge av hvilke deler av hønsekroppen det består av. Fugler lagrer mye av fettets sitt (28%) i større og mindre fettdepot, hvorav fettvevet i mageregionen utgjør det største. Skjelett og skinn inneholder henholdsvis 15 % og 19 % av det totale fettets. I og med at den tverrstripede muskulaturen til fuglearter karakteriseres av et lavt fettinnhold (1,5 %), vil resterende fettinnhold befinne seg i fuglens innmat [Nir et al. (1988), - ikke sett, sitert etter Sturkie (2015)]. Foruten adipocytter, vil fuglearter kunne lagre triacylglyserider i hepatocytter (leverceller) og eggceller. Leveren er det organet som står for fettsyntesen. Oppdrettsfugler er ofte avhengige av leverens fettsyntese, for fett til lagring og bruk i kroppen, som et resultat av at de gis fôr med et lavt fettinnhold. Verpehøns bør i tillegg ha en høy eggproduksjonsrate, noe som også vil fremme fettsyntesen i leveren [Hermier (1997)]. Disse faktorene kan bidra til å øke fettlagrene i hepatocytter hos verpehøns, sammenlignet med andre fuglearter.

#### 1.4.2 Oksidasjon

Lipidoksidasjon er en viktig faktor når det gjelder forringelse av matvarer. Oksidering vil ikke bare gi matvaren de uønskede sensoriske egenskapene assosiert med harskhet, men kan i tillegg bidra til misfarging, ødeleggelse av vitaminer og tap av næringsinnhold [Sherwin (1978)]. Det er hovedsakelig autooksidasjon av enumettede og flerumettede fettsyrer som er årsaken til nedbrytning av lipider i matvarer. Fettsyren som oksideres kan tilhøre en fettsyreester, et fosfolipid, eller være en del av et acylglyserolmolekyl [Aursand et al. (2011)]. I flerumettede fettsyrer vil en metylengruppe plassert ved en dobbeltbinding ( $\alpha$ -metylengruppe), som vist i figur 1-2, ha et labilt hydrogenatom. Dette hydrogenatomet avgis lettere enn de øvrige hydrogenatomene i karbonkjeden [Gray (1978)]. Hydrogenatom på  $\alpha$ -metylengrupper plassert mellom to dobbeltbindinger er mest utsatt, og økende grad av umettethet gjør derfor en fettsyre mer disponert for oksidasjon [Sherwin (1978), Coultate (2009)]. Singlett oksygen ( $^1\text{O}_2$ ), en svært reaktiv og energirik form av oksygen, er i stand til å initiere autooksidasjon ved å abstrahere det labile hydrogenatomet [Coultate (2009)]. I tillegg til kjemiske oksidanter, kan varme og innskuddsmetaller initiere autooksidasjon [Aursand et al. (2011)].

Ved tilstedeværelse av triplett oksygen (atmosfærisk oksygen,  $^3\text{O}_2$ ) forløper nedbrytningen av lipider i følgende tre trinn:

- 1. Initierting:** en umettet fettsyre (LH) avgir et labilt hydrogenatom og danner et fettsyreradikal ( $\text{L}^\cdot$ ) [Sherwin (1978)].
- 2. Propagering:**  $\text{L}^\cdot$  reagerer med atmosfærisk oksygen ( $\text{O}_2$ ) og danner et lipidperoksidradikal ( $\text{LOO}^\cdot$ ).  $\text{LOO}^\cdot$  reagerer med ny LH og danner det primære oksidasjonsproduktet lipidhydroperoksid ( $\text{LOOH}$ ).  $\text{LOOH}$  er et mellomprodukt i dannelsen av karbonylforbindelser ( $\text{LO}^\cdot$ ) og hydroksylforbindelser ( $^\cdot\text{OH}$ ) [Gray (1978)].
- 3. Terminering:** To frie radikaler reagerer og danner polymeriserte sluttprodukter av to fettsyrer ( $\text{LL}$  og  $\text{LOOL}$ ) [Gray (1978)].

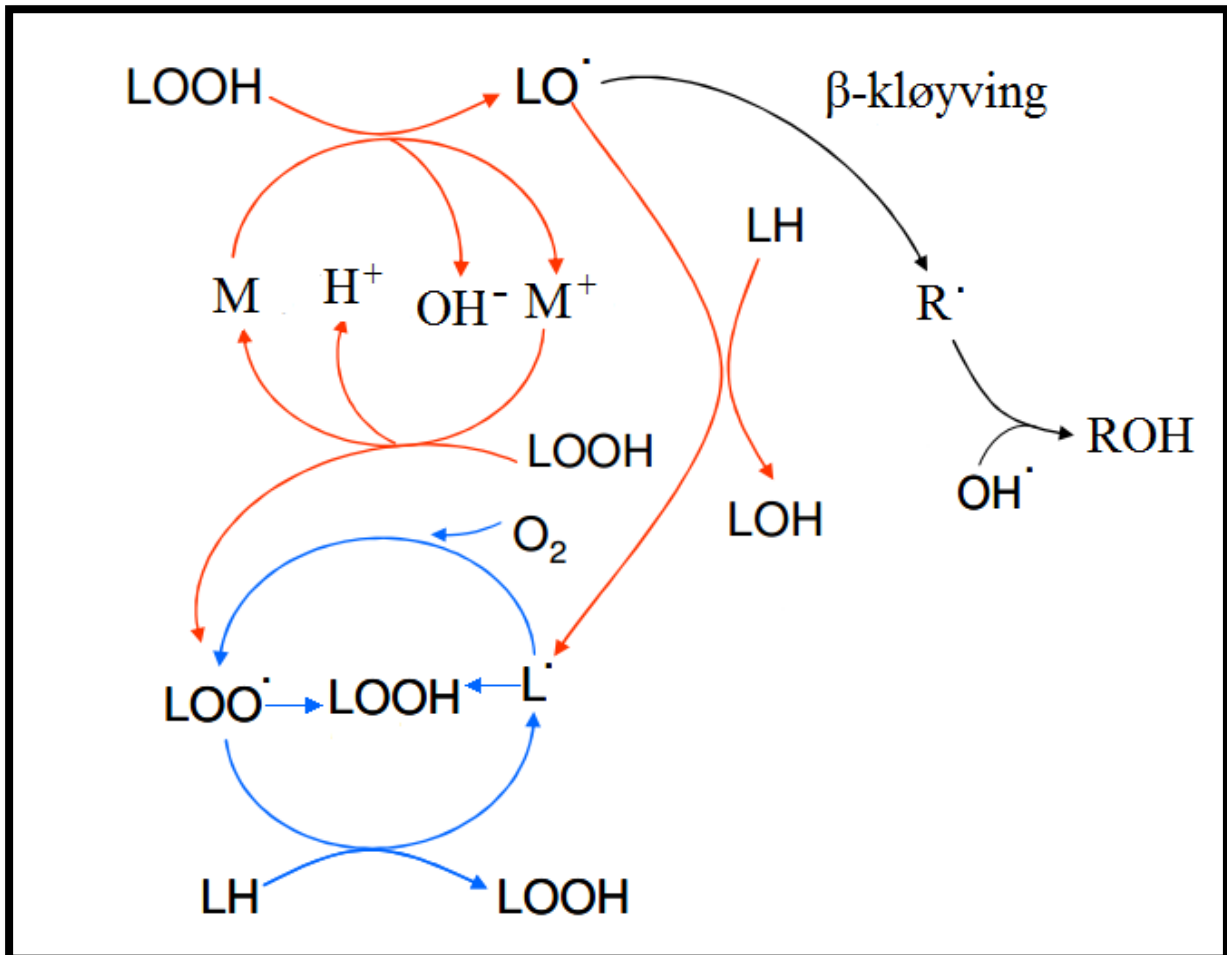


**Figur 1-4:** Illustrasjon av de tre stegene i lipidoksidasjon: initierting, propagering og terminering. Primære oksidasjonsprodukt består av lipidhydroperoksider ( $\text{LOOH}$ ). En videre propagering av oksidasjonsreaksjonen resulterer i dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukt [Fritt redigert etter Kumar et al. (2015)].

De tre stegene av lipidoksidasjon, illustrert i figur 1-4, involverer dannelsen av en rekke frie radikaler. Dette er kjemiske forbindelser som har et uparet elektron, og derfor er svært reaktive og kortlevde [Coulter (2009)]. Frie radikaler er i seg selv sterke initiatorer av lipidoksidasjon, noe som gjør reaksjonen selvforsterkende [Sherwin (1978)]. Lipidoksidasjonens reaksjonsmekanisme kan derfor beskrives som en kjedereaksjon av frie radikaler [Gray (1978), Sherwin (1978)].

Dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukt skjer etter lipidhydroperoksider har akkumulert seg i det oksiderende lipidet (induksjonsperiode) [Coulter (2009)]. Ved høye temperaturer, og tilstedeværelse av innskuddsmetaller som jern og kobber, kan lipidhydroperoksider brytes ned til alkoksyreradikaler ( $\text{LO}^\cdot$ ). Alkoksyreradikaler kan deretter få karbonkjeden kløyvet i en

reaksjon kalt  $\beta$ -kløyving [Aursand et al. (2011)].  $\beta$ -kløyvingen resulterer i dannelsen av et aldehyd og et alkylradikal ( $R\cdot$ ). Alkylradikalet på hydrokarbonkjeden kan reagere med hydrogenradikal og danne hydrokarbon, med hydroksylradikal ( $OH\cdot$ ) og gi alkohol (ROH) eller med oksygen og gi hydroperoksid [Damodaran et al. (2008)]. Dette er illustrert i figur 1-5.



**Figur 1-5:** Nedbrytning av primære oksidasjonsprodukter til sekundære oksidasjonsprodukter katalysert av innskuddsmetall ( $M$ ). Lipidhydroperoksider ( $LOOH$ ) brytes ned til alkoksyradikaler ( $LO\cdot$ ) eller peroksidradikaler ( $LOO\cdot$ ). Alkoksyradikaler kan brytes ned til aldehyd og alkylradikal ( $R\cdot$ ) ved  $\beta$ -kløyving. Alkylradikalet kan reagere med flere forbindelser, deriblant et hydroksylradikal ( $OH\cdot$ ) og danne en alkohol (ROH) [Fritt redigert etter Aursand et al. (2011)].

Et lipid består av mange ulike fettsyrer, og  $\beta$ -kløyving kan skje ved ulike posisjoner på en fettsyre. Det kan derfor dannes mange ulike sekundære oksidasjonsprodukt, både av flyktig og ikke-flyktig natur [Damodaran et al. (2008)]. Dette inkluderer aldehyder, ketoner, etere, laktoner, alkoholer og syrer [Guillén et al. (2002)]. Den karakteristiske lukten av harskt fett skyldes hovedsakelig de flyktige sekundære oksidasjonsproduktene [Coulter (2009)].

### 1.4.3 Prooksidanter og antioksidanter

Som tidligere nevnt øker hastigheten på lipidoksidasjon med økende grad av umettethet på en fettsyre, samt tilstedeværelse av oksygen. Frie fettsyrer er i tillegg mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer i triacylglyserider. Andre faktorer som fremmer oksidasjon er høy temperatur, økt overflateareal, økt vannaktivitet og tilstedeværelse av prooksidanter [Damodaran et al. (2008)].

Prooksidanter er forbindelser som forårsaker eller akselererer lipidoksidasjon. Virkningsmekanismen involverer ofte direkte interaksjon med en fettsyre, men prooksidanter kan også virke ved å fremme dannelsen av frie radikaler. Eksempler på prooksidanter er singlettoksygen, lipoksygenaser, innskuddsmetaller og UV-lys [Damodaran et al. (2008), Aursand et al. (2011)]. Jern og kobber er naturlig forekommende innskuddsmetaller, og vil derfor befinne seg i restråstoff fra verpehøns. Under prosessering av restråstoffet ved høye temperaturer, kan innskuddsmetallene bidra til å øke oksidasjonshastigheten og dermed forringe oljens kvalitet [Carvajal et al. (2015)].

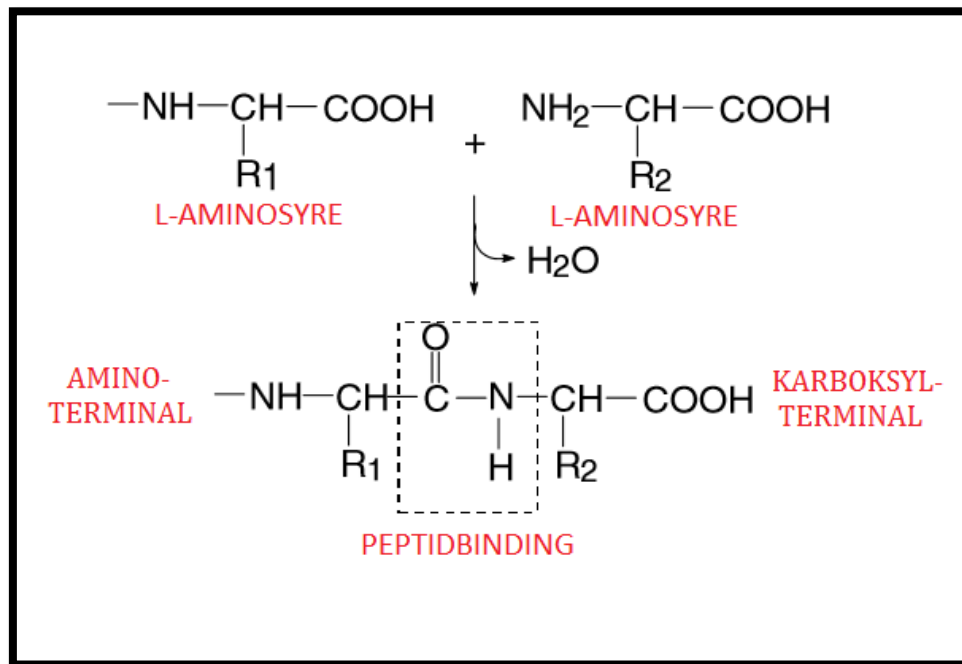
Antioksidanter er forbindelser som reduserer hastigheten på lipidoksidasjon. Disse kan tilsettes en matvare eller opprinnelig være tilstede i råmaterialet. Som tilsetning brukes både naturlige og syntetiske antioksidanter. Det er også vanlig å bruke flere ulike antioksidanter i matvarer, da de i kombinasjon kan utvise en synergistisk effekt [Coulter (2009)]. Antioksidanters virkningsmekanisme kan deles inn i følgende tre kategorier:

1. Kontroll av frie radikaler
2. Kontroll av prooksidanter som innskuddsmetall og singlettoksygen
3. Kontroll av mellomprodukter i autooksidasjon som peroksider [Damodaran et al. (2008)].

I denne oppgaven ble natriumbisulfitt brukt som antioksidant ved ensilering av restråstoff fra verpehøns. Sulfitt virker antioksiderende ved å reagere med oksygen, som ellers kunne bidratt til å øke hastigheten på lipidoksidasjon [Rose et al. (1989)].

## 1.5 Proteiner

Proteiner er polymerer av naturlig forekommende aminosyrer i L-konfigurasjon. Aminosyrene er bundet sammen av kovalente peptidbindinger til en uforgrenet kjede kalt en peptidkjede [Damodaran et al. (2008), Alberts (2015)]. Figur 1-6 illustrerer hvordan et dipeptid blir dannet ved en kondensasjonsreaksjon mellom to vilkårlige aminosyrer. Dipeptidet vil ha en aminoterminal og en karboksylterminal.



**Figur 1-6:** Kondensasjonsreaksjon mellom to aminosyrer i L-konfigurasjon. Reaksjonen resulterer i dannelsen av en peptidbinding.  $R_1$  og  $R_2$  representerer sidegrupper spesifikke for en gitt aminosyrer. Det resulterende dipeptidet vil ha en amino- og en karboksylterminal [Fritt redigert etter Damodaran et al. (2008)].

Proteiners struktur kan beskrives i fire nivå: primær-, sekundær-, tertiær- og kvartærstruktur. Egenskapene og funksjonen til et gitt protein er fullstendig avhengig av dets eksakte aminosyresekvens, og det er denne som utgjør proteinets primærstruktur. Proteinets sekundærstruktur er et resultat av interaksjoner mellom aminosyreenhetene og består av lokale ordnede områder i form av  $\alpha$ -helikser og  $\beta$ -sheets. I tillegg til disse lokale ordnede områdene har proteinet en overordnet struktur. Denne tertiære strukturen ledsages for noen proteiner av en kvartærstruktur, som består av flere assosierte peptidkjeder [Coulate (2009)].

### 1.5.1 Essensielle aminosyrer

De 20 naturlig forekommende aminosyrene kan kategoriseres basert på menneskers evne til å syntetisere dem. Noen aminosyrer kan ikke syntetiseres i kroppen, og må derfor tilføres via kostholdet for å opprettholde en normal proteinsyntese. Disse betegnes som essensielle. Noen

ikke-essensielle aminosyrer er avhengig av en essensiell aminosyre for sin syntese, og betegnes derfor som delvis essensielle aminosyrer [Damodaran et al. (2008)]. En oversikt over essensielle, delvis essensielle og ikke-essensielle aminosyrer er presentert i tabell 1.

**Tabell 1:** *Oversikt over essensielle, delvis essensielle og ikke-essensielle aminosyrer. Aminosyrer markert med \* har lav syntetiseringsrate i kroppen [Fritt redigert etter Coultate (2009)].*

Essensielle aminosyrer	Delvis essensielle aminosyrer	Ikke-essensielle aminosyrer
Fenylalanin	Cystein	Alanin
Isoleucin	Tyrosin	Arginin*
Leucin		Asparagin
Lysin		Aspartat
Metionin		Glutamat
Treonin		Glutamin
Tryptofan		Glysin
Valin		Histidin*
		Prolin
		Serin

I tabell 1 er de ikke-essensielle aminosyrene histidin og arginin markert med \*. Mennesker kan i teorien syntetisere disse to aminosyrene, men hastigheten på syntesen er såpass lav at det ikke produseres tilstrekkelige mengder hos for eksempel barn i vekstaler. Histidin og arginin kategoriseres derfor ofte som essensielle når det gjelder ernæring [Coultate (2009)].

### 1.5.2 Funksjon og funksjonelle egenskaper

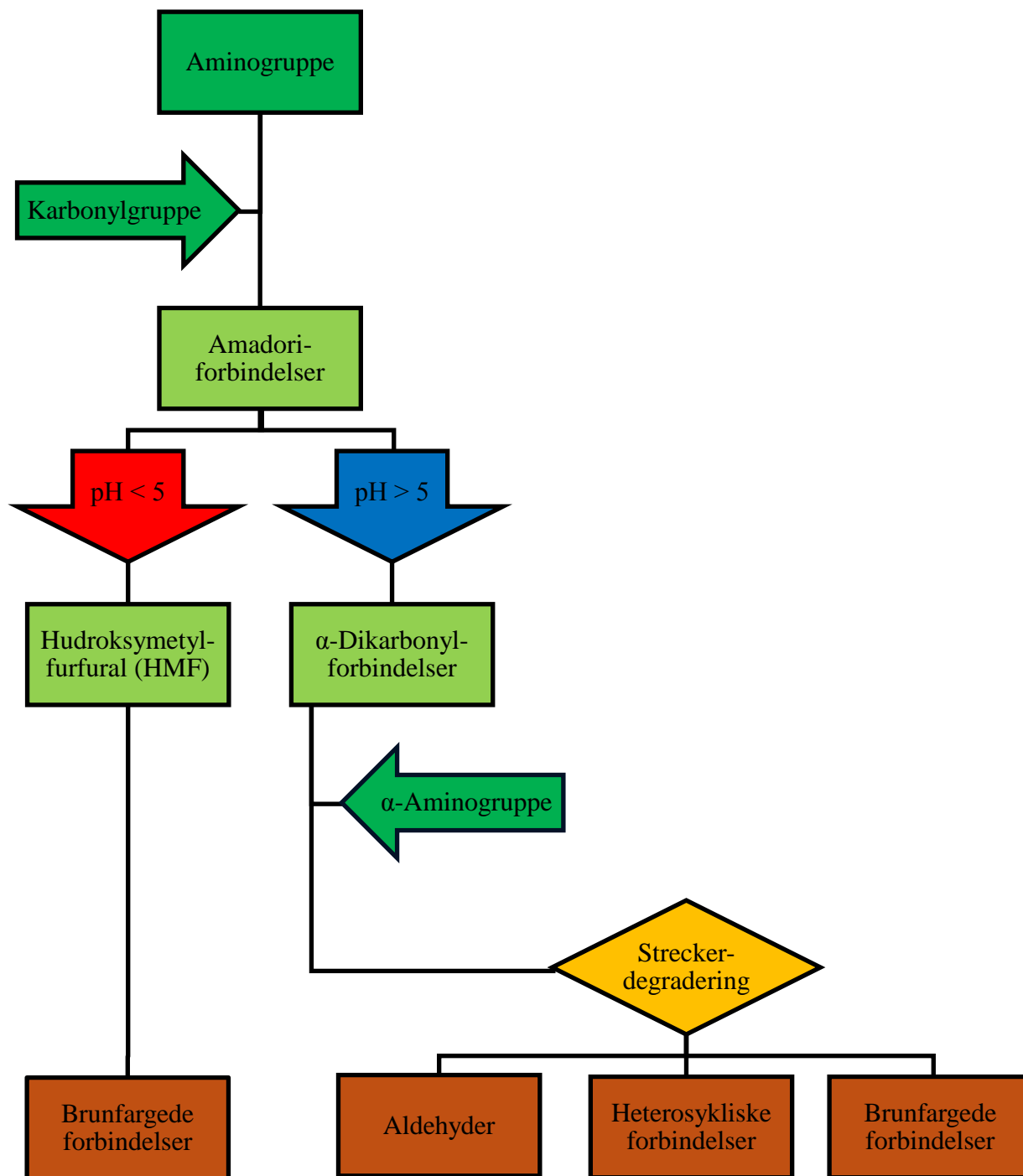
I biologiske systemer har proteiner et bredt spekter av funksjoner. Dette inkluderer deres funksjon som enzymer, strukturelle proteiner, kontraktile proteiner, hormoner, overføringsproteiner, antistoffer i immunsystemet, lagringsproteiner, toksiner og allergener [Damodaran et al. (2008)]. Strukturelle og kontraktile proteiner vil utgjøre store deler av det totale proteinet i restråstoff fra verpehøns. Dette inkluderer de kontraktile proteinene aktin og myosin i tverrstripet muskulatur, samt de strukturelle proteinene kollagen (bein) og  $\beta$ -keratin (fjær) [Sturkie (2015)].

Proteiners fundamentale rolle i biologiske system gjør dem til livsnødvendige makromolekyl i ernæring. Den ernæringsmessige verdien til en proteinkilde er derfor avhengig av fordøyelighet (biotilgjengelighet), samt innholdet av essensielle aminosyrer [Shiau (1994), -

ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. I tillegg til å være en kilde til aminosyrer, har proteiner mange funksjonelle egenskaper i matvarer. Dette inkluderer løselighet, viskositet, vannbinding, geldannelse, adhesjon, elastisitet, emulgering, skumdannelse og fett- og smaksbinding. De funksjonelle egenskapene er igjen et resultat av de fysiske og kjemiske egenskapene til proteinet, som aminosyresammensetning, størrelse, struktur, ladning, fleksibilitet og evne til å interagere med andre forbindelser. Proteinenes funksjonelle egenskaper i en matvare er avgjørende for sensoriske egenskaper som tekstur, smak, farge og utseende [Damodaran et al. (2008)].

Proteiner er involvert i mange kjemiske reaksjoner som er viktige i produksjon av matvarer med spesifikke karakteristikk. Blant disse er Maillardreaksjonen, også kalt ikke-enzymatisk bruning [Coultate (2009)]. Maillardreaksjonen, som starter med en reaksjon mellom en karbonylgruppe og en aminogruppe, er illustrert i figur 1-7.





**Figur 1-7:** Illustrasjon av Maillardreaksjonen, en kjemisk reaksjon mellom en karbonylgruppe og en aminogruppe. Flere reaksjonstrinn resulterer i dannelsen av amadoriforbindelser, som videre vil følge en pH-avhengig degradering. Ved nøytral og alkalisk pH vil reaksjon med en ny aminogruppe resultere i dannelsen av en serie flyktige forbindelser, samt brunfargede forbindelser (melanoider), ved Strecker-degradering [Coultrate (2009)].

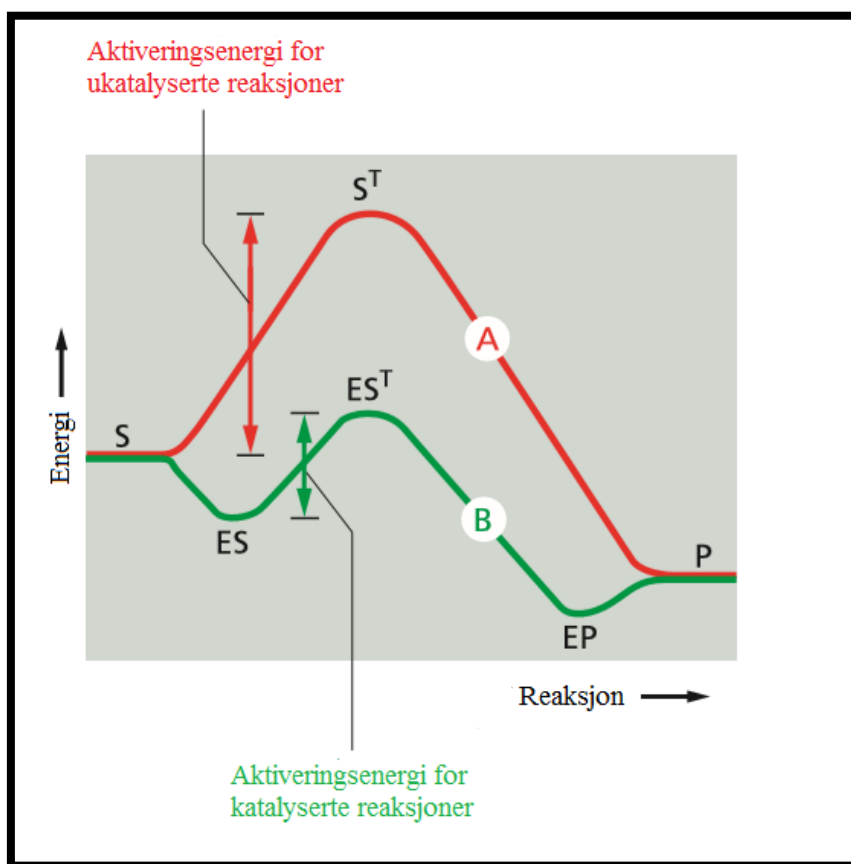
Opphavet til de to forbindelsene som reagerer i første steg av Maillardreaksjonen varierer. Aminogruppen kan tilhøre en aminosyre ( $\alpha$ -aminogruppe) eller en sidegruppe i et protein. Karbonylgruppen tilhører ofte et reduserende sukker, men også andre forbindelser. Blant annet kan karbonylgruppen på aldehyd- og ketonforbindelser, dannet ved lipidoksidasjon, reagere med en aminogruppe. En serie reaksjoner resulterer i dannelsen av amadoriforbindelser, som videre vil følge en pH-avhengig rute for videre degradering. Ved nøytrale og alkaliske pH-verdier vil  $\alpha$ -dikarbonylforbindelser dannes. Disse kan reagere med en ny  $\alpha$ -aminogruppe, og brytes ned til en rekke sluttprodukter via en rute som kalles Strecker-degradering. Sluttproduktene i reaksjonen består av en rekke flyktige forbindelser, ansvarlige for aromaen assosiert med bakst og stekt kjøtt. I tillegg vil Maillardreaksjonen resultere i dannelsen av brunfargede forbindelser (melanoider). I næringsmiddelindustrien er dette ofte et ønsket resultat ved prosessering av matvarer, men kan også medføre uønskede endringer for det aktuelle produktet [Damodaran et al. (2008), Coultate (2009)].

Reaksjoner mellom proteiner og lipider kan resultere i dannelsen av ulike komplekser. Et eksempel på dette er dannelsen av lipid-proteinradial, som følge av reaksjonen mellom et fritt radikal fra lipidoksidasjon og et protein. Denne typen reaksjoner har som regel alltid en negativ innvirkning på proteiners ernæringsverdi [Damodaran et al. (2008)].

### 1.5.3 Enzymer

En av de viktige biologiske funksjonene til proteiner er som enzymer. Enzymer katalyserer kjemiske reaksjoner involvert i syntese, metabolisme, signalisering og omsetning i levende organismer. De forekommer i et bredt spekter av størrelser: fra en molvekt på omkring 8 kDa til en molvekt på 4600 kDa. Som beskrevet for protein, kan også enzymer ha en kvartærstruktur bestående av flere assosierte peptidkjeder. I dette tilfellet betegnes hver enkelt peptidkjede som en subenhet av enzymet [Damodaran et al. (2008)]. Noen enzymer er i tillegg avhengig av en kjemisk forbindelse, en kofaktor, eller et komplekst organisk molekyl, et koenzym, for sin aktivitet [Lehninger et al. (2008)].

To viktige egenskaper ved enzymer er deres rolle som biokjemiske katalysatorer, samt den spesifikke substratselektivitet de utviser. Biokjemisk katalysator er en betegnelse brukt om en forbindelse som øker hastigheten på en reaksjon, uten å selv bli kjemisk modifisert. Enzymer øker reaksjonshastigheten ved å senke aktiveringsenergien nødvendig for å omdanne reaktant (substrat) til produkt [Damodaran et al. (2008)]. Dette er illustrert i figur 1-8, hvor aktiveringsenergien nødvendig for å initiere ikke-katalyserte reaksjoner sammenlignes med aktiveringsenergien nødvendig for å initiere katalyserte reaksjoner.



**Figur 1-8:** Koordinatdiagram over en biokjemisk reaksjon med energi som funksjon av reaksjonsprosessen. Enzymer (E) katalyserer biokjemiske reaksjoner som resulterer i dannelsen av et produkt (P) fra et substrat (S). Enzymet reduserer aktiveringsenergien nødvendig for å initiere en reaksjon (B, grønn linje) ved dannelsen av et enzym-substrat kompleks (ES). Til sammenligning vil aktiveringsenergien for ikke-katalyserte reaksjoner være høyere (A, rød linje) [Fritt redigert etter Alberts (2015)].

Aktiveringsenergien reduseres som følge av at substratet blir bundet til en spesifikk del av enzymet kalt det aktive setet. Dette resulterer i dannelsen av et enzym-substrat kompleks (ES-kompleks). Det aktive setet består av bestemte aminosyrer i peptidkjeden, samt eventuelle kofaktorer nødvendige for enzymets aktivitet. Disse aminosyrene interagerer med substratet ved kovalente og ikke-kovalente bindinger. Den ikke-katalytiske delen av peptidkjeden har også mange viktige funksjoner. Foruten å samle de katalytiske aminosyreenehetene i det samme tredimensjonale området, er denne delen essensiell i modifisering av enzymets aktivitet og stabilitet [Damodaran et al. (2008)]. Den ikke-katalytiske delen sørger også for at interaksjonen mellom substratet og det aktive setet forgår skjermet for ytre påvirkning av andre forbindelser. Dette skjer ved dannelsen av upolare hulrom i enzymet. Disse hulrommene vil ekskludere vann og dermed fremme dannelsen av bindinger mellom

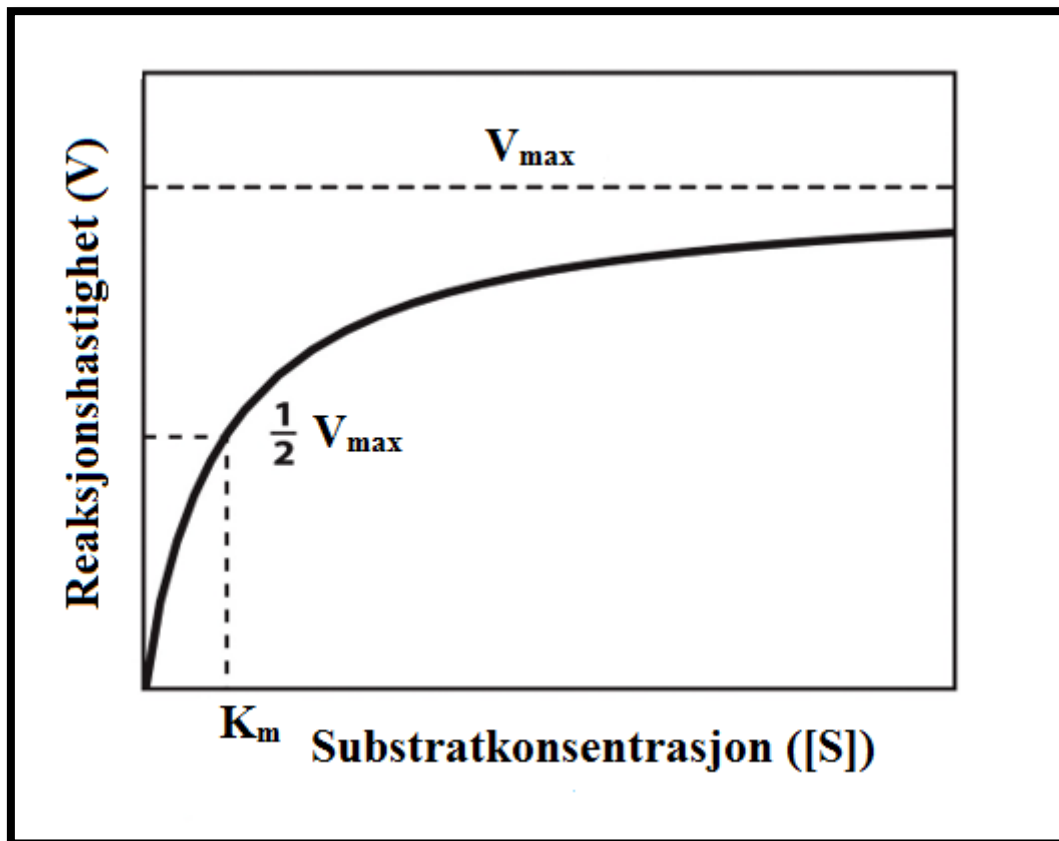
substratet og enzymets aktive sete [Fersht (1985), - ikke sett, sitert etter Damodaran et al. (2008)].

Enzymer utviser en spesifikk substratselektivitet, noe som betyr at de kan diskriminere mellom molekyler i dannelsen av ES-komplekset. Enzymer vil favorisere substrat som kan danne et optimalt antall interaksjoner med det aktive setet, og på denne måten øke stabiliteten til ES-kompleksets. Aminosyresammensetningen i det aktive setet er derfor avgjørende for enzymets substratselektivitet [Lehninger et al. (2008)].

Hastigheten til en enzymkatalysert reaksjon er avhengig av substrat- og enzymkonsentrasjon, samt reaksjonens pH og temperatur [Adler-Nissen (1986)]. Enzymkatalyserte reaksjoner følger hovedsakelig Michaelis-Menten kinetikk, og består av to steg:

1. Bindingen av substrat (S) til enzymets aktive sete (E), i dannelsen av enzym-substrat komplekset (ES).
2. Nedbrytningen av ES, i dannelsen av produkt (P) og frigjøringen av E.

Reaksjonsstegenes hastighet er avhengig av to egenskaper ved enzymet, henholdsvis dets affinitet for substratet og dets katalytiske evne. Enzymkatalyserte reaksjoner karakteriseres ofte av en konstant enzymkonsentrasjon ( $[E]$ ). Endringer i reaksjonshastighet ( $V$ ), som funksjon av substratkonsentrasjon ( $[S]$ ), kan da beskrives av et Michaelis-Menten plot (figur 1-9). Når tilnærmet alt enzym er bundet til substrat (ES), vil reaksjonen nå en maksimal hastighet ( $V_{\max}$ ). En videre økning av substratkonsentrasjon etter  $V_{\max}$  vil ikke medføre en økning i reaksjonshastighet. Michaelis-Menten konstanten ( $K_m$ ), som er karakteristisk for et gitt enzym, beskriver substratkonsentrasjonen som gir en halv  $V_{\max}$ . Ved lav  $[S]$ , vil  $V$  være svært avhengig av  $K_m$ , hvilket betyr at hastigheten på reaksjonen i hovedsak avhenger av enzymets affinitet for substratet.  $K_m$  kan påvirkes av faktorer i enzymets omgivelser, som temperatur og pH. Ved høy  $[S]$  vil derimot enzymets katalytiske evne, og dermed  $V_{\max}$ , avgjøre reaksjonshastigheten.  $V_{\max}$  øker proporsjonalt med  $[E]$  [Lehninger et al. (2008)].



**Figur 1-9:** Michaelis-menten plot for en enzymkatalysert reaksjon med reaksjonshastighet ( $V$ ) som funksjon av substratkonsentrasjon ( $[S]$ ). Reaksjonen når en maksimal hastighet ( $V_{max}$ ) når tilnærmet alt enzym er bundet til substrat. Michaelis-Menten konstanten ( $K_m$ ) tilsvarer substratkonsentrasjonen ved en halv  $V_{max}$  [Lehninger et al. (2008)].

Hvert enzym vil ved en gitt kombinasjon av pH og temperatur ha maksimal aktivitet [Kristinsson et al. (2000)]. Ekstreme temperaturer eller pH-verdier kan på den annen side virke destabiliserende for enzymet og forårsake tap av katalytisk funksjon på grunn av denaturering. Når proteiner denatureres vil de miste sin tredimensjonale struktur, noe som vil føre til en utfolding av peptidkjeden [Lehninger et al. (2008)]. Denne utfoldingen gjør at hydrofobe grupper på proteinet eksponeres. De hydrofobe gruppene kan interagere, og danne intra- og intermolekylære bindinger, noe som resulterer i utfelling av proteinet og dermed tap av dets funksjon [Monahan et al. (1995), Lehninger et al. (2008)].

#### 1.5.3.1 Proteaser

Proteaser (peptidaser) er en undergruppe av hydrolaser, enzymer som katalyserer hydrolysen av kjemiske bindinger. Hydrolaser er derfor viktige komponenter i fordøyelsen hos levende organismer [Hill et al. (2008)]. Proteaser hydrolyserer peptidbindinger mellom aminosyrer i en prosess kalt proteolyse [Damodaran et al. (2008)]. De kan klassifiseres basert opphav, katalytiske mekanisme eller aminosyresammensetningen i det katalytiske setet. Basert på

opphav kan enzymer klassifiseres som endogene eller eksogene. Endogene proteaser finnes naturlig i organismen, og vil derfor alltid være tilstede i restråstoff. Eksogene proteaser kan derimot tilsettes restråstoff, for å oppnå en ønsket endring ved prosessering [Adler-Nissen (1986)]. I denne oppgaven ble aktiviteten til endogene proteaser, samt en kombinasjon av aktiviteten til endogene og eksogene proteaser, utnyttet ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns. Den endogene enzymaktiviteten i restråstoffet ble også utnyttet ved ensilering.

Basert på katalytisk mekanisme kan proteaser deles inn:

- 1. Endopeptidaser (proteinase):** hydrolyserer peptidbindinger inne i peptidkjeden. Deres spesifisitet er i hovedsak avhengig av aminosyresekvensen i nærheten av den spesifikke peptidbindingen de hydrolyserer [Polgár (1989)].
- 2. Eksopeptidaser:** hydrolyserer peptidbindinger ved C-terminal eller N-terminal i peptidkjeden. Deres spesifisitet er rettet mot frie  $\alpha$ -karboksylgrupper eller frie  $\alpha$ -aminogrupeer [Polgár (1989)].

Ved hydrolyse av matproteiner i næringsmiddelindustrien benyttes alltid endopeptidaser, da det ønskede utfallet som regel er en hurtig reduksjon av peptidens molekylvekt. Hvis det er ønske om en mer grundig degradering av proteinene, samt frigjøring av små oligopeptider og frie aminosyrer, kan endopeptidaser kombineres med eksopeptidaser [Adler-Nissen (1986), Damodaran et al. (2008)]. I denne oppgaven ble en kombinasjon av endo- og eksopeptidaseaktivitet benyttet ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns. Endopeptidaser kan videre klassifiseres i grupper basert på aminosyresammensetningen i det aktive sete [Adler-Nissen (1986)]. Innen næringsmiddelindustrien tilhøre de fleste endopeptidaser én av følgende fire klasser:

- 1. Serinproteaser:** karakteriseres av et aktivt sete som inneholder de to aminosyrene serin og histidin. Endopeptidaser tilhørende denne klassen har maksimal aktivitet ved alkalisk pH [Damodaran et al. (2008)].
- 2. Asparaginproteaser:** karakteriseres av et aktivt sete som inneholder aminosyren asparagin. Endopeptidaser tilhørende denne klassen har maksimal aktivitet ved sur pH [Damodaran et al. (2008)].
- 3. Cysteinproteaser:** karakteriseres av et aktivt sete som inneholder aminosyrene cystein og histidin. Endopeptidaser tilhørende denne klassen har maksimal aktivitet ved nøytral pH [Adler-Nissen (1986)].

**4. Metalloproteaser:** karakteriseres av et aktivt sete som inneholder et essensielt metallion. Endopeptidaser tilhørende denne klassen har maksimal aktivitet ved nøytral pH [Polgár (1989)].

#### 1.5.3.2 Lipaser

En annen viktig gruppe av fordøyelsesenzymer er lipaser. Lipaser skilles ut i tynntarmen av bukspyttkjertelen, hvor de hydrolyserer esterbindinger i triacylglyserider. Hydrolysen resulterer i en frigjøring av fettsyrene fra glyserol. I og med at lipider er uløselige i vann, er aktiviteten til de vannløselige lipasene avhengige av den emulgerende aktiviteten til gallesalter. Gallesalter er amfifile molekyler som produseres i leveren og utskilles via galleblæren. Ved deres aktivitet blir lipiddråper brutt opp, slik at overflatearealet blir størst mulig. Det økte overflatearealet resulterer i økt lipaseaktivitet, og dermed en mer effektiv nedbrytning i grensesjiktet mellom vann og lipid [Hill et al. (2008)]. I tillegg til å være essensielle komponenter i fordøyelsen, er lipaser viktige i nedbrytning av fett, og mobiliseringen av fettlagrene, innad i en organisme [Sovik et al. (2005a)]. Den intracellulære nedbrytningen av triacylglyseroler er avhengig av aktiviteten til lipaser fra cellens lysozymer [Anderson et al. (1991)]. Lysozymer er membranomsluttede organeller som finnes i alle eukaryote celler, og inneholder en rekke hydrolytiske enzymer. Lipasene i lysozymer vil, i motsetning til lipasene i tarmen, være aktive ved sur pH (4.5-5.0) [Alberts (2015)].

Lipaser av endogent og eksogent opphav kan bidra til å øke innholdet av frie fettsyrer ved prosessering av restråstoff fra verpehøns. Frie fettsyrer er mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer bundet i triacylglyserol. Hvis innholdet av frie fettsyrer øker ved prosessering av restråstoffet, kan dette medføre en reduksjon av produktets kvalitet [Damodaran et al. (2008)].

## 1.6 Varmebehandling

Varmebehandling (termisk behandling, rendering) kan benyttes til å separere lipid fra de andre komponentene i restråstoff [Jayathilakan et al. (2012), Carvajal et al. (2015)]. Prosesseringsmetoden vil også påvirke proteinene i restråstoffet [Plumb et al. (1994), - ikke sett, sitert etter Cui et al. (2009)]. Avhengig av varighet og temperatur, kan dette resultere i endrede funksjonelle egenskaper, økt hydrolysegrad eller denaturering. [Torreggiani et al. (2008), - ikke sett, sitert etter Cui et al. (2009)]. Varmebehandlingens varighet og temperatur, samt restråstoffets kvalitet, vil også påvirke kvaliteten til den separerte oljen. Oljen kan ha flere bruksområder, hvilket inkluderer produksjon av matoljer, kosmetikk, dyrefôr, såper og vaskemidler [Meeker et al. (2006)]. Den proteinholdige restmassen kan derimot tørkes, kvernes og brukes som proteinkilde i dyrefôr [Shareefdeen et al. (2005), - ikke sett, sitert etter Lasekan et al. (2013)]

Varmebehandling kan kategoriseres som «spiselig» eller «uspiselig». Sistnevnte benyttes om oljen er tiltenkt dyrefôr eller teknisk bruk (såper, vaskemiddel) [Jayathilakan et al. (2012)]. «Uspiselig» varmebehandling kan utføres som en våt prosess, hvor vann tilsettes restråstoffet, eller som en tørr prosess, uten tilsetning av vann. Begge prosessene foregår tradisjonelt i et åpent system, slik at vannet kan fordampe fra restråstoffet. Våt varmebehandling utføres ved en temperatur på 82-96 °C, mens tørr varmebehandling utføres ved temperaturer over 100 °C [Meeker et al. (2006)]. «Uspiselig» varmebehandling vil bryte ned cellulære strukturer i restråstoffet, og dermed frigjøre triacylglyserider. Råoljen fra en slik prosessering vil ikke bare inneholde triacylglyserider, men også andre lipidforbindelser som frie fettsyrer og fosfolipider [Damodaran et al. (2008)].

«Spiselig» varmebehandling blir tradisjonelt utført ved lavere temperaturer (<49 °C). Slike temperaturer gjør fett flytende, men ødelegger ikke cellulære strukturer i den grad «uspiselig» varmebehandling gjør. Cellene ødelegges derfor mekanisk, og oljen separeres fra restråstoffet ved sentrifugering [Meeker et al. (2006), Jayathilakan et al. (2012)]. Produksjon av olje til humant konsum kan også utføres ved høyere temperaturer (82-100°C) [Jayathilakan et al. (2012)]. Høyere temperatur vil resultere i en bedre oljeseparasjon, men proteinene behandlet på denne måten er uegnet i matvarer [Prokop (1985)]. Høye temperaturer er dessuten kjent for å akselerere lipidoksidasjon [Sherwin (1978)]. Varmebehandling ved høye temperaturer kan derfor redusere den separerte oljens kvalitet og oksidative stabilitet, spesielt ved tilstedeværelse av prooksidanter som jern [Carvajal et al. (2015)] .



I denne oppgaven ble varmebehandling utført på restråstoff fra verpehøns ved 100 °C i 15 minutter. Basert på prosesseringsparameterne, vil dette tilsvare en «uspiselig» prosess. Som nevnt kan «spiselig» varmebehandling også utføres ved høye temperaturer, men dette kan redusere oljens kvalitet. Bruksområdet til oljen vil derfor hovedsakelig være produksjon av dyrefôr, samt teknisk bruk.

## 1.7 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse betegner prosessen hvor proteinmolekyler brytes ned til mindre peptider, og eventuelt frie aminosyrer, som følge av enzymaktivitet. Hydrolysen av peptidbindinger katalyseres av proteaser, som kan være av endogent eller eksogent opphav [Adler-Nissen (1986)]. Som prosesseringsmetode, er enzymatisk hydrolyse velegnet til å utvinne proteiner fra restråstoff. Prosesseringen kan i tillegg forbedre proteinenes ernæringsmessige og funksjonelle egenskaper [Šližytė et al. (2005a)]. Foruten forbedring av funksjonelle egenskaper som løselighet, geldannelse og emulgering, inkluderer dette forbedring av ernæringsmessige egenskaper som fordøyelighet, redusert allergenisitet og frigjøring av bioaktive peptider [Clemente (2000), Lasekan et al. (2013)]. Enzymatisk hydrolyse er lettere å kontrollere enn kjemisk hydrolyse, ved bruk av syrer eller baser. Kjemisk hydrolyse kan i tillegg redusere ernæringsverdien til proteinene i restråstoffet ved å ødelegge de biotilgjengelige L-aminosyrene, samt danne giftige forbindelser som lysinoalanin [Lahl et al. (1989), - ikke sett, sitert etter Clemente (2000)].

