Master's thesis

2020

Kristina Ryeng Simavik

NTNU
Norwegian University of
Science and Technology
Faculty of Natural Sciences
Department of Biotechnology and Food Science

Kristina Ryeng Simavik

Hydrolyse av restråstoff fra regnbueørret (Oncorhynchus mykiss)

Effekten av antioksidanter på kvalitet under lagring

June 2020

NTNU
Norwegian University of
Science and Technology

NTNU
Norwegian University of
Science and Technology

NTNU
Norwegian University of
Science and Technology

Hydrolyse av restråstoff fra regnbueørret (Oncorhynchus mykiss)

Effekten av antioksidanter på kvalitet under lagring

Kristina Ryeng Simavik

Industriell Kjemi og Bioteknologi
Submission date: June 2020
Supervisor: Turid Rustad
Co-supervisor: Kristine Kvangarsnes

Norwegian University of Science and Technology
Department of Biotechnology and Food Science

Lovfestet erklæring

Jeg erklærer at jeg har skrevet denne oppgaven selv, at jeg ikke har brukt andre enn de oppgitte kildene/ressursene og at jeg tydelig har merket alt materiale som har blitt sitert enten bokstavelig eller etter innhold fra de brukte kildene.

Trondheim, juni 2020
Kristina Ryeng Simavik

Forord

Denne masteroppgaven er en del av det toårige masterprogrammet Industriell Kjemi og Bioteknologi ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap, Trondheim. Oppgaven er en del av arbeidet som inngår i doktorgradsavhandlingen til PhD-student Kristine Kvangarsnes ved NTNU Ålesund. Oppgaven er en utvidelse av prosjektoppgaven med samme tittel skrevet høsten 2019 og hvilke analyser og resultater som ble presentert der er angitt under de enkelte resultatene.

Jeg vil gjerne takke min veileder Professor Turid Rustad for muligheten til å skrive denne oppgaven, i tillegg til god hjelp med forsøkene som ble utført på laboratoriet og rapportskrivingen. Jeg vil også takke ekstern veileder og PhD-student Kristine Kvangarsnes for hennes gode svar på mine spørsmål. Takk til laboratorieansvarlig Siri Stavrum for hjelpen jeg fikk på laboratoriet og med analyse med HPLC. Til slutt vil jeg takke medstudent Robin S. Gjermstad for hans hjelp og praktiske tips på laboratoriet og for godt samarbeid på det rapporttekniske.

Trondheim, Juni 2020
Kristina Ryeng Simavik

Sammendrag

Enzymatisk hydrolyse av restråstoff fra fisk gir fiskeproteinhydrolysat (FPH) som har funksjonelle egenskaper som er egnet for matindustrien. Målet med denne oppgaven var å studere endringer i egenskaper til FPH tilsatt antioksidanter gjennom lagring. FPH ble produsert fra regnbueørrethoder (*Oncorhynchus mykiss*) og ble tilsatt BHT, propylgallat, sitronsyre og askorbinsyre for å studere hvordan de påvirket endringer gjennom lagring to, fire og seks måneder. Alle hydrolysatene inneholdt en høy andel vannløselige proteiner som bidro til høy løselighet. Mengden vannløselige proteiner ble noe redusert etter lagring i seks måneder. Spaltingen av peptidbindingene under hydrolysen førte til en økt %DH og økt mengde syreløselige peptider, frie aminogrupper og frie aminosyrer. Tiolkonsentrasjonene i FPH ble redusert under lagringsperioden. Etter lagring i seks måneder var tiolkonsentrasjonene omtrent like for alle hydrolysatene som indikerer proteinoksidasjon og at antioksidantene var brukt opp. Det ble ikke observert store endringer i sammensetningen av aminosyrer, som indikerer at antioksidantene ikke hadde noen effekt på den totale aminosyresammensetningen. Det totale proteininnholdet varierte mellom 82-85 vekt% i hydrolysatene. Molvektsfordelingene for hydrolysatene som ikke ble lagret lignet molvektsfordelingene for hydrolysatene som ble lagret seks måneder, som indikerer at antioksidantene motvirket nedbrytning av peptidene under lagring. Hydrolysatene ble mørkere, rødere og gulere under lagringsperioden. Propylgallat var best til å ivareta kjemiske og funksjonelle kvalitetsparametere, mens askorbinsyre var dårligst.