### 1.7.1 Hydrolysatets egenskaper og bruksområder

Hovedproduktet av den enzymatiske hydrolysen er et proteinhydrolysat med den vannløselige delen av restråstoffets proteiner [Adler-Nissen (1986)]. Når proteiner hydrolyseres, dannes peptider av mindre molekylær størrelse. Disse er ofte mer løselige enn det opprinnelige proteinet grunnet den reduserte størrelsen, samt den økte forekomsten av ioniserbare amino- og karboksylgrupper [Panyam et al. (1996), - ikke sett, sitert etter Opheim et al. (2015)]. Dette vil fremme interaksjoner mellom protein og vann, og løseligheten til proteinene i restråstoffet vil derfor generelt øke med økende hydrolysegrad [Damodaran et al. (2008)].

Flere faktorer er avgjørende for hydrolysatets sammensetning. Dette inkluderer restråstoffets sammensetning, de endogene og eksogene enzymenes aktivitet, spesifisitet og konsentrasjon, samt pH, temperatur og tid på hydrolysen [Mahmoud et al. (1992), Opheim et al. (2015)]. Proteininnhold, lipidinnhold og peptidenes kjedelengde i hydrolysatet er avgjørende for dets egenskaper og kvalitet. Hydrolysat med høy kvalitet kjennetegnes av et høyt proteininnhold og et lavt lipidinnhold [Šližytė et al. (2005a)]. Et høyt innhold av lipider gjør hydrolysatet mer utsatt for oksidasjon. Dette kan redusere den oksidative stabiliteten, og potensielt forringe produktets sensoriske egenskaper og kvalitet [Opheim et al. (2015)]. Hydrolysatets funksjonelle og organoleptiske egenskaper, som emulgatorfunksjon, løselighet og bitterhet, vil i stor grad avhenge av peptidenes molvektfordeling [Dauksas et al. (2004), Rossi et al. (2009)].

Bitterhet vil være negativt for hydrolysatets kvalitet, og kan begrense produktets bruksområde [Rustad (2003)]. Både restråstoffets sammensetning og hydrolyseprosessen kan være mulige kilder til forbindelser som gir bitter smak. Et eksempel på slike forbindelser er bitre peptider, som kan dannes ved hydrolyse av restråstoff. En hydrolysegrad på 4-40 % medfører en høy risiko for dannelsen av bitre peptider [Dauksas et al. (2004)]. I tillegg til kjedelengde, er bitterhet avhengig av den gjennomsnittlige hydrofobisiteten til peptidet [Mohr (1980)]. Små og hydrofobe peptider er ofte bitre, og bitterhet i hydrolysat kan derfor unngås ved å begrense hydrolysegraden til 3-5 % [Adler- Nissen (1984)]. Hydrofobe peptider er dessuten vesentlig bitrere enn den tilsvarende blandingen av frie aminosyrer. En fullstendig hydrolyse av peptider til frie aminosyrer vil derfor også kunne redusere hydrolysatets bitterhet [Belitz et al. (1975), - ikke sett, sitert etter Dauksas et al. (2004)].

Hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse har flere bruksområder i næringsmiddelindustrien. Dette inkluderer tilsetning til ulike matvarer som smaksforsterker, funksjonell ingrediens eller for å øke proteininnholdet i den aktuelle matvaren [Bhaskar et al. (2007)]. I tillegg kan hydrolysat brukes i fremstillingen av kosttilskudd til individer med spesifikke behov. Eksempler på dette er kosttilskudd spesialisert for eldre, for vektkontroll eller til individer med behov for en modifisert diett som følge av sykdom [Frøkjær (1994), - ikke sett, sitert etter Clemente (2000)]. Hydrolysat er også en potensiell kilde til bioaktive peptider med antioksidativ og antimikrobiell aktivitet. De antioksidative peptidene kan utgjøre et naturlig alternativ til syntetiske antioksidanter brukt i næringsmiddelindustrien [Rustad (2003), Chalamaiah et al. (2012)].

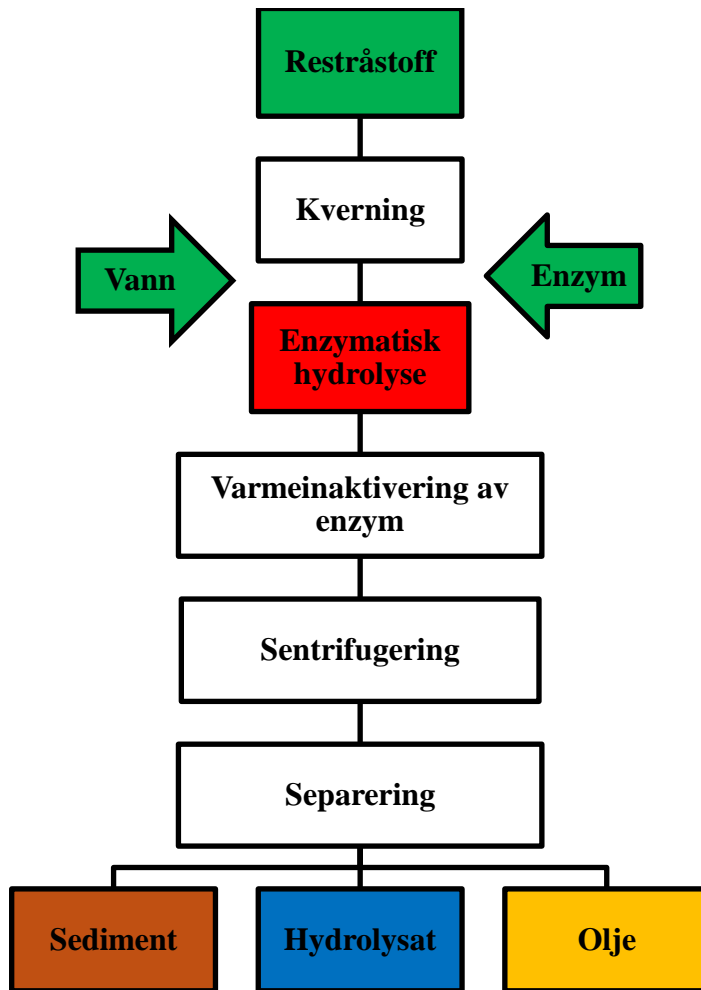
Som funksjonell ingrediens i matvarer kan hydrolysat bidra til økt vannbinding, emulsjonsdannelse, skumdannelse og fettabsorbering. Å tilsette hydrolysat med god vannbindingsevne kan derfor redusere en matvares vanntap ved prosessering [Kristinsson et al. (2000)]. I kvernete kjøttprodukter er proteinets evne til å holde på vann avgjørende for sensoriske egenskaper som saftighet og mørhet. Proteinets vannbindingsevne påvirkes av flere faktorer, deriblant pH, temperatur, salt og proteinkonformasjon [Damodaran et al. (2008)].

### 1.7.2 Hydrolyseprosessen

Den enzymatiske hydrolysen består av flere prosesseringstrinn, illustrert ved en skjematisk oversikt i figur 1-10. I det første steget kvernes restråstoffet for å gjøre peptidbindingene mer tilgjengelig for proteasene. Det er vanlig å blande restråstoffet med vann før hydrolysen, da tilstedeværelse av vann er en nødvendighet for enzymenes aktivitet [Damodaran et al.

(2008)]. Vannet reduserer også restråstoffets viskositet, noe som muliggjør produksjon av en mer homogen hydrolysemikstur [Šližytė et al. (2014)]. Hydrolysen kan utføres med endogene enzymer, eller med tilsetning av kommersielle enzymer (eksogene). For å oppnå en fullstendig kontroll over hydrolyseprosessen, kan det være nødvendig å foreta en initiell inaktivering av endogene enzym, før tilsetning av kommersielle enzymer [Šližytė et al. (2005a)]. En initiell varmeinaktivering utsetter restråstoffet for høye temperaturer, og kan derfor denaturere proteinene i restråstoffet [Damodaran et al. (2008)]. Denaturering kan bidra til økt eksogen enzymaktivitet ved å eksponere gjenkjenningsekvenser for proteasers aktive sete. På den annen side kan denaturering resultere i dannelsen av en mer kompakt proteinkonformasjon, noe som kan gjøre peptidbindingene utilgjengelige for proteaser, og derfor ha negativ innvirkning på hydrolysen [Cui et al. (2009)]. Studier har vist at initiell varmeinaktivering er med på å inhibere enzymatisk hydrolyse av proteiner i både fiskekjøtt [Mohr (1980)] og kyllingkjøtt [Cui et al. (2009)]. Inhibering av enzymaktivitet vil redusere proteinutbyttet i produktet. På grunn av den potensielle negative innvirkningen på peptidbindingenes tilgjengelighet, ble det ikke foretatt en initiell varmeinaktivering av endogene enzymer i denne oppgaven. Restråstoffet ble derimot kvernet, og blandet med vann, før hydrolysen.

Når det gjelder valg av kommersielle enzymer, og konsentrasjon av disse, er det viktig å ta hensyn til det ønskede utfallet av hydrolysen. Ulike enzymer har ulik spesifisitet, og vil derfor gi hydrolysat med ulike egenskaper. Selv om produktutbyttet øker med økt enzymkonsentrasjon, kan dette medføre store kostnader. Det er derfor viktig å finne en balanse mellom effektivitet og kostnad [Lahl et al. (1994), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)] Som tidligere nevnt vil et enzym ha maksimal aktivitet ved en gitt kombinasjon av temperatur og pH. I tillegg øker proteiners løselighet i temperaturintervallet 0-40 °C, mens de ved temperaturer over 40°C vil kunne denatureres [Damodaran et al. (2008)]. I valg av temperatur for hydrolysen bør begge disse faktorene tas hensyn til. Hydrolyse av restråstoff fra verpehøns ble utført ved 50 °C. Etter hydrolysen stoppes enzymaktivitet ved varmeinaktivering. Sentrifugering benyttes for å skille de ulike fraksjonene generert av hydrolyseprosessen: hovedsakelig olje, hydrolysat og sediment.



**Figur 1-10:** Flytskjema for enzymatisk hydrolyse av restråstoff [Fritt redigert etter Kristinsson et al. (2000)].

### 1.7.3 Endogene proteaser

Enzymatisk hydrolyse katalysert av endogene fordøyelsesenzymmer kalles en autolytisk prosess (autolytisk hydrolyse) [Mohr (1977), Šližytė et al. (2005a)]. I animalsk restråstoff er en autolytisk hydrolyse i hovedsak avhengig av aktiviteten til proteasene trypsin og chymotrypsin, begge serin proteaser, samt asparaginproteasen pepsin. Lysozymale proteaser bidrar i mindre grad til hydrolysen [Kristinsson et al. (2000)]. Pepsin initierer proteinfordøyelsen i magesekken, hvilket medfører at proteasen har en maksimal aktivitet ved pH = 1-4. Videre nedbrytning av proteinene skyldes hovedsakelig aktiviteten til trypsin. Trypsin og chymotrypsin, med en maksimal aktivitet rundt pH = 8, skilles ut i tarmen av bukspyttkjertelen [Rao et al. (1998)]. De fleste endogene enzymer i pattedyr inaktiveres av temperaturer mellom 40-50 °C [Coultate (2009)].

### 1.7.4 Eksogene proteaser

Enzymatisk hydrolyse katalysert av eksogene proteaser, ved tilsetning av kommersielle enzympreparat, kalles en akselerert prosess [Mohr (1977), Šližytė et al. (2005a)]. I denne sammenheng vil valg av enzym være avgjørende for hydrolysatets kjemiske og funksjonelle egenskaper, som nevnt over [Šližytė et al. (2005a)]. I næringsmiddelindustrien brukes enzymer fra plantekilder og animalske kilder, men også enzymer av mikrobielt opphav [Damodaran et al. (2008)]. Mikroorganismer er en utmerket kilde til enzymer grunnet sin brede kjemiske diversitet, samt mottakelighet til genetisk manipulasjon [Rao et al. (1998)]. Disse egenskapene kan utnyttes i produksjon av proteaser med ønskede karakteristikk. Mikrobielle proteaser foretrekkes derfor ofte fremfor proteaser fra plante- og dyrekilder, som kan være både tidkrevende og kostbare å produsere [Rao et al. (1998), Rossi et al. (2009)]. I denne oppgaven ble aktiviteten til endogene og eksogene proteaser utnyttet ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns. De kommersielle enzymene stammet fra både plantekilder, animalske kilder og mikrobielle kilder, og er presentert i tabell 2.

**Tabell 2:** Oversikt over kommersielle enzymer benyttet ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns [Fritt redigert etter Adler-Nissen (1986), Ovissipour et al. (2013)]. \* Antatt temperatur for aktivitet basert på enzymkilde.

Trivialnavn	Kilde	Klasse	Område for aktivitet	
<b>Protamex®</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Cystein protease/ metalloprotease	pH = 5,5-7,5	30-65 °C
<b>Corolase PP</b>	<i>Sus scrofa domesticus</i> (bukspyttkjertel)		pH = 7,0-9,0	Fysiologisk temperatur *
<b>Papain</b>	<i>Carica papaya</i>	Cystein protease	pH = 5,0-9,0	40-80 °C
<b>Bromelain</b>	<i>Ananas comosus</i>	Cystein protease	pH = 5,0-9,0	20-70 °C

#### 1.7.4.1 Protamex®

Protamex® er et mikrobielt proteasekompleks produsert av bakterien *Bacillus subtilis*. Proteasekomplekset er blitt funnet å ha maksimal aktivitet ved pH = 5,5-7,5 og temperaturer mellom 35-60 °C. Protamex® har bred spesifisitet, og er kjent for å produsere ikke-bitre hydrolysat. Enzymet inaktiveres ved en temperatur på 85 °C [Adler-Nissen (1986), Liaset et al. (2003)].

#### 1.7.4.2 Corolase PP

Corolase PP er et proteolytisk enzympreparat av animalsk opphav. Det fremstilles fra bukspyttkjertelen til gris (*Sus scrofa domesticus*). Enzympreparatet inneholder fordøyelsesenzymene trypsin og chymotrypsin, begge cystein protease, samt flere proteaser med eksopeptidaseaktivitet [Miguel et al. (2007)]. Dette gjør at Corolase PP har en bred spesifisitet, med en optimal aktivitet ved pH = 7-9 [Adler-Nissen (1986)].

#### 1.7.4.3 Papain

Papain er en planteprotease som ekstraheres fra eksudatet til frukten på papayatreet (*Carica papaya*). Enzymets aktivitet er blant annet avhengig av fremstillingsmetode, hvor grovfremstilling gir enzymet en bred spesifisitet. Den brede spesifisiteten skyldes tilstedeværelse av flere isoenzymer, av endopeptidaser og eksopeptidaser, i det opprinnelige eksudatet. Enzymet er aktivt ved pH = 5-9 og stabilt ved høye temperaturer (80-90 °C). Papain er kjent for å gi smakfulle hydrolysat, med høy grad av løselighet [Rao et al. (1998)].

#### 1.7.4.4 Bromelain

Bromelain er en planteprotease som ekstraheres fra stilken, og saften fra frukten, til ananasplanten (*Ananas comosus*). Dette er en cystein protease som, i likhet med papain, er aktiv mellom pH = 5-9. Enzymet inaktiveres ved en temperatur på 70 °C [Rao et al. (1998)].

## 1.8 Ensilering

Ensilering, eller syrekonservering, er en prosesseringsmetode som muliggjør en enkel og økonomisk utnyttelse av proteininnholdet i restråstoff [Vieira et al. (2015)]. Prinsippet bak metoden er at endogene fordøyelsesenzymer fordeler seg i restråstoffet når det kvernes. Restråstoffets pH reduseres ved å tilsette syre, noe som favoriserer enzymaktivitet og hindrer bakteriell vekst i produktet. Den autolytiske aktiviteten til fordøyelsesenzymene vil deretter omdanne restråstoffet til flytende masse, en ensilasje [Tatterson et al. (1974), Vieira et al. (2015)]. Ved lav pH kan enzymaktiviteten i hovedsak tilskrives pepsin, med maksimal aktivitet ved pH = 1-4 [Adler-Nissen (1986)].

Produktet av ensileringen, ensilasjen, har hovedsakelig bruksområde som proteinkilde i dyrefôr [New et al. (1995), - ikke sett, sitert etter Vieira et al. (2015)]. Ensilasjen kan tilsettes fôret direkte, eller prosesseres videre til en høyere proteinkonsentrasjon [Rustad (2003)]. Oljen assosiert med det opprinnelige råstoffet kan separeres ut før og under prosessen, eller forbli i ensilasjen. Ved lagring av ensilasje kan oljen oksideres, og dermed redusere produktets kvalitet. Det vil derfor være gunstig å begrense lipidinnholdet. Å avfette restråstoffet før ensilering kan være problematisk, da dette vil kreve omfattende og dyre separasjonsteknikker [Tatterson et al. (1974)]. Ved ensilering av restråstoff fra verpehøns, ble olje separert fra ensilasjen etter prosessering, men det ble ikke foretatt en initiell avfetting av restråstoffet. Før ensilasjen kan brukes som proteinkilde i dyrefôr må pH nøytraliseres, slik at produktet blir kompatibel med dyrets fysiologiske pH. Det er vanlig å bruke kaustisk soda (NaOH) til dette formålet. I den sammenheng er det viktig å ta hensyn til natriumkonsentrasjonen i dyrefôret, som generelt ikke bør overskride 1% [Vieira et al. (2015)].

### 1.8.1 Sulfitt

Sulfitt benyttes som tilsetningsstoff i matvarer for å inhibere mikrobiell vekst, inhibere enzymaktivitet, inhibere ikke-enzymatisk bruning, bleke matvarer, bidra til prosessering eller virke som antioksidant [Rose et al. (1989), Doyle et al. (1997)]. I denne oppgaven ble natriumbisulfitt tilsatt restråstoff fra verpehøns før ensilering for å hindre lipidoksidasjon og mikrobiell vekst i ensilasjen. Sulfitt betegner, foruten sulfittionet ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), de to forbindelsene svoveldioksid ( $\text{SO}_2$ ) og bisulfitt ( $\text{HSO}_3^-$ ). Fordelene assosiert med tilsetning av sulfitt i matvarer, skyldes det faktum at de er veldig reaktive [Doyle et al. (1997)]. Bisulfitt kan reagere med karbonylgruppen til aldehyder og ketoner, begge mellomprodukter i maillardreaksjonen. Dette resulterer i dannelsen av  $\alpha$ -hydroksysulfonater [Doyle et al.



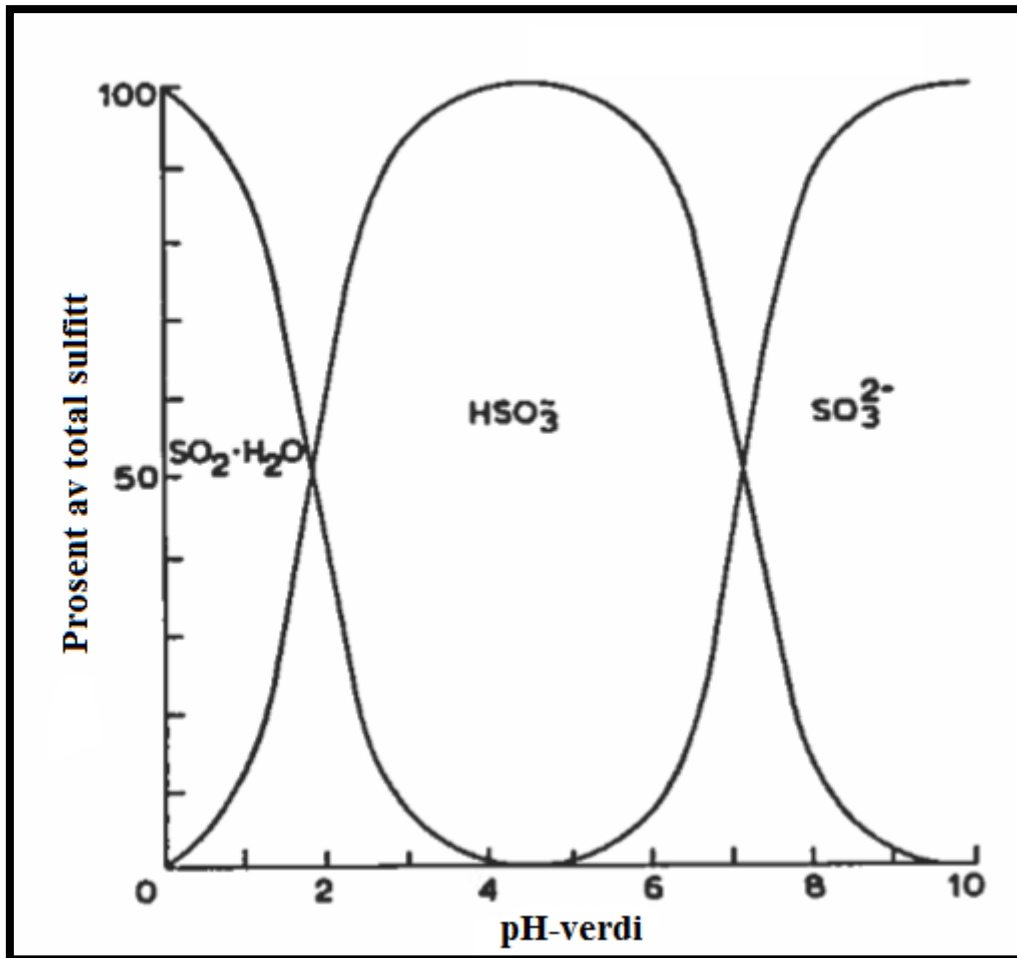
(1997)]. Ved dannelsen av  $\alpha$ -hydroksysulfonater hindrer bisulfitt at mellomproduktene brytes ned til sluttprodukter, som brunfargede melanoider, hvilket kan redusere kvaliteten på en matvare [Rose et al. (1989)].

Den antioksidative effekten av sulfitt er et resultat av dets reaksjon med oksygen. Sulfittionet oksideres mye lettere en bisulfitt, og den antioksidative effekten er derfor hovedsakelig et resultat av at sulfitt ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) oksideres av molekylært oksygen ( $\text{O}_2$ ) til sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) [Rose et al. (1989)]. Denne reaksjonen medfører en reduksjon av matvarens totale innhold av oksygen, hvilket kan redusere hastigheten på lipidoksidasjon. En annen gunstig effekt av et lavere oksygeninnhold er at den mikrobielle veksten begrenses til mikroorganismer som kan leve under anaerobe forhold. Dette gjelder for eksempel melkesyrebakterier [Rose et al. (1989)]. Den generelle inhibitoriske effekt til sulfitt på mikroorganismer er trolig mest effektiv ved pH lavere enn 4,0 når syren befinner seg i ikke-ionisert form ( $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) [Hailer (1911), - ikke sett, sitert etter Rose et al. (1989), Doyle et al. (1997)].

Natriumbisulfitt ( $\text{NaHSO}_3$ ), som brukt i denne oppgaven, er et salt av bisulfitt ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Når bisulfittsaltet løses i vann vil det eksistere i de tre formene svoveldioksid, bisulfitt og sulfitt i en likevekt som vist i ligning 1.1 [Doyle et al. (1997)]:



Likevekten bestemmes av løsningsens pH, noe som medfører at pH er den faktoren som i størst grad påvirker aktiviteten til sulfitt [Doyle et al. (1997)]. Prosentandel av hver av de tre formene for sulfitt som funksjon pH er presentert i figur 1-11.



**Figur 1-11:** Ulike former av bisulfitt i vannløsning. Figuren viser et koordinatdiagram med mengden sulfitt ( $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), bisulfitt ( $\text{HSO}_3^-$ ) og svoveldioksid ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), i prosent, som funksjon av løsningsens pH [Fritt redigert etter Rose et al. (1989)].

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Råstoff

I denne oppgaven ble utrangerte verpehøns benyttet som råstoff. I industriell sammenheng blir utrangerte verpehøns sendt til forbrenning som risikoavfall. Utrangerte verpehøns kan derfor anses som et biprodukt av eggeproduksjonsindustrien, og omtales i denne oppgaven som restråstoff. Restråstoffet ble hentet fra Ytterøykyllings produksjonslokaler 17.09.2015 og inkluderte 15 høner med innmat, 15 høner uten innmat, 5 hoder og en plastpose med fjær fra produksjonslokalets ribbe-avdeling.

Restråstoffet ble fraktet i isoporbokser med kjøleelement fra produksjonslokalet på Ytterøy i Nord-Trøndelag til SINTEF Sealab i Trondheim. Restråstoffet ble separert i to ulike restråstoffmasser brukt til videre analyse. Det ble deretter kvernet i kjøkkenmaskin (Hobart AE200) med 10 mm hullstørrelse, deretter 5 mm hullstørrelse, til en homogen masse. Den ene restråstoffmassen bestod av 15 hele høner med innmat, tilsatt 5 hoder og fjær: heretter omtalt som restråstoff M (**med**). Den andre restråstoffmassen bestod av hel høne uten innmat, hode og fjær: heretter omtalt som restråstoff U (**uten**). Etter kverning ble restråstoffet pakket i plastposer i fraksjoner på ca. 2 kg, nedfrost og oppbevart ved – 80 °C. Restråstoff M og restråstoff U er avbildet i figur 2-1.



**Figur 2-1:** Bilde av de to restråstoffmassene benyttet i denne oppgaven. Kvernet høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) er avbildet til venstre. Kvernet høne uten innmat, hode og fjær (restråstoff U) er avbildet til høyre.

## 2.2 Instrumenter

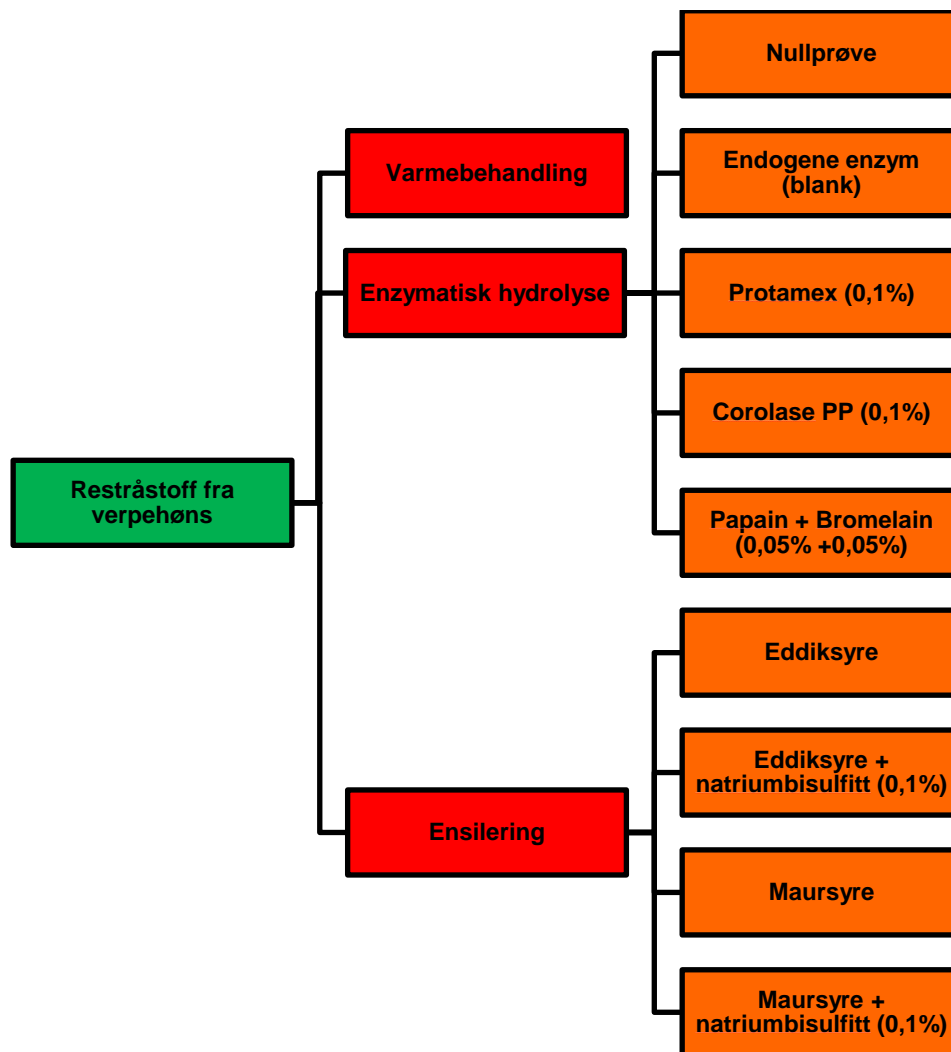
En liste over instrument benyttet ved forsøk og analyser i denne oppgaven er presentert i tabell 3.

**Tabell 3:** *Instrumentoversikt. Instrumenter i tabell ble benyttet til forsøk utført på restråstoff fra verpehøns, samt analyser på prosesseringsprodukt.*

<b>Instrument</b>	<b>Navn</b>	<b>Produsent</b>
Automatisk titrator	TitraLab® TIM 980 Titration Manager	HACH
Homogeniserer	T25 digital Ultra-Thurrax®	IKA®
Kjøkkenmaskin	Bowl Cutter C9 VV	Sirman
Magnetrører	Heidolph MR 3002	Sigma-Aldrich®
pH-meter	TIM900 Titration Manager	Radiometer Copenhagen
Rotator	Rotator SB3	Stuart Equipment
Sentrifuge	3K-2	Sigma Centrifuges
Sentrifuge	5804 R	Eppendorf
Sentrifuge	Universal 16A Nerliens	Hettich Zentrifugen
Spektrofotometer	UV mini 1240 Spectrophotometer	Shimadzu
Stekeovn	SelfCookingCenter®	RATIONAL
Varmeblokk	Pierce Reacti-Therme heating module	Thermo Fischer Scientific
Vekt	AG204 Delta Range	Mettler Toledo
Whirlmixer	MS2 Minishaker	IKA®

## 2.3 Screeningforsøk

Det ble kjørt et teknologisk screeningforsøk på restråstoff M og restråstoff U. Forsøket bestod av tre ulike prosesseringsmetoder: varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. For varmebehandling og enzymatisk hydrolyse ble det gjort 10 paralleller per restråstoff per behandling, mens for ensilering ble det gjort 5 paralleller per restråstoff per behandling. En oversikt over screeningforsøket er presentert i figur 2-2.



**Figur 2-2:** Systematisk oversikt over teknologisk screeningforsøk utført på hel høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) og hel høne uten innmat (restråstoff U). Forsøket inkluderte tre ulike prosesseringsmetoder: varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. Ved enzymatisk hydrolyse ble fem ulike behandlinger brukt, mens det ved ensilering ble brukt fire ulike behandlinger.

### 2.3.1 Varmebehandling

Varmebehandling (termisk, T) ble utført i 10 paralleller på restråstoff M og restråstoff U, heretter omtalt som henholdsvis MT og UT. Til 50 ml sentrifugerør ble det tilsatt 40 g restråstoff. Prøven ble varmet i mikrobølgeovn ved maksimal effekt (750-800 W) til restråstoffets temperatur nådde 70–80 °C, deretter ble prøven plassert i kokende vannbad (100 °C) i 15 minutter. Prøven ble sentrifugert i 10 minutter (3075 × g, 40 °C), deretter frosset i loddrett stilling og oppbevart ved -20 °C.

Separering av fraksjoner i sentrifugerør ble utført manuelt ved bruk av skalpell på frosne prøver. Alle fraksjoner ble veid med 4 desimalers nøyaktighet. Opptint oljefraksjon ble sentrifugert, samlet og nedfrost ved -80 °C. Opptint limvannfraksjonen ble filtrert, samlet og nedfrost ved -80 °C, frysetørket og oppbevart som pulver i fryser ved -20 °C. Opptint slamfraksjon ble samlet, nedfrost og oppbevart ved -80 °C.

Før samling av prøvene ble det tatt individuelle tørrstoffprøver fra limvann, samt tørrstoff- og askeprøver fra slam for hver parallell. For enkelte av parallellene ble det tatt en felles tørrstoffprøve fra limvann på grunn av at denne fraksjonen var for liten til individuell prøve. Det ble ikke tatt tørrstoffprøver av oljefraksjon, basert på antagelsen om at denne inneholdt 100% tørrstoff.

### 2.3.2 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse (H) ble utført på restråstoff M og restråstoff U, heretter omtalt som henholdsvis MH og UH. Restråstoff ble blandet med oppvarmet destillert vann (ca. 50 °C) i forholdet 1 : 1 (150 g restråstoff : 150 ml vann). Blandingen av restråstoff og destillert vann ble varmet opp til 50 °C i mikrobølgeovn ved maksimal effekt (750-800 W). 5 ulike behandlinger ble benyttet i forsøket: prøve uten hydrolyse, prøve uten tilsatt kommersielle enzym (endogene enzym), prøve tilsatt 0,1 % Protamex, prøve tilsatt 0,1 % Corolase PP og prøve tilsatt 0,1 % Papain + Bromelain i blanding (0,05 % + 0,05 %). Hver behandling ble utført i 10 paralleller. Kommersielle enzym ble tilsatt etter oppvarming av restråstoffblandingen til 50°C.

De ulike behandlingene er heretter indikert i prøvenavn med forkortelse:

- **O**: uten hydrolyse (nullprøve)
- **Bl**: uten tilsatt kommersielle enzym (**bl**ank, endogene enzym)
- **Pr**: tilsatt **Protamex** (0,1 %)
- **PP**: tilsatt **Corolase PP** (0,1 %)
- **P+B**: tilsatt **Papain + Bromelain** (0,1%)

En oversikt over de ulike hydrolyseforsøkene utført på restråstoff M og restråstoff U er presentert i tabell 4.

**Tabell 4:** Oversikt over de ulike hydrolyseforsøkene utført på hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Prøve	Protamex	Corolase PP	Papain + Bromelain	Hydrolyse	Varme- inaktivering
<b>MHO</b>					X
<b>MHBl</b>				X	X
<b>MHPr</b>	X			X	X
<b>MHPP</b>		X		X	X
<b>MHP+B</b>			X	X	X
<b>UHO</b>					X
<b>UHBl</b>				X	X
<b>UHPr</b>	X			X	X
<b>UHPP</b>		X		X	X
<b>UHP+B</b>			X	X	X

Til 50 ml sentrifugerør ble det tilsatt 40 g restråstoffblanding (20 g restråstoff + 20 ml vann). Sentrifugerør ble festet til en rotator (roteringshastighet = 8) og plassert i varmeskap hvor hydrolyse ble utført ved 50 °C i 60 minutter. Enzymene i prøven ble varmeinaktivert ved oppvarming til 90 °C i mikrobølgeovn på maksimal effekt (750-800 W). Temperaturen (> 90 °C) ble holdt stabil i 10 minutter. Prøven ble sentrifugert i 10 minutter (3075 × g, 40 °C), deretter frosset i loddrett stilling og oppbevart ved -20 °C.

Separering av fraksjoner i sentrifugerør ble utført manuelt ved bruk av skalpell på frosset prøve. Alle fraksjoner ble veid med 4 desimalers nøyaktighet. Opptint oljefraksjon ble

sentrifugert, samlet og nedfryst ved -80 °C. Opptint hydrolysat ble filtrert, samlet og nedfryst ved -80 °C, frysetørket og oppbevart som pulver i fryser ved -20 °C. Opptint sedimentfraksjon ble samlet, nedfryst og oppbevart ved -80 °C. Emulsjonsfraksjon ble kastet etter veiing.

Før samling ble det tatt individuelle tørrstoffprøver fra hydrolysat, samt tørrstoff- og askeprøver fra sediment for hver parallell. Det ble ikke tatt tørrstoffprøver av oljefraksjon, basert på antagelsen om at denne inneholdt 100 % tørrstoff.

### 2.3.3 Ensilering

Ensilering (E) ble utført på restråstoff M og restråstoff U, heretter omtalt som henholdsvis ME og UE. Restråstoff ble blandet med syre til blandingen nådde pH = 3,0, målt ved pH-meter. Fire ulike behandlinger ble benyttet i forsøket: prøve tilsatt eddiksyre, prøve tilsatt eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt, prøve tilsatt maursyre og prøve tilsatt maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt. Hver behandling ble utført i 5 paralleller. Natriumbisulfitt ble tilsatt etter pH var justert til 3,0. De ulike behandlingene er heretter indikert i prøvenavn med forkortelse:

- **Ed:** tilsatt eddiksyre
- **Ed.S:** tilsatt eddiksyre + natriumbisulfitt (0,1%)
- **Ma:** tilsatt maursyre
- **Ma.S:** tilsatt maursyre + natriumbisulfitt (0,1%)

En oversikt over de ulike ensileringsforsøkene utført på restråstoff M og restråstoff U er presentert i tabell 5.

**Tabell 5:** Oversikt over de ulike ensileringsforsøkene utført på hel høne med innmat, hode og fjær (ME) og hel høne uten innmat (UE). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S.).

Prøve	Eddiksyre	Maursyre	Natriumbisulfitt	Ensilering
<b>MEd</b>	X			X
<b>MEd.S</b>	X		X	X
<b>MEMa</b>		X		X
<b>MEMa.S</b>		X	X	X
<b>UEEd</b>	X			X
<b>UEEd.S</b>	X		X	X
<b>UEMa</b>		X		X
<b>UEMa.S</b>		X	X	X



Til 50 ml sentrifugerør ble det tilsatt 40 g restråstoff. Ensilering ble utført i varmeskap ved 40 °C i 24 timer. Enzymene i prøven ble varmeinaktivert ved oppvarming til 90 °C i mikrobølgeovn på maksimal effekt (750-800 W). Temperaturen (> 90 °C) ble holdt stabil i 10 minutter. Prøven ble sentrifugert i 10 minutter (3075 × g, 40 °C), deretter frosset i loddrett stilling og oppbevart ved -20 °C.

Separering av fraksjoner i sentrifugerør ble utført manuelt ved bruk av skalpell på frossen prøve. Alle fraksjoner ble veid med 4 desimalers nøyaktighet. Opptint oljefraksjon ble sentrifugert, samlet og nedfrost ved -80 °C. Opptint vannløselig fraksjon ble filtrert, samlet og nedfrost ved -80 °C, frysetørket og oppbevart som pulver i fryser ved -20°C. Opptint ensilasje ble samlet, nedfrost og oppbevart ved -80 °C.

Før samling ble det tatt individuelle tørrstoff- og askeprøver fra ensilasje for hver parallell. For vannløselig fraksjonen ble det tatt felles tørrstoffprøve grunnet manglende analysemateriale. Det ble ikke tatt tørrstoffprøver av oljefraksjon, basert på antagelsen om at denne inneholdt 100 % tørrstoff.

## 2.4 Oppskalert enzymatisk hydrolyse

I screeningforsøket, beskrevet i avsnitt 2.3, ble enzymatisk hydrolyse utført på restråstoff M og restråstoff U med 5 ulike behandlinger. Det ble foretatt en evaluering av de ulike behandlingene med hensyn på utbytte og produktets kvalitet. Avslutningsvis ble enzymatisk hydrolyse, med de best egnede prosesseringsparameterne, benyttet i et oppskalert forsøk. Målet med den oppskalerte hydrolysen var å produsere større mengder hydrolysat til bruk i produktutvikling av kyllingkjøttkaker.

Det ble bestemt at tilsetning av 0,1 % Papain + Bromelain var best egnet til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Screeningforsøket ble oppskalert fra 20 g restråstoff til 2 kg restråstoff. Restråstoffet bestod av hel høne uten innmat, hode og fjær. Før hydrolysen ble restråstoffet kvernet i kjøkkenmaskin (Hobart AE200), med 10 mm og 5 mm hullstørrelse, til en homogen masse. Halvparten av restråstoffet ble i tillegg kvernet med 2 mm hullstørrelse. Dette resulterte i et grovkvernet restråstoff (H2), som brukt i screeningforsøket, og et mer finkvernet restråstoff (H1).

Enzymatisk hydrolyse ble utført på restråstoff H1 og restråstoff H2. Restråstoff ble blandet med oppvarmet destillert vann (ca. 50 °C) i forholdet 1:1 (2 kg restråstoff : 2 l vann). Blandingen av restråstoff og destillert vann ble varmet opp til 50 °C i mikrobølgeovn ved maksimal effekt (750-800 W). Restråstoffblandingen ble overført til en reaktor, med mekanisk omrøring, og plassert i vannbad (50 °C). 0,1 % Papain + Bromelain (0,5 % + 0,5 %) ble tilsatt restråstoffblandingen når temperaturen hadde stabilisert seg på 50 °C. Enzymatisk hydrolyse ble utført ved 50 °C i 60 minutter. Enzymene i prøven ble varmeinaktivert ved oppvarming til 90 °C i mikrobølgeovn på maksimal effekt (750-800 W). Temperaturen (> 90 °C) ble holdt stabil i 10 minutter. Prøven ble overført til en sentrifugekopp, og sentrifugert i 10 minutter. Olje, hydrolysat og sediment ble separert manuelt ved bruk av pipette og skje. Hver fraksjon ble veid, og det ble tatt tørrstoffprøver av hydrolysat, samt tørrstoff- og askeprøve av sediment. Olje og sediment ble nedfrost ved – 20 °C til videre analyser som ikke er en del av denne oppgaven. Hydrolysatet ble nedfrost ved – 80 °C, deretter frysetørket til bruk i produktutviklingsforsøk.

## 2.5 Produktutviklingsforsøk: kyllingkjøttkaker

Hønseproteinhydrolysat (HPH) fra oppskalert enzymatiske hydrolyse av restråstoff H1 (HPH1) og restråstoff H2 (HPH2) ble benyttet i et produktutviklingsforsøk. Forsøket ble utført som et teknologisk screeningforsøk, med den hensikt å optimalisere prosessbetingelsene for videre forsøk med HPH som funksjonell ingrediens i matvarer. I denne oppgaven ble kun beregninger av vanntap ved steking, samt en enkel sensorisk analyse, utført.

For å studere vannbindingsevnen til HPH i kyllingkjøttkaker, ble det kommersielle produktet ScanPro™ benyttet til sammenligning. ScanPro™ FCP 75/SF er et kommersielt produkt produsert ved mekanisk prosessering og varmebehandling av kylling med matkvalitet. Produktet tilsettes matvarer som funksjonell ingrediens, og kan bidra til vann- og fettbinding i ulike produkt for humant konsum [ScanPro™FCP75/SF (n.d.)].

Farse av kyllingkjøtt ble tillaget ved Ytterøykyllings produksjonslokaler på Mule i Levanger. Kyllingfarsen ble tilsatt de samme ingrediensene som Ytterøykylling benytter i produksjon av egne farseprodukt. Ferdig kyllingfarse ble fraktet til SINTEF Sealab i Trondheim i frosset tilstand. 4 ulike tilsetninger ble benyttet i produktutviklingsforsøket: 4 % vann, 4 % vann + 1 % ScanPro, 4 % vann + 1 % HPH1 og 4 % vann + 1 % HPH2. De ulike tilsetningene er heretter indikert i prøvenavn med forkortelse:

- **SD:** Vann (4 %) (standard)
- **SP:** Vann (4 %) + ScanPro (1 %)
- **HPH1:** Vann (4 %) + HPH1 (1 %)
- **HPH2:** Vann (4 %) + HPH2 (1 %)

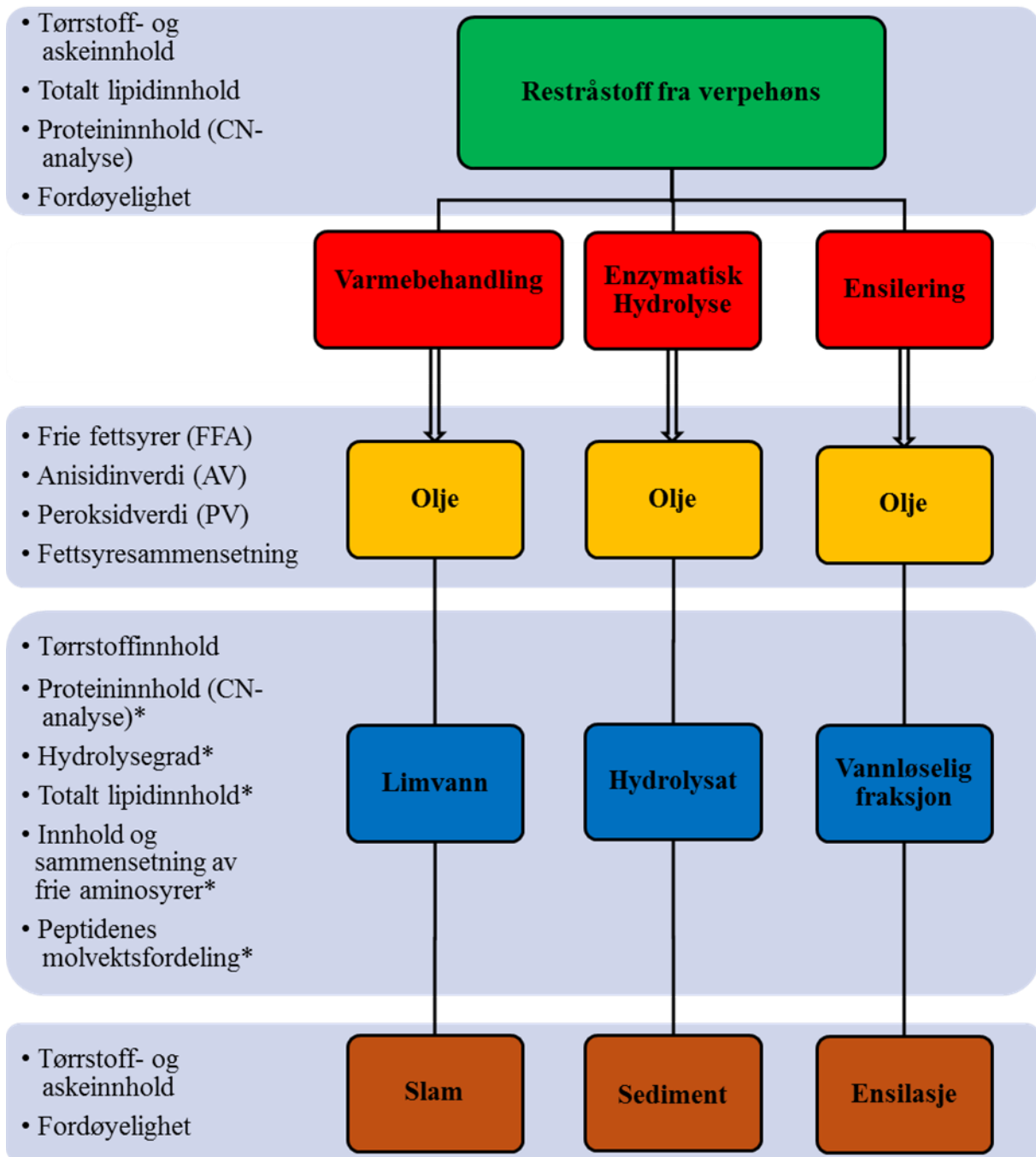
300 g farse med tilsetning ble blandet i kjøkkenmaskin i 30 sekunder. Blandingen ble formet til 7 kjøttkaker. Hver kjøttkake ble veid, deretter stekt i varmluftsovn ved 200 °C i 14 minutter. Etter avkjøling ble kjøttkakene veid på nytt, og vanntap ble beregnet som differansen mellom vekt før varmebehandling og det ferdige produktets vekt.

Det ble utført en enkel smakstest på de 4 ulike produktene. Et utrent panel bestående av totalt 10 personer deltok i den sensoriske analysen, hvorav 4 hadde kjennskap til forsøket. Deltakerne ble bedt om å besvare to spørsmål:

1. Har kjøttkakene ulik smak?
2. Smaker én av kjøttkakene bedre enn de andre?

## 2.6 Analysemetoder

Ulike analyser ble utført på restråstoffet, samt de ulike fraksjonene generert fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. En oversikt over analyser utført på restråstoff, oljefraksjon, og de vannløselige og uløselige fraksjonene er presentert i figur 2-3. Analyse av tørrstoffinnhold ble utført på den vannløselige fraksjonen fra alle de tre prosesseringsmetodene. Analyse av proteininnhold (\*) og proteinerenes hydrolysegrad (\*) ble utført på limvann og hydrolysat. Analyse av totalt lipidinnhold (\*), innhold og sammensetning av frie aminosyrer (\*), samt analyse av peptidenes molvektfordeling (\*), ble bare utført på hydrolysat.



**Figur 2-3:** Oversikt over analyser utført på restråstoff fra verpehøns, samt oljefraksjon, vannløselig fraksjon og uløselig fraksjon fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensiling. Analyse av tørrstoffinnhold ble utført på den vannløselige fraksjonen fra alle tre prosesseringsmetodene. Analyse av proteininnhold og proteinenes hydrolysegrad ble bare utført på limvann og hydrolysat. Analyse av totalt lipidinnhold, innhold og sammensetning av frie aminosyrer, samt analyse av peptidenes molvektfordeling, ble bare utført på hydrolysat.

### 2.6.1 Tørrvekt og aske

Innhold av tørrstoff og aske ble bestemt ved gravimetrisk analyse. 1-3 g prøve veid inn i dramsglass med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble satt i varmeskap ved 105 °C i 24 timer, deretter plassert i eksikator til avkjøling i minimum 1 time. Etter ny veiing, ble prøvens tørrstoffinnhold beregnet som differansen i vekt før og etter tørking.

Analyse av askeinnhold ble utført i henhold til AOAC metode [AOAC (1990)]. 1-3 g prøve ble veid inn i digel med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble satt i varmeskap ved 105 °C i 24 timer, deretter plassert i eksikator til avkjøling i minimum 1 time. Digel med tørket prøve ble plassert i kald muffelovn. Temperaturen i muffelovn ble satt til 590°C, og prøven fikk stå i 12 timer. Digel ble igjen plassert i eksikator til avkjøling i minimum 1 time. Det ble foretatt en ny veiing, og askeinnholdet ble beregnet som differansen mellom prøvens vekt før og etter foraskning.

### 2.6.2 Totalt nitrogen til beregning av grovt proteininnhold

Totalt nitrogeninnhold i frysetørket prøve ble bestemt ved bruk av CN-analysator (Carlo Erba NA-1500 CN elemental analyzer).

I CN-analysatoren vil en fast prøve pakket i tinnkapsel spontant forbrennes ved en temperatur på 1800 °C og tilstedeværelse av oksygen. Forbrenningen resulterer i dannelsen av gassproduktene N<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>. Med helium som bæregass vil disse transporteres, via en kolonne som inneholder kromoksid og koboltoksid, til en kobberkolonne. I kobberkolonnen reduseres nitrogenoksider til elementært nitrogen. Etter absorbering av vann og oksygen vil de gjenværende gassene overføres til en gasskromatografovn, hvor N<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> separeres i en Poropak QS-kolonne. En termal konduktivitetdetektor (TCD) produserer et elektrisk signal proporsjonalt til konsentrasjonen av nitrogen og karbon.

Prøvene ble analysert i 3-4 paralleller. Frysetørket prøve ble veid inn i tinnkapsel med 4 desimalers nøyaktighet, pakket og satt i varmeskap ved 60 °C i minimum 24 timer. Etter tørking ble prøven plassert i eksikator. CN-analysator ble kjørt av Marte Schei ved SINTEF Fiskeri og havbruk.

Grovt proteininnhold (CP) ble beregnet ved å multiplisere totalt nitrogeninnhold (%) med en faktor på 6,25.

### 2.6.3 Totalt lipidinnhold

Ekstraksjon av fett fra våt og tørr prøve, til bestemmelse av totalt lipidinnhold, ble utført som beskrevet av Bligh og Dyer [Bligh et al. (1959)] med modifikasjoner. Til ekstraksjon av fett

fra restråstoff (våt prøve) ble makrometode benyttet, mens mikrometode ble benyttet til ekstraksjon av fett fra frysetørket hydrolysat (tørr prøve).

Ved å homogenisere en prøve med en løsning bestående av et polart og et upolart løsemiddel, vil ulike komponenter kunne separeres basert på løselighet. I det resulterende to-fase systemet vil lipider befinne seg i den upolare fasen, mens ikke-lipid komponenter vil befinne seg i den polare fasen. Dette gjør det mulig å ekstrahere fett, og separere dette fra de andre komponentene i en prøve.

Mikrometode: Prøvene ble analysert i 2 paralleller. Ca. 50 mg tørr prøve ble veid inn i kimaxrør med 2 desimalers nøyaktighet. Prøven ble tilsatt 0,8 ml destillert vann, 2,0 ml metanol og 1,0 ml kloroform etterfulgt av homogenisering i 1 minutt. Prøven ble igjen tilsatt 1,0 ml kloroform og homogenisert i 20 sekunder. Til slutt ble prøven tilsatt 1,0 ml destillert vann og homogenisert i ytterligere 20 sekunder. Prøven ble oppbevart på is under hele prosedyren, inkludert homogenisering. For å separere fasene ble prøven sentrifugert i 10 minutter ( $1610 \times g$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nøyaktig 0,5 ml av kloroformfasen ble overført fra kimaxrør til forhåndsveide reagensrør ved bruk av pasteurpipette. Prøven ble inndampet over natten i avtrekksskap, deretter plassert i eksikator i 1 time. Inndampet prøve ble veid på nytt, og mengde lipid ble beregnet som differansen mellom reagensrørets vekt med og uten inndampet prøve. Ved antagelsen om at alt lipid befant seg i kloroformfasen, ble totalt lipidinnhold (%) beregnet ved bruk av ligning 2.1.

$$\text{Totalt lipidinnhold (\%)} = \frac{A \times B \times 100}{(C \times V)} \quad \text{Ligning 2.1}$$

Hvor A = mengde inndampet lipid (mg), B = volum kloroform tilsatt (ml), C = volum kloroform inndampet (ml) og V = innveid prøve (mg).

Makrometode: Prøvene ble analysert i 3 paralleller. Ca. 10 g våt prøve ble veid inn i sentrifugekopp med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble tilsatt 16 ml destillert vann, 40 ml metanol og 20 ml kloroform etterfulgt av homogenisering i 2 minutter. Prøven ble igjen tilsatt 20 ml kloroform og homogenisert i 2 minutter. Til slutt ble prøven tilsatt 20 ml destillert vann og homogenisert i 40 sekunder. For å separere fasene ble prøven sentrifugert i 15 minutter ( $2000 \times g$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nøyaktig 2,0 ml av kloroformfasen ble overført til forhåndveid reagensrør ved bruk av glasspipette. Kloroform ble avdampet på varmeblokk ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) med innblåsing av nitrogengass ( $\text{N}_2$ ). Prøven ble deretter avkjølt i eksikator i minimum 1 time. Inndampet prøve ble veid på nytt, og mengde lipid ble beregnet som differansen mellom reagensrørets vekt

med og uten inndampet prøve. Ved antagelsen om at alt lipid befant seg i kloroformfasen, ble totalt lipidinnhold (%) beregnet ved bruk av ligning 2.2.

$$\text{Totalt lipidinnhold (\%)} = \frac{A \times B \times 100}{(C \times V)} \quad \text{Ligning 2.2}$$

Hvor A = mengde inndampet lipid (g), B = volum kloroform tilsatt (ml), C = volum kloroform inndampet (ml) og V = innveid prøve (g).

#### 2.6.4 Frie fettsyrer (FFA)

Innhold av frie fettsyrer (%) i lipid ble bestemt, som beskrevet av Bernardez et al. [Bernardez et al. (2005)], med modifikasjoner. Isooktan ble brukt som løsemiddel i stedet for sykloheksan.

Karboksygruppen i frie fettsyrer reagerer med kobber(II)acetat-pyridinmonohydrat, og danner stabile kobbersåpe-komplekser med blå farge. Disse absorberer bølgelengder ved 715 nm. Et lipids innhold av frie fettsyrer (%) kan derfor bestemmes ved å måle prøvens absorbans, og sammenligne denne med absorbansen til en standardløsning.

Standardløsning av oleinsyre (0,1 M) ble fremstilt ved å veie inn 0.2825 g oleinsyre og løse dette i 10 ml isooktan. De ulike mengdene (n) av oleinsyre (0-20  $\mu$ mol) brukt til fremstilling av standardkurven, samt formler og utregninger, er presentert i tabell 1C i vedlegg C. Standardkurven er presentert i figur C-1 i vedlegg C.

Prøvene ble analysert i 8 paralleller. 0,1-0,2 g prøve ble veid inn i kimaxrør med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble tilsatt 5,0 ml isooktan og blandet. Deretter ble prøven tilsatt 0,5 ml kobber(II)acetat-pyridinmonohydrat-reagens. Kobber(II)acetat-pyridinmonohydrat-reagens ble fremstilt ved å løse 5,00 g kobberacetat(II)monohydrat i 100 ml destillert vann. Reagensens pH justeres til 6,0-6,2 ved å tilsette pyridin dråpevis. Etter reagensen var tilsatt ble prøven blandet og sentrifugert i 5 minutter ( $906 \times g$ , 20 °C). Toppfasen ble overført til kyvetter, spektrofotometer ble nullstilt mot isooktan, og prøvens absorbans ble målt ved 715 nm. Oljens innhold av frie fettsyrer (%) ble bestemt ved bruk av ligning C i vedlegg C.

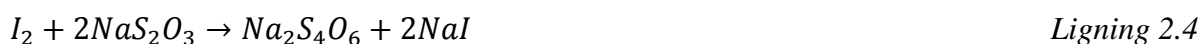
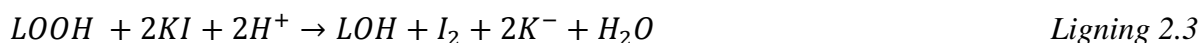
#### 2.6.5 Peroksidverdi (PV)

Peroksidverdi (PV) i lipid ble bestemt, som beskrevet i ISO 3960, basert på AOCS Official Method Cd 8b-90 [AOCS (2013)]. Analysen ble utført med halverte mengder reagenser, automatisert jodometrisk titrering og potentiometrisk bestemmelse av ekvivalenspunkt.

PV er et mål på mengden primære oksidasjonsprodukt: lipidhydroperoksider (LOOH). Metoden baserer seg på lipidhydroperoksiders evne til å oksidere indikatorforbindelser, i dette



tilfellet jodid [Damodaran et al. (2008)]. I en mettet kaliumjodidløsning vil lipidhydroperoksider oksidere jodidioner til jod etter det støkiometriske forholdet presentert i ligning 2.3. Når løsningen titreres med natriumtiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) vil denne forbindelsen redusere jod tilbake til jodid etter ligning 2.4. Titreringens ekvivalenspunkt, og dermed PV-verdi, bestemmes ved å registrere endringer i løsningens elektriske potensial (eV). PV uttrykkes som milliekvivalenter (meq) aktivt oksygen (peroksid) per kg olje [AOCS (2013)].



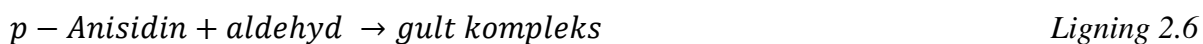
Prøvene ble analysert i 8 paralleller. 0,2-0,3 g lipid ble veid inn i plastbeger med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble tilsatt 25 ml isooktan/eddiksyreløsning (2 : 3) og 0,25 ml mettet kaliumjodidløsning. Mettet kaliumjodidløsning ble tillaget ved å løse kaliumjodid i destillert vann, ved risting, inntil bunnfall ble observert. Prøven ble plassert på magnetrører til omrøring i nøyaktig 1 minutt, deretter umiddelbart tilsatt 15 ml destillert vann. Prøven ble titrert med natriumtiosulfat (0,1 M) ved bruk av automatisk titrator. PV ble bestemt ved bruk av ligning 2.5.

$$\text{PV} = \frac{C_{(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)} \times (\text{titrering prøve} - \text{titrering blank}) \times 1000}{\text{Prøvens vekt (g)}} \quad \text{Ligning 2.5}$$

### 2.6.6 Anisidinverdi (AV)

Anisidinverdi (AV) i lipid ble bestemt i henhold til AOCS Official Method Cd 18-90 [AOCS (2013)].

AV er et mål på mengden sekundære oksidasjonsprodukt, nærmere bestemt kjernealdehyder (2,4-dienaler og 2-alkenaler), som dannes ved  $\beta$ -kløyving. I en sur løsning vil p-anisidin reagerer med aldehydforbindelser og danne et gult kompleks, som vist i ligning 2.6. Dette komplekset absorberer bølglengder ved 350 nm, og målt absorbans kan derfor benyttes til å bestemme lipidets innhold av kjernealdehyder.



Prøvene ble analysert i 4 paralleller. 0,25 % anisidinreagens ble tillaget ved å veie inn 0,25 g p-anisidin i en 100 ml målekolbe. Det ble tilsatt 100 ml eddiksyre til målekolben, etterfulgt av kraftig risting, til det ikke lenger kunne observeres p-anisidin i fast form. 0,1-0,3 g lipid (m) ble veid inn i kimaxrør med 4 desimalers nøyaktighet. Prøven ble tilsatt 5,0 ml isooktan og blandet. Spektrofotometer ble nullstilt mot isooktan. 2,5 ml prøve ( $S_1$ ) ble pipettert ut i en glasskyvette, mens 2,5 ml isooktan ( $B_1$ ) ble pipettert ut i en annen (blankprøve). Absorbans

ble målt ved 350 nm for begge prøvene, og ga henholdsvis  $A_{S1}$  og  $A_{B1}$ . Til begge glasskvyttene ble det tilsatt 0,5 ml 0,25 % p-anisidinreagens. Prøven og blankprøven ble blandet ved å snu kvyttene opp ned 5 ganger. Etter 10 minutters henstand i mørke ble absorpsjons målt på nytt, ved 350 nm, for begge kvyttene. Dette ga henholdsvis  $A_{S2}$  og  $A_{B2}$ . Anisidinverdi ble beregnet ved bruk av ligning 2.7.

$$\text{Anisidinverdi} = \frac{25 \times (1,2 \times (A_{S2} - A_{B2}) - (A_{S1} - A_{B1}))}{m} \quad \text{Ligning 2.7}$$

### 2.6.7 Total oksidasjonsverdi (TOTOX)

Den totale oksidasjonsverdien (TOTOX) ble beregnet ved bruk av ligning 2.8.

$$\text{TOTOX} = (2 \times PV) + AV \quad \text{Ligning 2.8}$$

TOTOX er et empirisk mål bestående av to parametere med ulik måleenhet. Til tross for dette er TOTOX en viktig kvalitetsparameter i industriell sammenheng, og kan reflekterer både den oksidative «historien» (AV) og den nåværende oksidative statusen (PV) til en olje [Shahidi et al. (2008)].

### 2.6.8 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning i lipid ble analysert ved gaskromatografi (Agilent 7890 GC System), tilkoblet en flammeioniseringsdetektor (GC-FID), Prosedyren inkluderte preanalytisk metylering av fettsyrer. En Agilent CP7713 kolonne (25 m × 250µm × 0,2 µm) ble benyttet. Injeksjonsvolum var 1,7 µl (pulsed splitless), med en temperatur på 250 °C.

Preanalytisk metylering av fettsyrer, ved bruk av  $\text{BF}_3$ -metanol som syrekatalysator, resulterer i en transesterifisering av fettsyrer til deres metylesterderivater. Dette frigjør fettsyrer som er bundet til triacylglyserol, og lipidets totale fettsyresammensetning kan derfor analyseres. Syrekatalysert transesterifisering av fettsyre er illustrert i figur 2-4.



ved 100 °C i 5 minutter. Igjen ble prøven avkjølt i romtemperatur, deretter tilsatt 1 ml heksan. Skrukork ble satt på kimaxrør, før prøven ble plassert på varmeblokk ved 100 °C i 1 minutt. Etter avkjøling i romtemperatur, ble prøven tilsatt 1 ml heksan og 2 ml mett saltløsning. Prøven ble blandet og sentrifugert i 3 minutter (906 × g, 20 °C). Toppfasen (heksanfasen) ble overført til et nytt kimaxrør ved bruk av pasteurpipette. Prøven ble igjen tilsatt 1 ml heksan, blandet og sentrifugert i 3 minutter (906 × g, 20 °C). Den resulterende toppfasen ble overført til samme kimaxrør som toppfasen fra forrige sentrifugering. Til slutt ble prøven tilsatt 2 ml heksan, blandet og sentrifugert i 3 minutter (906 × g, 20 °C). Den siste toppfasen ble overført til samme kimaxrør som de to forrige toppfasene. De samlede heksanfasene ble overført til prøverør for GC. GC-FID ble kjørt av Merethe Selnes ved SINTEF Fiskeri og havbruk etter program presentert i tabell 6.

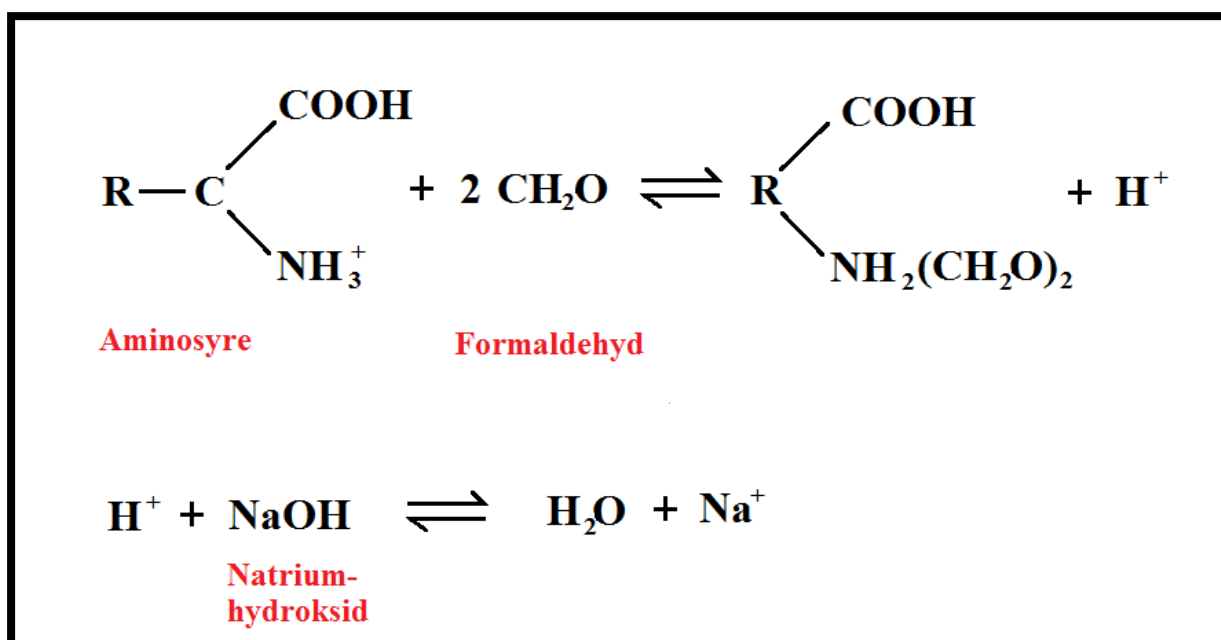
**Tabell 6:** GC-FID program brukt til analyse av fettsyresammensetning i lipid (Agilent 7890 GC System).

	Økningsrate (°C/min)	Temperatur (°C)	Holdetid (min)
<b>Starttemperatur</b>		80	1
<b>Økning 1</b>	25	180	8
<b>Økning 2</b>	2,5	205	2
<b>Økning 3</b>	2,5	215	5

### 2.6.9 Formoltitrering

Proteinenes hydrolysegrad i frysetørket prøve ble bestemt ved formoltitrering, som beskrevet av Taylor [Taylor (1957)].

Hydrolysegrad (DH) angir mengden kløyvet peptid i forhold til totalt nitrogeninnhold i en prøve, og er den mest brukte parameteren for å beskrive proteinhydrolyse [Kristinsson et al. (2000)]. Formaldehyd vil reagere med aminosyrenes aminogrupeer ( $\text{NH}_3^+$ ), noe som fører til at det avgis tilsvarende mengde proton ( $\text{H}^+$ ) til løsningen. Mengden frigitt proton, og dermed mengden frie aminogrupeer, estimeres ved å titrere løsningen med natriumhydroksid (NaOH). Reaksjonen er illustrert i figur 2-5.



**Figur 2-5:** Kjemiske reaksjoner involvert i formoltitrering. Aminogrupper ( $\text{NH}_3^+$ ) reagerer med formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) og avgir et proton ( $\text{H}^+$ ). En løsnings innhold av proton, og derfor av frie aminogrupper, kan estimeres ved å titrere med natriumhydroksid ( $\text{NaOH}$ ).

Prøvene ble analysert i 2-3 paralleller. Ca. 0,3 g frysetørket prøve ble veid inn i begerglass (100 ml). Deretter ble det tilsatt destillert vann til en totalvekt på ca. 50 g. Løsningens pH ble justert til 7,0, målt pH-meter, ved bruk av 0,1 M NaOH. Justering av pH ble utført under omrøring på magnetrører. Prøven ble tilsatt 10 ml formaldehyd (ca. 37%, justert til pH=8,5 med NaOH), etterfulgt av henstand i 5 minutter. Til slutt ble prøven plassert tilbake på magnetrører, og titrert med 0,1 M NaOH til pH = 8,5. Forbruk av NaOH (ml) ble notert med 2 desimalers nøyaktighet. Prøvens innhold av frie aminogrupper (%) ble beregnet ved bruk av ligning 2.9.

$$\text{Frie aminogrupper (\%)} = \frac{A \times B \times 14,007 \times 100}{C \times 1000} \qquad \text{Ligning 2.9}$$

Hvor A = forbruk NaOH (ml), B = konsentrasjon NaOH (M) og C = mengde prøve (g).

Prøvens hydrolysegrad (%) ble beregnet ved bruk av ligning 2.10.

$$\text{Hydrolysegrad (\%)} = \frac{D \times 100}{E} \qquad \text{Ligning 2.10}$$

Hvor D = prøvens innhold av frie aminogrupper (%) og E = prøvens innhold av nitrogen (%) beregnet ved CN-analyse.

### 2.6.10 Innhold og sammensetning av frie aminosyrer

Innhold og sammensetning av frie aminosyrer i frysetørket prøve ble bestemt ved Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), etter utfelling av proteiner med sulfosalicylsyre, som beskrevet av Osnes et al. [Osnes et al. (1985)]. Revers-fase UHPLC (Dionex UltiMate® 3000 UHPLC<sup>+</sup> focused, Dionex UltiMate® 3000 Autosampler, Dionex RF Fluorescence Detector, Thermo Scientific, USA), inkludert prekolonne-derivatisering av aminosyrer med o-phthaldialdehyd, og Nova-Pak kolonne (Nova-Pak® C18 4 µm) ble benyttet i analysen.

Bruk av HPLC til å analysere aminosyresammensetning baserer seg på separasjon av aminosyrer som et resultat av ulik affinitet for den stasjonære fasen (kolonnen). I revers-fase HPLC er den mobile fasen polar og kolonnen upolar. Dette vil påvirke retensjonstiden for en gitt aminosyre. En detektor registrerer retensjonstid og kvantitet, presentert i form av et kromatogram. Derivater av aminosyrer og o-phthaldialdehyd vil fluorisere, og slik kunne registreres av detektor (438 nm). Ved sammenligning med aminosyrestandard, og løsning med kjent konsentrasjon, kan en aminosyre identifiseres og kvantifiseres.

Prøvene ble analysert i 2 paralleller. 25 mg frysetørket prøve ble veid inn og løst i 2,5 ml destillert vann. 1 ml løsning ble overført til eppendorfrør og tilsatt 0,25 ml 10% sulfosalicylsyre (2-hydrokxy-5-sulfobenzosyre), deretter blandet. Prøven ble satt i kjøleskap (4°C) i 30 minutter, deretter sentrifugert i 10 minutter (2000 × g, 20 °C). For å teste om alt proteinet var utfelt, ble 0,5 ml av supernatant overført til et nytt eppendorfrør og tilsatt 0,125 ml 10% sulfosalicylsyre. Prøven ble blandet, satt i kjøleskap og sentrifugert som beskrevet over. Prøven ble fortynnet i forholdet 1 : 50 og 1 : 100, deretter filtret gjennom filter med porestørrelse 0,20 µm (Whatman). 0,205 ml løsning ble overført til prøveglass. HPLC ble kjørt av Siri Stavrum ved Institutt for bioteknologi. Det ble bestemt en felles konsentrasjon for glysin og arginin, grunnet sammenfallende topper på kromatogram.

### 2.6.11 Molvektsfordeling

Molvektsfordelingen til peptider i frysetørket prøve ble analysert ved bruk av High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Prøvene ble analysert på Hitachi HPLC med Superdex® peptide 10/300 kolonne. Retensjonstid ble detektert med UV-detektor (220 nm).

Hydrolyse av proteiner vil gi et produkt med peptider av ulik størrelse. Molvektsfordelingen til peptidene vil påvirke produktets sensoriske og funksjonelle egenskaper, og det er derfor av interesse å bestemme denne parameteren ved HPLC. Peptider av ulik kjedelengde i den

mobile fasen vil ha ulik affinitet for den stasjonære fasen (kolonne), og slik kunne separeres basert på molvekt. I en Superdex® peptide 10/300 kolonne, som benyttet i denne oppgaven, vil store peptider ha kortest retensjonstid. Ved å sammenligne med ulike standarder av kjent molvekt, kan innholdet av peptid i et gitt vektintervall bestemmes. Resultatet av analysen vil være et kromatogram med absorbans som funksjon av retensjonstid.

Prøvene ble analysert i 2 paralleller. Frysetørket prøve ble løst i vann til en konsentrasjon på ca. 10 mg/ml. Deretter ble prøven fortynnet med vann (1 : 10) til en endelig konsentrasjon på 1 mg/ml. Prøven ble kjørt isokratisk med 30 % acetonitril/0,1 % TFA i vann (mobil fase), ved en hastighet på 0.3 ml/min og romtemperatur. Prøvens injeksjonsvolum var 20 µl. Cytokrom C (12327 Da), aprotinin (6511 Da), insulin A (2532 Da), leucin enkephalin (555,6 Da), Val-Tyr-Val (379,5 Da) og Gly-Tyr (238,2 Da) ble brukt som standarder. Standardenes regresjonslinje var  $R^2 = 0,960$ . Integrering av kromatogram ble utført manuelt. Molvekt ble fordelt over 11 intervaller: <200 Da, 200-500 Da, 500-1000 Da, 1000-2000 Da, 2000-4000 Da, 4000-6000 Da, 6000-8000 Da, 8000-10000 Da, 10000-15000 Da, 15000-20000 Da og >20000 Da. Analysen ble utført i sin helhet av Jannicke Fugledal Remme ved SINTEF Fiskeri og havbruk.

### 2.6.12 Fordøyelighet

Fordøyelighet av pepsin på avfettet og tørket prøve ble analysert som beskrevet i AOAC 971.09 [AOAC (1990)].

Kvaliteten på en proteinkilde bestemmes i hovedsak av aminosyresammensetning og fordøyelighet. Det finnes ulike måter å måle fordøyelighet på. Biologiske metoder, som involverer testdyr, måler fordøyelighet in vivo basert på nitrogenretensjon i dyr som fores med en proteinrik diett. Slike metoder er kostbare og tidkrevende. Ved bruk av enzymatiske metoder, som involverer tilsetning av animalske fordøyelsesenzymmer, kan fordøyelighet studeres in vitro [Damodaran et al. (2008)]. En slik prosess vil simulere fordøyelsen av proteiner i fordøyelsessystemet til levende organismer. Enzymatiske metoder muliggjør derfor analyse av fordøyelighet på en effektiv og økonomisk måte. For at en proteinkilde skal ha god kvalitet, bør fordøyelighet tilsvare fordøyeligheten på eggehvite (albumin) eller melkeprotein (kasein).

Prøvene ble avfettet på forhånd. Basert på fett ekstraksjon i Bligh & Dyers makrometode [Bligh et al. (1959)], ble en blanding av metanol og kloroform (1 : 1) benyttet. 20 g prøve ble veid inn i sentrifugekopp, deretter tilsatt 10 ml metanol og 10 ml kloroform. Prøven ble ristet

og sentrifugert i 5 minutter ( $2000 \times g$ ,  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Metanol- og kloroformfasen ble fjernet fra prøven ved dekantering og bruk av pasteurpipette. Prøven fikk avdampe i romtemperatur over natten.

Prøvene ble analysert i 2 paralleller, og kasein ble brukt som referanseprotein. Pepsinløsning ble tillaget ved å fortynne 6,1 ml saltsyre (HCl) til 1 L med destillert vann. Løsningen ble oppvarmet til  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , deretter tilsatt 2,0 g pepsin. Det ble rørt forsiktig i løsningen til pepsin var fullstendig oppløst. Ca. 0,5 g avfettet prøve ble veid inn i 50 ml sentrifugerør. Det ble tilsatt 20 ml pepsinløsning, og fordøyelse ble utført i varmeskap ved  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  i 16 timer. Etter avkjøling til romtemperatur (1 time), ble prøven sentrifugert i 20 minutter ( $2000 \times g$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Den flytende fasen ble fjernet ved dekantering. Prøven ble tilsatt 10 ml vann og ristet for hånd, deretter sentrifugert i ytterligere 20 minutter ( $2000 \times g$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Den flytende fasen ble igjen fjernet ved dekantering, samt bruk av pasteurpipette. Prøven ble tørket ved  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  over natten. Etter avkjøling ble prøven veid på nytt, og fordøyelighet (%) ble beregnet ved bruk av ligning 2.11.

$$\text{Fordøyelighet (\%)} = \frac{\text{Prøvens vekt (g)} - \text{Vekt etter tørking (g)}}{\text{Prøvens vekt (g)}} \times 100 \quad \text{Ligning 2.11}$$

### 2.6.13 Statistiske analyser og beregninger

Statistiske analyser ble utført i programvare Microsoft Excel (Microsoft Office 2016). Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt av [n] antall paralleller. Verdiene ble antatt å være uavhengige og normalfordelte, og standardavvik (SD) er derfor oppgitt som mål på verdienes spredning. Standardavvik ble bestemt ved formel STDAV.P (standardavvik for populasjon). Signifikante forskjeller mellom verdiene ble bestemt ved bruk av ligning 2.12.

$$\frac{\text{Verdi 1} - \text{Verdi 2}}{\sqrt{\text{STD1}^2 + \text{STD2}^2}} \quad \text{Ligning 2.12}$$

Grensen for signifikans ble satt til  $p = 0,05$ . En forskjell større enn 1,96 i ligning 2.12 vil bety at prøven avviker fra normalfordelingen med mer enn to standardavvik. Ved et signifikansnivå på  $p = 0,05$  kan det konkluderes med at prøvene er signifikant forskjellige, da det er 95% sannsynlighet for at avviket ikke skyldes en tilfeldighet.

Utbytte av olje og protein i de ulike fraksjonene, fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns, ble beregnet ved bruk av ligning 2.13.

$$\text{Utbytte (\%)} = \frac{\text{Innhold}_{\text{fraksjon}} \times \text{Vekt}_{\text{fraksjon}}}{\text{Innhold}_{\text{råstoff}} \times \text{Vekt}_{\text{råstoff}}} \quad \text{Ligning 2.13}$$



Alle beregninger av massebalanse baserer seg på utregning av totalt tørrstoffutbytte ved bruk av ligning 2.14.

$$\begin{aligned} & Vekt_{råstoff} \times Tørrstoff (\%)_{råstoff} = \\ & (Vekt_{oljefraksjon} \times Tørrstoff (\%)_{oljefraksjon}) \\ & + (Vekt_{vannløselig\ fraksjon} \times Tørrstoff (\%)_{vannløselig\ fraksjon}) \\ & + (Vekt_{uløselig\ fraksjon} \times Tørrstoff (\%)_{uløselig\ fraksjon}) \end{aligned} \qquad \text{Ligning 2.14}$$

### 3 Resultat og diskusjon

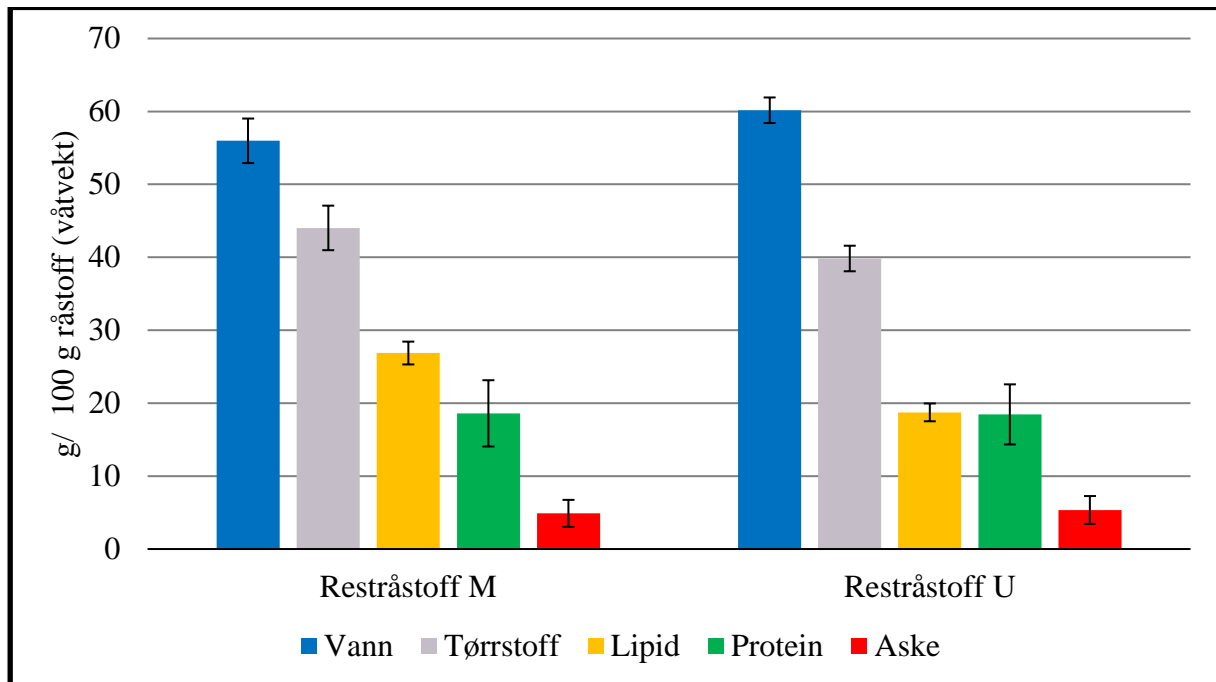
I denne oppgaven ble varmebehandling (termisk, T), enzymatisk hydrolyse (H) og ensilering (E) utført på to ulike restråstoff fra verpehøns. Det ene restråstoffet bestod av kvernede verpehøns med innmat, hode og fjær (restråstoff M). Det andre restråstoffet bestod av kvernede verpehøns uten innmat, hode og fjær (restråstoff U). Målet med prosesseringen var å utvinne lipider og proteiner med høy kvalitet fra restråstoff M og restråstoff U. Restråstoffet fordelte seg i tre fraksjoner ved prosessering: oljefraksjon, vannløselig fraksjon og uløselig fraksjon.

Restråstoffenes sammensetning, samt produktenes sammensetning og kvalitet, ble analysert. Oljefraksjonens sammensetning og kvalitet ble vurdert basert på innhold av frie fettsyrer, oksidativ status og fettsyresammensetning. Den vannløselige fraksjonens sammensetning og kvalitet ble vurdert basert på farge, lipidinnhold, proteininnhold, proteinenes hydrolysegrad, innhold og sammensetning av frie aminosyrer, samt peptidenes molvektfordeling. Den uløselige fraksjonens kvalitet ble vurdert basert på fordøyelighet.

Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt av [n] antall paralleller, og standardavvik (SD) er oppgitt som mål på verdienes spredning. Grunnlagsdata fra enkelte analyser var for omfattende til å bli presentert som en del av oppgaven, men de viktigste er inkludert under resultater eller i vedlegg.

### 3.1 Restråstoffets sammensetning

For å kunne vurdere effektiviteten av en prosessering basert på utbytte, er det nødvendig å karakterisere restråstoffet. Restråstoffets sammensetning ble bestemt ved analyse av aske-, tørrstoff-, lipid- og proteininnhold. Sammensetningen til restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-1. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg A, tabell 1A.



**Figur 3-1:** Restråstoffets sammensetning for hel høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) og hel høne uten innmat (restråstoff U). Innhold av vann, tørrstoff, lipid, protein og aske er oppgitt i g/ 100 g råstoff (våtvekt) (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 3-4).

Det ble funnet et høyere lipidinnhold i restråstoff M ( $26,9 \pm 1,6$  %), sammenlignet med restråstoff U ( $18,7 \pm 1,2$  %). Dette tyder på at innmat fra verpehøns har et høyt lipidinnhold sammenlignet med resterende komponentene fra hønsekroppen. Antagelsen støttes av upubliserte data, fra analyser ved SINTEF Fiskeri og havbruk, som fant et lipidinnhold på 30 % i innmat fra verpehøns. Også i litteraturen er det antatt at en stor del av fuglers totale lipidinnhold befinner seg i innmaten [Nir et al. (1988), - ikke sett, sitert etter Sturkie (2015)]. Tørrstoffinnholdet i restråstoff M ( $44,0 \pm 3,1$  %) var høyere enn tørrstoffinnholdet i restråstoff U ( $39,8 \pm 1,8$  %). Dette reflekterer forskjellene i lipidinnhold, da restråstoffenes proteininnhold var omtrent likt (restråstoff M:  $18,6 \pm 4,5$  %, restråstoff U:  $18,5 \pm 4,1$  %).

Det ble funnet et høyere askeinnhold i restråstoff U ( $5,4 \pm 1,9$  %), sammenlignet med restråstoff M ( $4,9 \pm 1,9$  %). Dette er trolig et resultat av at bein utgjør en større andel av restråstoff U enn med restråstoff M.

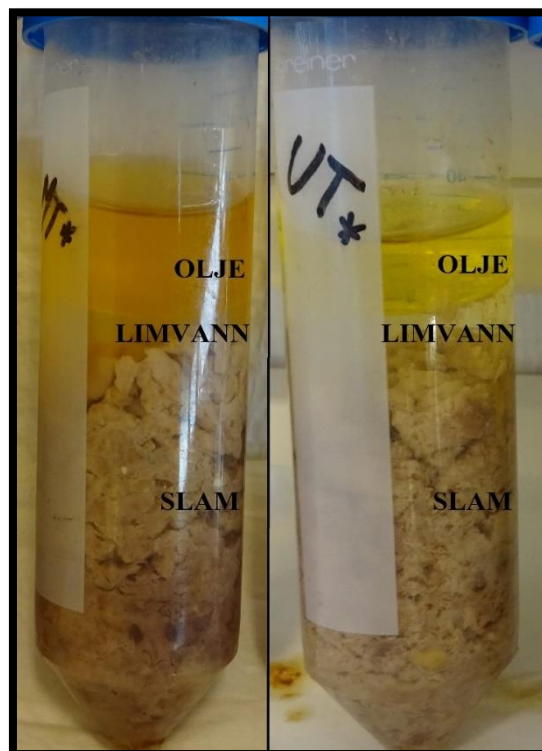
Standardavvikene var relativt høye i flere av analysene. Dette skyldes trolig at restråstoffmassen ikke var tilstrekkelig homogen. Etter kverning inneholdt restråstoffet forholdsvis store partikler, noe som kan observeres ved å se på bildet av de to restråstoffene i figur 2-1.

## 3.2 Massebalanse

Målet med prosesseringen av restråstoffet var å utvinne lipid og løselig protein med høy kvalitet. Lipid og protein er hovedkomponentene i restråstoffets tørrstoff, som vil fordele seg i ulike fraksjoner ved prosessering. Hvor stor andel av det totale tørrstoffet som havner i en gitt fraksjon (tørrstoffutbyttet), kan derfor gi en indikasjon på fraksjonens innhold lipid og protein. I denne sammenheng er massebalanse et nyttig verktøy, som kan gi et bilde på separasjonsgraden. Massebalanse av tørrstoffet ble beregnet for prøver fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns. Alle beregninger baserer seg på bruk av ligning 2.14 (avsnitt 2.6.13).

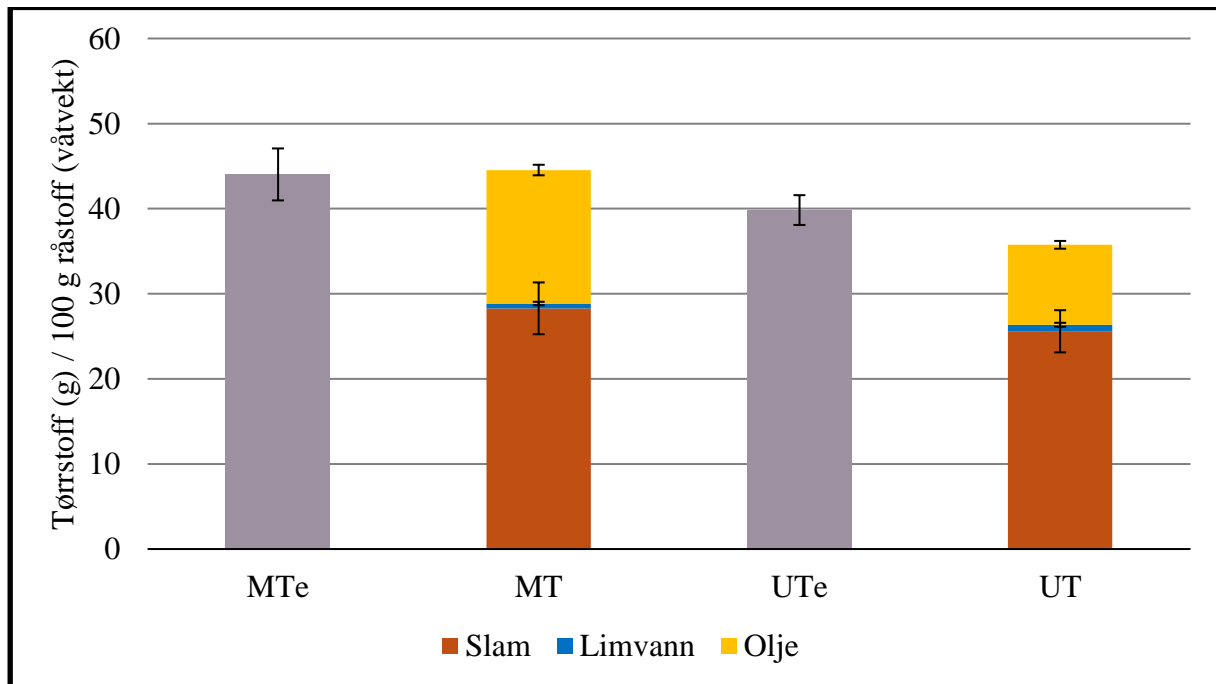
### 3.2.1 Varmebehandling

Varmebehandling av restråstoff M (MT) og restråstoff U (UT) genererte tre fraksjoner: olje, limvann (vannløselig fraksjon) og slam (uløselig fraksjon). Oljefraksjonen var gul, med en mørkere fargetone i olje fra restråstoff M enn restråstoff U. Limvannet var klart og lite viskøst, mens slammet var fast og grålig rosa. Sentrifugerør etter varmebehandling (MT og UT) er avbildet i figur 3-2.



**Figur 3-2:** Sentrifugerør etter varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT). Bildene er tatt etter sentrifugering. Rør til venstre representerer én parallell av MT. Rør til høyre representerer én parallell av UT. De ulike fraksjonene, olje, limvann og slam, er markert.

Hver fraksjon ble veid, og innhold av tørrstoff ble bestemt ved gravimetrisk analyse. Tørrstoffutbyttet (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i de ulike fraksjonene er presentert i figur 3-3. Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på tørrstoffinnhold i restråstoff M og restråstoff U, er også inkludert i figuren som henholdsvis MTe og UTe. Grunnlagsdata, med de ulike fraksjonenes størrelse (g) og tørrstoffinnhold (%), samt beregning av massebalanse, er gitt i vedlegg B, tabell 1B.



**Figur 3-3:** Tørrstoffutbytte (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i olje, limvann og slam fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 10$ ). Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på restråstoffenes tørrstoffinnhold, er presentert som henholdsvis MTe og UTe (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 4$ ).

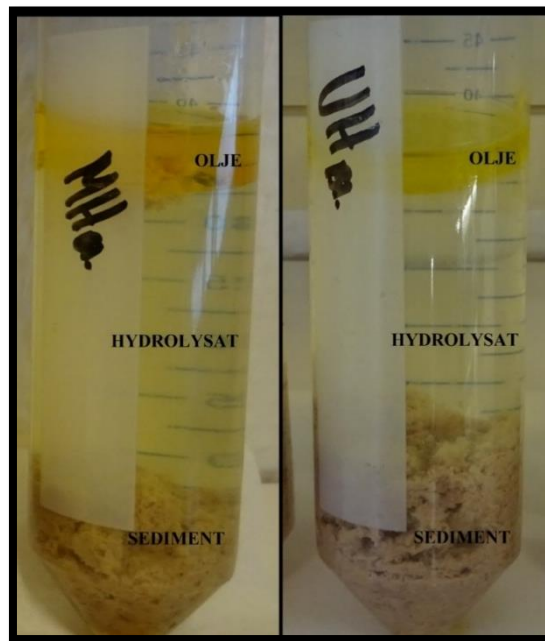
Hovedmålet med varmebehandling av restråstoffet var å separere olje fra protein. For å få en best mulig oljeseparasjon må oljeutbyttet i oljefraksjonen maksimeres, mens oljeutbytte i de andre fraksjonene må minimeres. Varmebehandling av restråstoff M resulterte i en større oljefraksjon sammenlignet med restråstoff U. Dette var forventet da restråstoff M hadde et høyere lipidinnhold enn restråstoff U (avsnitt 3.1). Tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen fra MT og UT var henholdsvis  $15,7 \pm 0,6$  g/ 100 g råstoff og  $9,4 \pm 0,5$  g/ 100 g råstoff. Det ble antatt at olje utgjorde 100 % av tørrstoffet i oljefraksjonen, og tørrstoffutbyttet vil derfor tilsvare oljeutbyttet. En økning i oljeutbyttet betyr at en større andel av restråstoffets lipidinnhold har havnet i oljefraksjonen, noe som medfører en økt grad av oljeseparasjon. Tørrstoffutbyttet, og derfor oljeutbyttet, i oljefraksjonen tilsvarte en oljeseparasjon på 58,4 % (MT) og 50,1 % (UT) av restråstoffets lipidinnhold.