Abstract

Enzymatic hydrolysis of rest raw-materials from fish yields fish protein hydrolysates (FPH) which have functional abilities well suited for the food industry. The aim of this thesis was to study the changes in the properties of FPH added antioxidants throughout storage. The FPHs were produced from rainbow trout heads (*Onchorhynchus mykiss*) and were added BHT, propyl gallate, citric acid and ascorbic acid. The FPHs were analyzed after storage two, four and six months. All the hydrolysates contained a high amount of water soluble proteins contributing to high solubility. A slight decrease was observed for the amount of water-soluble proteins after six-month storage. The cleavage of peptide bonds during hydrolysis yielded an increased %DH and an increased amount acid-soluble peptides, free amino groups and free amino acids. The thiol-concentrations in FPH were reduced during storage. After six-month storage, the thiol-concentration was roughly the same for all hydrolysates indicating protein oxidation and that the antioxidants were used up. No significant changes were observed in the amino acid content indicating that the antioxidants had no effect on the total amino acid content. Total protein content varied between 82-85 weight% in the hydrolysates. Molecular weight distributions for the hydrolysates that was not stored compared to the molecular weight distributions for hydrolysates stored six months indicated that the antioxidants counteracted decomposition of the peptides during storage. The hydrolysates became darker, redder and more yellow during storage. Propyl gallate was found to be best to preserve chemical and functional quality parameters whereas ascorbic acid was found to have the smallest effect.

Innholdsfortegnelse

Lovfestet erklæring i

Forord ii

Sammendrag iii

Abstract iv

1. Introduksjon 1

1.1. Produksjon av proteinhydrolysat 2

1.2. Kjemisk hydrolyse 3

1.2.1. Hydrolyse med syre 3

1.2.2. Hydrolyse med base 3

1.3. Biokjemisk hydrolyse 4

1.3.1. Enzymatisk hydrolyse 4

1.4. Faktorer som påvirker kvaliteten av FPH 5

1.4.1. Enzymvalg 5

1.4.2. Lipidoksidasjon 6

1.4.3. Proteinoksidasjon 6

1.4.4. Antioksidanter 10

1.4.5. Bitterhet 16

1.5. Målet med prosjektet 17

2. Materialer og metoder 18

2.1. Råmateriale 19

2.1.1. Frysetørking av råmaterialet 19

2.2. Hydrolyse 19

2.3. Kjemiske analyser 21

2.3.1. Tørrstoff- og askeinnhold 21

2.3.2. Vannløselige proteiner ved Lowrymetoden 21

2.3.3. Syreløselige peptider ved Lowrymetoden 22
2.3.4. Kjeldahl 22
2.3.5. Kvantifisering av SH-grupper i vannløselige proteiner 23
2.3.6. Frie aminogrupper og hydrolysegrad ved formoltitrering 24
2.3.7. Total aminosyresammensetning med HPLC 24
2.3.8. Frie aminosyrer med HPLC 25
2.3.9. Molvektsfordelinger med FPLC 26
2.3.10. Fargemålinger ved kolorimetri 26
2.4. Statistiske analyser 27
3. Resultater og Diskusjon 28
3.1. Tørrstoff- og askeinnhold 28
3.2. Vannløselige proteiner 29
3.3. Syreløselige peptider 31
3.4. Totalt protein- og nitrogeninhold 32
3.5. SH-grupper i vannløselige proteiner 33
3.6. Frie aminogrupper og hydrolysegrad 34
3.7. Aminosyreprofiler 35
3.7.1. Totalt aminosyreinnhold 35
3.7.2. Total aminosyresammensetning 36
3.8. Frie aminosyrer 42
3.9. Molvektsfordelinger 44
3.10. Fargemålinger 47
3.11. Korrelasjoner 50
4. Konklusjon 54
5. Videre arbeid 56
Bibliografi 57