Limvannsfraksjonen hadde et relativt høyt tørrstoffinnhold ( $4,2 \pm 0,3$  -  $4,7 \pm 0,1$  %), sammenlignet med tørrstoffinnholdet i hydrolysat fra autolytisk hydrolyse ( $1,4 \pm 0,1$  %). Totalvekten (g) på limvannet var derimot lav. Dette resulterte i et lavt tørrstoffutbytte i limvann fra både MT og UT, på henholdsvis  $0,6 \pm 0,2$  g/ 100 g råstoff og  $0,8 \pm 0,2$  g/ 100 g råstoff. Slamfraksjonen hadde det største tørrstoffutbyttet, på  $28,3 \pm 3,0$  g/ 100 g råstoff (MT) og  $25,6 \pm 2,5$  g/ 100 g råstoff (UT), noe som tilsvarer omtrent 64 % av restråstoffets tørrstoffinnhold. Det lave tørrstoffutbyttet i limvann, og det høye tørrstoffutbyttet i slam, tyder på at lite protein ble løseliggjort ved denne prosesseringsmetoden. Graden av proteinhydrolyse ved varmebehandling er svært avhengig av prosesseringsfaktorene tid og temperatur [Torreggiani et al. (2008), - ikke sett, sitert etter Cui et al. (2009)]. I denne oppgaven ble varmebehandlingen utført ved 100 °C. En så høy temperatur vil denaturere proteinene i restråstoffet. Denatureringen resulterer i en utfolding av proteinenes tredimensjonale struktur, og dermed en eksponering av hydrofobe grupper. Disse kan igjen interagere, noe som vil føre til utfelling [Damodaran et al. (2008)]. Denaturering av endogene enzymer vil gjøre dem inaktive. Det var derfor ikke forventet at endogen proteaseaktivitet ville bidra til å løseliggjøre proteinene i restråstoffet ved varmebehandlingen. Når restråstoffets proteiner denatureres og utfelles, vil de dessuten være mer motstandsdyktige mot endogen enzymaktivitet. Dette er et resultat av at peptidbindingene blir mer utilgjengelige for proteasene [Mohr (1977), - ikke sett, sitert etter Šližytė et al. (2005a)]. Utfelte proteiner vil befinne seg i slammet, og dermed bidra til å øke denne fraksjonens tørrstoffinnhold. Slammet hadde lav fordøyelighet (avsnitt 3.5.1), og vil derfor ha begrenset bruksområde. En optimal utnyttelse av utrangerte verpehøns vil innebære å utvinne så mye som mulig av de høyverdige ingrediensene fra restråstoffet. Per dags dato behandles utrangerte verpehøns som avfall, og en bedre utnyttelse restråstoffet vil derfor gi en reduksjon av avfallet generert av eggeproduksjonsindustrien. Hvis slamfraksjonen ikke kan brukes, vil den totale avfallsreduksjonen være relativt lav ved varmebehandling. Avfallsreduksjonen burde muligens vært høyere om det skal lønne seg, økonomisk så vel som for miljøet, å anvende varmebehandling for utnyttelse av restråstoff fra verpehøns.

I henhold til ligning 2.14 skal summen av tørrstoffutbyttet i de ulike fraksjonene tilsvare det totale tørrstoffinnholdet i restråstoffet (teoretisk tørrstoffutbytte). For noen av prøvene overskred summen av fraksjonenes tørrstoffutbytte det teoretiske tørrstoffutbyttet. Dette skyldes trolig usikkerheten i analyser og beregninger. Et lavere tørrstoffutbytte kan i tillegg skyldes tap av materiale ved prosessering og manuell separasjon.

### 3.2.2 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) og restråstoff U (UH) genererte i hovedsak tre fraksjoner: olje, hønseproteinhydrolysat (HPH, vannløselig fraksjon) og sediment (uløselig fraksjon). I noen av prøvene ble det i tillegg observert en emulsjon ( $\leq 4,8$  g). Emulsjonsfraksjonen ble ikke inkludert i beregninger av massebalanse og videre analyser grunnet utilstrekkelig materiale. Oljefraksjonen var gul, med en litt mørkere farge på oljer fra MH enn UH. HPH var klart, med varierende viskositet. Den varierende viskositeten skyldes trolig varierende tørrstoffinnhold, da viskositeten til de fleste proteinløsninger øker eksponentielt med proteinkonsentrasjon [Damodaran et al. (2008)]. I tillegg kan peptidstørrelse påvirke viskositet. Sedimentfraksjonen var liten og kompakt, med farger som varierte i toner av grå og brun. Sentrifugerør etter enzymatisk hydrolyse ved bruk av endogene enzymer (autolytisk hydrolyse, MHBl og UHBl) er avbildet figur 3-4.

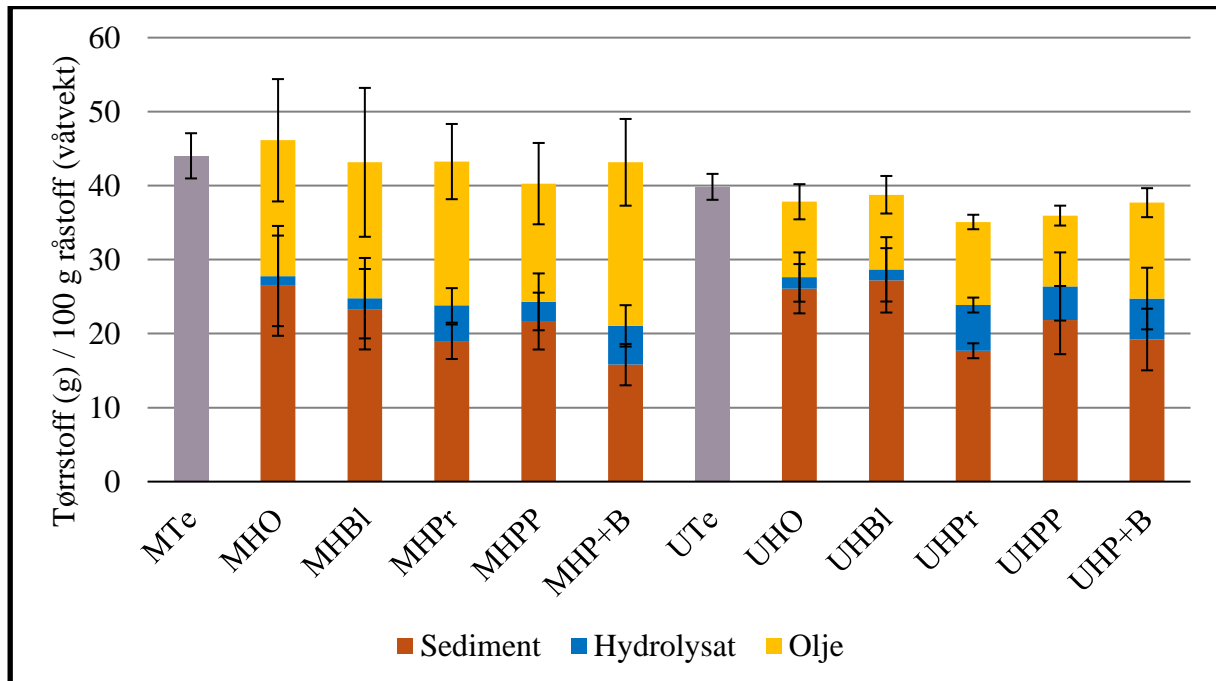


**Figur 3-4:** Sentrifugerør etter enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) med endogene enzym (Bl). Bildene er tatt etter sentrifugering. Rør til venstre representerer én parallell av MHBl. Rør til høyre representerer én parallell av UHBl. De ulike fraksjonene, olje, hønseproteinhydrolysat (HPH) og sediment, er markert.

Hver fraksjon ble veid, og innhold av tørrstoff ble bestemt ved gravimetrisk analyse. Tørrstoffutbyttet (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i de ulike fraksjonene, fra hver behandling, er presentert i figur 3-5. Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på tørrstoffinnhold i restråstoff M og restråstoff U, er også inkludert i figuren som henholdsvis MTe og UTe. Grunnlagsdata, med de ulike fraksjonenes størrelse (g) og tørrstoffinnhold (%), samt beregning av massebalanse



for enzymatisk hydrolyse av restråstoff M, er gitt i vedlegg B, tabell 2B. Tilsvarende grunnlagsdata for restråstoff U er gitt i vedlegg B, tabell 3B.



**Figur 3-5:** Tørrstoffutbytte (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i olje, hønsproteinhydrolysat (HPH) og sediment fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 10$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på restråstoffenes tørrstoffinnhold, er presentert som henholdsvis MTe og UTe (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 4$ ).

Hovedproduktet av enzymatiske hydrolyse er et proteinhydrolysat som inneholder de vannløselige proteinene fra restråstoffet [Adler-Nissen (1986)]. Ideelt sett bør hydrolysatet ha et høyt proteininnhold og et lavest mulig lipidinnhold. Det er derfor ønskelig å maksimere proteinutbyttet i denne fraksjonen. I enzymatisk hydrolyse, som i varmebehandling, er det ønskelig med en god oljeseparasjon. Emulsjon- og sedimentfraksjonen bør derimot være så liten som mulig [Šližytė et al. (2005a)].

Ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff U resulterte tilsetning av alle kommersielle enzymer (UHPPr, UHPP, UHP+B) i et signifikant høyere tørrstoffutbytte i HPH ( $4,5 \pm 1,2 - 6,2 \pm 0,6$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (UHBl,  $1,5 \pm 0,2$  g/ 100 g råstoff). For restråstoff M resulterte tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain (MHPPr, MHP+B) i et signifikant høyere tørrstoffutbytte i HPH ( $4,9 \pm 0,4 - 5,2 \pm 0,5$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (MHBl,  $1,5 \pm 0,2$  g/ 100 g råstoff). Dette indikerer at

tilsetning av eksogene proteaser er effektivt for å maksimere tørrstoffutbyttet i HPH, og derfor øke innholdet av løste proteiner.

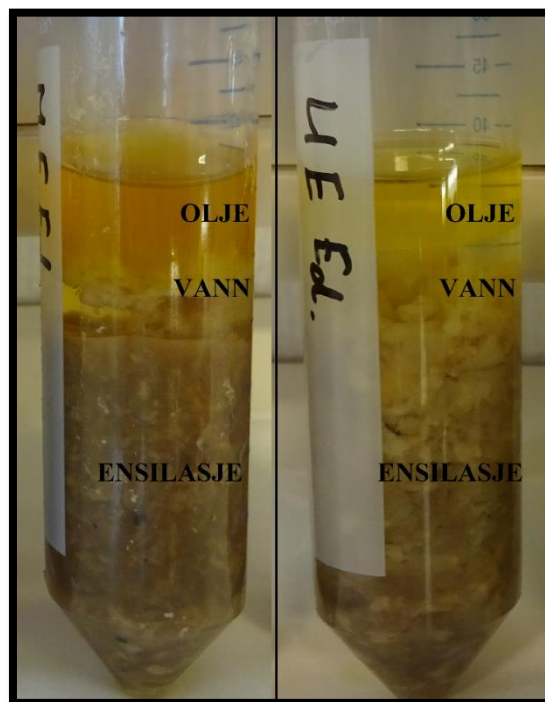
Det ble ikke funnet en signifikant forskjell mellom tørrstoffutbyttet i HPH fra nullprøver (MHO, UHO) og HPH fra autolytisk hydrolyse (MHBl, UHBl). Tørrstoffutbyttet i HPH fra autolytisk hydrolyse var i tillegg lavt, som nevnt over. Dette indikerer at endogene enzymer er lite aktive i å løseliggjøre proteiner i hydrolyseprosessen. Innmat fra kylling antas å ha et høyt innhold av endogene proteaser, med størst aktivitet ved pH = 2,5 og minst aktivitet ved pH = 6,5-7,0 [Jamdar et al. (2005)]. Dette vil medføre lav endogen enzymaktivitet under de fysiologiske pH-betingelsene ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (pH = 5,8) og restråstoff U (pH = 5,5). Resultatene er i overenstemmelse med funn av lav endogen proteaseaktivitet i råmaterialet, samt lavt tørrstoffutbytte i hydrolysat, ved autolytisk hydrolyse av mekanisk utbeinet kylling [Tveit (2014)]. Den lave enzymaktiviteten kan også skyldes temperaturforholdene ved hydrolysen (50 °C), som kan ha denaturert og inaktivert de endogene enzymene [Coulate (2009)]. Endogene enzymer er derimot aktive, under de samme temperatur- og pH-betingelsene som kommersielle enzymer, ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra torsk (*Gadus morhua*) [Šližytė et al. (2005a), Sovik et al. (2005b)]. Den lave endogene enzymaktiviteten i restråstoff fra verpehøns vil trolig gjøre det lettere å oppnå en kontrollert hydrolyseprosess, uten å måtte inaktivere endogene enzymer. Å unngå initiell varmeinaktivering er gunstig, da høye temperaturer kan denaturere proteiner og gjøre dem resistente mot enzymatisk nedbrytning [Damodaran et al. (2008), Cui et al. (2009)]. I tillegg vil det være økonomisk gunstig å unngå varmeinaktivering av endogene enzymer, da kostnaden på en gitt prosessering vil øke med antall prosesseringstrinn [Kristinsson et al. (2000)].

Oljefraksjonene fra MH var generelt større (g) enn oljefraksjonene fra UH. Dette var forventet, da restråstoff M hadde et høyere lipidinnhold enn restråstoff U (avsnitt 3.1). Et høyere lipidinnhold i restråstoffet har vist seg å øke størrelsen på oljefraksjonen ved enzymatisk hydrolyse [Šližytė et al. (2005b)]. Tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen varierte fra  $16,0 \pm 5,5 - 22,1 \pm 5,9$  g/ 100g råstoff (MH) og  $9,6 \pm 1,3 - 13,0 \pm 2,0$  g/ 100 g råstoff (UH), noe som tilsvarer en oljeseparasjon på henholdsvis 59,4–82,3 % og 51,1–69,1 % av restråstoffets lipidinnhold. Dette er i samsvar med en oppnådd oljeseparasjon på 62,2–71,2 % ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra kylling [Tveit (2014)]. Enzymatisk hydrolyse gir altså en tilsvarende, eller bedre, oljeseparasjon sammenlignet med varmebehandling. Tilsetning av Papain + Bromelain ga den beste oljeseparasjonen for begge restråstoff, mens

tilsetningen av Corolase PP ga den dårligste. Forskjellen var ikke signifikant. En kombinasjon av Papain og Bromelain har vist seg å gi god oljeseparasjon også i andre studier [Šližytė et al. (2014), Tveit (2014)]. Når tilsetning av Corolase PP ga en dårligere oljeseparasjon, betyr dette at en større andel av restråstoffets lipidinnhold har fordelt seg i de andre fraksjonene fra prosesseringen. I denne sammenheng er det verdt å poengtere at samme behandling ga en mer distinkt emulsjon, sammenlignet med tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain. Lipid i emulsjon og HPH er et uønsket utfall av den enzymatiske hydrolysen. Resultatene indikerer derfor at Corolase PP er uegnet som tilsetning ved enzymatisk hydrolyse restråstoff fra verpehøns.

### 3.2.3 Ensilering

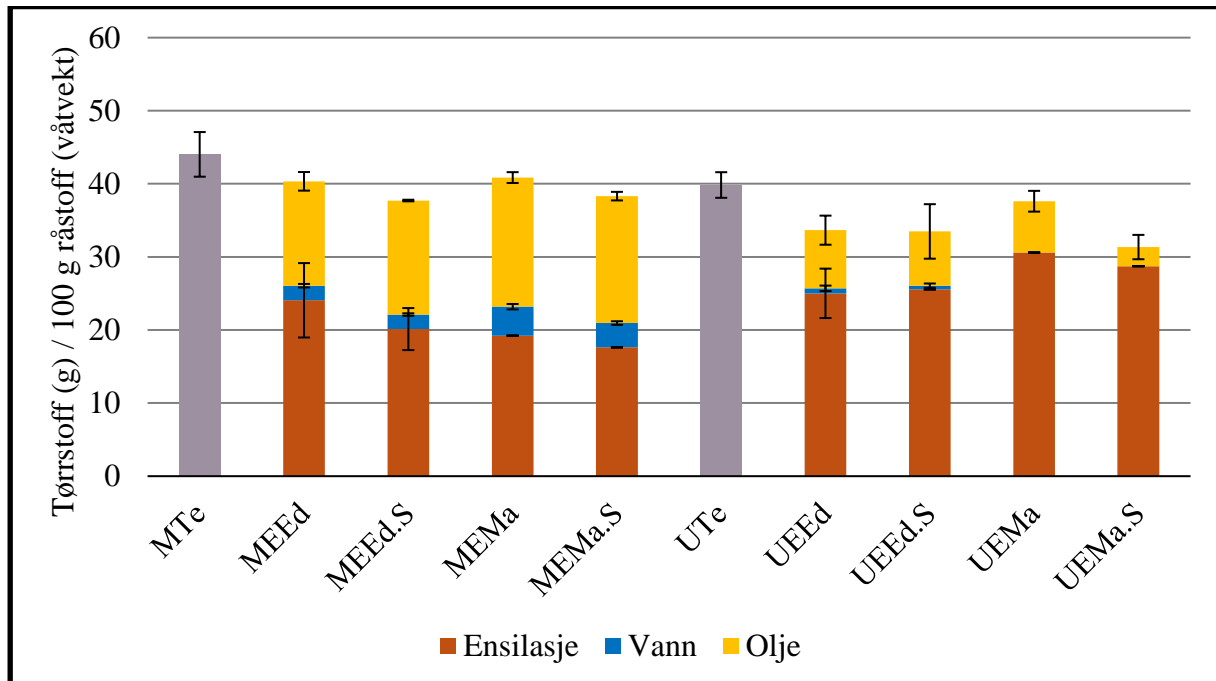
Ensilering av restråstoff M (ME) og restråstoff U (UE) genererte i hovedsak en oljefraksjon og en viskøs, flytende masse (ensilasje). I noen av prøvene ble det også observert en liten vannløselig fraksjon. Oljefraksjonen var mørkegul, med en litt lysere farge fra UE enn ME. Den vannløselige fraksjonen var uklar og viskøs. Ensilasjen var seig, og mindre kompakt enn slam og sediment fra henholdsvis varmebehandling og enzymatisk hydrolyse. Den luktet i tillegg sterkt av syre. Sentrifugerør etter ensilering med eddiksyre (MEE<sub>d</sub> og UEEd) er avbildet i figur 3-6.



**Figur 3-6:** Sentrifugerør etter ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (ME) og hel høne uten innmat (UE) med eddiksyre (Ed). Bildene er tatt etter sentrifugering. Rør til venstre representerer én parallell av MEE<sub>d</sub>. Rør til høyre representerer én parallell av UEEd. De ulike fraksjonene, olje, vannløselig fraksjon (vann) og ensilasje, er markert.

Hver fraksjon ble veid, og innhold av tørrstoff ble bestemt ved gravimetrisk analyse. Tørrstoffutbyttet (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i de ulike fraksjonene, fra hver behandling, er presentert i figur 3-7. Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på tørrstoffinnhold i restråstoff M og restråstoff U, er også inkludert i figuren som henholdsvis MTe og UTe. Grunnlagsdata, med de ulike fraksjonenes størrelse (g) og tørrstoffinnhold (%), samt beregning av massebalanse for ensilering av restråstoff M, er gitt i vedlegg B, tabell 4B. Tilsvarende grunnlagsdata for restråstoff U er gitt i vedlegg B, tabell 5B. Der det var mulig å separere ut en vannløselig

fraksjon ble det bare tatt én felles tørrstoffprøve, og det foreligger derfor ikke standardavvik for disse verdiene i tabell 4B og 5B (markert \*).



**Figur 3-7:** Tørrstoffutbytte (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i olje, vannløselig fraksjon (vann) og ensilasje fra ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (ME) og hel høne uten innmat (UE) (gjennomsnitt ± SD, n = 5). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Teoretisk tørrstoffutbytte, basert på restråstoffenes tørrstoffinnhold, er presentert som henholdsvis MTe og UTe (gjennomsnitt ± SD, n = 4).

Ensilasjen er hovedproduktet av ensileringen, og kan brukes som proteinkilde i dyrefôr [New et al. (1995), - ikke sett, sitert etter Vieira et al. (2015)]. I motsetning til varmebehandling og enzymatisk hydrolyse, er det derfor ønskelig med et høyt tørrstoffutbytte i den «uløselige fraksjonen» (ensilasjen) ved ensilering. For ensilering, som for de to andre prosesseringsmetodene, er det ønskelig å oppnå en best mulig oljeseparasjon. Ved varmebehandling og enzymatisk hydrolyse vil god oljeseparasjon gi et produkt som kan brukes til humant konsum og dyrefôr. Ved ensilering vil oljefraksjonens bruksområde begrense seg til teknisk bruk, og ønsket om separasjon kommer av at oljen kan oksideres ved ensileringens lave pH [Tatterson et al. (1974)]. Oksiderte lipider i ensilasjen vil kunne forringe produktet, og dermed begrense bruksområdet.

Tørrstoffutbyttet i ensilasjen var generelt høyt, og varierte fra  $17,6 \pm 0,0$  –  $24,1 \pm 5,1$  g/ 100 g råstoff (ME) og  $25,0 \pm 3,4$  –  $30,6 \pm 0,0$  g/ 100 g råstoff (UE). Det ble ikke observert signifikante forskjeller mellom tørrstoffutbyttet i ensilasjen ved de fire ulike behandlingene. Dette indikerer at eddiksyre og maursyre er like effektive i produksjon av ensilasje med høyt

tørrstoffutbytte fra restråstoff fra verpehøns. Både protein- og lipidinnholdet i ensilasjen vil bidra til fraksjonens tørrstoffutbytte. Det er derfor viktig å ta hensyn til hvilken behandling som ga best oljeseparasjon.

Ensilering av restråstoff M ga en god oljeseparasjon (53,1 – 65,7 % av restråstoffets lipidinnhold) ved alle behandlinger. Maursyre ga et signifikant høyere tørrstoffutbytte i oljefraksjonen ( $17,4 \pm 0,6 - 17,7 \pm 0,7$  g/100 g råstoff), sammenlignet med eddiksyre ( $14,3 \pm 1,3 - 15,6 \pm 0,1$  g/ 100 g råstoff). For restråstoff U var oljeseparasjonen varierende ved de ulike behandlingene (14,0 – 42,5 % av restråstoffets lipidinnhold), men generelt lavere enn for restråstoff M. En mulig forklaring på dette er at restråstoff U, som ikke består av innmat, vil ha et lavere innhold av endogene fordøyelsesenzymmer (pepsin) aktive ved ensileringens pH [Rao et al. (1998)]. Restråstoffets innhold av endogene enzymer, og deres aktivitet ved en lav pH, er essensiell i ensileringsprosessen [Tatterson et al. (1974), Vieira et al. (2015)]. Endogen proteaseaktivitet vil øke graden av proteinhydrolyse. Dette vil igjen gi bedre oljeseparasjon og høyere grad av fordøyelighet på ensilasjen, hvilket er gunstig for produktet og dets bruksområde. Resultatene tyder derfor på at det vil være fordelaktig å inkludere innmat ved ensilering av restråstoff fra verpehøns. I denne sammenheng kan maursyre være bedre egnet enn eddiksyre, basert på oljeseparasjon.

Ensilasjen fra alle prøver hadde en sterk lukt av syre som opplevdes ubehagelig ved separering og videre analyser. Dette kan ha negative konsekvenser for bruksområdet til produktet, hovedsakelig som proteinkilde i dyrefôr [New et al. (1995), - ikke sett, sitert etter Vieira et al. (2015)]. Trolig vil det være nødvendig å behandle ensilasjen, for å fjerne lukt, før produktet kan bli anvendbart.

### 3.2.4 Oppsummering

Varmebehandling av restråstoff fra verpehøns ga god oljeseparasjon, men et lavt tørrstoffutbytte i limvann.

Enzymatisk hydrolyse resulterte i en god oljeseparasjon. Den endogene enzymaktiviteten var lav ved pH-betingelsene for den enzymatiske hydrolysen. Tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain ga et signifikant høyere tørrstoffutbytte i HPH, sammenlignet med autolytisk hydrolyse. Tilsetning av Corolase PP ga lavere tørrstoffutbytte i HPH, og dårligere oljeseparasjon, sammenlignet med Protamex og Papain + Bromelain.

Både eddiksyre og maursyre ga et høyt tørrstoffutbytte i ensilasjen ved ensilering. Ensilering av restråstoff M resulterte i en generelt bedre oljeseparasjon, sammenlignet med restråstoff U. Dette tyder på at endogene enzymer var aktive ved pH-betingelsene for ensileringen. Ved ensilering av restråstoff M, ga maursyre en bedre oljeseparasjon enn eddiksyre.

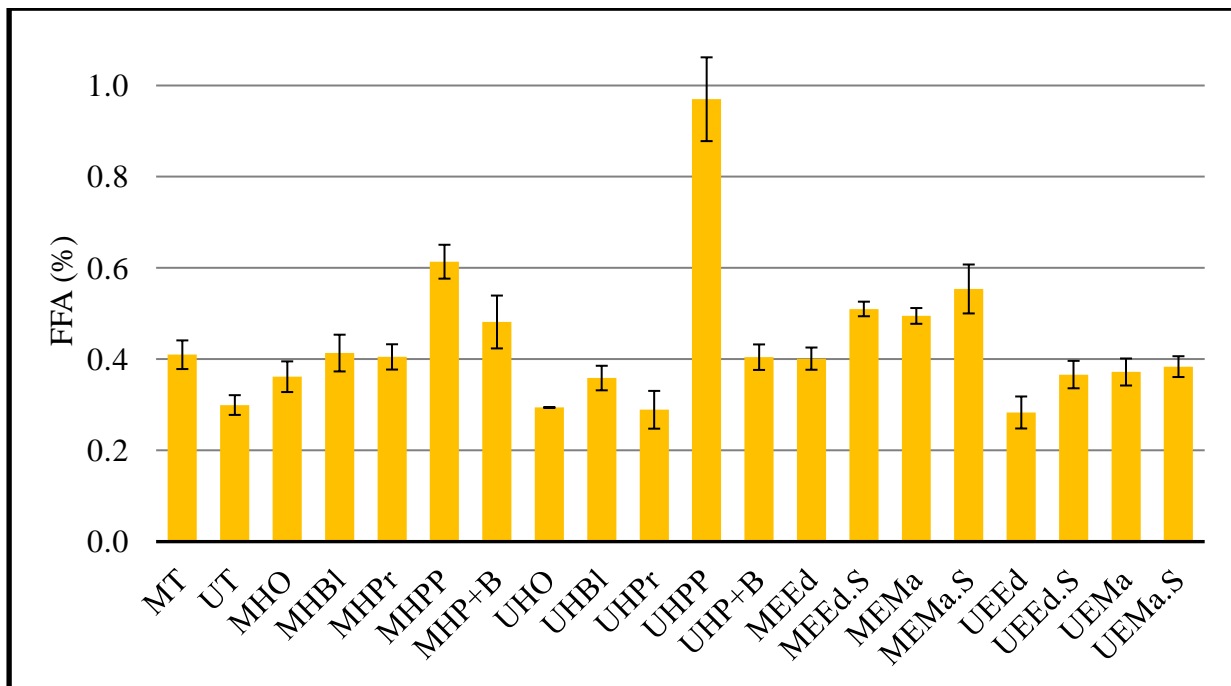
### 3.3 Oljefraksjon: kvalitet og sammensetning

Olje ble separert fra resten av komponentene i restråstoff fra verpehøns ved varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering. Oljens kvalitet og sammensetning vil påvirkes av kvaliteten på restråstoffet og prosesseringsparameterne. Hvis oljen skal kunne brukes som kosttilskudd, eller funksjonell ingrediens i matvarer ment for humant konsum, må den ha høy kvalitet. Oljer av høy kvalitet kjennetegnes ved et lavt innhold av frie fettsyrer, lav oksidativ status og høy stabilitet [Carvajal et al. (2015)]. Den separerte oljens kvalitet og sammensetning ble vurdert basert på innhold av frie fettsyrer, oksidativ status og fettsyresammensetning.

#### 3.3.1 Frie fettsyrer

En oljes innhold av frie fettsyrer (FFA) er et mål på frigjøringen av fettsyrer fra triacylglyseridene. FFA oksideres lettere enn fettsyrer bundet i triacylglyserol, og et høyt innhold av FFA vil derfor gjøre oljen mer utsatt for oksidasjon. Oksidasjon vil igjen forringe oljens kvalitet [Damodaran et al. (2008)]. For at oljen skal ha høy kvalitet bør innholdet av FFA derfor være lavere enn 4 % [Tatterson et al. (1974)]. FFA (%) i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-8. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg C, tabell 2C.





**Figur 3-8:** Innhold av frie fettsyrer (FFA, %) i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 4-8$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene ved enzymatisk hydrolyse: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene ved ensilering: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Standardkurve ble tillaget med oleinsyre (0-20  $\mu$ mol).

Det ble funnet et lavt innhold av FFA ( $\leq 1,0 \pm 0,1$  %) i alle oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns. Dette indikere en generelt lav endogen lipaseaktivitet i restråstoffet [Zanardi (2008)].

For oljer fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff U med Corolase PP (UHPP), ble det funnet et signifikant høyere innhold av FFA, sammenlignet med alle andre prøver. Den samme trenden ble observert for MHPP, men forskjellen var ikke signifikant. Dette kan tenkes å ha sammenheng med enzympreparatets egenskaper. Corolase PP er et kommersielt produkt fremstilt av bukspyttkjertelen hos gris, og vil derfor utvise en enzymatisk aktivitet tilsvarende den samlede aktiviteten til enzymene som normalt utskilles fra kjertelen. Dette inkluderer både proteaser og lipaser, hvorav aktiviteten til det enkelte enzym vil være avhengig av dets toleranse for fremstillingen. Det er antatt at fremstillingen av enzympreparatet bare delvis inaktiverer lipaseaktiviteten [Uhlig (1998)]. Ved enzymatisk hydrolyse vil lipaseaktivitet i Corolase PP bidra til økt frigjøring av fettsyrer fra triacylglyserider, og dermed øke den separerte oljenes innhold av FFA.

Ved ensilering av restråstoff fra fisk, kan oljens innhold av FFA øke betraktelig ved lagring av ensilasjen (2 °C og 23 °C) [Tatterson et al. (1974)]. Ensilering av restråstoff fra verpehøns ga oljer med et lavt innhold av FFA ( $\leq 0,6 \pm 0,1$  %). Det er vanskelig å si noe om hvordan lagring ved høyere temperaturer vil påvirke ensilasjens innhold av FFA, da innholdet ble målt i oljer lagret ved  $-20$  °C. Dette vil kreve flere forsøk og analyser.

Restråstoff fra torsk (*Gadus morhua*) er funnet å ha lipaseaktivitet ved både nøytrale og sure pH-verdier. I innmat økte lipaseaktiviteten ved tilsetning av gallesalter og co-lipaser. Lipaser aktive ved pH = 5 ble i tillegg funnet å være relativt varmestabile, og aktiviteten økte med oppvarming til 40 °C [Sovik et al. (2005a)]. Restråstoff M inneholder alle komponenter fra innmat, og vil derfor kunne inneholde gallesalter og co-lipaser fra galleblære og lever. Ensileringsforholdene anvendt i denne studien (40 °C, pH = 3) kan i tillegg tenkes å favorisere aktiviteten til sure lipaser. Dette kan forklare hvorfor det ble observert et signifikant høyere innhold av FFA i oljer fra ensilering av restråstoff M ( $0,5 \pm 0,0 - 0,6 \pm 0,1$  %), med unntak av MEEed, sammenlignet med oljer fra ensilering av restråstoff U ( $0,3 \pm 0,0 - 0,4 \pm 0,0$  %).

### 3.3.2 Oksidativ status: AV, PV og TOTOX

Autoksidasjon av fettsyrer resulterer i dannelsen av primære- (lipidhydroperoksider) og sekundære oksidasjonsprodukter. Denne oksidasjonsprosessen er hovedårsaken til forringelse av lipidholdige matvarer, da nedbrytningen av fettsyrer resulterer i et bemerkelsesverdig tap av oljens kvalitet og ernæringsverdi [Damodaran et al. (2008)]. Et bredt spekter av forbindelser kan dannes ved autooksidasjon av fettsyrer. For å bestemme den oksidative statusen til en olje er det derfor nødvendig å analysere innholdet av både primære- og sekundære oksidasjonsprodukt [Wai et al. (2009)]. I tillegg vil det relative tidspunktet for dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukt i en olje kunne variere. I noen oljer skjer nedbrytningen til sekundære oksidasjonsprodukt først etter en betydelig konsentrasjon av lipidhydroperoksider er dannet, mens det i andre oljer skjer en tilnærmet samtidig dannelse av primære- og sekundære oksidasjonsprodukt [Guillén et al. (2002)].

I denne oppgaven ble peroksidverdi (PV) brukt som mål på primære oksidasjonsprodukt, mens anisidinværdi (AV) ble brukt som mål på sekundære oksidasjonsprodukt. I tillegg ble den totale oksidasjonsverdien (TOTOX) beregnet etter ligning 2.8. Resultater fra analyse av PV og AV, samt beregnet TOTOX, i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff M og restråstoff U er presentert i tabell 7.

**Tabell 7:** Resultater av analyser utført på olje fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene ved enzymatisk hydrolyse: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene ved ensilering: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Peroksidverdi, anisidinverdi (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 4-8$ ) og beregnet TOTOX (verdi  $\pm$  SD,  $n = 1$ ) er oppgitt. Analyse av prøver markert \* resulterte i negative verdier for AV, og disse er derfor ikke inkludert i tabellen.

Prøve	Peroksidverdi (PV, meq/kg)	Anisidinverdi (AV)	TOTOX
MT	1,36 $\pm$ 0,54	1,19 $\pm$ 0,89	3,92 $\pm$ 1,17
UT	0,49 $\pm$ 0,42	0,11 $\pm$ 0,24	1,10 $\pm$ 0,65
MHO *	0,31 $\pm$ 0,44		
MH <sub>Bl</sub>	0,39 $\pm$ 0,27	0,20 $\pm$ 0,69	0,99 $\pm$ 0,79
MH <sub>Pr</sub> *	0,91 $\pm$ 0,56		
MH <sub>PP</sub> *	0,33 $\pm$ 0,21		
MH <sub>P+B</sub> *	0,45 $\pm$ 0,21		
UHO *	0,39 $\pm$ 0,32		
UH <sub>Bl</sub> *	0,20 $\pm$ 0,32		
UH <sub>Pr</sub> *	0,96 $\pm$ 0,60		
UH <sub>PP</sub> *	0,74 $\pm$ 0,44		
UH <sub>P+B</sub> *	0,97 $\pm$ 1,20		
ME <sub>Ed</sub>	18,70 $\pm$ 0,91	27,88 $\pm$ 1,00	65,27 $\pm$ 1,64
ME <sub>Ed.S</sub>	7,68 $\pm$ 0,14	13,45 $\pm$ 1,35	28,80 $\pm$ 1,37
ME <sub>Ma</sub>	7,29 $\pm$ 0,14	3,35 $\pm$ 0,20	17,93 $\pm$ 0,28
ME <sub>Ma.S</sub>	1,97 $\pm$ 0,23	9,30 $\pm$ 0,10	13,24 $\pm$ 0,34
UE <sub>Ed</sub>	25,76 $\pm$ 0,23	23,85 $\pm$ 0,24	75,38 $\pm$ 0,41
UE <sub>Ed.S</sub>	14,82 $\pm$ 0,60	42,15 $\pm$ 0,27	71,79 $\pm$ 0,88
UE <sub>Ma</sub>	31,71 $\pm$ 0,53	15,84 $\pm$ 0,84	79,26 $\pm$ 1,12
UE <sub>Ma.S</sub>	11,72 $\pm$ 0,19	17,29 $\pm$ 1,06	40,74 $\pm$ 1,09

Varmebehandling av restråstoff M (MT) ga oljer med signifikant høyere TOTOX (3,92  $\pm$  1,17) sammenlignet med varmebehandling av restråstoff U (UT, 1,10  $\pm$  0,65). Dette kan ha sammenheng med at restråstoff M inneholder innmat, og derfor har en høyere forekomst av prooksidanter som hemoglobin. Oljer fra MT hadde også et signifikant høyere innhold av FFA (avsnitt 3.3.1). Dette kan tyde på at sammensetningen til restråstoff U er bedre egnet til

varmebehandling. TOTOX var likevel lav for begge oljene (MT og UT), noe som indikerer lav oksidativ status og dermed god kvalitet.

I tabell 7 er TOTOX bare oppgitt for én oljeprøve fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) og restråstoff U (UH): MHB1 ( $0,99 \pm 0,79$ ). I oljer fra de andre behandlingene ble det funnet negativ AV med høye standardavvik. Negativ AV er ikke et gyldig resultat av analysen, og kan tyde på at innholdet av sekundære oksidasjonsprodukter var for lavt til å kunne analyseres nøyaktig. Denne antagelsen støttes av at analysen er funnet å være usikker for  $AV \leq 0,89$  [Semb (2012)]. Analyse av PV på samme oljer resulterte i lave verdier med høye standardavvik. PV analysert ved jodometrisk titrering har en lavere deteksjonsrate på 0,5 meq/kg [Frankel (2005)]. Som beskrevet for AV, vil et lavt innhold av lipidhydroperoksider kunne gi unøyaktige resultater ved PV-analyse. Samlet sett viser disse resultatene at enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns genererer stabile oljer med lav oksidativ status. Dette er lovende med tanke på oljens bruksområde. For at smeltet fett fra animalske kilder skal være spiselige må de, i henhold til animaliehygieneforskriften, ha  $PV < 4$  [Animaliehygieneforskriften (2009)]. Olje separert fra restråstoff fra verpehøns ved varmebehandling og enzymatisk hydrolyse kan derfor være egnet til humant konsum, så vel som ingrediens i dyrefôr.

Basert på verdiene i tabell 7, ble lipider oksidert i betydelig grad under ensileringsprosessen ( $TOTOX \geq 13,24 \pm 0,34$ ). Analyse av PV og AV ga høye, entydige verdier med lave standardavvik. Den høyeste verdien for TOTOX ble beregnet for olje fra ensilering av restråstoff U med maursyre (UEMa):  $79,26 \pm 1,12$ . Ved så høye TOTOX er oljen svært oksidert, og vil derfor ha dårlig kvalitet. Basert på beregnet oljeutbytte i oljefraksjon (14,0-65,7 %), vil en god del olje befinne seg i ensilasjen. Med tanke på at autooksidasjon er en selvgenererende prosess, vil det være fordelaktig å fjerne separert olje så tidlig som mulig for å unngå videre oksidasjon av ensilasjens lipidinnhold. Det kan derfor være interessant å se om en kontinuerlig fjerning av olje vil være mer fordelaktig enn separering etter endt ensilering, som utført i denne oppgaven. For å avgjøre dette er det behov for flere forsøk, samt analyser av separert olje og oljeinnholdet i ensilasjen.

Med unntak av MEEed, ble det funnet signifikant lavere TOTOX i oljer fra ensilering av restråstoff M (ME) sammenlignet med restråstoff U (UE). Ensilering av restråstoff M resulterte også i en generelt bedre oljeseparasjon sammenlignet med restråstoff U (avsnitt 3.2.3). Dette tyder på at sammensetningen til restråstoff M er bedre egnet til prosessering ved ensilering. Olje fra MEEed hadde en signifikant høyere TOTOX ( $65,27 \pm 1,64$ ) sammenlignet

med olje fra MEMa ( $17,93 \pm 0,28$ ). Maursyre kan derfor tenkes å være bedre egnet til ensilering av restråstoff M, basert på TOTOX og oljeseparasjon (avsnitt 3.2.3).

Restråstoffenes sammensetning er mest sannsynlig årsaken til at ensilering var bedre egnet til prosessering av restråstoff M enn restråstoff U. Restråstoff M inneholder innmat, hvilket medfører et høyere innhold av endogene proteaser. Aktiviteten til de endogene proteasene i restråstoffet er, som nevnt, en viktig del av ensileringsprosessen [Tattersson et al. (1974)]. I denne oppgaven ble sulfitt brukt som antioksidant ved ensilering. Sulfitter kan også reagere med disulfidbindinger i proteiner, samt koenzymer, og på denne måten inhibere enzymaktivitet [Doyle et al. (1997)]. Forbindelser som inhiberer enzymaktivitet vil trolig påvirke restråstoff med et høyt enzyminnhold (restråstoff M) i mindre grad, sammenlignet med restråstoff med et lavt enzyminnhold (restråstoff U). Inhibering av endogen enzymaktivitet kan derfor ha bidratt til å gi en mindre fordøyelig ensilasje, og en dårligere oljeseparasjon, ved ensilering av restråstoff U. Denne antagelsen støttes av at tilsetning av sulfitt, ved ensilering av restråstoff U med maursyre (UEMa), resulterte i en signifikant reduksjon av tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen (avsnitt 3.2.3).

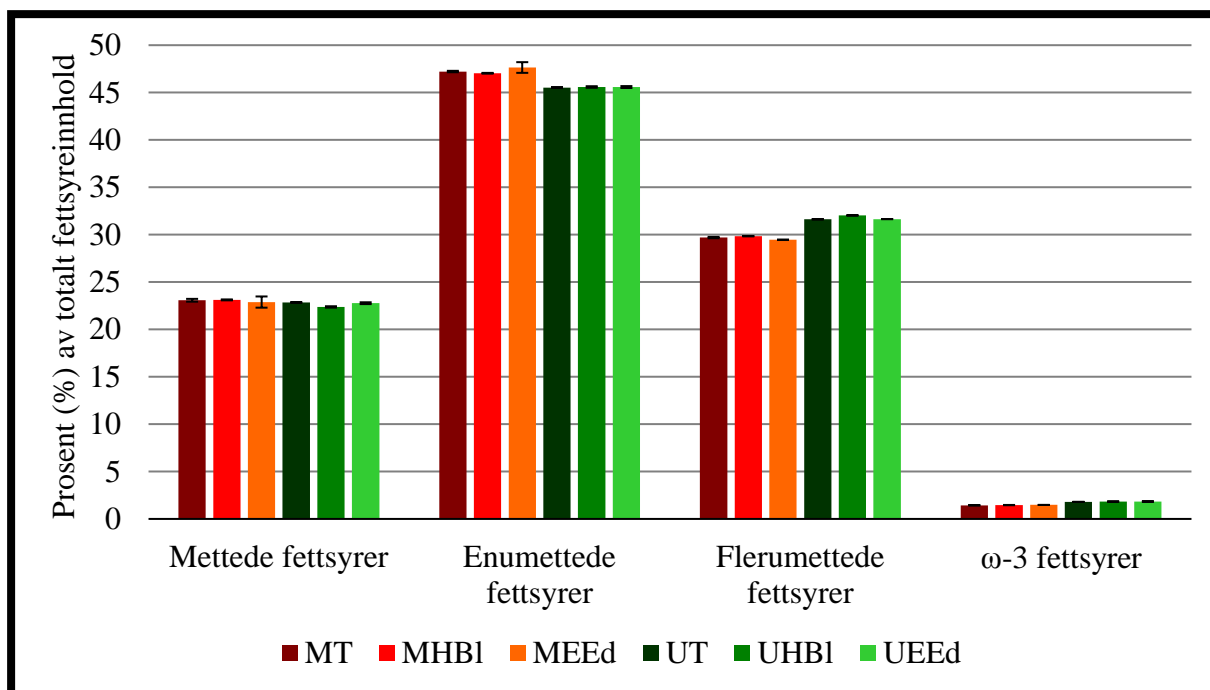
To av de gunstige funksjonene til sulfitt, som tilsetningsstoff i matvarer, er antioksidativ og antimikrobiell aktivitet [Doyle et al. (1997)]. I olje fra ME og UE ble det funnet signifikant lavere PV ved tilsetning av sulfitt (MEEed.S, MEMa.S, UEEed.S, UEMa.S), sammenlignet med oljer fra ensilering uten sulfitt (MEEed, MEMa, UEEed, UEMa). I olje fra MEEed ble det også funnet signifikant lavere AV ved tilsetning av sulfitt (MEEed.S). Det ble derimot ikke funnet en signifikant reduksjon av AV i oljer fra de andre prøvene. Ensileringen ble utført ved pH = 3, noe som medfører en forskyving av likevekten i ligning 1.1 (avsnitt 1.8.1) mot venstre. Sulfitt vil derfor hovedsakelig forekomme i løsningen som bisulfitt og svoveldioksid. Konsentrasjonen av sulfittioner vil derimot være lavere. Lav forekomst av sulfittioner kan ha begrenset den antioksidative funksjonen til sulfitt, da sulfittionet oksideres lettere av molekylært oksygen enn bisulfitt [Rose et al. (1989)]. Dette kan forklare hvorfor tilsetning av sulfitt ikke medførte en signifikant reduksjon av AV ved ensilering.

Sulfitters antimikrobielle aktivitet er størst ved lav pH [Hailer (1911), - ikke sett, sitert etter Doyle et al. (1997)]. Den mikrobielle aktiviteten i restråstoffet ved ensilering ble ikke analysert, men vil trolig være lav grunnet prosesseringens lave pH. I denne oppgaven vil den antimikrobielle aktiviteten til sulfitt derfor være av mindre betydning enn den antioksidative aktiviteten når det gjelder sluttproduktets kvalitet. Basert på den observerte reduksjonen av PV, bør natriumbisulfitt tilsettes som antioksidant ved ensilering av restråstoff fra verpehøns.

### 3.3.3 Fettsyresammensetning

Sammensetningen av fettsyrer i en olje vil være avgjørende for dens funksjonelle egenskaper, så vel som oksidativ stabilitet. Fettsyresammensetningen i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns ble analysert ved gaskromatografi. Analyseresultater, inkludert grunnlagsdata for figur 3-9 og 3-10, er gitt i vedlegg D: olje fra MT og UT i tabell 1D, olje fra MH i tabell 2D, olje fra UH i tabell 3D, olje fra ME i tabell 4D og olje fra UE i tabell 5D.

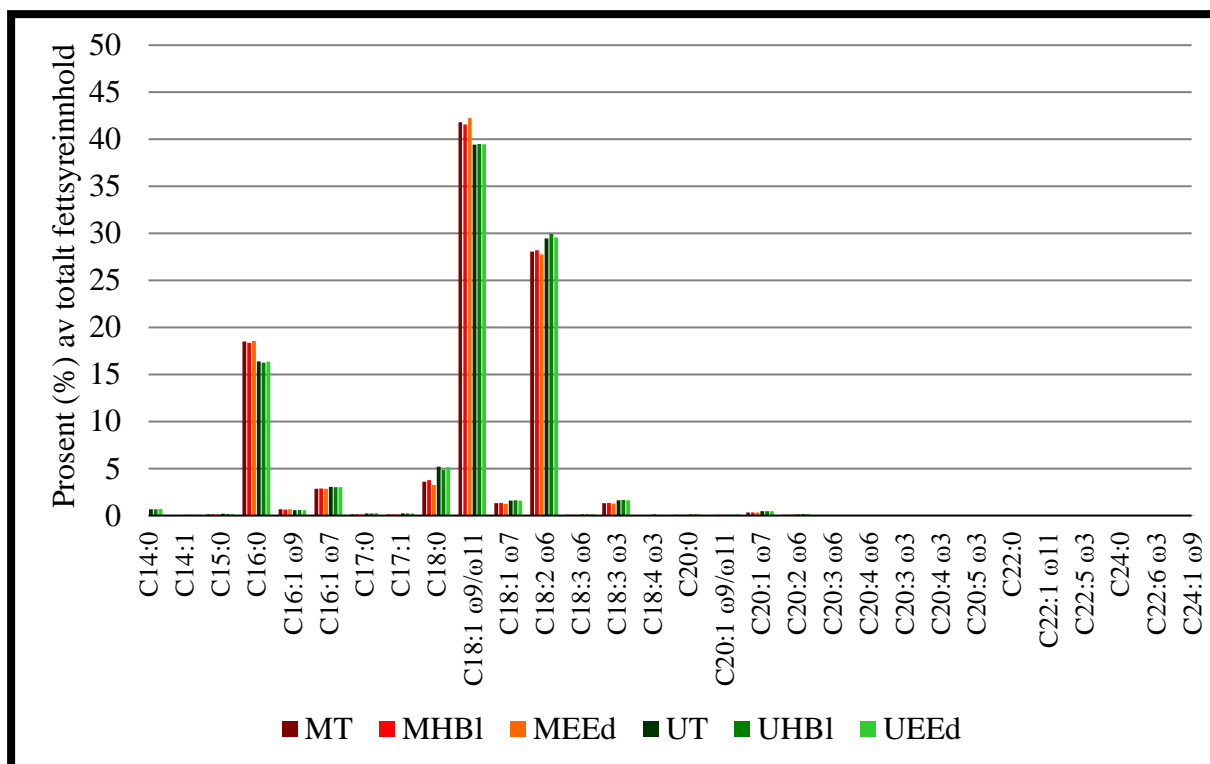
Forskjellen i fettsyresammensetningen til oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av samme restråstoff var svært liten. Oljens fettsyresammensetning ser derfor ikke ut til å påvirkes av hvilken prosesseringsmetode som benyttes for separering av olje fra restråstoffet. En større forskjell ble derimot observert mellom fettsyresammensetningen til oljer fra restråstoff M og restråstoff U, uavhengig av prosesseringsmetode. Dette er illustrert i figur 3-9, der oljenes innhold av mettede, enumettede, flerumettede og omega-3 fettsyrer er presentert. Den røde serien representerer et utvalg av oljer separert fra restråstoff M, ved de tre ulike prosesseringsmetodene benyttet i denne oppgaven, mens den grønne serien representerer et utvalg av oljer separert fra restråstoff U.



**Figur 3-9:** Innhold av mettede, enumettede, flerumettede og omega-3 fettsyrer i olje fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME, rød serie) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE, grønn serie). Forkortelser er brukt for enzymatisk hydrolyse med endogene enzym (Bl) og ensilering med eddiksyre (Ed). Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ).

Innholdet av mettede fettsyrer var omtrent likt i oljene separert fra restråstoff M og restråstoff U. Oljer fra MT, MHBl og MEEd hadde et signifikant høyere innhold av enumettede fettsyrer, og et signifikant lavere innhold av flerumettede og omega-3 fettsyrer, sammenlignet med oljer fra UT, UHBl og UEEd. Inntak av omega-3 fettsyrer er assosiert med flere helsegevinster, deriblant en reduksjon av risikoen for hjerte- og karsykdommer [Rustad (2003)]. Sammenlignet med marine restråstoff, er restråstoff fra verpehøns en dårlig kilde til omega-3 fettsyrer (1,4-2,0 %). Studier utført på restråstoff fra sild (*Clupea harengus*) og makrell (*Scomber scombrus*) har funnet et omega-3 innhold på henholdsvis 16,9-18,3 % [Carvajal et al. (2015)] og 26,6 % [Al-Janabi (2016)]. På den annen side vil et høyt innhold av langkjedede flerumettede fettsyrer i en olje øke risikoen for oksidasjon [Carvajal et al. (2009)]. Olje fra restråstoff fra verpehøns vil derfor trolig ha høyere oksidativ stabilitet, sammenlignet med olje fra restråstoff fra marine kilder. Dette kan være positivt med tanke på bruksområdene til oljen.

Fettsyresammensetningen i oljer fra samme prøver er presentert i figur 3-10. Den røde serien representerer igjen et utvalg oljer separert ved varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff M. Den grønne serien representerer oljer separert fra restråstoff U.



**Figur 3-10:** Fettsyresammensetning i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME, *rød serie*) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE, *grønn serie*). Forkortelser er brukt for enzymatisk hydrolyse med endogene enzym (BI) og ensilering med eddiksyre (Ed). Fettsyrene er navngitt etter omega-systemet, hvor CX:Y betegner en fettsyre med X antall karbonatomer og Y antall dobbeltbindinger. Den første dobbeltbindingens plassering angis som ωZ: Z antall karbonatomer fra fettsyrens metylende. Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt, n = 2).

Oljen separert fra restråstoff fra verpehøns inneholdt tilnærmet alle fettsyrene det ble analysert for, men mange kun i små mengder. Et fåtall fettsyrer var tilstede i fremtredende mengder. Dette gjaldt hovedsakelig palmitinsyre (C16:0), oljesyre (C18:1 ω9) og linolsyre (C18:2 ω6). Et betydelig høyere innhold av disse tre fettsyrene, sammenlignet med innhold av andre fettsyrer, har også blitt funnet i studier av fettsyresammensetningen i muskel fra kylling [Zanetti et al. (2010), De Marchi et al. (2012)]. I tillegg ble det funnet et relativt høyt innhold av stearinsyre (C18:0), vaccensyre (C18:1 ω11) og α-linolensyre (C18:3 ω3) i denne oppgaven.

Fettsyresammensetningen, presentert i figur 3-10, viser igjen den samme trenden som ble observert for innhold av mettede, umettede, flerumettede og omega-3 fettsyrer. Fettsyresammensetningen i oljen ble ikke påvirket av separasjonsmetode, men av restråstoffets sammensetning.



Fjærkre har et generelt høyere innhold av umettede fettsyrer, sammenlignet med drøvtyggere som storfe og får [Damodaran et al. (2008)]. I motsetning til drøvtyggere, påvirkes fettsyresammensetningen til fjærkre av fettsyresammensetningen i dietten [Miller et al. (1967), - ikke sett, sitert etter Chow (2007)]. Det høye innholdet av oljesyre og linolsyre, i oljer separert fra restråstoff fra verpehøns, tyder på at fôret inneholder vegetabiliske oljer. Mais er en vanlig bestanddel av fôret til verpehøns, og har et høyt innhold av linolsyre [Damodaran et al. (2008)]. At dietten påvirker dyrenes fettsyresammensetning, vil muliggjøre en manipulering av fettsyresammensetningen i den separerte oljen. I industriell sammenheng kan det være interessant å utnytte dette potensialet til produksjon av olje med ønskede karakteristikk.

### 3.3.4 Oppsummering

Oljen separert fra restråstoff fra verpehøns, ved varmebehandling og enzymatisk hydrolyse, hadde god kvalitet og lav oksidativ status basert på FFA og TOTOX. Det høyeste innholdet av FFA ble funnet i olje fra hydrolyse med Corolase PP.

Oljen separert ved ensilering hadde dårlig kvalitet basert på TOTOX. Ensilering av restråstoff M ga signifikant lavere TOTOX, sammenlignet med ensilering av restråstoff U. Maursyre ga oljer med signifikant lavere TOTOX enn eddiksyre, ved ensilering av restråstoff M. Sulfitt virket antioksidierende ved ensilering av begge restråstoff, basert på PV.

Fettsyresammensetningen i den separerte oljen ble ikke påvirket av prosesseringsmetode brukt for separasjon, men av restråstoffets sammensetning. Oljen fra restråstoff M hadde et signifikant høyere innhold av enumettede fettsyrer, mens innholdet av flerumettede fettsyrer og omega-3 fettsyrer var signifikant lavere, sammenlignet med oljen fra restråstoff U. Innholdet av mettede fettsyrer var omtrent likt. Oljen hadde et fremtredende innhold av tre fettsyrer: palmitinsyre (16:0), oljesyre (C18:1  $\omega$ 9) og linolsyre (C18:2  $\omega$ 6).

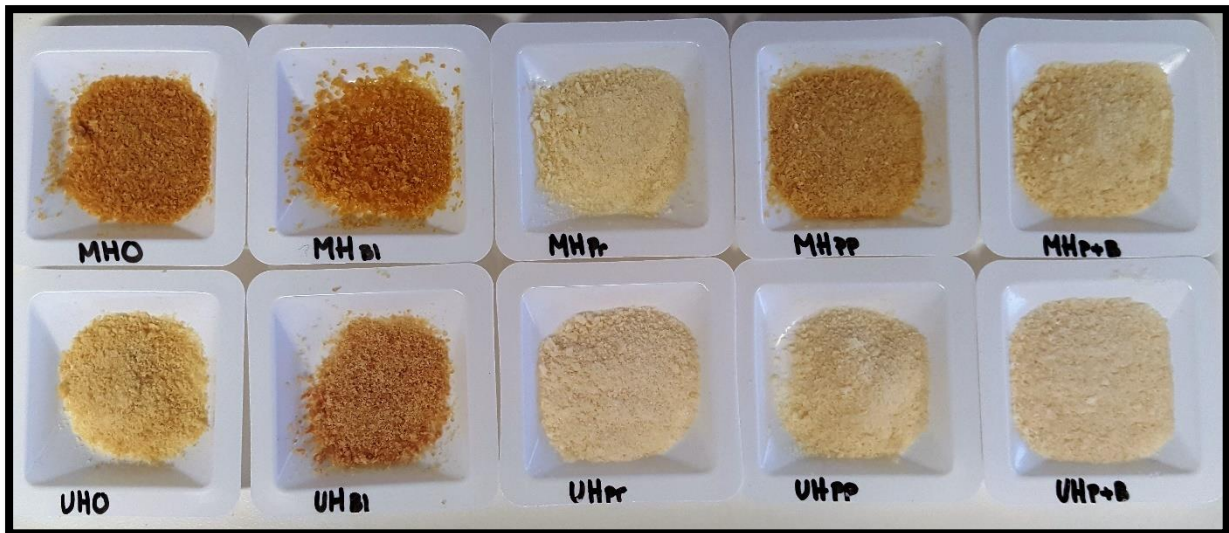
### 3.4 Vannløselige fraksjon: kvalitet og sammensetning

Varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns resulterte i en vannløselig fraksjon. Ved varmebehandling betegnes denne fraksjonen som limvann, mens hydrolysat er betegnelsen brukt om den vannløselige fraksjonen fra enzymatisk hydrolyse. Analyser av den vannløselige fraksjonen ble i hovedsak utført på limvann og hydrolysat. Årsaken til dette er at den vannløselige fraksjonen fra ensilering ikke er av stor interesse i industriell sammenheng, og at kun minimale mengder lot seg separere ut ved ensilering av restråstoffet.

Hønseproteinhydrolysat (HPH) er fraksjonen av størst interesse fra enzymatisk hydrolyse. For at HPH skal ha god kvalitet bør det ha et høyt proteininnhold og et lavt lipidinnhold [Šližytė et al. (2005a)]. Sensoriske egenskaper som utseende, lukt og smak er også avgjørende for produktets aksept i næringsmiddelindustrien [Kristinsson et al. (2000)]. Varmebehandling blir i hovedsak brukt til å separere olje fra restråstoff, men prosessering ved lavere temperaturer kan også øke proteinenes løselighet [Plumb et al. (1994), - ikke sett, sitert etter Cui et al. (2009)]. Limvann av god kvalitet kan potensielt ha samme bruksområder som HPH. God kvalitet vil, også i denne sammenheng, bety et høyt proteininnhold og et lavt lipidinnhold.

#### 3.4.1 Farge

De sensoriske egenskapene til frysetørket HPH ble i stor grad påvirket av hvilken behandling som ble brukt ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U, særlig med tanke på utseende. Frysetørket HPH fra alle behandlinger er avbildet i figur 3-11. All vurdering av farge er basert på observerbare ulikheter, da det ikke ble fortatt fargemåling ved bruk av kolorimeter.



**Figur 3-11:** Farge på frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Hydrolysatets sensoriske kvalitet defineres av dets farge og smak. Ved bruk som tilsetning i matvarer, kan fargen på hydrolysatet påvirke sluttproduktets farge. Det er derfor viktig at denne imøtekommer konsumentenes krav [Francis (1985), Kristinsson et al. (2000)]. HPH av god kvalitet bør, med andre ord, være så fargeløst (hvitt) som mulig. Tilsetning av kommersielle enzymer bidro til en gunstig fargeendring på frysetørket HPH (figur 3-11). Med unntak av MHPP, var alle HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer lysere enn HPH fra autolytisk hydrolyse. HPH fra MHPP hadde en tydelig mørkere farge sammenlignet med alle andre HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer (MHPr, MHP+B, UHPr, UHPP, UHP+B). Den mørke fargen kan skyldes det høye lipidinnholdet (avsnitt 3.4.2). Et økt innhold av lipider i HPH vil medføre en økt risiko for oksidasjon. I Maillardreaksjonen kan oksidasjonsprodukter reagere med aminogrupeer og danne brune pigmenter, noe som vil gi en mørkere farge på HPH [Kristinsson et al. (2000), Damodaran et al. (2008)]. Det er lite trolig at den mørkere fargen skyldes enzympreparatets (Corolase PP) spesifikke proteaseaktivitet, da dette også ville resultert i et mørker HPH fra UHPP. Hvis virkningsmekanismen til Corolase PP gir HPH med høyt lipidinnhold, vil formørkningen være en indirekte konsekvens av enzympreparatets aktivitet ved at lipidene oksiderer. Restråstoff M vil trolig ha et høyere innhold av hemoglobin som følge av innmatinnholdet. Dette vil også kunne bidra til å øke oksidasjonsraten, da hemoglobin har vist seg å være en sterk prooksidant sammenlignet med for eksempel jern [Carvajal et al. (2009)].

Når det gjelder farge på frysetørket limvann foreligger det bare to prøver til sammenligning, én fra varmebehandling av restråstoff M og én fra varmebehandling av restråstoff U. Disse er avbildet i figur 3-12.

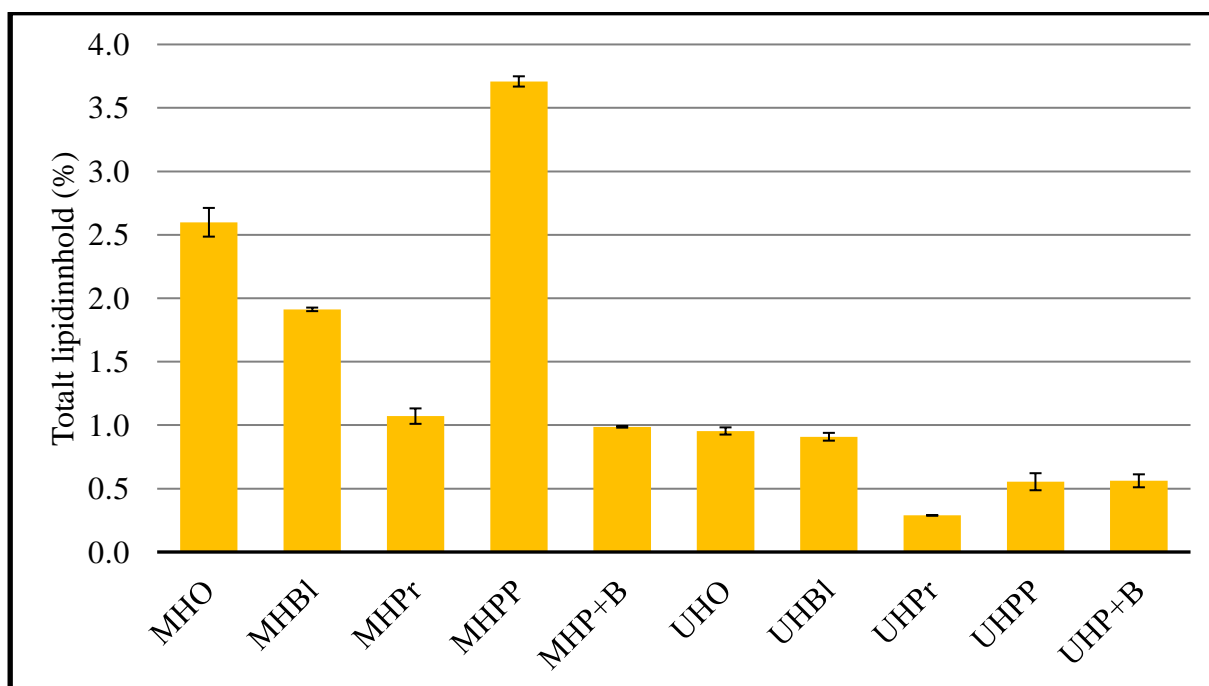


**Figur 3-12:** Farge på frysetørket limvann fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT).

Bildet i figur 3-12 viser at limvann fra MT var tydelig mørkere enn limvann fra UT. Den samme forskjellen mellom restråstoffene kan også observeres i figur 3-11, for frysetørket HPH fra nullprøve av restråstoff M (MHO) og nullprøve av restråstoff U (UHO). For HPH fra MHO og UHO kan forskjellene i farge forklares av prøvenes ulike lipidinnhold (avsnitt 3.4.2). Lipidinnhold i frysetørket limvann ble ikke analysert grunnet manglende materiale, men vil trolig være ulik basert på restråstoffenes sammensetning (avsnitt 3.1). Et høyere lipidinnhold i MT kan, som beskrevet over, forklare den mørkere fargen på limvannet.

### 3.4.2 Lipidinnhold

Hydrolysat av høy kvalitet kjennetegnes av et lavt lipidinnhold, som nevnt over. Et lavt lipidinnhold vil bidra til å øke hydrolysatets stabilitet ved lagring [Shahidi et al. (1995), - ikke sett, sitert etter Rossi et al. (2009)]. Stabilitet er en essensiell egenskap hvis hydrolysatet skal brukes som funksjonell ingrediens i matvarer. Mye lipid i hydrolysat vil gi økt risiko for oksidasjon, og på denne måten kunne forringe kvaliteten til den aktuelle matvaren. Totalt lipidinnhold i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-13. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg E, tabell 1E,



**Figur 3-13:** Totalt lipidinnhold (% av tørrstoff) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Det ble funnet et signifikant høyere lipidinnhold i HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M med Corolase PP (MHPP,  $3,7 \pm 0,0$  %), sammenlignet med alle andre prøver. Som tidligere nevnt kan dette være årsaken til den mørke fargen på frysetørket HPH fra MHPP, sammenlignet med HPH fra hydrolyse med Protamex og Papain + Bromelain (avsnitt 3.4.1). Det høye lipidinnholdet, og den mørke fargen, tyder på at Corolase PP er uegnet til produksjon av høykvalitets HPH. Lipidinnholdet i HPH kan ses i sammenheng med den dårlige oljeseparasjonen for MHPP (avsnitt 3.2.2), og er med på å bekrefte dette enzympreparatets begrensninger.

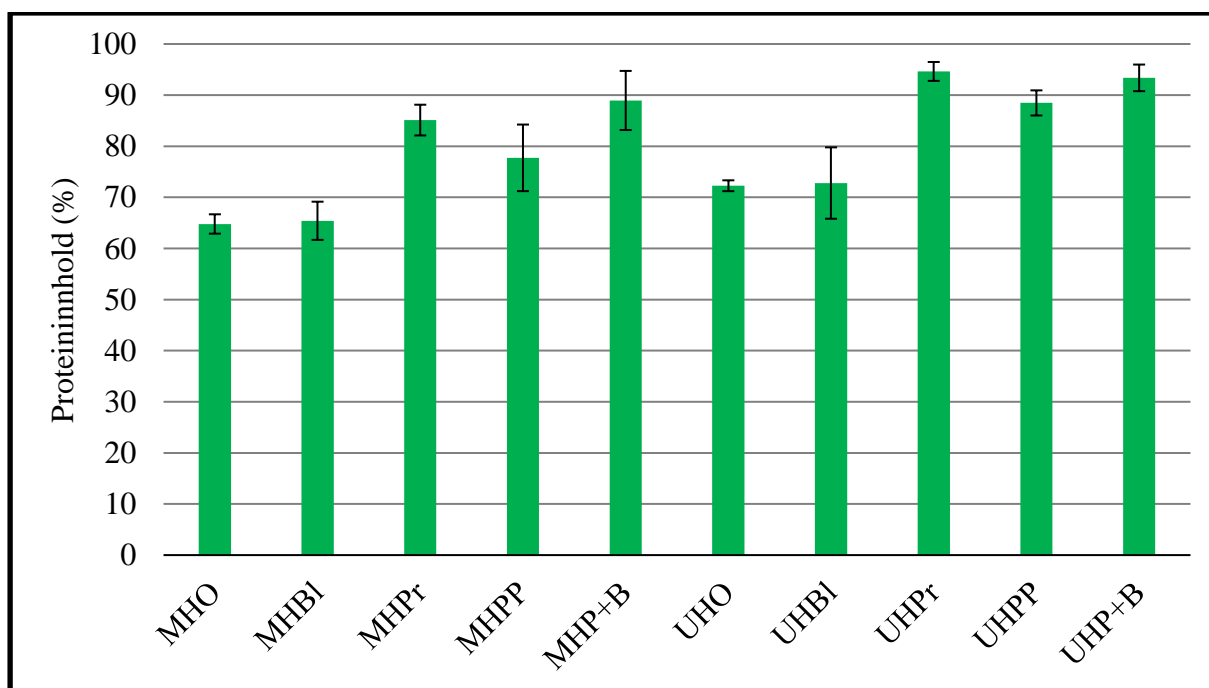
For resterende HPH ble lipidinnhold funnet å være  $\leq 1,9 \pm 0,0$  % (ekskudert nullprøver). Tilsetning av kommersielle enzymer ga et signifikant lavere lipidinnhold i HPH for begge restråstoff (MH:  $1,1 \pm 0,0 - 1,1 \pm 0,1$  %, UH:  $0,3 \pm 0,0 - 0,6 \pm 0,1$  %), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (MHBl:  $1,9 \pm 0,0$  %, UHBl:  $0,9 \pm 0,0$  %). Dette gjaldt alle prøver unntatt MHPP, som forklart over. Lipidinnholdet var generelt høyere for HPH fra MH enn UH. Dette kan forklares av at restråstoff M inneholdt mer lipid enn restråstoff U (avsnitt 3.1). Et høyere lipidinnhold i råstoffet er funnet å gi hydrolysat med et høyere innhold av lipid ved

enzymatisk hydrolyse [Šližytė et al. (2005b)]. Det lave lipidinnholdet i HPH fra hydrolyse av begge restråstoff med kommersielle enzymer kan, som beskrevet tidligere, forklare den hvitere fargen (avsnitt 3.4.2).

I produksjon av høykvalitets hydrolysat fra restråstoff fra fisk, er det ønskelig med et lipidinnhold under 0,5 % [Šližytė et al. (2005a)]. Selv om lipidinnholdet i HPH ikke innfrir dette kravet, må det tas med i beregningen at lipid fra fjærkre har et høyere innhold av mettede fettsyrer enn lipid fra marine organismer [Damodaran et al. (2008)]. Dette gjør lipidet mer stabil mot oksidasjon, og dets tilstedeværelse i HPH vil ikke redusere oksidativ stabilitet i like stor grad.

### 3.4.3 Proteininnhold

En annen kvalitetsindikator for HPH er et høyt proteininnhold, beregnet i denne oppgaven ved å multiplisere nitrogeninnhold (%) med en faktor på 6,25. Proteininnhold (%) i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-14. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg E, tabell 1E



**Figur 3-14:** Proteininnhold (% av tørrstoff) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff M med Protamex (MHPPr) og Papain + Bromelain (MHP+B) ga et signifikant høyere proteininnhold i frysetørket HPH ( $85,1 \pm 3,0$  % -  $89,0 \pm$

5,8 %), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (MHBl,  $65,4 \pm 3,7$  %). For restråstoff U resulterte tilsetning av alle de tre kommersielle enzymene (UHPr, UHPP, UHP+B) i et signifikant høyere proteininnhold i HPH ( $88,5 \pm 2,5$  % –  $94,6 \pm 1,8$  %), sammenlignet med autolytisk hydrolyse (UHBl,  $72,8 \pm 7,0$  %). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom proteininnholdet i HPH fra prøver tilsatt Protamex og prøver tilsatt Papain + Bromelain. Dette gjaldt begge restråstoff. Både Protamex og Papain + Bromelain er derfor egnet til å øke proteininnholdet i HPH ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns.

Autolytisk hydrolyse medførte ikke en signifikant økning i proteininnhold (MHBl:  $65,4 \pm 3,7$  %, UHBl:  $72,8 \pm 7,0$  %), sammenlignet med nullprøve (MHO:  $64,8 \pm 1,9$  %, UHO:  $72,3 \pm 1,1$  %). Dette tyder igjen på at restråstoff fra verpehøns har lav endogen proteaseaktivitet, og at endogene enzymer er lite delaktige i å løseliggjøre proteiner under hydrolyseprosessen.

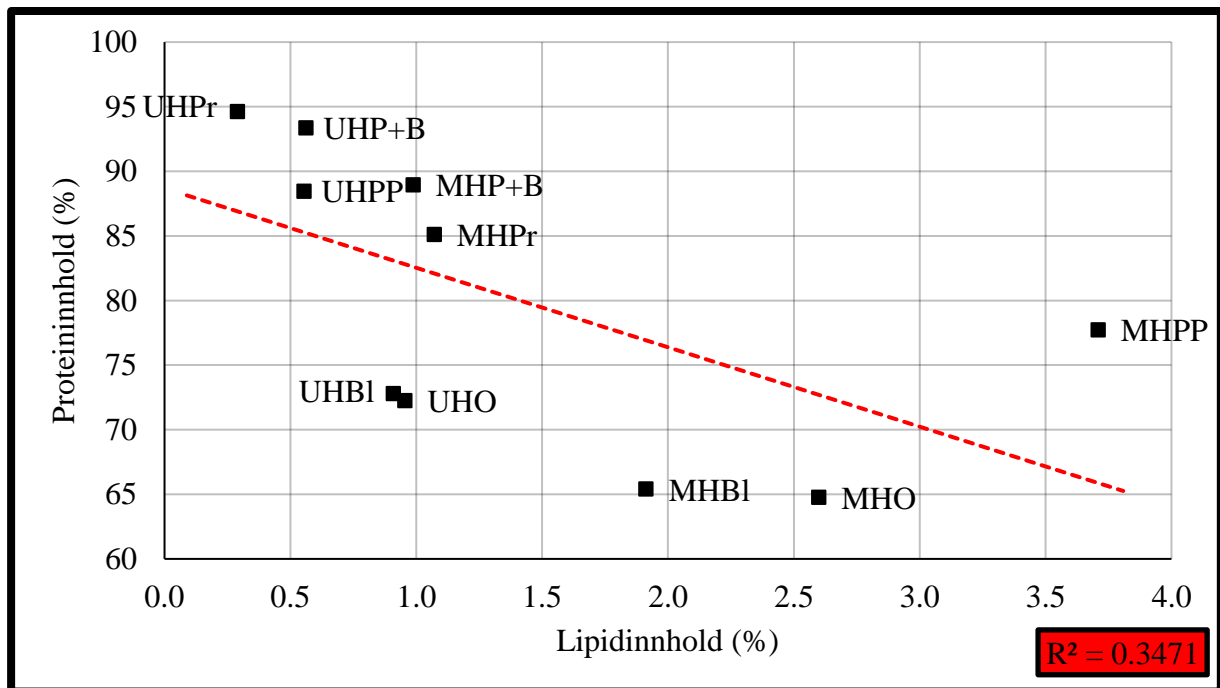
Når det gjelder proteinutbyttet i HPH, økte også dette ved tilsetning av kommersielle enzymer, sammenlignet med autolytisk hydrolyse, for begge restråstoff. For restråstoff M resulterte tilsetning av kommersielle enzymer i en økning av proteinutbyttet i HPH fra 5 % (MHBl) til 10,9-25,0 %. Av de kommersielle enzymene, ga Corolase PP det laveste proteinutbyttet i HPH (MHPP, 10,9 %). Det lave proteinutbyttet kan ses i sammenheng med det høye lipidinnholdet i HPH fra MHPP (avsnitt 3.4.2), og bidrar til å styrke antagelsen om at dette enzympreparatet ikke er egnet til enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns. For restråstoff U økte proteinutbyttet i HPH fra 5,9 % (UHBl) til 21,8-31,7 % ved tilsetning av kommersielle enzymer. Corolase PP ga igjen det laveste proteinutbyttet i HPH (UHPP, 21,8 %), sammenlignet med de to andre kommersielle enzymene.

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff U ga et generelt høyere proteinutbytte i HPH enn enzymatisk hydrolyse av restråstoff M. Begge restråstoff ble funnet å ha omtrent likt proteininnhold, men ulikt innhold av lipid (avsnitt 3.1). En mulig forklaring på det lavere proteinutbyttet i HPH fra restråstoff M, er dannelsen av protein-lipid komplekser. Disse kompleksene kan dannes i restråstoff med et relativt høyt lipidinnhold (10-30 %) og vil, på grunn av resistens mot enzymatisk nedbrytning, kunne redusere proteinutbyttet i den vannløselige fraksjonen [Šližytė et al. (2005b)].

I avsnitt 3.4.2 ble det nevnt at lipidinnholdet i HPH ikke vil være like kritisk for produktets kvalitet, som lipidinnholdet i hydrolysat fra marine biprodukt. Dette på grunn av at lipider fra fjærkre har lavere grad av umettethet. Ved sammenligning ble det funnet en svak negativ korrelasjon mellom lipidinnhold (%) og proteininnhold (%) i frysetørket HPH, som vist i figur 3-15. Sammenhengen er lineær, der et økt lipidinnhold ser ut til å være assosiert med

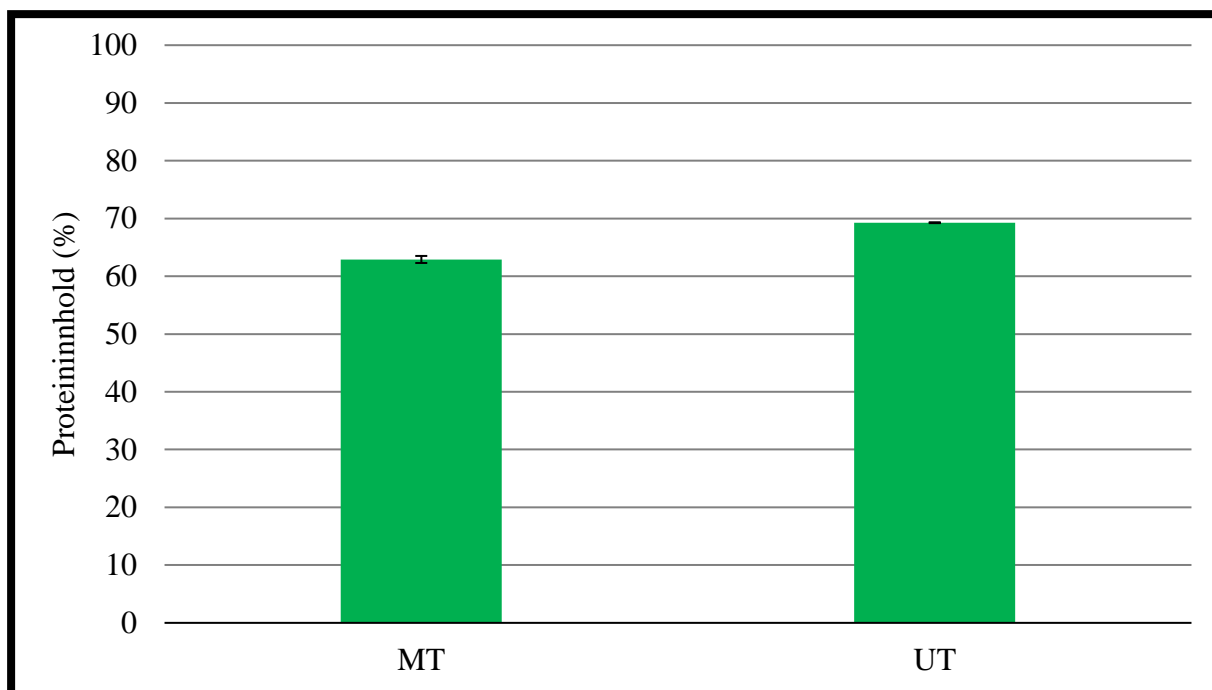


reduksjon av proteininnholdet i HPH. Sammenhengen var signifikant for HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff U, men ikke restråstoff M. Dette er vist i henholdsvis figur E-2 og E-1 i vedlegg E. HPH med god kvalitet bør derfor ha et lavt lipidinnhold, til tross for at lipidinnholdet i HPH trolig vil være relativt stabilt med tanke på oksidasjon.



**Figur 3-15:** Proteininnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 3$ ) som funksjon av lipidinnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 2$ ) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Regresjonslinje for lineær sammenheng, samt trendlinjens  $R^2$ -verdi, er inkludert i figuren.

Når det gjelder limvann ble det funnet et høyt proteininnhold fra både MT og UT, henholdsvis  $62,9 \pm 0,6$  % og  $69,3 \pm 0,1$  %. Resultatene er presentert i figur 3-16. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg E, tabell 1E

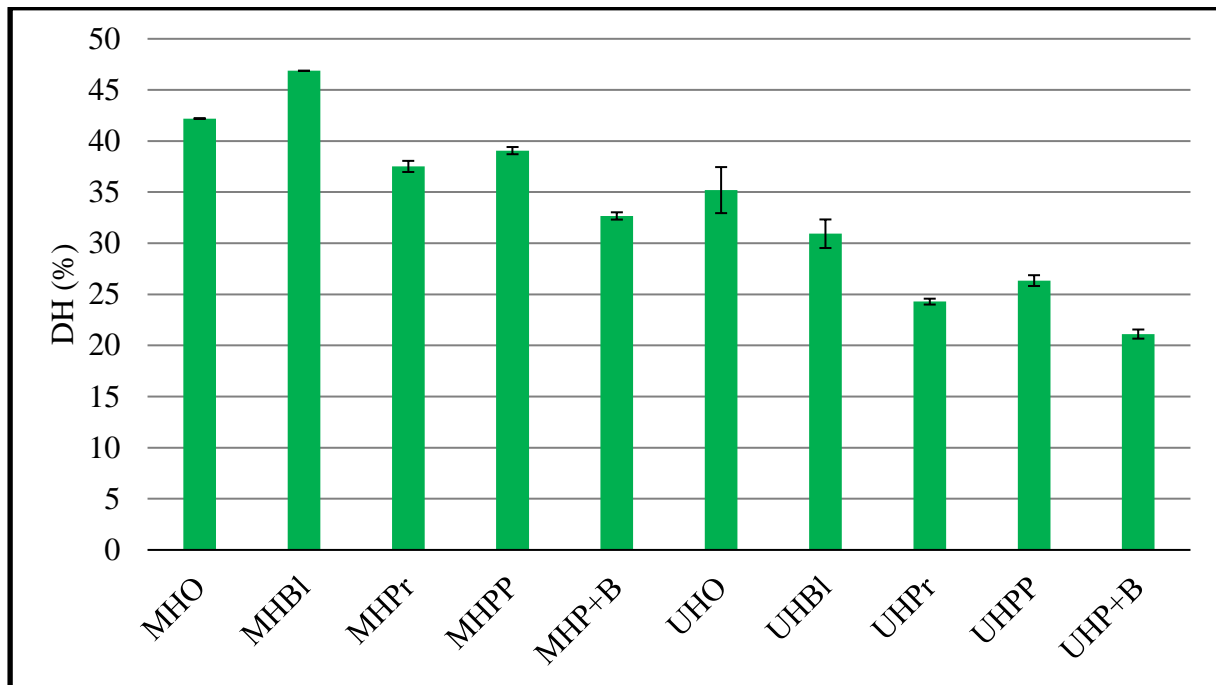


**Figur 3-16:** Proteininnhold (% av tørrstoff) i frysetørket limvann fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Proteinutbyttet i limvann ble beregnet til 1,9 % for MT og 2,9 % for UT. Dette er lavt sammenlignet med proteinutbyttet i HPH (4,5 - 28,0 %). Varmebehandling er derfor dårlig egnet til å utvinne proteiner fra restråstoff fra verpehøns, som forventet.

### 3.4.4 Hydrolysegrad

Hydrolysegrad (DH) i frysetørket HPH ble bestemt ved formoltitrering. DH (%) i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-17. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg E, tabell 1E.



**Figur 3-17:** Hydrolysegrad (DH, %) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2-3$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

DH påvirker proteinenes, og dermed hydrolysatets, funksjonelle egenskaper [Damodaran et al. (2008)]. For proteiner i et restråstoff vil løseligheten øke med graden av hydrolyse [McNairney (1984), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. En DH på 100 % vil i denne sammenheng bety at hydrolysatet består av 100 % frie aminosyrer [Damodaran et al. (2008)].

DH i HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns varierte fra  $21,1 \pm 0,4$  % (UHP+B) til  $46,9 \pm 0,0$  % (MHBl). Det ble funnet en signifikant høyere DH i HPH fra autolytisk hydrolyse (MHBl:  $46,9 \pm 0,0$  %, UHBl:  $30,9 \pm 1,4$  %), sammenlignet med HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer (MH:  $32,7 \pm 0,4$  –  $39,1 \pm 0,4$  %, UH:  $21,1 \pm 0,5$  -  $26,4 \pm 0,5$  %). HPH fra autolytisk hydrolyse hadde derimot et lavt proteininnhold (avsnitt 3.4.3). Dette kan tyde på at de endogene proteasene, som er aktive under hydrolyseprosessen, hovedsakelig er eksopeptidaser. Eksopeptidaseaktivitet resulterer i frigjøringen av aminosyrer

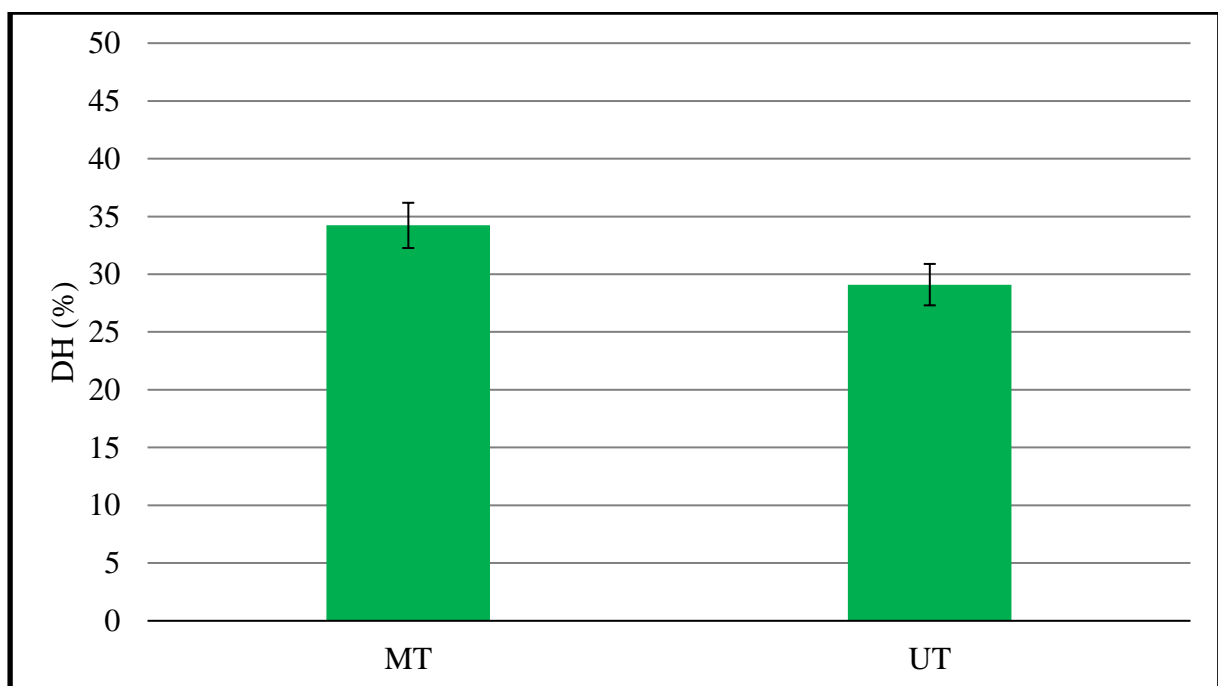
eller små peptider, og vil kunne gi høy DH. Aktiviteten til endogene enzymer kan også forklare hvorfor det ble observert generelt høyere DH i HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M sammenlignet med restråstoff U. Restråstoff M inneholder innmat, og har derfor et høyere innhold av endogene enzymer. På den annen side ble det også funnet signifikant høyere DH i HPH fra nullprøve av restråstoff M (MHO) og restråstoff U (UHO), sammenlignet med HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer. Det kan derfor tenkes at det ikke er endogene eksopeptidaser, men prosesseringen av restråstoffet før og etter hydrolysen, som gir høy DH. Før hydrolysen vil tilsatt vann «vaske» ut små og vannløselige proteiner i restråstoffet, hvilket vil gi høy DH i HPH. Hvis endogene enzymer hydrolyserer proteinene som i utgangspunktet var vannløselige, vil dette øke DH ytterligere, som observert for MHO ( $42,2 \pm 0,0$  %) og MHBI ( $46,9 \pm 0,0$  %). Kommersielle enzymer vil derimot bidra til å løseliggjøre mer av proteinene i restråstoffet, og derfor «fortynne» løsningen med større peptider. Hvordan dette kan resultere i lavere DH, sammenlignet med autolytisk hydrolyse, vil bli forklart under. En annen mulig forklaring på høy DH er usikkerheten i analysemetoden. Formol reagerer ikke utelukkende med  $\alpha$ -aminogrupper, men også andre nitrogenholdige forbindelser [Šližytė et al. (2014)].

De kommersielle enzymene er hovedsakelig endopeptidaser. I motsetning til eksopeptidaser, hydrolyserer endopeptidaser peptidbindinger inne i peptidkjeden. Dette vil gi lengre peptidkjeder i HPH. Ved å løseliggjøre proteinene i restråstoffet på denne måten, kan kommersielle enzymer øke proteininnholdet i HPH (avsnitt 3.4.3). DH er et mål på mengden frie aminogrupper i forhold til det totale nitrogeninnholdet i en prøve, som definert av ligning 2.10. En økning i proteininnholdet medfører en økning av det totale nitrogeninnholdet i HPH. En gitt mengde frie aminogrupper vil påvirke HPH med et høyt nitrogeninnhold i mindre grad enn HPH med et lavt nitrogeninnhold. HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer kan derfor ha et høyere innhold av frie aminosyrer, sammenlignet med HPH fra autolytisk hydrolyse (avsnitt 3.4.5), uten at dette motstrider resultatene presentert i dette avsnittet.

I og med at DH påvirker hydrolysatets funksjonelle egenskaper, vil ønsket DH variere med den funksjonen man ønsker at hydrolysatet skal ha. For hydrolysatets emulgerende og skumdannende egenskaper vil høy DH være negativt, da disse egenskapene antas å være optimale ved  $DH < 10$  % [Damodaran (1997)]. En høy DH vil på den annen side resultere i en reduksjon av allergenisitet, samt gjøre proteinet mer lettfordøyelig [Damodaran et al. (2008)]. Dette er gunstig hvis HPH skal kunne brukes som næringsmiddel tilpasset individer med spesielle behov. En DH mellom 4-40 % har blitt assosiert med en høy risiko for dannelse av

bitre peptider [Dauksas et al. (2004)]. Flere av prøvene hadde en DH i dette området, og det er derfor sannsynlig at HPH inneholder bitre peptider. Bitre peptider kan begrense bruken av HPH i matvarer, men dannelsen av disse er ikke utelukkende avhengig av DH. Blant annet har hydrofobisitet blitt assosiert med bitterhet hos peptider [Damodaran (1997)]. Det vil derfor være nødvendig med en sensorisk analyse, i form av en smakstest, for å kunne vurdere innholdet av bitre peptider i HPH.

DH i limvann fra varmebehandling av restråstoff M og restråstoff U ble funnet å være henholdsvis  $34,2 \pm 2,0$  % og  $29,1 \pm 1,8$  %. Resultatene er presentert i figur 3-18. Grunnlagsdata er gitt i vedlegg E, tabell 1E.



**Figur 3-18:** Hydrolysegrad (DH, %) i frysetørket limvann fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT) (gjennomsnitt ± SD, n = 3).

Prosessering av restråstoff M ga tilnærmet likt proteininnholdet i limvann fra varmebehandling (MT,  $62,9 \pm 0,6$  %) og HPH fra autolytisk hydrolyse (MHBl,  $65,4 \pm 3,74$ ). DH var derimot signifikant høyere i HPH fra MHBl ( $46,9 \pm 0,0$  %) sammenlignet med limvann fra MT ( $34,2 \pm 2,0$  %). Den samme tendensen ble observert for restråstoff U, men forskjellen var ikke signifikant. Dette skyldes trolig temperaturforskjellen mellom prosesseringsmetodene. Endogene enzymer kan være aktive ved den enzymatiske hydrolysens temperatur ( $50$  °C), og vil dermed kunne bidra til å øke DH i HPH. Varmebehandlingens temperatur ( $100$  °C) vil derimot denaturere og inaktivere endogene enzymer.

Peptidstørrelsens påvirkning på de funksjonelle egenskapene til HPH, vil bli diskutert videre i sammenheng med analyser av peptidenes molvektsfordeling (avsnitt 3.4.6).

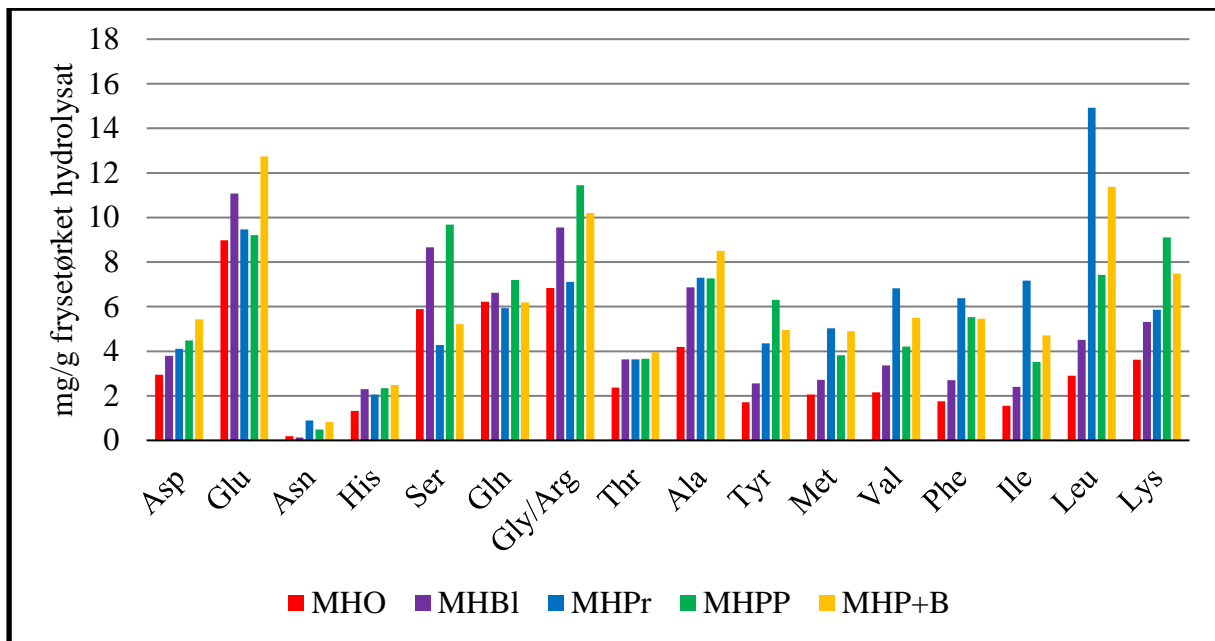
### 3.4.5 Innhold og sammensetning av frie aminosyrer

Innhold og sammensetning av frie aminosyrer i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U ble analysert ved HPLC. Analyseresultater, inkludert grunnlagsdata for figur 3-19 og 3-20, er gitt i vedlegg F, henholdsvis tabell 1F og tabell 2F.