Vedlegg A Tørrstoff- og askeinnhold....68
A.1. Tørrstoffinnhold....68
A.2. Askeinnhold....69
Vedlegg B Vannløselige proteiner og syreløselige peptider....70
B.1. Vannløselige proteiner....70
B.2. Syreløselige peptider....72
Vedlegg C Protein- og nitrogeninnhold....74
Vedlegg D SH-grupper i vannløselige proteiner....76
Vedlegg E Hydrolysegrad....79
Vedlegg F Aminosyreinnhold....81
F.1. Totalt aminosyreinnhold....81
F.2. Essensielle, aromatiske og hydrofobe aminosyrer....92
Vedlegg G Frie aminosyrer....97
Vedlegg H Molvektsfordelinger....108
Vedlegg I Fargemålinger....110
Vedlegg J Hydrolysatene....111

Figurliste

Figur 1.4-1: ROS-mediert oksidasjon av proteiner [47] 7
Figur 1.4-2: Dannelsen av disulfid og TNB fra en tiol og DTNB. 9
Figur 1.4-3: Antioksidantmekanismer initierings- og forplantningsreaksjoner under oksidasjon [68]. 11
Figur 1.4-4: Kjemiske strukturer av BHA isomere (I og II) og BHT (III) [71]. 12
Figur 1.4-5: Kjemiske strukturer og reaksjonsseter for nøytral (PG) og deprotonert (PG^-) form av PG [83]. 13
Figur 1.4-6: Kjemisk struktur av CA [93]. 15
Figur 1.4-7: Kjemisk struktur av L-askorbinsyre [77]. 15
Figur 2.2-1: Flytskjema for tillaging av FPH med antioksidant. 19
Figur 3.2-1: Forskjellene i vannløselige proteiner [vekt%] i FPH lagret seks måneder målt for parallell 1 og 2 (p1 og p2). 30
Figur 3.5-1: Konsentrasjon av tioler [nmol/mg protein] i FPH. Standardavvik er vist som feilbarer. 34
Figur 3.7-1: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for KON under lagringsperioden. 38
Figur 3.7-2: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt BHT under lagringsperioden. 39
Figur 3.7-3: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt PG under lagringsperioden. 39
Figur 3.7-4: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt CA under lagringsperioden. 40
Figur 3.7-5: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt AA under lagringsperioden. 40
Figur 3.8-1: Innhold av frie aminosyrer i råstoff og i FPH lagret fra null til seks måneder [mg/g]. Standardavvik er gitt for n=2. 43
Figur 3.8-2: Aminosyreprofilen til FAA [mg/g] i FPH uten lagring. 43
Figur 3.8-3: Aminosyreprofilen til FAA [mg/g] i FPH lagret seks måneder. 44
Figur 3.9-1: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for råstoff sammenliknet med kjente standarder. 45

Figur 3.9-2: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for FPH som ikke ble lagret sammenliknet med kjente standarder. 46
Figur 3.9-3: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for FPH lagret 6 mnd sammenliknet med kjente standarder. 47
Figur 3.10-1: ΔE for FPH lagret to, fire og seks måneder i forhold til FPH som ikke ble lagret. 50
Figur 3.11-1: Korrelasjoner mellom frie aminosyrer [mg/g FPH] og %DH for FPH lagret fire måneder og seks måneder. 50
Figur 3.11-2: Korrelasjoner mellom VLP [vekt%] og konsentrasjonen av tioler [nmol/mg protein] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder. 51
Figur 3.11-3: Korrelasjoner mellom frie aminosyrer [mg/g FPH] og tiolkonsentrasjon [nmol/mg protein] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder. 52
Figur 3.11-4: Korrelasjoner mellom totalt proteininnhold [vekt%] fra Kjeldahlanalyse og totalt aminosyreinnhold [nmol/mg FPH] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder. 53