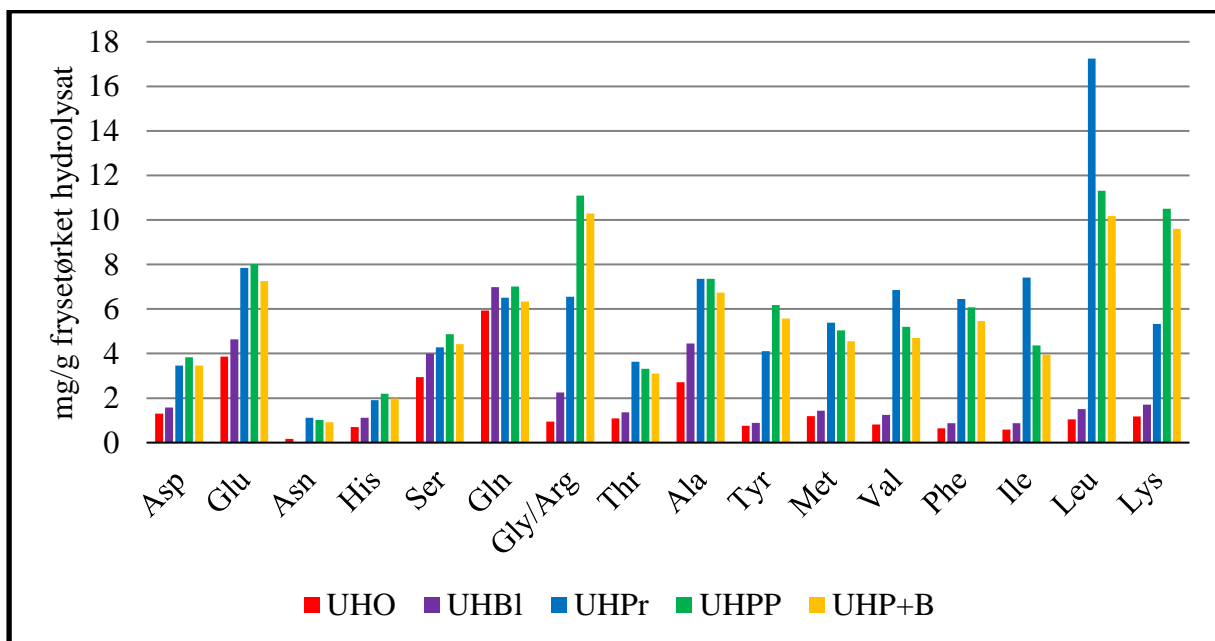
Det totale innholdet av frie aminosyrer var signifikant høyere i HPH fra autolytisk hydrolyse av restråstoff M (MHBl,  $76,20 \pm 2,16$  mg/g frysetørket HPH), sammenlignet HPH fra autolytisk hydrolyse av restråstoff U (UHBl,  $34,89 \pm 0,53$  mg/g frysetørket HPH). Det ble også funnet høyere DH i HPH fra MHBl enn i HPH fra UHBl (avsnitt 3.4.4). En høyere DH, og et høyere innhold av frie aminosyrer, i HPH fra MHBl indikerer igjen endogen eksopeptidaseaktivitet i restråstoff med innmat. Antagelsen om at aktiviteten til endogene eksopeptidaser er med på å frigjøre aminosyrer i HPH under hydrolyseprosessen, støttes av sammenligning med nullprøver (MHO:  $54,72 \pm 0,82$  mg/g frysetørket HPH, UHO:  $25,83 \pm 0,99$  mg/g frysetørket HPH). 60 minutters hydrolyse resulterte i et signifikant høyere innhold av frie aminosyrer i HPH for begge restråstoff (MHBl, UHBl). Endogene enzymer er derfor med på å hydrolysere vannløselige proteiner i HPH, men lite aktive i å løseliggjøre proteinene i restråstoffet.

Tilsetning av kommersielle enzymer resulterte i et signifikant høyere innhold av frie aminosyrer i HPH (MH:  $95,34 \pm 2,99 - 99,94$  mg/g frysetørket HPH, UH:  $88,50 \pm 4,15 - 97,36 \pm 3,58$  mg/g frysetørket HPH), sammenlignet med en autolytisk hydrolyse. Av de kommersielle enzymene benyttet i denne oppgaven, er det hovedsakelig Corolase PP som har dokumentert eksopeptidaseaktivitet. Det var derfor forventet at HPH fra enzymatisk hydrolyse med tilsetning av Corolase PP ville ha et høyere innhold av frie aminosyrer, sammenlignet med tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain. En slik effekt ble bare observert for restråstoff M. En mulig forklaring på dette kan være at pH-betingelsene ved den enzymatiske hydrolysen ikke var optimale for eksopeptidaseaktiviteten til Corolase PP. pH i kvernet restråstoff M og restråstoff U ble målt til henholdsvis 5.8 og 5.5. Disse pH-verdiene faller utenfor område for optimal aktivitet av enzympreparatet (pH = 7-9) [Adler-Nissen (1986)].

Sammensetningen av frie aminosyrer i HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U er presentert i henholdsvis figur 3-19 og figur 3-20.



**Figur 3-19:** Innhold og sammensetning av frie aminosyrer (mg/g frysetørket hydrolysat) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).



**Figur 3-20:** Innhold og sammensetning av frie aminosyrer (mg/g frysetørket hydrolysat) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Tilsetning av kommersielle enzymer økte frigjøringen av mange hydrofobe aminosyrer som ellers kunne bidratt til hydrofobe interaksjoner, innad i et peptid eller mellom peptider. Slike interaksjoner kunne igjen ført til utfelling, og peptidet ville da befunnet seg i den uløselige fraksjonen [Damodaran et al. (2008)]. Flere av de hydrofobe frie aminosyrene i HPH var essensielle (tabell 1, avsnitt 1.5.1). Dette kan være fordelaktig hvis HPH skal tilsettes en matvare, da konsentrasjonen av essensielle aminosyrer i en proteinkilde er avgjørende for dens ernæringsmessige verdi [Shiau (1994), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. Det er særlig fordelaktig hvis de essensielle aminosyrene, som del av et peptid, ville blitt utfelt på grunn av hydrofobe interaksjoner. Hvis peptidet uansett hadde forblitt løst i hydrolysatet, vil det være mer gunstig for produktet om de essensielle aminosyrene er bundet i en peptidkjede. Årsaken til dette er at et økt innhold av frie aminosyrer øker sannsynligheten for en reaksjon mellom aminogruppen og en karbonylgruppe i maillardreaksjonen. Dette fører ikke bare til tap av aminosyren, men kan også ha negative konsekvenser for produktet, som for eksempel brunfarging. Fargeendringen skjer spesielt hurtig i reaksjoner som involverer cystein, metionin og tryptofan [Damodaran et al. (2008)]. I tillegg vil essensielle aminosyrer i peptidform være mer biotilgjengelige, da kortkjedede peptider absorberes mer effektivt enn frie aminosyrer i tarmen [Siemensma et al. (1993), - ikke sett, sitert etter Clemente (2000)].

Bitterhet er en uønsket egenskap for HPH, og kan begrense bruksområdet til produktet [Rustad (2003)]. Et høyt innhold av hydrofobe frie aminosyrer i HPH kan i denne sammenheng være positivt, og bidra til å redusere bitterhet. Dette på grunn av at hydrofobe peptider er vesentlig bitrere enn den tilsvarende blandingen av frie aminosyrer [Belitz et al. (1975), - ikke sett, sitert etter Dauksas et al. (2004)].

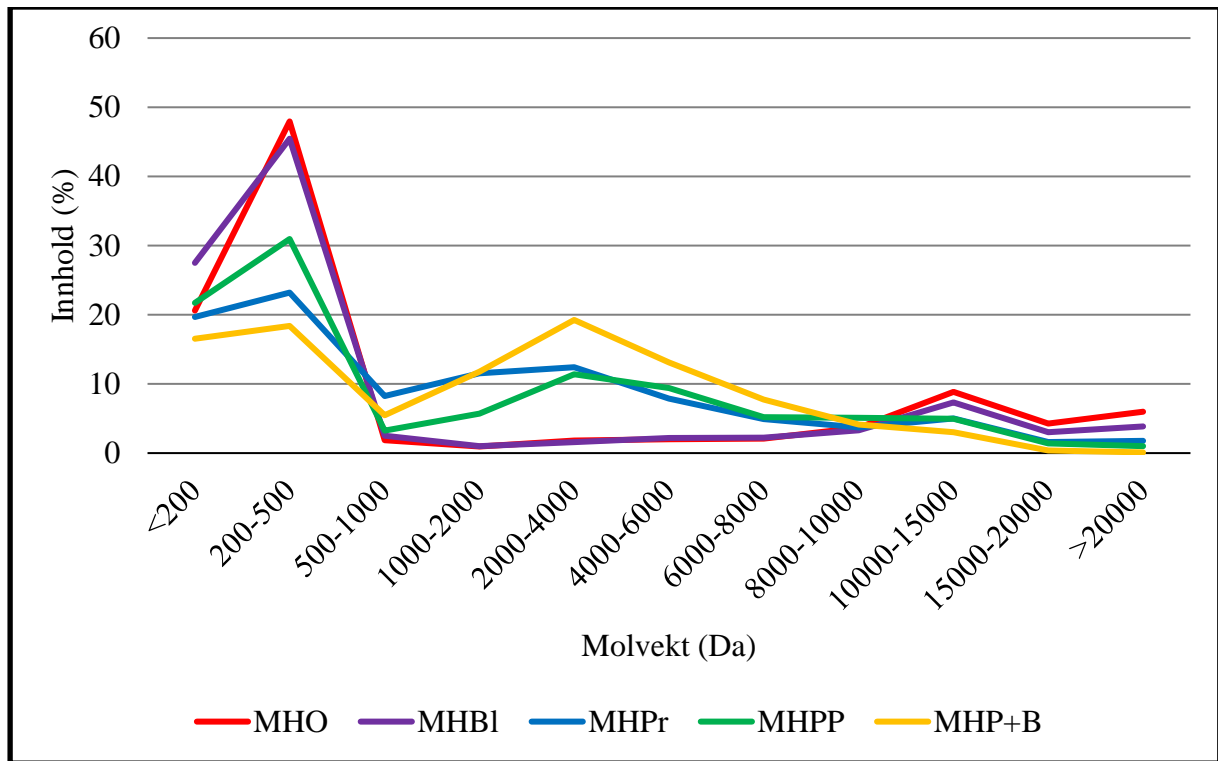
### 3.4.6 Peptidenes molvektsfordeling

Peptidenes molvektsfordeling i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U ble analysert ved HPLC. Analyseresultater, inkludert grunnlagsdata for figur 3-21 – 3-24, er gitt i vedlegg G, henholdsvis tabell 1G og tabell 2G.

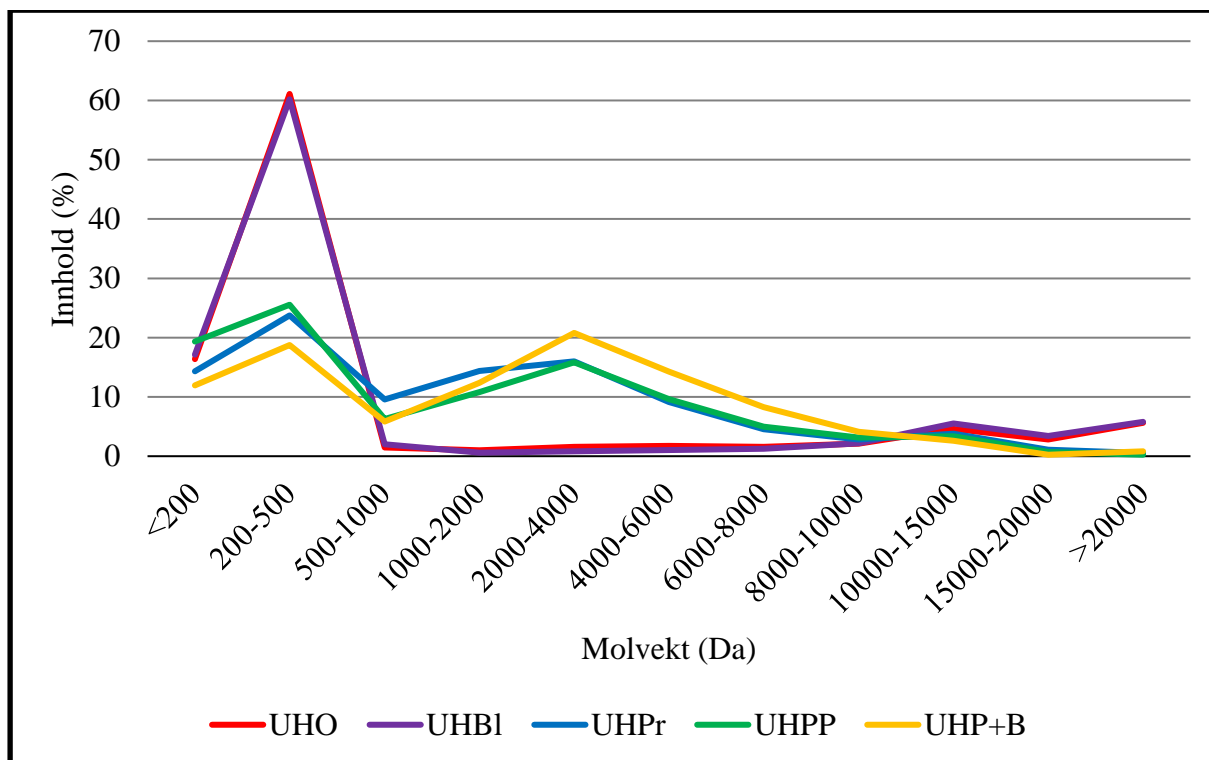
Størrelsen på peptidene i et hydrolysat vil påvirke dets sensoriske og funksjonelle egenskaper. Dette inkluderer bitterhet, biotilgjengelighet og løselighet, samt evne til å danne geler og emulsjoner [Gbogouri et al. (2004)]. Ønsket molvektsfordeling på peptidene vil derfor avhenge av den funksjonen man ønsker at hydrolysatet skal ha. Små peptider vil ha økt løselighet, redusert bitterhet og økt biotilgjengelighet, mens større peptider er nødvendige for dannelsen av stabile geler og emulsjoner.



Tilsetning av kommersielle enzymer, ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns, resulterte i en signifikant endring av molvektfordelingen (Da) til peptidene i HPH. Dette er illustrert i figur 3-21 (restråstoff M) og figur 3-22 (restråstoff U), der resultatene av de 5 ulike behandlingene er sammenlignet.

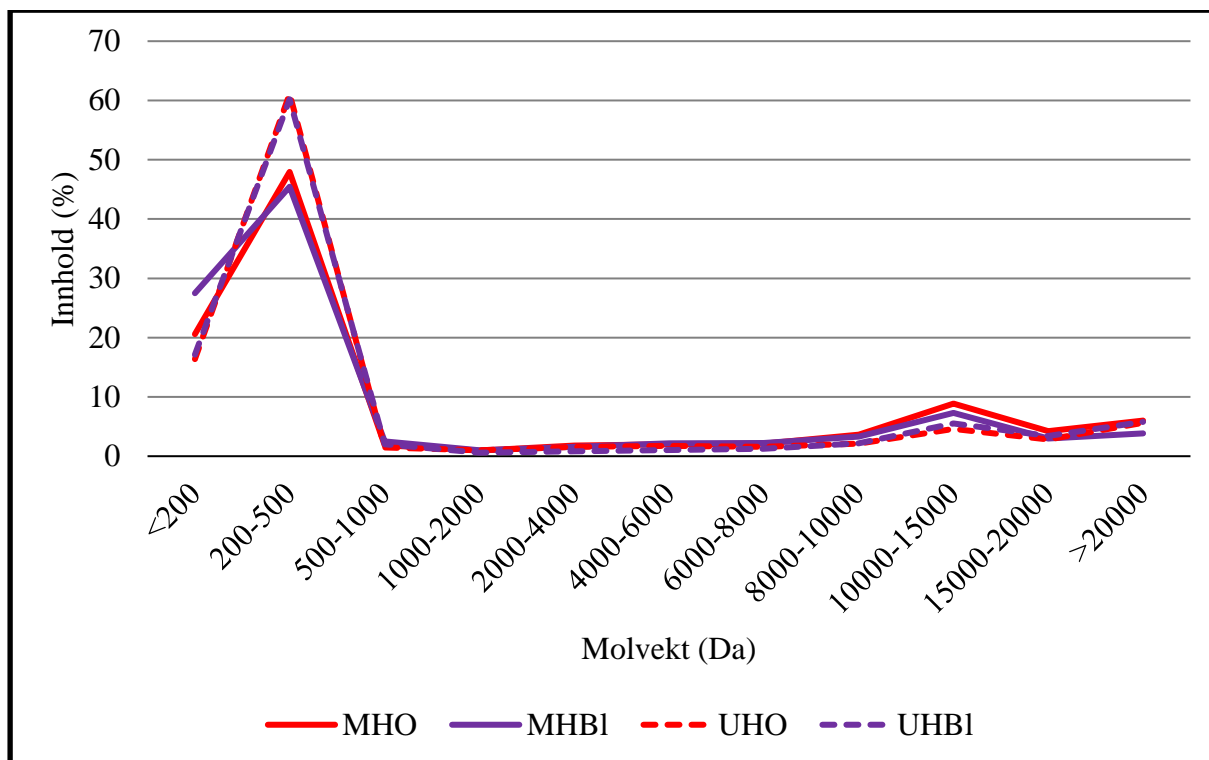


**Figur 3-21:** Molvektsfordeling (Da) til peptider i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt, n = 2).



**Figur 3-22:** Molvektsfordeling (Da) til peptider i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, BI), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt, n = 2).

Proteininnholdet i HPH fra autolytisk hydrolyse av begge restråstoff bestod hovedsakelig av små peptider (< 500 Da). Hydrolyse med kommersielle enzymer ga derimot en langt bredere molvektsfordeling på peptidene i HPH, med et høyere innhold av større peptider. Det kan derfor se ut til at peptidenes molvektsfordeling er mer avhengig av hvilke enzymer som benyttes, enn restråstoffets sammensetning. En sammenligning av peptidenes molvektsfordeling i HPH fra nullprøver (MHO, UHO) og autolytisk hydrolyse (MHBI, UHBI) av restråstoff M og restråstoff U er presentert i figur 3-23.

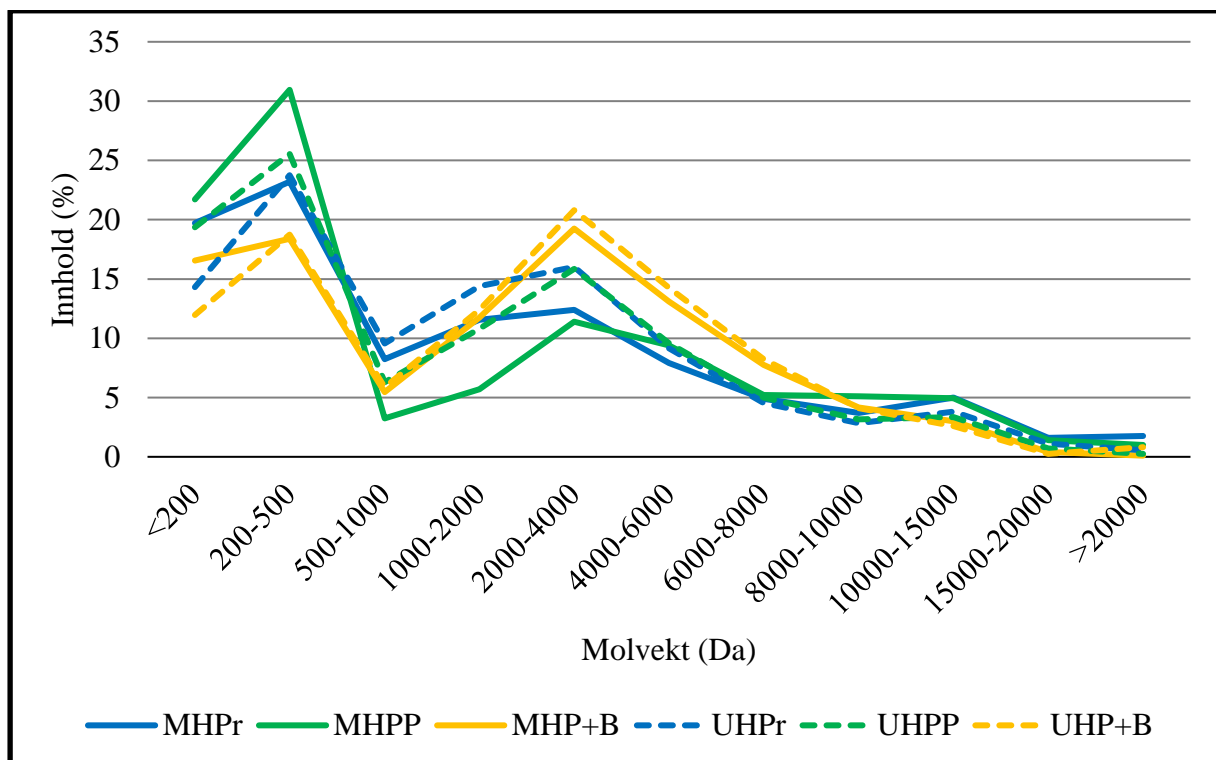


**Figur 3-23:** Sammenligning av molvektsfordeling (Da) til peptider i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH, heltrukken linje) og hel høne uten innmat (UH, stiptet linje). Forkortelser er brukt for prøver uten hydrolyse (O) og autolytisk hydrolyse (blank, BI). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt,  $n = 2$ ).

I figur 3-23 observeres to vektintervall hvor innholdet av peptider er betraktelig høyere enn ved resterende vektintervall: 200-500 Da og < 200 Da. Disse vektintervallene tilsvarer i hovedsak frie aminosyrer og små oligopeptider, da aminosyrer har en gjennomsnittlig molekylær masse på 120 Da [Kimura (1968)]. De fleste peptidene i HPH fra autolytisk hydrolyse av restråstoff M (MHBI) og restråstoff U (UHBI) hadde en størrelse på 200-500 Da, noe som indikerer en omfattende hydrolyse av proteinene i HPH. Dette er i samsvar med DH i samme prøver (avsnitt 3.4.4). Sammenligning med nullprøver (MHO, UHO) viste at 60 minutt autolytisk hydrolyse ikke medfører en vesentlig endring av molvektsfordelingen til peptidene i HPH. Innholdet av små peptider skyldes derfor ikke nødvendigvis endogen enzymaktivitet, men restråstoffet selv. Vannløselige proteiner vil være tilstede i restråstoffet, uavhengig av prosessering, og kan ha blitt «vasket» ut ved tilsetning av vann før hydrolysen (avsnitt 3.4.4). Hvis endogene enzymer hydrolyserer vannløselige proteiner, som diskutert i avsnitt 3.4.5, vil dette gi økt mengde peptider med lav molvekt i ved autolytisk hydrolyse sammenlignet med nullprøve. Dette ble observert for restråstoff M, hvor innholdet av peptider med molvekt < 200 Da økte fra  $20,6 \pm 1,0$  % (MHO) til  $27,5 \pm 1,0$  % (MHBI) ved autolytisk hydrolyse.

Når det gjelder bruksområde, vil et hydrolysat med høyt innhold av peptider av lav molekylær vekt, samt et minimalt innhold av frie aminosyrer, ha høy ernæringsverdi [Vijayalakshmi et al. (1986), - ikke sett, sitert etter Bhaskar et al. (2007)]. 45,5 % (MHBI) og 60,2 % (UHBI) av peptidene i HPH fra autolytisk hydrolyse befant seg i størrelsesintervallet 200-500 Da, noe som tyder på at HPH fra autolytisk hydrolyse vil være egnet til bruk i produkter med fokus på lettopptakelig næring (høy biotilgjengelighet). Det er likevel viktig å inkludere tørrstoffutbyttet i vurderingen. Sammenlignet med hydrolyse med kommersielle enzymer, resulterte autolytisk hydrolyse av begge restråstoff i et lavt tørrstoffutbytte i HPH (avsnitt 3.2.2). Dette betyr at relativt små mengder protein vil bli løseliggjort i HPH ved autolytisk hydrolyse, hvilket medfører en dårlig utnyttelse av restråstoffets potensiale.

En sammenligning av peptidenes molvektsfordeling i HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U med kommersielle enzym er presentert i figur 3-24.



**Figur 3-24:** Sammenligning av molvektsfordeling (Da) til peptider i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH, heltrukken linje) og hel høne uten innmat (UH, stiplet linje). Forkortelser er brukt for de tre ulike behandlingene: 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt, n = 2).

Enzymatisk hydrolyse med alle kommersielle enzymer (Protamex, Corolase PP, Papain + Bromelain) ga HPH med et lignende innhold av peptider i ulike vektintervall. To markante

«topper» er synlig i figur 3-24, noe som betyr at de fleste peptidene i HPH vil befinne seg i vektintervallene 200-500 Da og 2000-4000 Da. Hydrolyse med Protamex og Corolase PP ga et signifikant lavere innhold av peptider i vektintervallet 2000-4000 Da, og et signifikant høyere innhold av peptider i vektintervallet 200-500 Da, sammenlignet med Papain + Bromelain. Dette gjaldt begge restråstoff. En minking i innhold ved et vektintervall, vil medføre en økning ved et annet. Når økningen observeres ved et lavere vektintervall, som for Protamex og Corolase PP, tyder dette på at peptidene i vektintervallet 2000-4000 er brutt ned som følge av enzymenes aktivitet. Protamex og Corolase PP ga altså en mer omfattende nedbrytning av peptidene i HPH ved enzymatisk hydrolyse av begge restråstoff sammenlignet med Papain + Bromelain.

Når det gjelder HPH fra hydrolyse av restråstoff M med Corolase PP (MHPP), ble det i tillegg funnet et signifikant lavere innhold av peptider i vektintervallet 1000-2000 Da, sammenlignet med Protamex og Papain + Bromelain. Dette tyder på at aktiviteten til Corolase PP resulterer i den mest omfattende nedbrytningen av peptidene i HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer. Et høyt innhold av små peptider i HPH vil kunne føre til misfarging som følge av Maillardreaksjonen. Sammen med det høye lipidinnholdet i HPH fra MHPP, kan dette bidra til å forklare den observerte mørkere fargen på frysetørket HPH (avsnitt 3.4.1). Dette bekrefter igjen antagelsen om at Corolase PP er dårlig egnet som tilsetning, ved enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns, sammenlignet med Protamex og Papain + Bromelain.

Større peptider vil være bedre geldannere og emulgatorer, sammenlignet med små oligopeptider og frie aminosyrer. For at et peptid skal ha gode emulgerende egenskaper, bør kjedelengden være over 20 aminosyrer [Lee et al. (1987), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. Dette vil tilsvare en molekylvekt på > 2400 Da. En mer omfattende hydrolyse vil derfor redusere hydrolysatets evne til å danne stabile emulsjoner [Mahmoud (1994), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer vil derfor, på grunn av et vesentlig innhold av peptider i vektintervallet 2000-5000 Da (11,4 – 20,8 %), være godt egnet som funksjonell ingrediens i matvarer. Det høyeste innholdet av peptider i dette vektintervallet ble, som nevnt over, funnet i HPH fra hydrolyse med Papain + Bromelain.

Bitterhet er, som tidligere nevnt, en uønsket egenskap ved HPH. Peptider med hydrofobe aminosyreenheter, og en molekylvekt på 1000-6000 Da, har størst sannsynlighet for å være bitre [Tello et al. (1994), - ikke sett, sitert etter Kristinsson et al. (2000)]. Det er derfor større

sannsynlighet for at HPH fra hydrolyse med kommersielle enzymer er bittert enn HPH fra autolytisk hydrolyse, basert på peptidenes molvektfordeling.

### 3.4.7 Oppsummering

Varmebehandling av restråstoff fra verpehøns ga et lavt proteinutbytte i limvann. Dette indikerer lav endogen enzymaktivitet ved varmebehandlingens temperatur, som forventet.

Enzymatisk hydrolyse med Protamex og Papain + Bromelain resulterte i en vesentlig lysere farge på frysetørket HPH, et signifikant lavere lipidinnhold og et signifikant høyere proteininnhold i HPH, sammenlignet med autolytisk hydrolyse. Corolase PP ga en mørkere farge på HPH (restråstoff M), et signifikant høyere lipidinnhold (restråstoff U) og et lavere proteininnhold i HPH, sammenlignet med de andre kommersielle enzymene. HPH fra autolytisk hydrolyse hadde en signifikant høyere DH, sammenlignet med HPH fra hydrolyse med kommersielle enzym. Tilsetning av kommersielle enzymer økte innholdet av essensielle hydrofobe aminosyrer i HPH ved enzymatisk hydrolyse av begge restråstoff.

Tilsetning av kommersielle enzymer resulterte i en signifikant endring av molvektfordelingen til peptidene i HPH. De fleste peptidene i HPH fra autolytisk hydrolyse hadde en molvekt på  $< 500$  Da. Hydrolyse med kommersielle enzymer ga derimot en langt bredere molvektfordeling på peptidene i HPH, med et høyere innhold av større peptider ( $< 4000$  Da). Papain + Bromelain ga HPH med større andel peptider i vektintervallet 2000-4000 Da, sammenlignet med Protamex og Corolase PP.

## 3.5 Uløselige fraksjon: kvalitet og sammensetning

Varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns resulterte i en uløselig fraksjon. Denne fraksjonen vil bestå av alle komponenter i restråstoffet, foruten separerte olje og de vannløselige komponentene. Ved varmebehandling betegnes den uløselige fraksjonen som slam, ved enzymatisk hydrolyse betegnes den som sediment og ved ensilering betegnes den som ensilasje.

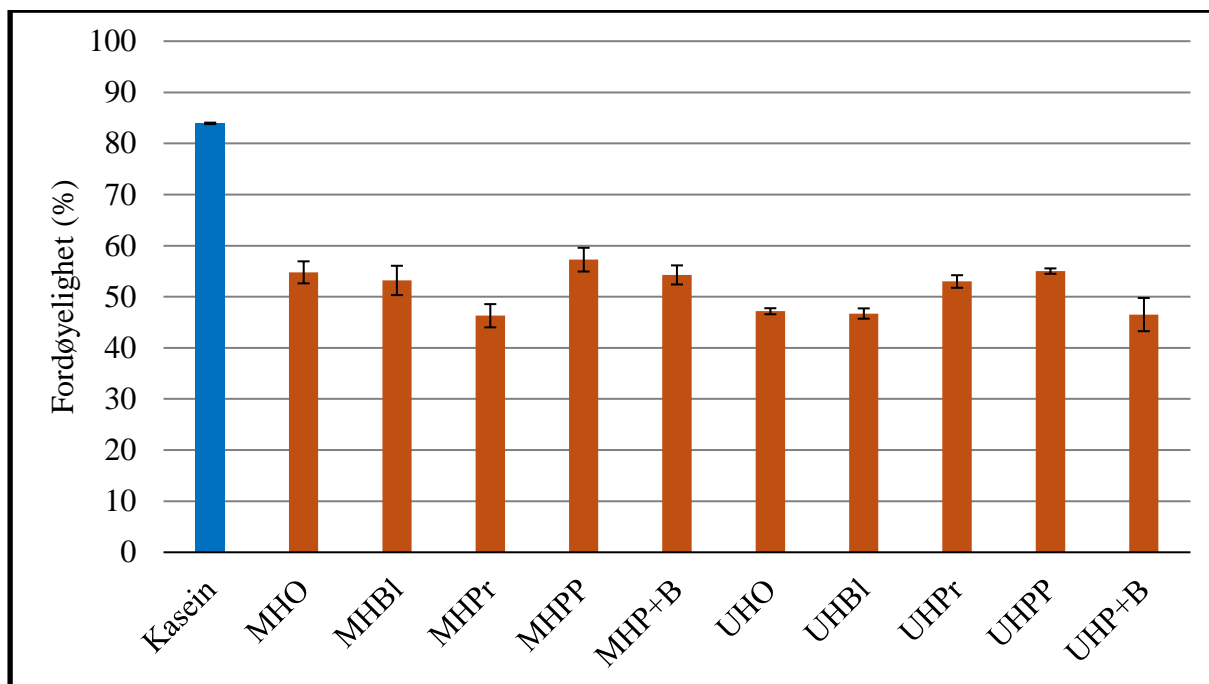
### 3.5.1 Fordøyelighet

Fordøyelighet (%) på avfettet og tørket slam, sediment og ensilasje ble analysert in vitro. Pepsin ble brukt som representant for proteasene som inngår i en normal fordøyelse. Kasein ble brukt som referanseprotein, og burde i teorien ha en fordøyelighet på 85-90 % med pepsin. Analyseresultater, med grunnlagsdata for figur 3-25 og 3-26, er gitt i vedlegg H, tabell 1H.

Slam fra varmebehandling av restråstoff M (MT) og restråstoff U (UT) hadde en fordøyelighet på henholdsvis  $42,3 \pm 3,1$  % og  $58,0 \pm 1,0$ . Til sammenligning hadde restråstoff M en fordøyelighet på  $66,2 \pm 2,0$  % og restråstoff U en fordøyelighet på  $57,3 \pm 3,1$  %. Varmebehandlingen økte derfor ikke fordøyeligheten på proteinene i denne fraksjonen, og fordøyeligheten på slammet var dårlig sammenlignet med kasein ( $83,9 \pm 0,1$  %). Dette tyder på at proteinene i slammet har lav ernæringsverdi, noe vil begrense bruksområdet til denne fraksjonen. Som diskutert i avsnitt 3.2.1 og 3.4.3, resulterte varmebehandlingen i en god oljeseparasjon, men et lavt proteinutbytte i limvann. Varmebehandling er derfor egnet til å separere lipid fra resten av komponentene i restråstoff fra verpehøns, men dårlig egnet til utnyttelse av restråstoffets proteiner. Oljen kan ha flere bruksområder, deriblant som tilsetning i dyrefôr, men slamfraksjonen vil ha et begrenset bruksområde grunnet lav fordøyelighet. På grunn av det høye tørrstoffutbyttet i slamfraksjonen, vil avfallsreduksjonen være relativt lav ved denne prosesseringsmetoden.

Fordøyeligheten på sediment fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) og restråstoff U (UH) er presentert i figur 3-25. Til sammenligning er fordøyeligheten på kasein inkludert i figuren.



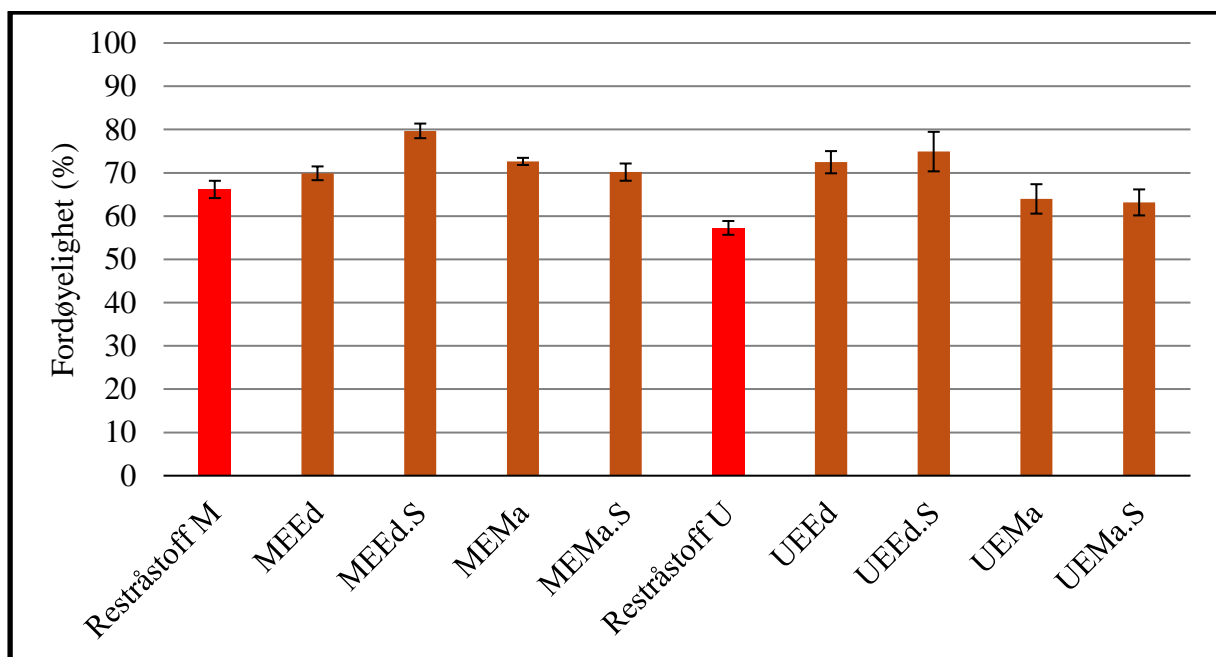


**Figur 3-25:** Fordøyelighet (%) av pepsin på kasein, samt sediment fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) og hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt ± SD, n = 2). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Fordøyeligheten på sediment fra enzymatisk hydrolyse varierte fra  $46,3 \pm 2,3$  -  $57,3 \pm 2,3$  %. Dette er lavt sammenlignet med fordøyeligheten på kasein ( $83,9 \pm 0,1$  %), og proteinene i sedimentet vil derfor ha lav ernæringsmessig verdi. Fordøyeligheten på sediment fra nullprøver (MHO:  $54,8 \pm 2,2$  %, UHO:  $47,2 \pm 0,6$  %) var ikke signifikant forskjellig fra fordøyeligheten på prøver fra autolytisk hydrolyse av restråstoff M (MHBl,  $53,2 \pm 2,9$  %) og restråstoff U (UHBl,  $46,7 \pm 1,0$  %). Den lave fordøyeligheten skyldes derfor trolig varmeinaktiveringen etter hydrolysen. Varmeinaktiveringen ble utført ved 90 °C, og ved denne temperaturen vil mange proteiner bli denaturert. Denaturerte proteiner vil være mindre tilgjengelige for proteaser, og derfor ha redusert fordøyelighet [Damodaran et al. (2008)]. På samme måte vil varmebehandling ved 100 °C redusere proteinenes fordøyelighet. Varmeinaktiveringen kan også resultere i dannelsen av lipid-protein komplekser, som hovedsakelig vil befinne seg i sedimentet. Disse kompleksene er motstandsdyktige mot enzymatisk aktivitet, og vil derfor ha lav fordøyelighet [Šližytė et al. (2005a), Šližytė et al. (2005b)]. I tillegg vil en del av proteinene i restråstoffet være løst i HPH etter den enzymatiske hydrolysen. Store deler av sedimentene vil derfor bestå av bein og andre komponenter, hvor enzymatisk aktivitet hindres av proteinets struktur.

Slam og sediment kan brukes i dyrefôr, men den begrensede fordøyeligheten vil gjøre dem lite eget til dette formålet. Tørrstoffutbytte i sediment fra enzymatisk hydrolyse med kommersielle enzymer var lavt ( $15,8 \pm 2,8 - 21,8 \pm 4,6$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med tørrstoffutbytte i slam fra varmebehandling ( $25,6 \pm 2,5 - 28,3 \pm 3,0$  g/ 100 g råstoff). Enzymatisk hydrolyse er en mer kostbar og tidkrevende prosesseringsmetode, men vil gi en bedre utnyttelse av restråstoffets potensiale, sammenlignet med varmebehandling.

Ensilasjen er hovedproduktet av ensilering, og kan tilsettes dyrefôr som proteinkilde [New et al. (1995), - ikke sett, sitert etter Vieira et al. (2015)]. Det er derfor essensielt at den har god fordøyelighet. Økt fordøyelighet vil øke biotilgjengeligheten på proteinene, og slik øke den ernæringsmessige kvaliteten på proteinkilden [Damodaran et al. (2008)]. Fordøyeligheten på ensilasje fra ensilering av restråstoff M (ME) og restråstoff U (UE) er presentert i figur 3-26. Til sammenligning, er fordøyeligheten på restråstoff M og restråstoff U også inkludert i figuren.



**Figur 3-26:** Fordøyelighet (%) av pepsin på hel høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) og hel høne uten innmat (restråstoff U), samt ensilasje fra ensilering av restråstoff M (ME) og ensilering av restråstoff U (UE) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S).

Under ensileringen vil aktiviteten til endogene proteaser resultere i et produkt hvor proteinene er mer nedbrutte enn de opprinnelige proteinene i restråstoffet. Fordøyeligheten på proteinene i ensilasjen bør derfor være høyere enn fordøyeligheten på restråstoffet. Ensilering ser ut til å øke fordøyeligheten på proteinene ( $63,2 \pm 3,0 - 79,7 \pm 1,7$  %), i restråstoff fra verpehøns,

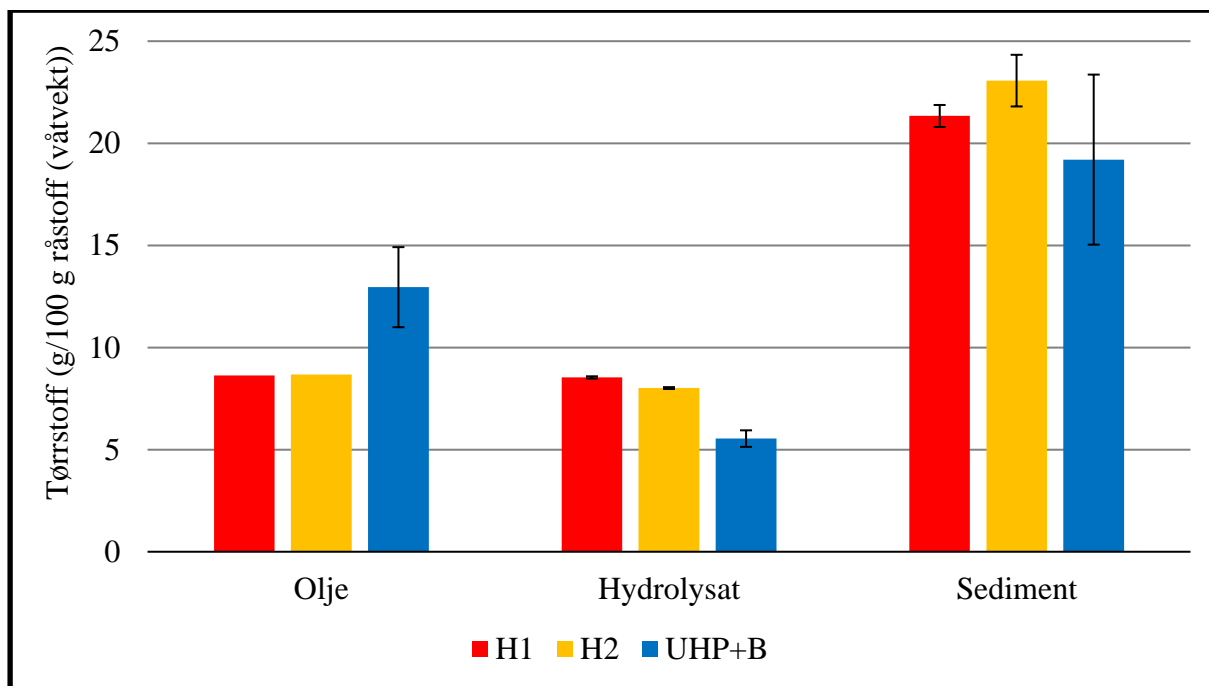
sammenlignet med restråstoffenes fordøyelighet ( $57,3 \pm 1,6$  -  $66,2 \pm 2,0$  %). Forskjellen var bare signifikant for noen av prøvene (MEMa, MEEed.S, UEEed, UEEed.S), men dette kan skyldes analysemetoden. Avfettingen av prøvene ble ikke utført i henhold til en standardisert metode. En ufullstendig avfetting vil påvirke resultatene av analysen, og det burde derfor blitt utført analyser for å bekrefte at alt fett var fjernet. I tillegg ble det bare brukt et enzym; pepsin. In vivo fordøyelse av proteiner involverer en rekke proteaser. En fordøyelighetsanalyse med ulike enzymkombinasjoner vil derfor gi mer pålitelige resultater. Videre bør det nevnes at prøvene var svært uhomogene, noe som også kan ha påvirket analyseresultatene. Hvis ensilering gir økt fordøyelighet vil dette, kombinert med en god oljeseparasjon, gjøre ensilasjen egnet som proteinkilde i dyrefôr.

### 3.6 Oppskalert enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns med tilsetning av Corolase PP resulterte i hønseproteinhydrolysat (HPH) med mørk farge, høyt lipidinnhold, lavt proteininnhold og mer nedbrutte peptider, sammenlignet med tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain. Basert på disse resultatene, ble tilsetning av 0,1 % Protamex, og 0,1 % Papain + Bromelain funnet å være best egnet til enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra verpehøns. Papain + Bromelain ga bedre oljeseparasjon, samt HPH med peptider av høyere molvekt, sammenlignet med Protamex. I næringsmiddelindustrien kan det i tillegg være fordelaktig å bruke eksogene enzymer fra plantekilder, da mikrobielle enzymer kan vekke negative assosiasjoner hos forbrukerne. I denne studien ble det derfor bestemt at 0,1 % Papain + Bromelain skulle benyttes som tilsetning ved den oppskalerte enzymatiske hydrolysen.

I den oppskalerte enzymatisk hydrolysen ble restråstoffet kvernet i ulik grad for å se om partikkelstørrelse påvirket resultatet av hydrolysen: finkvernet (restråstoff H1) og grovkvernet (restråstoff H2). Restråstoffsammensetningen tilsvarte sammensetningen av restråstoff U benyttet i screeningforsøket: hel høne uten innmat, hode og fjær. Grad av kverning på restråstoff U tilsvarte grovkvernet, altså restråstoff H2.