Tabelliste

Tabell 1.1-1: Restråstoff fra havbruk (laks og ørret) i 2016 angitt i tonn. Fordeling på type restråstoff. [5].....2
Tabell 1.4-1: Aminosyrene som er mest mottakelige for oksidasjon [47].....8
Tabell 1.5-1: Oversikt over analyser utført på råstoff og FPH. 18
Tabell 2.2-1: Mengde antioksidant tilsatt råstoff (ppm). Verdien er angitt i forhold til mengde råstoff. 20
Tabell 2.3-1: Temperaturprofil for analyse med K-449.....23
Tabell 2.3-2: Destillering og titrering med KJELMASTER-systemet K-375/K-376.....23
Tabell 3.1-1: Tørrstoff- og askeinnhold i råstoff, FPH lagret null og seks måneder. Standardavvik er gitt for n=2. Ulike bokstaver i samme rad og kategori (tørrstoff/aske) indikerer signifikant forskjell (p < 0,05). 29
Tabell 3.2-1: Vannløselig protein [vekt%] av tørrvekt for FPH fortynnet 1:400. Standardavvik er gitt for n=2. 30
Tabell 3.3-1: Mengde syreløselige peptider i vekt% våtvekt for FPH og råstoff fortynnet. Standardavvik er gitt for n=2 (svart) og n=3 (blå). Verdier som også ble presentert i prosjektoppgaven med samme tittel [133] er markert med stjerne.....32
Tabell 3.4-1: Nitrogen og Total Protein [vekt%] i FPH som ikke ble lagret. Standardavvik er gitt for n=2. 32
Tabell 3.5-1: Mengde tioler i vannløselig protein [nmol/mg protein] i råstoff og FPH lagret fra null til seks måneder. Standardavvik er gitt for n=3. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05). 33
Tabell 3.6-1: Frie aminogrupper og %DH (vekt%) bestemt med formoltitrering. Standardavvik gitt for frie aminogrupper og %DH; (n=2 FPH; n=3 råmateriale). Ulike bokstaver i samme rad og kategori (frie aminogrupper/%DH) indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).....35
Tabell 3.7-1: Summen av TAI angitt i mg/g FPH og mg/g råstoff. Standardavvik er gitt for n=2 (blå) og n=3 (svart). Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05). .36
Tabell 3.7-2: Aminosyreprofil gitt som vekt% av TAI for råstoff sammenliknet med aminosyreprofilen for ørrethoder undersøkt av Li et. al [7]. Standardavvik gitt for n=3. 37
Tabell 3.7-3: Summen av EAS gitt som prosent og forholdet mellom EAS og NEAS i FPH som ikke ble lagret og FPH lagret. 42

Tabell 3.10-1: Fargemålinger for FPH lagret fra null til seks måneder. Standardavvik er gitt for n=3. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell ($p < 0,05$). 49

Forkortelser

AA = Askorbinsyre

AAS = Aromatiske aminosyrer

Ala = Alanin

Arg = Arginin

Asp = Aspartat

BHA = Butylert hydroksyanisol

BHT = Butylert hydroksytoluen

BSA = Bovine Serum Albumin

CA = Sitronsyre

Cys = Cystein

Da = Dalton

EAS = Essensielle aminosyrer

FAA = Frie aminosyrer

FPH = Fiskeproteinhydrolysat

FPK = Fiskeproteinkonsentrat

FPLC = Fast protein liquid chromatography

Gln = Glutamin

Glu = Glutamat

Gly = Glycin

GRAS = Generally Recognized as Safe

HAS = Hydrofobe aminosyrer

His = Histidin

HPLC = High pressure liquid chromatography

Ile = Isoleucin

Mb = myoglobin

Met = Metionin

MMb = metmyoglobin

MbO_2 = oksymyoglobin

PH = proteinhydrolysat

PG = Propylgallat

Phe = Fenylalanin

Pro = Prolin

ROS = Reaktive oksygenforbindelser

SD = standardavvik

Ser = Serin

TAI = Totalt aminosyreinnhold

TAS = Total aminosyresammensetning

TCA = Trikloreddiksyre

Thr = Treonin

Trp = Tryptofan

Tyr = Tyrosin

Val = Valin

VLP = Vannløselige proteiner

WHO = World health organization

%DH = Hydrolysegrad

Kapittel 1

Introduksjon

Oppdrettsnæringen er en av de fremste eksportnæringene i Norge. 1,3 millioner tonn oppdrettsfisk ble produsert i 2018, derav 1,28 millioner tonn laks og 68.000 tonn ørret [1]. Av dette ble 1,1 millioner tonn laks og 46.000 tonn ørret eksportert til en verdi av 67,8 og 3 milliarder kroner [2]. Disse tallene viser at denne næringen er viktig for Norge, både med tanke på økonomi, verdiskapning, arbeidsplasser og produksjon av sunne konsumprodukter. Av totalt 1,3 millioner tonn ørret og laks produsert i 2018 ble 417.900 tonn restråstoff utnyttet, noe som utgjorde 91 % av restråstoffet [3].

Restråstoff kan defineres som det ikke primære produktet under anvendelse av et råstoff og må behandles i henhold til hygieneregelverket [4]. Fiskefraksjonene som omtales som restråstoff er død-fisk, utkast, slo, hode, rygg, spol, skinn, buklist og annet avskjær. Død-fisk er et restråstoff som defineres som biprodukt, som ikke skal benyttes til humant konsum. Forskjellen mellom biprodukt og restråstoff avhenger av hvilket hygieneregelverk det behandles i henhold til [5]. Mengden og type restråstoff fra laks og ørret som utnyttes er vist i Tabell 1.1-1. Fiskeblod er den eneste andelen av laks og ørret som ikke blir utnyttet i dag siden det mangler tekniske og økonomiske løsninger for dette [5, 6].

Restråstoff fra havbruksnæringen inneholder mange essensielle næringsstoffer som proteiner, lipider, mineraler, vitaminer og antioksidanter og er dermed et godt råstoff for produksjon av fôr- og konsumprodukter. Norske restråstoffprodukter kan klassifiseres i tre kategorier: fôr, konsum og energi/biogass. Fôrmarkedene er de viktigste i forhold til å ta unna store volum og i 2013 ble det produsert 245.000 tonn fôrprodukter fra marint restråstoff til husdyr, pelsdyr og fisk. Disse fôrproduktene består av oljer, proteiner og andre ingredienser. I fiskefôr er marine oljer den viktigste ingrediensen i tillegg til proteiningredienser (mel, fiskeproteinhydrolysat (FPH) og fiskeproteinkonsentrat (FPK). FPH og FPK utgjorde den største produktgruppen basert på marint restråstoff og utgjorde totalt 81.500 tonn i 2013, hvorav

FPH utgjorde 15,9 %. Lite av restråstoffet i Norge utnyttes i høyere betalende markeder som kosttilskudd-, kosmetikk- eller farmasimarkedet [6].

Tabell 1.1-1: Restråstoff fra havbruk (laks og ørret) i 2016 angitt i tonn. Fordeling på type restråstoff. [5]

Type råstoff	Totalt oppstått	Ikke utnyttet	Utnyttet
Død-fisk	83.830		83.830
Blod	34.934	34.934	
Utkast	17.880		17.880
Slo	144.832		144.832
Hoder	29.611		29.611
Rygg og spol	30.634		30.634
Skinn	21.971		21.971
Buklist	14.264		14.264
Div. avskjær	22.886		22.886
Total	**400.842**	**34.934**	**365.908**