En oppskalert enzymatisk hydrolyse kan gi en indikasjon på hvorvidt prosesseringen vil gi like gode resultater, ved utnyttelse av restråstoff fra verpehøns, i industriell sammenheng. En sammenligning av tørrstoffutbyttet (g/ 100 g råstoff (våtvekt)) i olje, hønseproteinhydrolysat (HPH) og sediment fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff U (20 g), restråstoff H1 (2 kg) og restråstoff H2 (2 kg) er presentert i figur 3-27. Grunnlagsdata, med de ulike fraksjonenes størrelse (g) og tørrstoffinnhold (%), samt beregning av massebalanse for enzymatisk hydrolyse av restråstoff H1 og restråstoff H2, er gitt i vedlegg I, tabell 11.



**Figur 3-27:** Tørrstoffutbytte i olje, hønsproteinhydrolysat (HPH) og sediment fra oppskalert enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat, hode og fjær: finkvernet (H1) og grovkvernet (H2) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 1-3$ ), samt enzymatisk hydrolyse av samme restråstoff i mindre skala (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 10$ ). Forkortelser er brukt for tilsetning av 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff H1 og restråstoff H2 resulterte i HPH med et signifikant høyere tørrstoffutbytte ( $8,0 \pm 0,1$  -  $8,5 \pm 0,1$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med UHP+B ( $5,5 \pm 0,4$  g/ 100 g råstoff). Dette indikerer at enzymatisk hydrolyse med 0,1 % Papain + Bromelain også er egnet til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns i en industriell sammenheng.

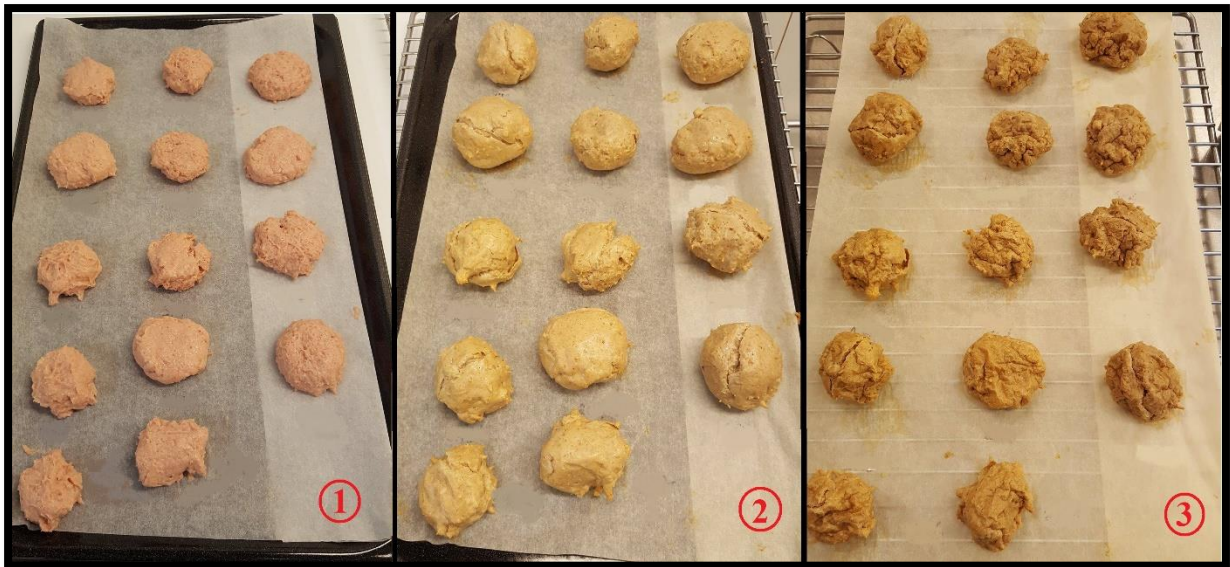
Partikkelstørrelsen på restråstoffet påvirket resultatet av hydrolysen. Finkverning (restråstoff H1) resulterte i et signifikant høyere tørrstoffutbytte i HPH ( $8,5 \pm 0,1$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med grovkverning (restråstoff H2,  $8,0 \pm 0,0$  g/ 100 g råstoff). Finkverning så også ut til å redusere tørrstoffutbyttet i sediment, men forskjellen var ikke signifikant. Det er likevel sannsynlig at det økte tørrstoffutbyttet i HPH, fra hydrolyse av restråstoff H1, skyldes at større mengder protein er blitt løseliggjort, noe som vil medføre en reduksjon av tørrstoffutbyttet i sediment. Denne antagelsen er basert på tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen, som var tilnærmet likt for restråstoff H1 og restråstoff H2. Det økte tørrstoffutbyttet i HPH, fra hydrolyse av restråstoff H1, skyldes derfor trolig ikke økt lipidinnhold.

Tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen var høyere for UHP+B ( $13,0 \pm 2,0$  g/ 100 g råstoff), sammenlignet med oljefraksjonen fra hydrolyse av restråstoff H1 ( $8,6$  g/ 100 g råstoff) og

restråstoff H2 (8,7 g/ 100 g råstoff). Dette betyr ikke nødvendigvis at en oppskalert enzymatisk hydrolyse resulterer i en dårligere oljeseparasjon, men kan skyldes usikkerhet i metoden. Tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen fra UHP+B ble beregnet basert på resultater av 10 paralleller. Tørrstoffutbyttet i oljefraksjonen, fra hydrolyse av restråstoff H1 og restråstoff H2, ble derimot beregnet fra kun 1 parallell. I tillegg kan restråstoffet ha hatt ulikt lipidinnhold i utgangspunktet. Selv om sammensetningen var lik (hel høne uten innmat, hode og fjær), ble restråstoffet innhentet og kvernet ved to ulike tidspunkt. Det er ikke utenkelig at det på grunn av årstid, og eventuelt andre faktorer som fôring og avstamming, eksisterer individuelle forskjeller i hønenes fettprosent.

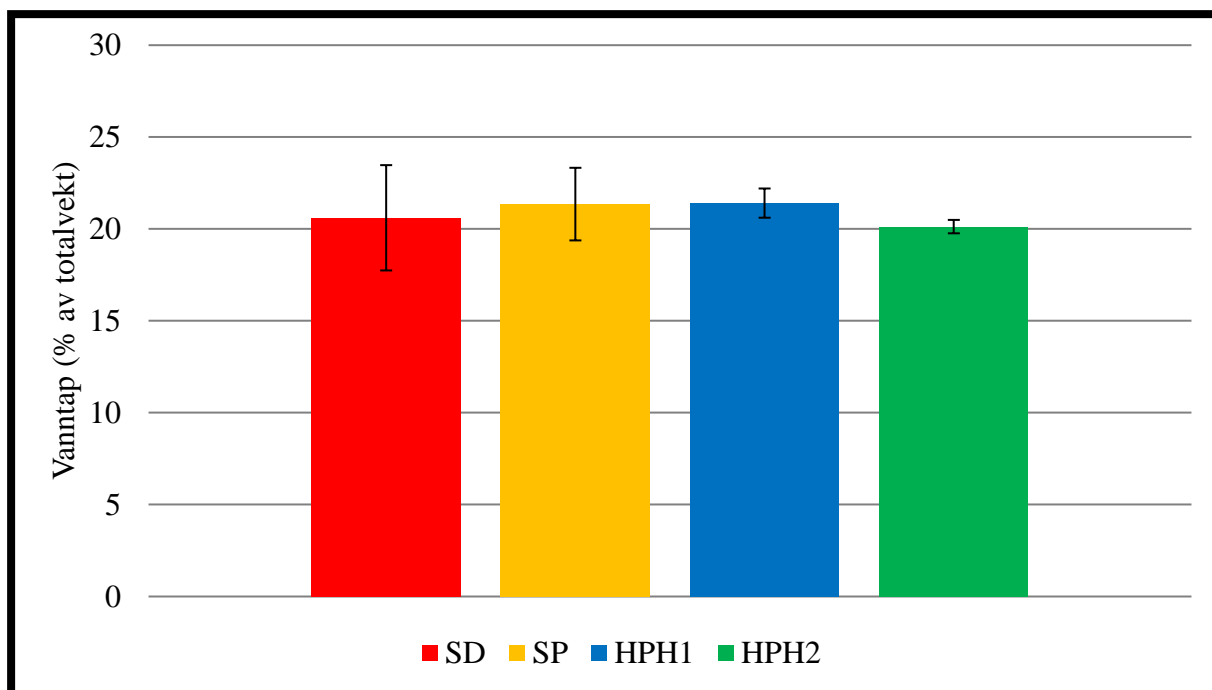
### 3.7 Produktutviklingsforsøk: kyllingkjøttkaker

Oppskalering av enzymatisk hydrolyse, med tilsetning av 0,1 % Papain + Bromelain, ble utført for å produsere større mengder hønseproteinhydrolysat (HPH). Forsøket ble utført på hel høne uten innmat med ulik grad av kverning: finkvernet (restråstoff H1) og grovkvernet (restråstoff H2). Hønseproteinhydrolysat (HPH) fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff H1 (HPH1) og restråstoff H2 (HPH2) ble brukt i som funksjonell ingrediens i produktutvikling av kyllingkjøttkaker. Kyllingkjøttkaker før steking, etter steking og etter avkjøling i romtemperatur er avbildet i figur 3-28.



**Figur 3-28:** Kyllingkjøttkaker fra produktutviklingsforsøk. Hønseproteinhydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat, hode og fjær ble forsøkt brukt som funksjonell ingrediens. Bildene er tatt før steking (1), etter steking i varmluft ved 200 °C i 14 minutter (2) og etter avkjøling i romtemperatur (3).

Forsøket ble utført som et screeningforsøk, med den hensikt å optimalisere metode og prosesseringsparametere til videre arbeid med HPH som funksjonell ingrediens i matvarer ment for humant konsum. Underveis ble det oppdaget flere svakheter ved metoden. I denne oppgaven var formålet med forsøket hovedsakelig å undersøke om tilsetning av HPH påvirker vanntap ved steking, samt smaken på produktet. Beregnet vanntap (%) ved steking for kyllingkjøttkaker tilsatt 4 % vann (SD), tilsatt 4 % vann og 1 % ScanPro (SP), tilsatt 4 % vann og 1 % HPH1, samt tilsatt 4 % vann og 1 % HPH2, er presentert i figur 3-29.



**Figur 3-29:** Vanntap (% av totalvekt) i kyllingkjøttkaker som følge av steking i varmluft ved 200 °C i 14 minutt. Forkortelser er brukt for de 4 ulike tilsetningene: 4 % vann (SD), 4 % vann og 1 % ScanPro (SP), 4 % vann og 1 % hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av finkvernet restråstoff fra verpehøns uten innmat (HPH1), samt 4 % vann og 1 % hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av grovkvernet restråstoff fra verpehøns uten innmat (HPH2) (gjennomsnitt ± SD, n = 2).

Teoretisk sett burde tilsetning av funksjonelle proteiner, med vannbindende egenskaper, gi redusert vanntap i kyllingkjøttkakene ved steking. En slik effekt ble ikke observert i dette forsøket, da ingen av tilsetningene ga en signifikant endring av vanntapet. Dette kan skyldes svakheter ved metoden. Det ble tilsatt veldig små mengder vann (4 %) og ScanPro/HPH (1 %). Usikkerheten involvert i tillaging, veiing og steking var stor, og det kan derfor være nødvendig med et bedre eksperimentelt oppsett. Til videre forsøk anbefales det også å steke kjøttkakene i panne før tilberedning i varmluftsovn. Dette vil i større grad simulere en industriell prosessering av denne typen produkt, og derfor gi et mer troverdig resultat.

Den sensoriske analysen på kyllingkjøttkakene bestod av en enkel smakstest utført av et utrent panel på 10 personer, hvorav 4 personer hadde kjennskap til forsøket. Dette vanskeliggjør fremstilling av resultatene fra analysen, men noen fellestrekk syntes å være:

- Alle de fire behandlingene gir kyllingkjøttkaker som er gode på smak
- Kyllingkjøttkakene tilsatt 4 % vann er mindre saftige basert på utseende og tekstur
- Det er ikke mulig å skille mellom kyllingkjøttkaker som er tilsatt ScanPro og HPH



Basert på hensikten med produktutviklingsforsøket, er disse resultatene lovende. Hvis HPH har de samme funksjonelle egenskapene som ScanPro i farseprodukter, og gir et produkt med tilsvarende smak, kan HPH potensielt erstatte ScanPro i industriell sammenheng. ScanPro<sup>TM</sup> er et kommersielt produkt som produseres fra kylling av matkvalitet[ScanPro<sup>TM</sup>FCP75/SF (n.d.)]. HPH ble i denne oppgaven produsert fra restråstoff fra verpehøns, et råmateriale som i utgangspunktet destrueres. Å erstatte kommersielle produkter med HPH vil derfor bidra til å øke utnyttelsen av, og inntjeningen på, restråstoff fra verpehøns.

## 4 Konklusjon

Prosesseringsmetodene benyttet i denne oppgaven var opprinnelig utviklet for utnyttelse av restråstoff fra fisk. Det kan konkluderes med at varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering også kan brukes til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns.

Varmebehandling av restråstoff M og restråstoff U resulterte i en god oljeseparasjon, på henholdsvis 58,4 % og 50,1 % av restråstoffets lipidinnhold. Oljen var av god kvalitet, og hadde lav oksidativ status, basert på FFA (0,3-0,4 %) og TOTOX (1,1-3,9). Fettsyresammensetningen til den separerte oljen ble påvirket av restråstoffets sammensetning, men ikke av prosesseringsmetode. Oljen hadde et fremtredende innhold av tre fettsyrer: palmitinsyre (16:0), oljesyre (C18:1  $\omega$ 9) og linolsyre (C18:2  $\omega$ 6). Det ble dannet lite limvann ved varmebehandlingen, noe som medførte et lavt proteinutbytte i denne fraksjonen (1,9-2,9 %). Slammet hadde lav fordøyelighet (42,3 – 58,0 %), sammenlignet med kasein (83,9 %). Varmebehandling er derfor egnet til å separere lipid fra resten av komponentene i restråstoffet, men dårlig egnet til utnyttelse av restråstoffets proteininnhold.

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff M og restråstoff U resulterte i en god oljeseparasjon, på 51,1-82,3 % av restråstoffets lipidinnhold. Oljen var av god kvalitet, og hadde lav oksidativ status, basert på FFA (0,3-1,0 %) og TOTOX ( $\leq$  1,0). Endogene enzymer var lite aktive i å løseliggjøre proteinene i restråstoffet, basert på tørrstoffutbytte (1,5 g/ 100 g råstoff) og proteininnhold (65,4-72,8 %) i frysetørket hønseproteinhydrolysat (HPH) fra autolytisk hydrolyse. Tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain ga et signifikant høyere tørrstoffutbytte (4,9-6,2 g/ 100 g råstoff), et signifikant lavere lipidinnhold (0,3-1,1 %) og et signifikant høyere proteininnhold (85,1-94,6 %) i HPH, sammenlignet med autolytisk hydrolyse. Fargen på frysetørket HPH ble også synlig hvitere ved tilsetning av disse kommersielle enzymene. Autolytisk hydrolyse resulterte i HPH hvor de fleste peptidene hadde en molvekt på  $<$  500 Da. Hydrolyse med Protamex, Corolase PP og Papain + Bromelain resulterte derimot i HPH hvor peptidene hadde en molvekt på  $<$  40000 Da. Sedimentet hadde lav fordøyelighet (46,3-57,3 %), sammenlignet med kasein (83,9 %). Tørrstoffutbyttet i sediment fra hydrolyse med kommersielle enzym var lavt (15,8-21,8 g/ 100 g råstoff), sammenlignet med tørrstoffutbyttet i slam fra varmebehandling (25,6-28,3 g/ 100 g råstoff). Enzymatisk hydrolyse, med kommersielle enzymer, er derfor egnet til utnyttelse av både lipid- og proteininnholdet i restråstoffet.

Tilsetning av Corolase PP ga en dårligere oljeseparasjon, et signifikant høyere innhold av FFA i separert olje (restråstoff U: 1,0 %), samt en mørkere farge, et lavere tørrstoffutbytte (2,6-4,5 g/ 100 g råstoff), et signifikant høyere lipidinnhold (restråstoff M: 3,71 %) og et lavere proteininnhold (77,7-88,5 %) i HPH, sammenlignet med tilsetning av Protamex og Papain + Bromelain. Enzymatisk hydrolyse bør derfor utføres med tilsetning av Protamex eller Papain + Bromelain. Oppskalering av enzymatisk hydrolysen med Papain + Bromelain, fra 20 g restråstoff til 2 kg restråstoff, ga et signifikant høyere tørrstoffutbytte i HPH. Dette kan tyde på at enzymatisk hydrolyse med Papain + Bromelain også vil være egnet for utnyttelse av restråstoff fra verpehøns i industriell sammenheng.

Ensilering av restråstoff M resulterte i en bedre oljeseparasjon enn restråstoff U, på henholdsvis 53,1-65,7 % og 14,0-42,5 % av restråstoffets lipidinnhold. Den separerte oljen var svært oksidert basert på TOTOX (13,2-79,3). Maursyre ga en bedre oljeseparasjon (64,6-65,7 %) og bedre oksidativ status (TOTOX = 13,2-17,9), sammenlignet med eddiksyre (oljeseparasjon: 53,1-58,0 %, TOTOX = 28,8-65,3), ved ensilering av restråstoff M. Sulfitt virket antioksiderende ved ensilering basert på PV. Fordøyeligheten på ensilasjen var god (63,2-79,7 %), sammenlignet med restråstoffets fordøyelighet (57,3-66,2 %). Ensilering med maursyre er derfor egnet til utnyttelse av proteininnholdet i restråstoff som inkluderer innmat. Sulfitt bør tilsettes for sin antioksidative funksjon.

Varmebehandling og ensilering utsetter restråstoffet for høye temperaturer og ekstrem pH. Dette medfører at prosesseringsproduktene hovedsakelig vil ha bruksområde som ingredienser i dyrefôr. Enzymatisk hydrolyse utgjør en mer skånsom prosesseringsmetode, og prosesseringsproduktene kan derfor brukes i produkter til humant konsum. Produktutvikling av kyllingkjøttkaker indikerte at HPH potensielt kan brukes som funksjonell ingrediens i matvarer.

## 5 Fremtidig arbeid

Denne oppgaven har vist at prosesseringsmetoder utviklet for utnyttelse av restråstoff fra fisk (varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering), også kan brukes til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns. Prosesseringsforsøkene ble hovedsakelig utført som screeningsforsøk. Det vil derfor være nødvendig med videre studier av prosesseringsparameterne, og hvordan disse påvirker utbyttet og produktenes kvalitet. Videre studier vil kunne bidra til å gjøre prosesseringsmetodene mer produktspesifikke, og dermed øke utnyttelsen av restråstoffet.

Oljen separert fra restråstoffet, ved varmebehandling og enzymatisk hydrolyse, var av god kvalitet. Det bør utføres studier på oljens oksidative stabilitet, før den kan bli brukt i produktutvikling. Neste steg vil være å finne et bruksområde for oljen, basert på produsentenes krav til kvalitet og fettsyresammensetning. Mulige bruksområder vil inkludere tilsetning i matoljer, kosmetikk og dyrefôr.

Enzymatisk hydrolyse med kommersielle enzymer ga lovende resultater, med tanke på produksjon av høykvalitets hønseproteinhydrolysat (HPH). Foruten en visuell bedømmelse av farge, ble det ikke foretatt sensoriske analyser av produktet i denne oppgaven. Det vil derfor være nødvendig med sensoriske analyser, utført av et kvalifisert testpanel, før HPH kan benyttes som funksjonell ingrediens i matvarer til humant konsum. Produktutviklingsforsøket viste at HPH potensielt kan brukes som vannbinder i farseprodukter. Det eksperimentelle oppsettet hadde mange svakheter, og det bør derfor utføres flere studier med fokus på de vannbindende egenskapene til HPH.

Ensilasjen kan potensielt brukes som proteinkilde i dyrefôr. Fordøyelighet var den eneste kvalitetsparameteren som ble undersøkt i denne oppgaven, og det bør derfor utføres flere analyser av ensilasjens kvalitet og sammensetning. Aminosyresammensetningen i ensilasjen vil være avgjørende for produktets kvalitet, og bør derfor analyseres. Det bør også utføres flere analyser med fokus på fordøyelighet. Fordøyelighetsanalysen utført i denne oppgaven hadde flere svakheter, noe som kan ha påvirket resultatene.

## Referanser

**Adler-Nissen, J. (1986).** *Enzymic hydrolysis of food proteins*. New York, USA, Elsevier Science Pub. Co. ISBN: 0853343861.

**Adler- Nissen, J. (1984).** *Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes*. ISBN: 1935-1828.

**Al-Janabi, Y. (2016).** *The Utilization of Mackerel (*Scomber scombrus*) Rest Raw Material Towards the Production of Oil and Protein-Effect of Storage Conditions on Yield, Quality, and Composition*. Institutt for bioteknologi. NTNU.

**Alberts, B. (2015).** *Molecular biology of the cell*. New York, NY, Garland Science, Taylor and Francis Group. ISBN: 9780815344322.

**Anderson, R. A. og Sando, G. (1991).** *Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase. Similarities to gastric and lingual lipases*. Journal of Biological Chemistry. 266 (33). Side: 22479-22484.

**Animalia (2015).** *Kjøttets tilstand* Status i norsk kjøtt- og eggeproduksjon. Alvseike, O. A. et al. Oslo, Norge.

**Animalia.no (2016).** *Helsetjenesten for fjørfe*. Aksessert: 13.09.2016, 2016, Hentet fra: [http://animalia.no/upload/BILDER/Fjorfe\\_og\\_egg/Boleg%20terrasse%20191007%20T%c3%b8nseth%20L%c3%b8ten.jpg](http://animalia.no/upload/BILDER/Fjorfe_og_egg/Boleg%20terrasse%20191007%20T%c3%b8nseth%20L%c3%b8ten.jpg).

**Animaliebiproduktforskriften (2016).** *Forskrift om animalske biprodukter som ikke er beregnet på konsum*. Hefte 12. Lovdata.no. Hentet fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-09-14-1064>.

**Animaliehygieneforskriften (2009).** *Forskrift om særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse*. Hefte 1. Lovdata.no. Hentet fra: [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1624/\\*#KAPITTEL\\_2](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1624/*#KAPITTEL_2).

**AOAC (1990).** *Official methods of analysis of AOAC International*. Washington DC, USA. ISSN: 1080-0344.

**AOCS (2013).** *Official methods and recommended practices of the AOCS*. Urbana, Ill., AOCS press. ISBN: 9781893997745

**Aursand, M., et al. (2011).** *Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils*. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM). Side: 73-118.

**Belitz, H. og Wieser, H. (1975).** *Steric arrangement of sweet and bitter taste of amino acids and peptides*. Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung. 160 (3). Side: 251-253.

- Bernardez, M., et al. (2005).** *Modified method for the analysis of free fatty acids in fish.* J Agric Food Chem. 53 (6). Side: 1903-1906.
- Bhaskar, N., et al. (2007).** *Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass.* Bioresource technology. 98 (2). Side: 388-394.
- Bligh, E. G. og Dyer, W. J. (1959).** *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Canadian journal of biochemistry and physiology. 37 (8). Side: 911-917.
- Carvajal, A. K., et al. (2009).** *Kinetic studies of lipid oxidation induced by hemoglobin measured by consumption of dissolved oxygen in a liposome model system.* Journal of agricultural and food chemistry. 57 (17). Side: 7826-7833.
- Carvajal, A. K., et al. (2015).** *Production of High Quality Fish Oil by Thermal Treatment and Enzymatic Protein Hydrolysis from Fresh Norwegian Spring Spawning Herring By-Products.* Journal of Aquatic Food Product Technology. 24 (8). Side: 807-823.
- Chalamaiah, M., et al. (2012).** *Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review.* Food Chemistry. 135 (4). Side: 3020-3038.
- Chow, C. K. (2007).** *Fatty acids in foods and their health implications.* CRC Press. ISBN: 1420006908.
- Christie, W. W. (1993).** *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis.* Advances in lipid methodology. 2. Side: 69-111.
- Clemente, A. (2000).** *Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition.* Trends in Food Science & Technology. 11 (7). Side: 254-262.
- Coultate, T. P. (2009).** *Food : the chemistry of its components.* Cambridge, Royal Society of Chemistry. ISBN: 9780854041114.
- Cui, C., et al. (2009).** *Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins.* Innovative Food Science & Emerging Technologies. 10 (1). Side: 37-41.
- Damodaran, S. (1997).** *Food proteins and their applications.* CRC Press. ISBN: 0824798201.
- Damodaran, S., et al. (2008).** *Fennema's food chemistry.* Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis. Side: 155-436;689-750. ISBN: 0824723457.
- Dauksas, E., et al. (2004).** *Bitterness in fish protein hydrolysates and methods for removal.* Journal of Aquatic Food Product Technology. 13 (2). Side: 101-114.

**De Marchi, M., et al. (2012).** *At-line prediction of fatty acid profile in chicken breast using near infrared reflectance spectroscopy.* Meat science. 90 (3). Side: 653-657.

**Doyle, M. P., et al. (1997).** *Food microbiology : fundamentals and frontiers.* Washington, DC, ASM Press. ISBN: 1555811175.

**Fersht, A. (1985).** *Enzyme structure and mechanism.* New York, W.H. Freeman. ISBN: 0716716143.

**Francis, F. (1985).** *Pigments and other colorants.* Food Chemistry. 2. Side: 545-584.

**Frankel, E. (2005).** *Lipid oxidation.* Bridgewater: The Oily Press. ISBN. 953194981.

**Frøkjær, S. (1994).** *Use of hydrosylates for protein supplementation.* Food Technology. 48 (10). Side: 86-88.

**Gbogouri, G., et al. (2004).** *Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrosylates.* Journal of Food Science. 69 (8). Side: C615-C622.

**Gray, J. (1978).** *Measurement of lipid oxidation: a review.* Journal of the American Oil Chemists' Society. 55 (6). Side: 539-546.

**Guillén, M. a. D. og Cabo, N. (2002).** *Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils.* Food Chemistry. 77 (4). Side: 503-510.

**Gunstone, F. D. (1996).** *Fatty acid and lipid chemistry.* Blackie Academic & Professional. ISBN: 0751402532.

**Hailer, E. (1911).** *Experiments on the properties of free sulfurous acid of sulfites, and a few complex compounds of sulfurous acid in killing germs and retarding their development.* Arb. kaiserl. Gesundh. 36. Side: 297.

**Helsedirektoratet (2015).** *Utviklingen i norsk kosthold 2015.* Helsedirektoratet.no. Hentet fra: <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/1021/Utviklingen-i-norsk-kosthold-2015-IS-2382.pdf>.

**Hermier, D. (1997).** *Lipoprotein metabolism and fattening in poultry.* The Journal of nutrition. 127 (5). Side: 805-808.

**Hill, R. W., et al. (2008).** *Animal physiology.* Sunderland, MA, Sinauer Associates. ISBN: 9780878933174.

**Jamdar, S. og Harikumar, P. (2005).** *Autolytic degradation of chicken intestinal proteins.* Bioresource technology. 96 (11). Side: 1276-1284.

**Jayathilakan, K., et al. (2012).** *Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review.* Journal of food science and technology. 49 (3). Side: 278-293.

**Kimura, M. (1968).** *Evolutionary rate at the molecular level.* Nature. 217 (5129). Side: 624-626.

**Kristinsson, H. G. og Rasco, B. A. (2000).** *Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties.* Critical reviews in food science and nutrition. 40 (1). Side: 43-81.

**Kumar, Y., et al. (2015).** *Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 14 (6). Side: 796-812.

**Lahl, W. og Grindstaff, D. (1989).** *Spices and seasonings: hydrolyzed proteins.* Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients—Applications, Status and Safety, Institute of Food Science and Technology Singapore.

**Lahl, W. J. og Braun, S. D. (1994).** *Enzymatic production of protein hydrolysates for food use.* Food Technology. 48 (10). Side: 68-71.

**Lasekan, A., et al. (2013).** *Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources.* Waste management. 33 (3). Side: 552-565.

**Lee, S. W., et al. (1987).** *Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolyzates of bovine caseins.* Agricultural and Biological Chemistry. 51 (6). Side: 1535-1540.

**Lehninger, A. L., et al. (2008).** *Lehninger principles of biochemistry.* New York, W.H. Freeman. ISBN: 9780716771081.

**Liaset, B., et al. (2003).** *Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™.* Process Biochemistry. 38 (12). Side: 1747-1759.

**Mahmoud, M. I. (1994).** *Physicochemical and functional properties of protein hydrosylates in nutritional products.* Food Technology. 48 (10). Side: 89-95.

**Mahmoud, M. I., et al. (1992).** *Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties.* Journal of Food Science. 57 (5). Side: 1223-1229.

**McNairney, J. (1984).** *Modification of a novel protein product.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology. 34 (3). Side: 206-214.

**Meeker, D. L. og Hamilton, C. (2006).** *Essential rendering.* Arlington, Virginia, Kirby Lithographic Company, Inc. ISBN: 0-9654660-3-5.



**Miguel, M., et al. (2007).** *Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: effect of a simulated intestinal digestion.* Food Chemistry. 104 (1). Side: 163-168.

**Miller, D., et al. (1967).** *Effect of refined menhaden oils on the flavor and fatty acid composition of broiler flesh.* Journal of Food Science. 32 (3). Side: 342-345.

**Mishra, J., et al. (2015).** *Efficient Utilization of Poultry By-Products for Economic Sustainability–The Need of the Hour.* International Journal of Livestock Research. 5 (10). Side: 1-9.

**Mohr, V. (1977).** *Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis.* Biochemical aspects of new protein food. New York: Pergamon. Side: 53-62.

**Mohr, V. (1980).** *Enzymes technology in the meat and fish industries.* Process Biochemistry.

**Monahan, F. J., et al. (1995).** *Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins.* Journal of agricultural and food chemistry. 43 (1). Side: 46-52.

**New, M. B., et al. (1995).** *Farm-made aquafeeds.* Food & Agriculture Org. Side: 434. ISBN: 9251035970.

**Nir, I., et al. (1988).** *Fat deposition in birds.* Leanness in domestic birds. Side: 141-174.

**Opheim, M., et al. (2015).** *Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials-Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates.* Process Biochemistry. 50 (8). Side: 1247-1257.

**Osnes, K. K. og Mohr, V. (1985).** *Peptide hydrolases of Antarctic krill, *Euphausia superba*.* Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 82 (4). Side: 599-606.

**Ovissipour, M., et al. (2013).** *Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 93 (7). Side: 1718-1726.

**Panyam, D. og Kilara, A. (1996).** *Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification.* Trends in Food Science & Technology. 7 (4). Side: 120-125.

**Plumb, G. W., et al. (1994).** *Effect of thermal and proteolytic processing on glycinin, the 11S globulin of soy (*Glycine max*): a study utilizing monoclonal and polyclonal antibodies.* Journal of agricultural and food chemistry. 42 (3). Side: 834-840.

- Polgár, L. s. (1989).** *Mechanisms of protease action.* Boca Raton, Fla., CRC Press. ISBN: 0849369010.
- Prokop, W. H. (1985).** *Rendering systems for processing animal by-product materials.* Journal of the American Oil Chemists' Society. 62 (4). Side: 805-811.
- Rao, M. B., et al. (1998).** *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.* Microbiology and molecular biology reviews. 62 (3). Side: 597-635.
- Rivera, J. A., et al. (2000).** *Composition and protein fractions of different meat by-products used for petfood compared with mechanically separated chicken (MSC).* Meat science. 55 (1). Side: 53-59.
- Rose, A. H. og Pilkington, B. J. (1989).** *Sulphite.* Mechanism of action of food preservation procedures. Gould, G. W. Barking, Essex, Elsevier Applied Science Publisher 201. ISBN: 1851662936.
- Rossi, D. M., et al. (2009).** *Production of high-protein hydrolysate from poultry industry residue and their molecular profiles.* Food Biotechnology. 23 (3). Side: 229-242.
- Rustad, T. (2003).** *Utilisation of marine by-products.* Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2 (4). Side: 458-463.
- ScanPro™FCP75/SF (n.d.).** *ScanPro™ FCP 75/SF by Essentia Protein Solutions (formerly BHJ Protein Foods) - Food, Beverage & Nutrition.* Aksessert: 25.11.16, Hentet fra: <https://www.ulprospector.com/en/eu/Food/Detail/4373/225769/ScanPro-FCP-75-SF>.
- Semb, T. N. (2012).** *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils.* Institutt for bioteknologi. NTNU.
- Shahidi, F., et al. (1995).** *Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus).* Food Chemistry. 53 (3). Side: 285-293.
- Shahidi, F. og Wanasundara, U. N. (2008).** *Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils.* Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. Akoh, C. C. og Min, D. B. USA, CRC press. Side: 387-402. ISBN: 1420046640.
- Shareefdeen, Z., et al. (2005).** *An odor predictive model for rendering applications.* Chemical Engineering Journal. 113 (2). Side: 215-220.
- Sherwin, E. (1978).** *Oxidation and antioxidants in fat and oil processing.* Journal of the American Oil Chemists' Society. 55 (11). Side: 809-814.
- Shiau, S.-Y. (1994).** *Seafood protein in human and animal nutrition.* Seafood Proteins. Springer. Side: 160-170. ISBN: 1461578302.

**Siemensma, A. D., et al. (1993).** *The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae.* Trends in Food Science & Technology. 4 (1). Side: 16-21.

**Šližytė, R., et al. (2014).** *Nutritionally rich marine proteins from fresh herring by-products for human consumption.* Process Biochemistry. 49 (7). Side: 1205-1215.

**Šližytė, R., et al. (2005b).** *Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products.* Process Biochemistry. 40 (3). Side: 1415-1424.

**Šližytė, R., et al. (2005a).** *Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products - Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions.* Process Biochemistry. 40 (12). Side: 3680-3692.

**Sovik, S. L. og Rustad, T. (2005a).** *Effect of season and fishing ground on the activity of lipases in byproducts from cod (*Gadus morhua*).* LWT-Food Science and Technology. 38 (8). Side: 867-876.

**Sovik, S. L. og Rustad, T. (2005b).** *Proteolytic activity in byproducts from cod species caught at three different fishing grounds.* Journal of agricultural and food chemistry. 53 (2). Side: 452-458.

**Speedy, A. W. (2004).** *Overview of world feed protein needs and supply.* Protein sources for the animal feed industry. FAO Expert Consultation and Workshop, Bangkok, Thailand, 29 April-3 May 2002., Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

**Steffens, W. (1994).** *Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.* Aquaculture. 124 (1-4). Side: 27-34.

**Sturkie, P. D. (2015).** *Avian physiology.* Academic Press, Elsevier Inc. Side: 443-467. ISBN: 978-0-12-407160-5.

**Tatterson, I. N. og Windsor, M. L. (1974).** *Fish silage.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 25 (4). Side: 369-379.

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

**Tello, P. G., et al. (1994).** *Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular- weight range.* Biotechnology and bioengineering. 44 (4). Side: 529-532.

**Torreggiani, A., et al. (2008).** *Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: a calorimetric and Raman study.* Journal of Molecular Structure. 891 (1). Side: 115-122.

**Tveit, G. M. (2014).** *Enzymatic Hydrolysis of Chicken Rest Raw Material*. Department of Biotechnology NTNU.

**Uhlig, H. (1998).** *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons. ISBN: 0471196606.

**Vieira, E. O., et al. (2015).** *Production, Conservation and Health Assessment of Acid Silage Viscera of Freshwater Fish as a Component of Animal Feed*. International Journal of Agriculture and Forestry. 5 (3). Side: 177-181.

**Vijayalakshmi, M., et al. (1986).** *High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 9 (16). Side: 3559-3576.

**Wai, W. T., et al. (2009).** *Determination of TOTOX value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer*. Food Chemistry. 113 (1). Side: 285-290.

**Zanardi, E. (2008).** *Determination of Lipolysis*. Processed Meats and Poultry Analysis. Side: 175.

**Zanetti, E., et al. (2010).** *Carcase characteristics and qualitative meat traits of three Italian local chicken breeds*. British poultry science. 51 (5). Side: 629-634.

## Vedlegg A: Restråstoffets sammensetning

To restråstoff fra verpehøns ble benyttet i denne oppgaven. Det ene restråstoffet bestod av hel høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) og det andre bestod av hel høne uten innmat, hode og fjær (restråstoff U). Sammensetningen til de to restråstoffene ble bestemt ved analyse av tørrstoff-, lipid-, protein- og askeinnhold. Analyseresultater er presentert i tabell 1A.

**Tabell 1A:** *Sammensetning til de to restråstoffene benyttet i denne oppgaven: hel høne med innmat, hode og fjær og hel høne uten innmat, hode og fjær. Innhold av tørrstoff, lipid, protein og aske er oppgitt i g/ 100 g råstoff (våtvekt).*

<b>Restråstoff</b>	<b>Tørrstoff</b>	<b>Lipid</b>	<b>Protein</b>	<b>Aske</b>
<b>Hel høne m/ innmat</b>				
<i>Parallell 1</i>	43,9	28,2	13,4	4,4
<i>Parallell 2</i>	39,5	24,7	15,1	5,5
<i>Parallell 3</i>	48,1	27,8	24,6	7,4
<i>Parallell 4</i>	44,6		21,3	2,2
<b>Gjennomsnitt ± SD</b>	<b>44,0 ± 3,1</b>	<b>26,9 ± 1,6</b>	<b>18,6 ± 4,5</b>	<b>4,9 ± 1,9</b>
<b>Hel høne u/ innmat</b>				
<i>Parallell 1</i>	41,1	20,1	13,1	6,3
<i>Parallell 2</i>	39,0	19,0	21,1	3,2
<i>Parallell 3</i>	41,9	17,1	23,6	8,0
<i>Parallell 4</i>	37,4		16,1	3,9
<b>Gjennomsnitt ± SD</b>	<b>39,8 ± 1,8</b>	<b>18,7 ± 1,2</b>	<b>18,5 ± 4,1</b>	<b>5,4 ± 1,9</b>

## Vedlegg B: Massebalanse

Tre prosesseringsmetoder ble brukt til utnyttelse av restråstoff fra verpehøns i denne oppgaven: varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering.

Massebalanse av tørrstoffet ble beregnet for de ulike fraksjonene generert av hver enkelt prosesseringsmetode. Tørrstoffets massebalanse er presentert i tabell: varmebehandling av begge restråstoff (MT, UT) i tabell 1B, enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) i tabell 2B, enzymatisk hydrolyse av restråstoff U (UH) i tabell 3B, ensilering av restråstoff M (ME) i tabell 4B og ensilering av restråstoff U (UE) i tabell 5B.

**Tabell 1B:** Beregning av massebalanse for varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT). Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), samt tørrstoffinnhold (TS, %) og tørrstoffutbytte (TS (g)/ 100 g RS (vv)) i fraksjoner, er oppgitt (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 10).

	MT	UT
<b>Olje</b>		
Totalvekt (g)	6,1 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,2
g/100 g RS (vv)	15,7 $\pm$ 0,6	9,4 $\pm$ 0,5
Tørrstoff (%)	100	100
Utbytte (TS(g)/100g RS (vv))	15,7 $\pm$ 0,6	9,4 $\pm$ 0,5
<b>Limvann</b>		
Totalvekt (g)	4,7 $\pm$ 1,6	6,7 $\pm$ 2,4
g/100 g RS (vv)	12,1 $\pm$ 4,3	17,1 $\pm$ 5,9
Tørrstoff (%)	4,7 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,3
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	0,6 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2
<b>Slam</b>		
Totalvekt (g)	28,3 $\pm$ 2,1	28,8 $\pm$ 1,9
g/100 g RS (vv)	72,2 $\pm$ 4,6	73,6 $\pm$ 6,0
Tørrstoff (%)	39,3 $\pm$ 4,3	35,0 $\pm$ 4,1
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	28,3 $\pm$ 3,0	25,6 $\pm$ 2,5
<b>Massebalanse</b>		
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	44,5 $\pm$ 3,1	35,8 $\pm$ 2,5
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	44,0 $\pm$ 3,1	39,8 $\pm$ 1,8
Differanse	0,5	-4,1

**Tabell 2B:** Beregning av massebalanse for enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (ME). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), samt tørrstoffinnhold (TS, %) og tørrstoffutbytte (TS (g)/ 100 g RS (vv)) i fraksjoner, er oppgitt (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 10).

	MHO	MHBl	MHPr	MHPP	MHP+B
<b>Olje</b>					
Totalvekt (g)	3,4 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 1,9	3,8 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,0	4,2 $\pm$ 1,1
g/100 g RS (vv)	9,2 $\pm$ 4,1	9,2 $\pm$ 5,0	9,7 $\pm$ 2,5	8,0 $\pm$ 2,7	11,1 $\pm$ 2,9
Tørrstoff (%)	100	100	100	100	100
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	18,3 $\pm$ 8,3	18,4 $\pm$ 10,1	19,4 $\pm$ 5,1	16,0 $\pm$ 5,5	22,1 $\pm$ 5,9
<b>Hydrolysat</b>					
Totalvekt (g)	19,1 $\pm$ 2,7	20,9 $\pm$ 2,3	23,1 $\pm$ 0,7	21,0 $\pm$ 1,0	22,4 $\pm$ 0,9
g/100 g RS (vv)	51,6 $\pm$ 7,6	54,7 $\pm$ 6,5	59,9 $\pm$ 1,6	54,0 $\pm$ 2,1	58,4 $\pm$ 1,9
Tørrstoff (%)	1,3 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,4
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	1,3 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,5
<b>Sediment</b>					
Totalvekt (g)	13,7 $\pm$ 3,3	12,8 $\pm$ 2,4	11,7 $\pm$ 1,1	11,9 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 1,0
g/100g RS (vv)	36,7 $\pm$ 8,0	33,5 $\pm$ 5,9	30,3 $\pm$ 2,6	30,6 $\pm$ 3,3	24,1 $\pm$ 2,5
Tørrstoff (%)	35,9 $\pm$ 6,8	34,4 $\pm$ 5,4	31,3 $\pm$ 2,3	35,4 $\pm$ 3,8	35,5 $\pm$ 2,8
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	26,5 $\pm$ 6,8	23,3 $\pm$ 5,4	18,9 $\pm$ 2,3	21,7 $\pm$ 3,8	15,8 $\pm$ 2,8
<b>Massebalanse</b>					
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	46,1 $\pm$ 10,7	43,1 $\pm$ 11,4	43,3 $\pm$ 5,6	40,3 $\pm$ 6,7	43,2 $\pm$ 6,5
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1
Differanse	2,1	-0,9	-0,8	-3,8	-0,9



**Tabell 3B:** Beregning av massebalanse for enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), samt tørrstoffinnhold (TS, %) og tørrstoffutbytte (TS (g)/ 100 g RS (vv)) i fraksjoner, er oppgitt (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 10).

	UHO	UH <sub>Bl</sub>	UH <sub>Pr</sub>	UH <sub>PP</sub>	UH <sub>P+B</sub>
<b>Olje</b>					
Totalvekt (g)	1,9 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,4
g/100 g RS (vv)	5,1 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 1,3	5,6 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 1,0
Tørrstoff (%)	100	100	100	100	100
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	10,2 $\pm$ 2,4	10,1 $\pm$ 2,5	11,2 $\pm$ 1,0	9,6 $\pm$ 1,3	13,0 $\pm$ 2,0
<b>Hydrolysat</b>					
Totalvekt (g)	20,9 $\pm$ 1,7	20,4 $\pm$ 2,0	24,7 $\pm$ 0,5	21,3 $\pm$ 0,9	21,7 $\pm$ 0,9
g/100 g RS (vv)	54,6 $\pm$ 3,2	53,8 $\pm$ 4,5	62,9 $\pm$ 1,6	55,1 $\pm$ 2,2	55,5 $\pm$ 1,8
Tørrstoff (%)	1,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 0,4
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	1,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 1,2	5,5 $\pm$ 0,4
<b>Sediment</b>					
Totalvekt (g)	15,4 $\pm$ 1,4	15,5 $\pm$ 1,8	12,4 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 1,6	12,3 $\pm$ 0,8
g/100 g RS (vv)	40,3 $\pm$ 3,3	41,1 $\pm$ 5,2	31,5 $\pm$ 1,7	31,9 $\pm$ 4,5	31,5 $\pm$ 2,0
Tørrstoff (%)	32,3 $\pm$ 3,3	33,1 $\pm$ 4,4	28,2 $\pm$ 1,0	34,2 $\pm$ 4,6	30,1 $\pm$ 4,2
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	26,1 $\pm$ 3,3	27,2 $\pm$ 4,4	17,7 $\pm$ 1,0	21,8 $\pm$ 4,6	19,2 $\pm$ 4,2
<b>Massebalanse</b>					
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	37,8 $\pm$ 4,1	38,8 $\pm$ 5,0	35,1 $\pm$ 1,5	36,0 $\pm$ 4,9	37,7 $\pm$ 4,6
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	39,8 $\pm$ 1,8	39,8 $\pm$ 1,8	39,8 $\pm$ 1,8	39,8 $\pm$ 1,8	39,8 $\pm$ 1,8
Differanse	-2,0	-1,1	-4,8	-3,9	-2,1

**Tabell 4B:** Beregning av massebalanse for ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (ME). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), samt tørrstoffinnhold (TS, %) og tørrstoffutbytte (TS (g)/ 100 g RS (vv)) i fraksjoner, er oppgitt (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 5).

	ME <sub>Ed</sub>	ME <sub>Ed.S</sub>	ME <sub>Ma</sub>	ME <sub>Ma.S</sub>
<b>Olje</b>				
Totalvekt (g)	5,5 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,3
g/100 g RS (vv)	14,3 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,7	17,4 $\pm$ 0,6
Tørrstoff (%)	100	100	100	100
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	14,3 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,7	17,4 $\pm$ 0,6
<b>Vannløselig fraksjon</b>				
Totalvekt (g)	5,0 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,5
g/100 g RS (vv)	13,0 $\pm$ 1,6	12,8 $\pm$ 1,1	20,7 $\pm$ 1,9	18,0 $\pm$ 1,3
Tørrstoff (%)	15,4*	15,5*	19,1*	18,5*
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	2,0 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,2
<b>Ensilasje</b>				
Totalvekt (g)	28,0 $\pm$ 0,7	28,3 $\pm$ 0,5	21,8 $\pm$ 0,8	21,4 $\pm$ 0,5
g/100 g RS (vv)	72,8 $\pm$ 1,1	71,6 $\pm$ 1,1	55,3 $\pm$ 1,8	55,7 $\pm$ 1,5
Tørrstoff (%)	33,1 $\pm$ 6,8	28,1 $\pm$ 3,6	34,9 $\pm$ 2,5	31,6 $\pm$ 1,4
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	24,1 $\pm$ 5,1	20,1 $\pm$ 2,9	19,2 $\pm$ 0,0	17,6 $\pm$ 0,0
<b>Massebalanse</b>				
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	40,3 $\pm$ 5,3	37,7 $\pm$ 2,9	40,9 $\pm$ 0,8	38,3 $\pm$ 0,6
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1	44,0 $\pm$ 3,1
Differanse	-3,7	-6,3	-3,2	-5,7

**Tabell 5B:** Beregning av massebalanse for ensilering av hel høne uten innmat (UE). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), samt tørrstoffinnhold (TS, %) og tørrstoffutbytte (TS (g)/100 g RS (vv)) i fraksjoner, er oppgitt (gjennomsnitt ± SD, n = 5).

	UEEd	UEEd.S	UEMa	UEMa.S
<b>Olje</b>				
Totalvekt (g)	3,2 ± 0,8	2,9 ± 1,5	2,8 ± 0,6	1,0 ± 0,7
g/100 g RS (vv)	8,0 ± 2,0	7,4 ± 3,7	7,0 ± 1,4	2,6 ± 1,7
Tørrstoff (%)	100	100	100	100
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	8,0 ± 2,0	7,4 ± 3,7	7,0 ± 1,4	2,6 ± 1,7
<b>Vannløselig fraksjon</b>				
Totalvekt (g)	3,0 ± 1,7	2,2 ± 1,3	0,0	0,0
g/100 g RS (vv)	7,6 ± 4,2	5,6 ± 3,2	0,0	0,0
Tørrstoff (%)	9,0*	9,2*	0,0	0,0
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,0	0,0
<b>Ensilasje</b>				
Totalvekt (g)	33,5 ± 2,1	34,5 ± 2,7	36,9 ± 0,4	38,6 ± 1,1
g/100 g RS (vv)	84,5 ± 6,0	87,0 ± 6,7	93,0 ± 1,4	97,4 ± 1,7
Tørrstoff (%)	29,7 ± 4,1	29,4 ± 2,6	32,9 ± 3,0	29,5 ± 1,7
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	25,0 ± 3,4	25,6 ± 0,0	30,6 ± 0,0	28,7 ± 0,0
<b>Massebalanse</b>				
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	33,7 ± 3,9	33,5 ± 3,7	37,6 ± 1,4	31,3 ± 1,7
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	39,8 ± 1,8	39,8 ± 1,8	39,8 ± 1,8	39,8 ± 1,8
Differanse	-6,2	-6,4	-2,2	-8,5

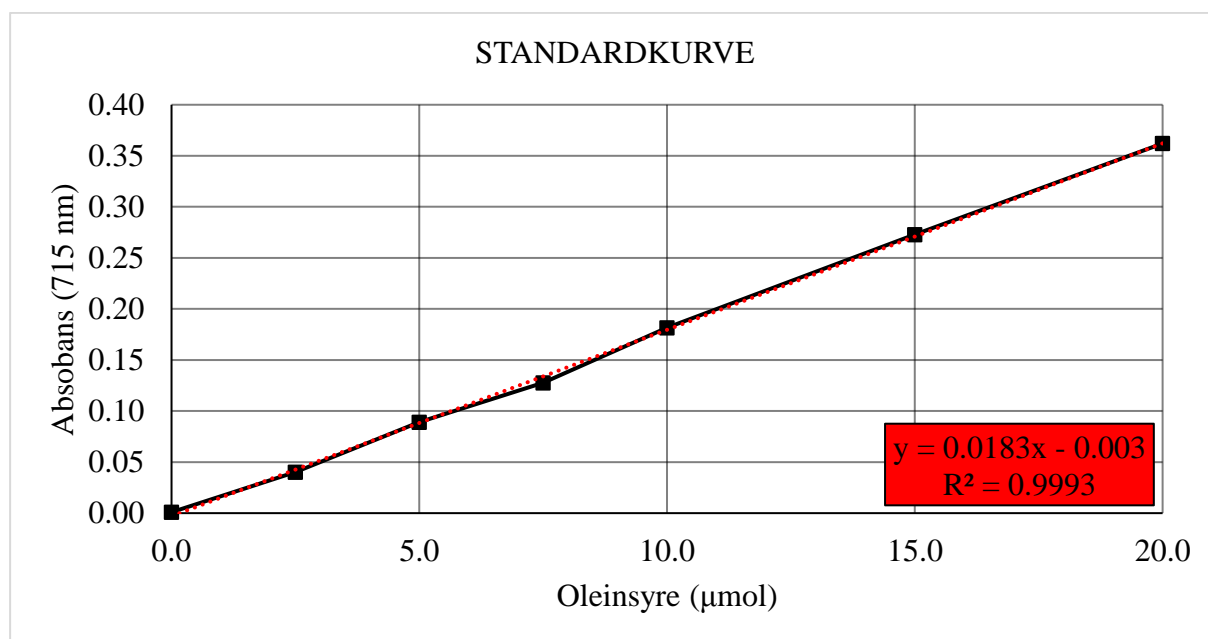
## Vedlegg C: Frie fettsyrer

Innholdet av frie fettsyrer (FFA) i olje, separert fra restråstoff fra verpehøns ved varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering, ble analysert som % oleinsyre.

De ulike konsentrasjonene av oleinsyre, brukt til fremstilling av standardkurve, er presentert i tabell 1C. Standardkurven er presentert i figur C-1.

**Tabell 1C:** Forhold mellom isooktan og standardløsning av oleinsyre (0,1 M) brukt til fremstilling av prøver for tillaging av standardkurve. Absorbans (715 nm) ble plottet mot løsningens innhold av oleinsyre (0-20  $\mu\text{mol}$ ).

n oleinsyre ( $\mu\text{mol}$ )	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0
ml iso-oktan	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
$\mu\text{L}$ iso-oktan	200	175	150	125	100	50	0
$\mu\text{L}$ standardløsning	0	25	50	75	100	150	200
Absorbans (715 nm)	0,0009	0,0402	0,0891	0,1278	0,1815	0,2730	0,3621



**Figur C-1:** Standardkurve basert på målt absorbans (715 nm) ved sju ulike konsentrasjoner av oleinsyre i isooktan (0-20  $\mu\text{mol}$ ). Regresjonslinjen, og dens parametere, er inkludert i figuren.

Ved bruk av lineær regresjon (Microsoft Excel 2016) ble regresjonslinjens stigningstall (A), skjæringspunkt med y-aksen (B) og R<sup>2</sup>-verdi funnet:

- A = 0,018
- B = -0,003
- R<sup>2</sup> = 0,0993

Prøvens innhold av frie fettsyrer (%), som oleinsyre, ble bestemt ved bruk av ligning C.

$$FFA (\%) = \frac{(Abs - B) \times 282,46}{A \times m \times 10000} \quad \text{Ligning C}$$

Hvor Abs = prøvens målte absorbanse, B = skjæringspunkt med y-aksen for standardkurvens lineære regresjon (blankprøvens absorbanse), 282,46 = molekylvekten til oleinsyre i g/mol, A = stigningstallet til regresjonslinjen, m = prøvens vekt (g) og 10000 = omregningsfaktor nødvendig for å angi resultat i prosent.

Innhold av FFA, i oljer fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff M (MT, MH, ME) og restråstoff U (UT, UH, UE), er presentert i tabell 2C.

**Tabell 2C:** Innhold av frie fettsyrer (FFA, %) i prøver fra varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE). Forkortelser er brukt for de ulike behandlingene ved enzymatisk hydrolyse: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Forkortelser er brukt for de ulike behandlingene ved ensilering: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S) (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 4-8).

<b>Prøve</b>	<b>FFA (%) <math>\pm</math> SD</b>
<b>MT</b>	0,41 $\pm$ 0,03
<b>UT</b>	0,30 $\pm$ 0,02
<b>MHO</b>	0,36 $\pm$ 0,03
<b>MHBl</b>	0,41 $\pm$ 0,04
<b>MHP<sub>r</sub></b>	0,40 $\pm$ 0,03
<b>MHPP</b>	0,61 $\pm$ 0,04
<b>MHP+B</b>	0,48 $\pm$ 0,06
<b>UHO</b>	0,29 $\pm$ 0,00
<b>UHBl</b>	0,36 $\pm$ 0,03
<b>UHPr</b>	0,29 $\pm$ 0,04
<b>UHPP</b>	0,97 $\pm$ 0,09
<b>UHP+B</b>	0,40 $\pm$ 0,03
<b>MEEd</b>	0,40 $\pm$ 0,02
<b>MEEd.S</b>	0,51 $\pm$ 0,02
<b>MEMa</b>	0,49 $\pm$ 0,02
<b>MEMa.S</b>	0,55 $\pm$ 0,05
<b>UEEd</b>	0,28 $\pm$ 0,04
<b>UEEd.S</b>	0,37 $\pm$ 0,03
<b>UEMa</b>	0,37 $\pm$ 0,03
<b>UEMa.S</b>	0,38 $\pm$ 0,02

## Vedlegg D: Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen i oljer, separert fra restråstoff fra verpehøns ved varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering, ble analysert ved bruk av GC. Analyseresultater er presentert i tabell: varmebehandling av begge restråstoff (MT, UT) i tabell 1D, enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) i tabell 2D, enzymatisk hydrolyse av restråstoff U (UH) i tabell 3D, ensilering av restråstoff M (ME) i tabell 4D og ensilering av restråstoff U er presentert i tabell 5D.

**Tabell 1D:** Fettsyresammensetning i oljer fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT). Oljens innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ).

Fettsyre	MT	UT
<b>C14:0</b>	0,62 $\pm$ 0,00	0,68 $\pm$ 0,00
<b>C14:1</b>	0,05 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00
<b>C15:0</b>	0,11 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,00
<b>C16:0</b>	18,50 $\pm$ 0,05	16,40 $\pm$ 0,01
<b>C16:1 <math>\omega</math>9</b>	0,66 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,01
<b>C16:1 <math>\omega</math>7</b>	2,83 $\pm$ 0,00	3,07 $\pm$ 0,01
<b>C17:0</b>	0,13 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,00
<b>C17:1</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00
<b>C18:0</b>	3,60 $\pm$ 0,10	5,20 $\pm$ 0,01
<b>C18:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	41,83 $\pm$ 0,12	39,43 $\pm$ 0,01
<b>C18:1 <math>\omega</math>7</b>	1,31 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 0,01
<b>C18:2 <math>\omega</math>6</b>	28,07 $\pm$ 0,02	29,47 $\pm$ 0,01
<b>C18:3 <math>\omega</math>6</b>	0,09 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C18:3 <math>\omega</math>3</b>	1,32 $\pm$ 0,00	1,63 $\pm$ 0,00
<b>C18:4 <math>\omega</math>3</b>	0,05 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,00
<b>C20:0</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	0,07 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>7</b>	0,34 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,00
<b>C20:2 <math>\omega</math>6</b>	0,09 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>6</b>	0,04 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>6</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>3</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01

<b>C20:4 ω3</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C20:5 ω3</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C22:0</b>	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00
<b>C22:1 ω11</b>	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>C22:1 ω9</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>C22:5 ω3</b>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C24:0</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>C22:6 ω3</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C24:1 ω9</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Sum fettsyrer:</b>		
Mettede	23,08 ± 0,15	22,85 ± 0,00
Enumettede	47,22 ± 0,07	45,53 ± 0,00
Flerumettede	29,70 ± 0,07	31,62 ± 0,01
Omega-3	1,44 ± 0,01	1,80 ± 0,01



**Tabell 2D:** Fettsyresammensetning i oljer fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 2).

Fettsyre	MHO	MHBI	MHP <sub>r</sub>	MHPP	MHP+B
<b>C14:0</b>	0,61 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,00
<b>C14:1</b>	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
<b>C15:0</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C16:0</b>	18,32 $\pm$ 0,04	18,37 $\pm$ 0,02	18,49 $\pm$ 0,01	18,40 $\pm$ 0,08	18,41 $\pm$ 0,04
<b>C16:1 <math>\omega</math>9</b>	0,63 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,00	0,64 $\pm$ 0,01
<b>C16:1 <math>\omega</math>7</b>	2,90 $\pm$ 0,01	2,88 $\pm$ 0,00	2,97 $\pm$ 0,01	2,94 $\pm$ 0,01	2,93 $\pm$ 0,01
<b>C17:0</b>	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00
<b>C17:1</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C18:0</b>	3,80 $\pm$ 0,01	3,76 $\pm$ 0,03	3,65 $\pm$ 0,14	3,55 $\pm$ 0,15	3,56 $\pm$ 0,15
<b>C18:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	41,63 $\pm$ 0,04	41,56 $\pm$ 0,06	41,43 $\pm$ 0,15	41,49 $\pm$ 0,22	41,68 $\pm$ 0,27
<b>C18:1 <math>\omega</math>7</b>	1,30 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,01	1,28 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,16
<b>C18:2 <math>\omega</math>6</b>	28,12 $\pm$ 0,01	28,21 $\pm$ 0,02	28,21 $\pm$ 0,04	28,24 $\pm$ 0,11	28,25 $\pm$ 0,02
<b>C18:3 <math>\omega</math>6</b>	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00
<b>C18:3 <math>\omega</math>3</b>	1,33 $\pm$ 0,00	1,34 $\pm$ 0,00	1,35 $\pm$ 0,00	1,35 $\pm$ 0,01	1,35 $\pm$ 0,00
<b>C18:4 <math>\omega</math>3</b>	0,07 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00
<b>C20:0</b>	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>7</b>	0,34 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
<b>C20:2 <math>\omega</math>6</b>	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>6</b>	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>6</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:5 <math>\omega</math>3</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C22:0</b>	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>11</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>9</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C22:5 <math>\omega</math>3</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01
<b>C24:0</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00

<b>C22:6 ω3</b>	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>C24:1 ω9</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ±	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00

**Sum fettsyrer:**

Mettede	23,11 ± 0,04	23,12 ± 0,05	23,14 ± 0,16	22,97 ± 0,25	22,95 ± 0,11
Enumettede	47,08 ± 0,00	47,04 ± 0,04	46,91 ± 0,14	46,95 ± 0,20	47,08 ± 0,09
Flerumettede	29,81 ± 0,04	29,84 ± 0,01	29,95 ± 0,03	30,08 ± 0,05	29,97 ± 0,02
Omega-3	1,49 ± 0,00	1,46 ± 0,02	1,50 ± 0,00	1,54 ± 0,02	1,48 ± 0,00

**Tabell 3D:** Fettsyresammensetning i oljer fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 2).

Fettsyre	UHO	UHBl	UHPr	UHPP	UHP+B
<b>C14:0</b>	0,70 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,00	0,69 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,00	0,68 $\pm$ 0,00
<b>C14:1</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00
<b>C15:0</b>	0,17 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,00
<b>C16:0</b>	16,30 $\pm$ 0,21	16,26 $\pm$ 0,08	16,66 $\pm$ 0,37	16,41 $\pm$ 0,07	16,35 $\pm$ 0,11
<b>C16:1 <math>\omega</math>9</b>	0,62 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,00
<b>C16:1 <math>\omega</math>7</b>	3,04 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,02	2,99 $\pm$ 0,01	3,01 $\pm$ 0,02	2,93 $\pm$ 0,02
<b>C17:0</b>	0,24 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,00
<b>C17:1</b>	0,23 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00
<b>C18:0</b>	4,87 $\pm$ 0,02	4,86 $\pm$ 0,02	4,99 $\pm$ 0,06	4,93 $\pm$ 0,00	5,14 $\pm$ 0,00
<b>C18:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	39,25 $\pm$ 0,34	39,51 $\pm$ 0,12	38,85 $\pm$ 1,06	39,44 $\pm$ 0,20	39,26 $\pm$ 0,19
<b>C18:1 <math>\omega</math>7</b>	1,66 $\pm$ 0,02	1,61 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,07	1,60 $\pm$ 0,02	1,54 $\pm$ 0,03
<b>C18:2 <math>\omega</math>6</b>	29,82 $\pm$ 0,16	29,95 $\pm$ 0,06	30,10 $\pm$ 0,34	29,85 $\pm$ 0,08	29,95 $\pm$ 0,08
<b>C18:3 <math>\omega</math>6</b>	0,11 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C18:3 <math>\omega</math>3</b>	1,77 $\pm$ 0,12	1,64 $\pm$ 0,00	1,65 $\pm$ 0,01	1,63 $\pm$ 0,01	1,65 $\pm$ 0,01
<b>C18:4 <math>\omega</math>3</b>	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:0</b>	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01
<b>C20:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	0,12 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,08	0,10 $\pm$ 0,04
<b>C20:1 <math>\omega</math>7</b>	0,47 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,00	0,45 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01
<b>C20:2 <math>\omega</math>6</b>	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,04
<b>C20:3 <math>\omega</math>6</b>	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
<b>C20:4 <math>\omega</math>6</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,03
<b>C20:4 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:5 <math>\omega</math>3</b>	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01
<b>C22:0</b>	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01
<b>C22:1 <math>\omega</math>11</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>9</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C22:5 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C24:0</b>	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00

<b>C22:6 ω3</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C24:1 ω9</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Sum fettsyrer:</b>					
Mettede	22,47 ± 0,27	22,37 ± 0,07	22,93 ± 0,47	22,60 ± 0,11	22,76 ± 0,13
Enumettede	45,50 ± 0,24	45,59 ± 0,08	44,87 ± 0,91	45,46 ± 0,11	45,20 ± 0,15
Flerumettede	32,03 ± 0,04	32,04 ± 0,01	32,20 ± 0,44	31,94 ± 0,01	32,04 ± 0,02
Omega-3	1,95 ± 0,11	1,83 ± 0,03	1,83 ± 0,04	1,83 ± 0,04	1,84 ± 0,05

**Tabell 4D:** Fettsyresammensetning i oljer fra ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (ME). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ).

Fettsyre	MEEd	MEEd.S	MEMa	MEMa.S
<b>C14:0</b>	0,63 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,00
<b>C14:1</b>	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
<b>C15:0</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01
<b>C16:0</b>	18,59 $\pm$ 0,03	18,42 $\pm$ 0,01	18,37 $\pm$ 0,00	18,32 $\pm$ 0,02
<b>C16:1 <math>\omega</math>9</b>	0,68 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,00
<b>C16:1 <math>\omega</math>7</b>	2,84 $\pm$ 0,02	2,82 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,00
<b>C17:0</b>	0,14 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00
<b>C17:1</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C18:0</b>	3,27 $\pm$ 0,55	3,79 $\pm$ 0,06	3,68 $\pm$ 0,12	3,76 $\pm$ 0,01
<b>C18:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	42,27 $\pm$ 0,62	41,80 $\pm$ 0,03	41,80 $\pm$ 0,21	41,74 $\pm$ 0,02
<b>C18:1 <math>\omega</math>7</b>	1,23 $\pm$ 0,06	1,29 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,02
<b>C18:2 <math>\omega</math>6</b>	27,77 $\pm$ 0,03	27,99 $\pm$ 0,02	28,11 $\pm$ 0,00	28,18 $\pm$ 0,02
<b>C18:3 <math>\omega</math>6</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00
<b>C18:3 <math>\omega</math>3</b>	1,29 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,00	1,32 $\pm$ 0,00	1,33 $\pm$ 0,00
<b>C18:4 <math>\omega</math>3</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:0</b>	0,09 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	0,09 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>7</b>	0,35 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00
<b>C20:2 <math>\omega</math>6</b>	0,13 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
<b>C20:3 <math>\omega</math>6</b>	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>6</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>3</b>	0,04 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C20:5 <math>\omega</math>3</b>	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C22:0</b>	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>11</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>9</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C22:5 <math>\omega</math>3</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C24:0</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

<b>C22:6 ω3</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C24:1 ω9</b>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Sum fettsyrer:</b>				
Mettede	22,89 ± 0,59	23,22 ± 0,08	23,04 ± 0,12	23,05 ± 0,02
Enumettede	47,65 ± 0,56	47,19 ± 0,04	47,21 ± 0,14	47,15 ± 0,01
Flerumettede	29,46 ± 0,03	29,59 ± 0,04	29,75 ± 0,02	29,80 ± 0,01
Omega-3	1,48 ± 0,00	1,43 ± 0,01	1,47 ± 0,01	1,45 ± 0,00

**Tabell 5D:** Fettsyresammensetning i oljer fra ensilering av hel høne uten innmat (UE). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S). Oljenes innhold av en gitt fettsyre er oppgitt i prosent (%) av totalt fettsyreinhold (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2$ ).

Fettsyre	UEEd	UEEd.S	UEMa	UEMa.S
<b>C14:0</b>	0,69 $\pm$ 0,00	0,69 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,00	0,69 $\pm$ 0,00
<b>C14:1</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00
<b>C15:0</b>	0,16 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,00
<b>C16:0</b>	16,37 $\pm$ 0,08	16,27 $\pm$ 0,01	16,37 $\pm$ 0,01	16,39 $\pm$ 0,04
<b>C16:1 <math>\omega</math>9</b>	0,58 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,00	0,60 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,01
<b>C16:1 <math>\omega</math>7</b>	3,03 $\pm$ 0,02	3,11 $\pm$ 0,00	3,05 $\pm$ 0,01	3,03 $\pm$ 0,01
<b>C17:0</b>	0,25 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,00
<b>C17:1</b>	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00
<b>C18:0</b>	5,12 $\pm$ 0,02	4,97 $\pm$ 0,00	5,20 $\pm$ 0,02	5,10 $\pm$ 0,06
<b>C18:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	39,48 $\pm$ 0,19	39,70 $\pm$ 0,02	39,49 $\pm$ 0,07	39,48 $\pm$ 0,08
<b>C18:1 <math>\omega</math>7</b>	1,59 $\pm$ 0,08	1,71 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,07
<b>C18:2 <math>\omega</math>6</b>	29,55 $\pm$ 0,06	29,41 $\pm$ 0,01	29,54 $\pm$ 0,00	29,54 $\pm$ 0,03
<b>C18:3 <math>\omega</math>6</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C18:3 <math>\omega</math>3</b>	1,62 $\pm$ 0,01	1,59 $\pm$ 0,00	1,62 $\pm$ 0,00	1,62 $\pm$ 0,01
<b>C18:4 <math>\omega</math>3</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:0</b>	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<b>C20:1 <math>\omega</math>9/ <math>\omega</math>11</b>	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
<b>C20:1 <math>\omega</math>7</b>	0,47 $\pm$ 0,00	0,46 $\pm$ 0,00	0,46 $\pm$ 0,00	0,46 $\pm$ 0,00
<b>C20:2 <math>\omega</math>6</b>	0,15 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02
<b>C20:3 <math>\omega</math>6</b>	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01
<b>C20:4 <math>\omega</math>6</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C20:3 <math>\omega</math>3</b>	0,02 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:4 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C20:5 <math>\omega</math>3</b>	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01
<b>C22:0</b>	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01
<b>C22:1 <math>\omega</math>11</b>	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<b>C22:1 <math>\omega</math>9</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>C22:5 <math>\omega</math>3</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
<b>C24:0</b>	0,01 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01

<b>C22:6 ω3</b>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>C24:1 ω9</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>Sum fettsyrer:</b>				
Mettede	22,77 ± 0,10	22,52 ± 0,03	22,84 ± 0,02	22,76 ± 0,00
Enumettede	45,58 ± 0,10	46,05 ± 0,03	45,59 ± 0,05	45,64 ± 0,01
Flerumettede	31,65 ± 0,01	31,42 ± 0,00	31,57 ± 0,03	31,61 ± 0,00
Omega-3	1,84 ± 0,02	1,78 ± 0,01	1,80 ± 0,01	1,82 ± 0,00



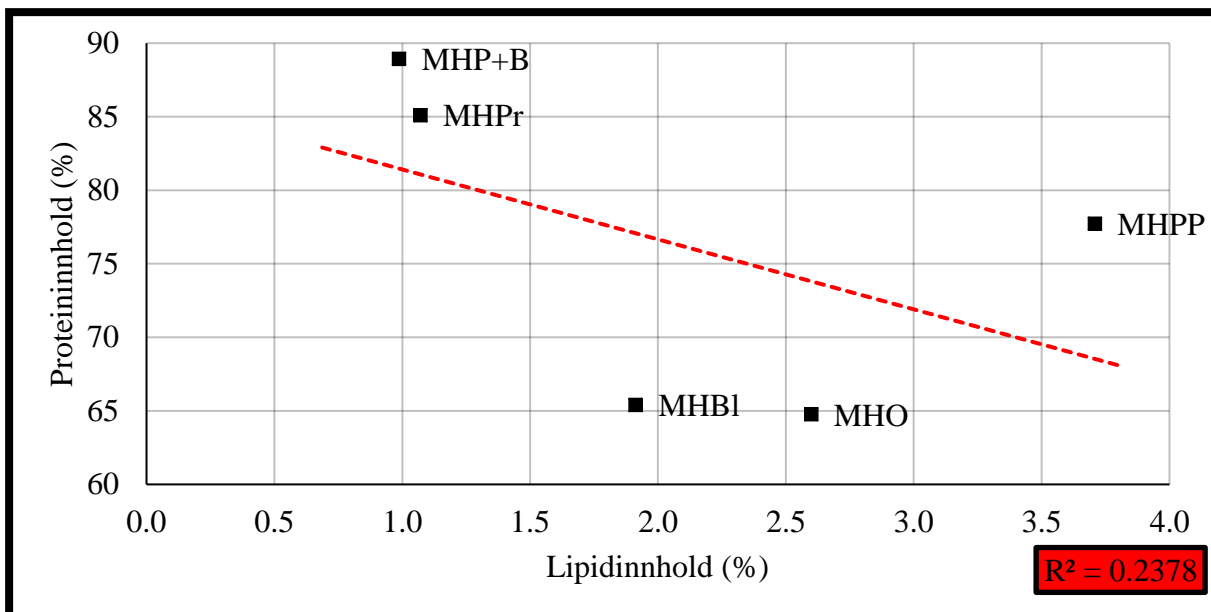
## Vedlegg E: Proteininnhold, lipidinnhold og DH

Sammensetningen til den vannløselige fraksjonen, fra varmebehandling (limvann) og enzymatisk hydrolyse (hønsproteinhydrolysat, HPH) av restråstoff fra verpehøns, ble analysert. Proteininnhold, proteinutbytte, lipidinnhold og hydrolysegrad (DH) i frysetørket limvann og frysetørket HPH er presentert i tabell 1E.

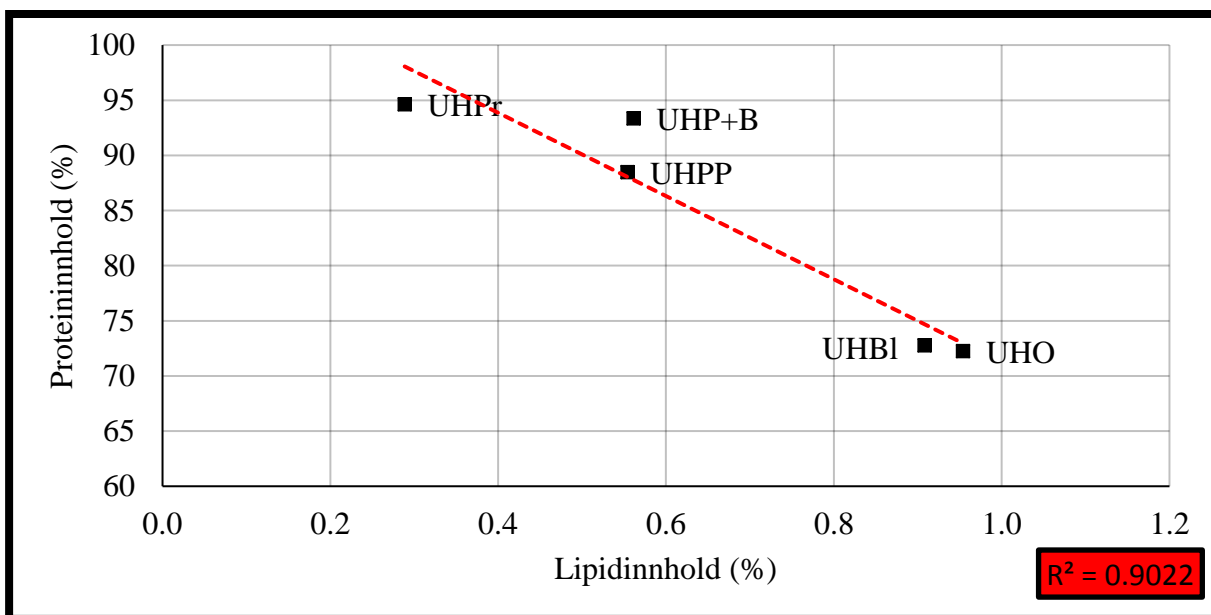
**Tabell 1E:** Resultat av analyser utført på frysetørket limvann fra varmebehandling av hel høne med innmat, hode og fjær (MT) og hel høne uten innmat (UT), samt frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av begge restråstoff (MH, UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Proteininnhold (% av tørrstoff), proteinutbytte (% av restråstoffets protein), lipidinnhold (% av tørrstoff) og hydrolysegrad (DH, %) (gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n = 2-3$ ) er oppgitt. Proteinutbytte ble beregnet basert på ligning 2.13. \* Analyser ble ikke utført grunnet manglende prøvemateriale.

Prøve	Protein (%)	Proteinutbytte (%)	Lipid (%)	DH (%)
MT	62,91 $\pm$ 0,61	1,92	*	34,23 $\pm$ 1,96
UT	69,27 $\pm$ 0,07	2,88	*	29,10 $\pm$ 1,79
MHO	64,78 $\pm$ 1,89	4,54	2,60 $\pm$ 0,11	42,20 $\pm$ 0,03
MHBl	65,41 $\pm$ 3,74	5,23	1,91 $\pm$ 0,01	46,87 $\pm$ 0,02
MHP <sub>Pr</sub>	85,11 $\pm$ 3,01	22,48	1,07 $\pm$ 0,06	37,52 $\pm$ 0,54
MHP <sub>PP</sub>	77,72 $\pm$ 6,51	10,86	3,71 $\pm$ 0,04	39,06 $\pm$ 0,35
MHP <sub>P+B</sub>	88,95 $\pm$ 5,78	25,04	0,99 $\pm$ 0,01	32,67 $\pm$ 0,36
UHO	72,27 $\pm$ 1,06	6,19	0,95 $\pm$ 0,03	35,20 $\pm$ 2,25
UHBl	72,79 $\pm$ 6,98	5,86	0,91 $\pm$ 0,03	30,90 $\pm$ 1,40
UHP <sub>Pr</sub>	94,63 $\pm$ 1,85	31,65	0,29 $\pm$ 0,00	24,29 $\pm$ 0,29
UHP <sub>PP</sub>	88,47 $\pm$ 2,46	21,77	0,55 $\pm$ 0,07	26,35 $\pm$ 0,53
UHP <sub>P+B</sub>	93,37 $\pm$ 2,60	28,02	0,56 $\pm$ 0,05	21,11 $\pm$ 0,45

Proteininnhold (%) som funksjon av lipidinnhold (%) i frysetørket HPH fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) er presentert i figur E-1, og restråstoff U (UH) i figur E-2. Den lineære sammenhengen er illustrert ved en regresjonslinje med R<sup>2</sup>-verdi i begge figurene.



**Figur E-1:** Proteininnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 3$ ) som funksjon av lipidinnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 2$ ) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Regresjonslinje for lineær sammenheng, samt trendlinjens  $R^2$ -verdi, er inkludert i figuren.



**Figur E-2:** Proteininnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 3$ ) som funksjon av lipidinnhold (% av tørrstoff) (gjennomsnitt,  $n = 2$ ) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Regresjonslinje for lineær sammenheng, samt trendlinjens  $R^2$ -verdi, er inkludert i figuren.

## Vedlegg F: Innhold og sammensetning av frie aminosyrer

Innhold og sammensetning av frie aminosyrer i hønseproteinhydrolysat (HPH), fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) og restråstoff U (UH), ble analysert ved bruk av HPLC. Analyseresultater er presentert i tabell: HPH fra MH i tabell 1F og HPH fra UH i tabell 2F.

**Tabell 1F:** *Innhold og sammensetning av frie aminosyrer (mg/g frysetørket hydrolysat) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 2). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). For prøve markert \* er n = 1, det foreligger derfor ikke standardavvik for disse verdiene.*

Aminosyre	MHO	MHBl	MHP <sub>r</sub>	MHPP	MHP+B*
ASP	2,94 $\pm$ 0,13	3,79 $\pm$ 0,34	4,11 $\pm$ 0,43	4,48 $\pm$ 0,11	5,43
GLU	8,98 $\pm$ 0,45	11,08 $\pm$ 1,04	9,47 $\pm$ 1,02	9,20 $\pm$ 0,22	12,74
ASN	0,19 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,01	0,82
HIS	1,33 $\pm$ 0,07	2,30 $\pm$ 0,22	2,06 $\pm$ 0,24	2,35 $\pm$ 0,07	2,48
SER	5,89 $\pm$ 0,38	8,66 $\pm$ 1,11	4,28 $\pm$ 0,46	9,69 $\pm$ 0,24	5,21
GLN	6,22 $\pm$ 0,28	6,63 $\pm$ 0,65	5,94 $\pm$ 0,65	7,20 $\pm$ 0,16	6,19
GLY/ARG	6,84 $\pm$ 0,31	9,55 $\pm$ 0,90	7,11 $\pm$ 0,93	11,45 $\pm$ 0,29	10,20
THR	2,37 $\pm$ 0,16	3,64 $\pm$ 0,37	3,64 $\pm$ 0,45	3,67 $\pm$ 0,06	3,96
ALA	4,20 $\pm$ 0,13	6,87 $\pm$ 0,30	7,30 $\pm$ 0,80	7,27 $\pm$ 0,10	8,51
TYR	1,71 $\pm$ 0,08	2,56 $\pm$ 0,14	4,36 $\pm$ 0,47	6,31 $\pm$ 0,16	4,95
MET	2,06 $\pm$ 0,10	2,71 $\pm$ 0,25	5,03 $\pm$ 0,57	3,83 $\pm$ 0,17	4,90
VAL	2,16 $\pm$ 0,10	3,36 $\pm$ 0,30	6,82 $\pm$ 0,74	4,21 $\pm$ 0,12	5,51
PHE	1,75 $\pm$ 0,08	2,70 $\pm$ 0,17	6,39 $\pm$ 0,71	5,53 $\pm$ 0,16	5,47
ILE	1,56 $\pm$ 0,07	2,40 $\pm$ 0,22	7,17 $\pm$ 0,78	3,52 $\pm$ 0,10	4,72
LEU	2,90 $\pm$ 0,13	4,52 $\pm$ 0,41	14,92 $\pm$ 1,63	7,43 $\pm$ 0,20	11,38
LYS	3,62 $\pm$ 0,16	5,32 $\pm$ 0,55	5,86 $\pm$ 0,66	9,11 $\pm$ 0,19	7,48
<b>Total</b>	<b>54,72 <math>\pm</math> 0,82</b>	<b>76,20 <math>\pm</math> 2,16</b>	<b>95,34 <math>\pm</math> 2,99</b>	<b>95,73 <math>\pm</math> 0,65</b>	<b>99,94</b>

**Tabell 2F:** *Innhold og sammensetning av frie aminosyrer (mg/g frysetørket hydrolysat) i frysetørket hydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne uten innmat (UH) (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 2). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B).*

<b>Aminosyre</b>	<b>UHO</b>	<b>UHBl</b>	<b>UHPr</b>	<b>UHPP</b>	<b>UHP+B</b>
<b>ASP</b>	1,30 $\pm$ 0,02	1,58 $\pm$ 0,02	3,46 $\pm$ 0,10	3,83 $\pm$ 0,37	3,46 $\pm$ 0,11
<b>GLU</b>	3,86 $\pm$ 0,06	4,64 $\pm$ 0,07	7,85 $\pm$ 0,38	8,01 $\pm$ 0,85	7,25 $\pm$ 0,21
<b>ASN</b>	0,16 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	1,12 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,05
<b>HIS</b>	0,70 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,22	1,90 $\pm$ 0,05	2,20 $\pm$ 0,26	1,97 $\pm$ 0,11
<b>SER</b>	2,95 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 0,13	4,28 $\pm$ 0,16	4,87 $\pm$ 0,53	4,42 $\pm$ 0,17
<b>GLN</b>	5,93 $\pm$ 0,08	6,99 $\pm$ 0,08	6,50 $\pm$ 0,24	7,01 $\pm$ 0,46	6,34 $\pm$ 0,01
<b>GLY/ARG</b>	0,95 $\pm$ 0,95	2,26 $\pm$ 0,29	6,55 $\pm$ 0,27	11,09 $\pm$ 1,98	10,29 $\pm$ 2,37
<b>THR</b>	1,08 $\pm$ 0,02	1,36 $\pm$ 0,34	3,63 $\pm$ 0,15	3,32 $\pm$ 0,43	3,10 $\pm$ 0,18
<b>ALA</b>	2,71 $\pm$ 0,27	4,46 $\pm$ 0,04	7,36 $\pm$ 0,41	7,36 $\pm$ 1,05	6,74 $\pm$ 0,41
<b>TYR</b>	0,76 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	4,11 $\pm$ 0,14	6,18 $\pm$ 1,62	5,58 $\pm$ 1,74
<b>MET</b>	1,19 $\pm$ 0,02	1,43 $\pm$ 0,01	5,39 $\pm$ 0,18	5,04 $\pm$ 0,06	4,56 $\pm$ 0,22
<b>VAL</b>	0,81 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,01	6,86 $\pm$ 0,32	5,19 $\pm$ 0,31	4,69 $\pm$ 0,02
<b>PHE</b>	0,64 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,01	6,45 $\pm$ 0,22	6,07 $\pm$ 0,96	5,46 $\pm$ 1,29
<b>ILE</b>	0,58 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	7,41 $\pm$ 0,25	4,36 $\pm$ 0,00	3,95 $\pm$ 0,26
<b>LEU</b>	1,04 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,01	17,25 $\pm$ 0,60	11,30 $\pm$ 0,26	10,17 $\pm$ 0,48
<b>LYS</b>	1,17 $\pm$ 0,02	1,71 $\pm$ 0,01	5,33 $\pm$ 0,08	10,50 $\pm$ 2,12	9,60 $\pm$ 2,51
<b>Total</b>	25,83 $\pm$ 0,99	34,89 $\pm$ 0,53	95,44 $\pm$ 1,06	97,36 $\pm$ 3,85	88,50 $\pm$ 4,15

## Vedlegg G: Peptidenes molvektsfordeling

Molvektsfordelingen til peptider i hønseproteinhydrolysat (HPH), fra enzymatisk hydrolyse av restråstoff M (MH) og restråstoff U (UH), ble analysert ved HPLC. Analyseresultater er presentert i tabell: HPH fra MH i tabell 1G og fra UH i tabell 2G.

**Tabell 1G:** *Molvektsfordeling til peptidene i hønseproteinhydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt, n = 2).*

<b>Vektintervall (Da)</b>	<b>MHO</b>	<b>MHBl</b>	<b>MHP<sub>r</sub></b>	<b>MHPP</b>	<b>MHP+B</b>
<b>&lt;200</b>	20,60 ± 0,14	27,50 ± 0,99	19,70 ± 0,00	21,70 ± 1,13	16,55 ± 0,21
<b>200-500</b>	47,95 ± 1,63	45,45 ± 0,07	23,20 ± 0,00	30,95 ± 0,35	18,40 ± 0,28
<b>500-1000</b>	1,85 ± 0,49	2,50 ± 0,14	8,25 ± 0,21	3,25 ± 0,07	5,45 ± 0,21
<b>1000-2000</b>	0,95 ± 0,21	1,00 ± 0,28	11,55 ± 0,07	5,70 ± 0,42	11,75 ± 0,21
<b>2000-4000</b>	1,80 ± 0,28	1,60 ± 0,28	12,40 ± 0,14	11,40 ± 0,71	19,25 ± 0,07
<b>4000-6000</b>	2,00 ± 0,14	2,20 ± 0,14	7,90 ± 0,14	9,40 ± 0,42	13,10 ± 0,28
<b>6000-8000</b>	2,10 ± 0,14	2,25 ± 0,07	4,90 ± 0,14	5,20 ± 1,27	7,75 ± 0,21
<b>8000-10000</b>	3,65 ± 0,07	3,30 ± 0,00	3,70 ± 0,14	5,10 ± 1,41	4,15 ± 0,07
<b>10000-15000</b>	8,85 ± 0,21	7,30 ± 0,00	5,00 ± 0,14	4,95 ± 0,35	3,00 ± 0,00
<b>15000-20000</b>	4,25 ± 0,07	3,00 ± 0,14	1,60 ± 0,00	1,40 ± 0,14	0,40 ± 0,00
<b>&gt;20000</b>	6,00 ± 0,14	3,85 ± 0,07	1,75 ± 0,21	1,00 ± 0,28	0,10 ± 0,00

**Tabell 2G:** *Molvektsfordeling til peptidene i hønseproteinhydrolysat fra enzymatisk hydrolyse av hel høne med innmat, hode og fjær (MH). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Innhold av peptider i de ulike vektintervallene er oppgitt som % av totalt proteininnhold (gjennomsnitt, n = 2).*

<b>Vektintervall (Da)</b>	<b>UHO</b>	<b>UHBI</b>	<b>UHPr</b>	<b>UHPP</b>	<b>UHP+B</b>
<b>&lt;200</b>	16,40 ± 0,14	17,15 ± 0,64	14,30 ± 0,85	19,35 ± 0,35	11,95 ± 0,35
<b>200-500</b>	61,10 ± 0,42	60,20 ± 0,57	23,75 ± 0,35	25,55 ± 0,21	18,75 ± 0,35
<b>500-1000</b>	1,45 ± 0,07	2,00 ± 0,14	9,55 ± 0,35	6,30 ± 0,28	5,85 ± 0,07
<b>1000-2000</b>	1,00 ± 0,00	0,60 ± 0,28	14,40 ± 0,28	10,80 ± 0,28	12,40 ± 0,42
<b>2000-4000</b>	1,60 ± 0,00	0,80 ± 0,42	16,00 ± 0,42	15,85 ± 0,64	20,80 ± 0,57
<b>4000-6000</b>	1,75 ± 0,07	1,05 ± 0,35	9,15 ± 0,21	9,60 ± 0,00	14,25 ± 0,21
<b>6000-8000</b>	1,60 ± 0,00	1,25 ± 0,21	4,55 ± 0,49	5,00 ± 0,00	8,25 ± 0,07
<b>8000-10000</b>	2,10 ± 0,14	2,15 ± 0,21	2,85 ± 0,21	3,15 ± 0,07	4,10 ± 0,14
<b>10000-15000</b>	4,60 ± 0,14	5,50 ± 0,00	3,80 ± 0,14	3,35 ± 0,21	2,60 ± 0,14
<b>15000-20000</b>	2,80 ± 0,00	3,40 ± 0,00	1,10 ± 0,14	0,70 ± 0,14	0,25 ± 0,07
<b>&gt;20000</b>	5,65 ± 0,21	5,80 ± 0,28	0,55 ± 0,07	0,25 ± 0,07	0,80 ± 1,13

## Vedlegg H: Fordøyelighet

Fordøyeligheten (%) på slam, sediment og ensilasje, fra henholdsvis varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av restråstoff fra verpehøns, ble analysert in vitro med pepsin. Til sammenligning, ble fordøyeligheten på restråstoff M og restråstoff U analysert. Kasein ble brukt som referanseprotein. Analyseresultater er presentert i tabell 1H.

**Tabell 1H:** Fordøyelighet (%) av pepsin på kasein, hel høne med innmat, hode og fjær (restråstoff M) og hel høne uten innmat (restråstoff U), samt fordøyelighet (%) på slam, sediment og ensilasje fra henholdsvis varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og ensilering av hel høne med innmat, hode og fjær (MT, MH, ME) og hel høne uten innmat (UT, UH, UE) (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 2). Forkortelser er brukt for de fem ulike behandlingene ved enzymatisk hydrolyse: uten hydrolyse (O), autolytisk hydrolyse (blank, Bl), 0,1 % Protamex (Pr), 0,1 % Corolase PP (PP) og 0,1 % Papain + Bromelain (P+B). Forkortelser er brukt for de fire ulike behandlingene ved ensilering: eddiksyre (Ed), eddiksyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ed.S), maursyre (Ma) og maursyre + 0,1 % natriumbisulfitt (Ma.S).

<b>Prøve</b>	<b>Fordøyelighet (%)</b>
<b>Kasein</b>	83,92 $\pm$ 0,14
<b>Restråstoff M</b>	66,16 $\pm$ 2,00
<b>Restråstoff U</b>	57,27 $\pm$ 1,60
<b>MT</b>	42,30 $\pm$ 3,06
<b>UT</b>	58,02 $\pm$ 0,98
<b>MHO</b>	54,78 $\pm$ 2,16
<b>MHBl</b>	53,19 $\pm$ 2,87
<b>MHP<sub>r</sub></b>	46,29 $\pm$ 2,27
<b>MHPP</b>	57,26 $\pm$ 2,32
<b>MHP+B</b>	54,27 $\pm$ 1,87
<b>UHO</b>	47,17 $\pm$ 0,59
<b>UHBl</b>	46,72 $\pm$ 1,01
<b>UHP<sub>r</sub></b>	52,99 $\pm$ 1,23
<b>UHPP</b>	55,02 $\pm$ 0,53
<b>UHP+B</b>	46,51 $\pm$ 3,25
<b>MEE<sub>d</sub></b>	69,89 $\pm$ 1,59
<b>MEE<sub>d</sub>.S</b>	79,70 $\pm$ 1,69
<b>MEM<sub>a</sub></b>	72,64 $\pm$ 0,83
<b>MEM<sub>a</sub>.S</b>	70,16 $\pm$ 1,99
<b>UEE<sub>d</sub></b>	72,46 $\pm$ 2,57
<b>UEE<sub>d</sub>.S</b>	74,91 $\pm$ 4,57
<b>UEM<sub>a</sub></b>	63,97 $\pm$ 3,40
<b>UEM<sub>a</sub>.S</b>	63,16 $\pm$ 3,01



## Vedlegg I: Oppskalert hydrolyse

Det ble utført en oppskalert enzymatisk hydrolyse på restråstoff bestående av hel høne uten innmat, hode og fjær. Den enzymatiske hydrolysen ble utført med 0,1 % Papain + Bromelain. Restråstoffet ble kvernet i ulik grad. Den ene delen ble finkvernet (restråstoff H1) og den andre delen ble grovkvernet (restråstoff H2). Tørrstoffets massebalanse ble beregnet for de ulike fraksjonene generert av prosesseringen. Massebalanse for restråstoff H1 og restråstoff H2 er presentert i tabell 1I.

**Tabell 1I:** Beregning av massebalanse for enzymatisk hydrolyse (0,1 % Papain + Bromelain) av finkvernet (H1) og grovkvernet (H2) hel høne uten innmat. Fraksjoners totalvekt, fraksjoners vekt per 100 g råstoff (RS) i våtvekt (vv), tørrstoffinnhold (TS, %) i fraksjon og tørrstoffutbytte (TS (g)/100 g RS (vv)) er oppgitt (gjennomsnitt  $\pm$  SD, n = 3).

	H1	H2
<b>Olje</b>		
Totalvekt (g)	160,9	162,1
g/100 g RS (vv)	4,3	4,3
Tørrstoff (%)	100	100
Utbytte (TS(g)/100g RS (vv))	8,6	8,7
<b>Hydrolysat</b>		
Totalvekt (g)	2322,1	2328,5
g/100 g RS (vv)	62,3	62,4
Tørrstoff (%)	6,8 $\pm$ 0,0	6,4 $\pm$ 0,0
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	8,5 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,0
<b>Sediment</b>		
Totalvekt (g)	1241,6	1243,1
g/100 g RS (vv)	33,3	33,3
Tørrstoff (%)	32,0 $\pm$ 0,8	35,7 $\pm$ 1,9
Utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	21,3 $\pm$ 0,5	23,1 $\pm$ 1,3
<b>Massebalanse</b>		
Totalt utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	38,5 $\pm$ 0,5	39,8 $\pm$ 1,3
Teoretisk utbytte (TS (g)/100 g RS (vv))	35,5 $\pm$ 0,7	39,3 $\pm$ 1,3
Differanse	2,9 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 1,8