1.1. Produksjon av proteinhydrolysat

Som tidligere nevnt inneholder marint restråstoff flere gunstige næringsstoffer som man ønsker å utnytte. Fiskehoder, som består av blant annet proteiner, lipider, antioksidanter og mineraler, utgjør en stor andel av biprodukter fra fisk og utvikling av teknologi for å utnytte dets verdifulle næringsstoffer mer effektivt har dermed fått oppmerksomhet på verdensbasis [7]. Én metode som muliggjør dette er hydrolyse; under hydrolyse av proteinholdige råstoff spaltes peptidbindinger for å oppnå et proteinhydrolysat (PH) som består av proteiner og peptider i ulike størrelser [8]. Hydrolyse av peptidbindinger fører til strukturendringer der hydrofile grupper som COOH og NH_2 frigjøres og bidrar til økt løselighet. I tillegg kan hydrofobe aminosyrer i proteinmolekylene eksponeres til overflaten av oligopeptidene som dannes og som bidrar til redusert løselighet [9]. Hydrolyse kan foregå på to måter: kjemisk ved bruk av syre eller base eller biologisk ved bruk av endogene eller tilsatte enzymer [8]. I dag produseres PH med høyt proteininnhold og lav produksjonskostnad fra flere typer råmaterialer som planter og restråstoff fra fiske- og kjøttindustri. Disse PH har flere bruksområder i matindustrien og brukes blant annet som proteintilskudd og smaksforsterkere [10, 11].

1.2. Kjemisk hydrolyse

Kjemisk hydrolyse av proteiner oppnås ved å spalte peptidbindinger med syre eller base [12]. Metoden er mye benyttet i industrien fordi den er relativt billig, men det er flere begrensninger for kjemisk produserte hydrolysat som matingredienser; prosessen er vanskelig å kontrollere, og fører nesten alltid til produkter med ulik kjemisk sammensetning og funksjonelle egenskaper [8, 13]. Proteinhydrolyse med sterke kjemikalier som syre og base utføres ved høye temperaturer og gir generelt produkter med redusert næringsverdi, dårlig funksjonalitet og begrenset bruk som smaksforsterkere [14].

1.2.1. Hydrolyse med syre

Under produksjon av FPH ved hydrolyse med syre tilsettes HCl eller svovelsyre til fiskeproteiner slik at peptidbindingene spaltes. Dette skjer ved lav pH under høy temperatur og høyt trykk. Videre tilsettes base for å nøytralisere pH til 6-7 før hydrolysatet enten konsentreres til en pasta eller tørkes videre [15]. Et av kjennetegnene til PH produsert ved syre er høy løselighet. Total hydrolyse av fiskeproteinsubstrat kan oppnås etter hydrolyse i 18 timer ved 118°C med 6M HCl [16].

Det er flere ulemper med produksjon av FPH ved bruk av syre; etter nøytralisering av pH med base inneholder FPH store mengder NaCl som begrenser bruken av hydrolysatene. Syrehydrolyse benyttes også for å omdanne underutnyttet og restråstoff fra fisk til gjødsel grunnet den lave produksjonskostnaden [11]. Hydrolyse med syre kan føre til nedbrytning av flere aminosyrer. I prosessen omdannes aminosyrene glutamin og asparagin til hhv. glutaminsyre og asparaginsyre sammen med ammoniakk. Tryptofan brytes helt ned. Tap av cystein, metionin og tyrosin gjennom oksidasjon varierer [17].

1.2.2. Hydrolyse med base

Basisk hydrolyse av proteiner benyttes for å gjenvinne proteiner og gjøre dem løselige [11]. Metoden er mye benyttet i utnyttelse av restråstoff fra fisk til gjødsel grunnet lave produksjonskostnader. Under basisk hydrolyse av fiskeproteiner benyttes hovedsakelig FPK som startsubstrat og NaOH som kjemikalie og proteinene spaltes til store, vannløselige polypeptider [18]. Hydrolyse med syre foretrekkes fremfor hydrolyse med base fordi sistnevnte ofte resulterer i dårlig funksjonalitet, lav næringsverdi av PH og økt risiko for igangsetting av skadelige reaksjoner. De skadelige reaksjonene kan føre til rasemisering av en L-aminosyre til en D-aminosyre, som mennesker ikke kan absorbere, og igangsettes ved at H-atomet i α-

karbonet i en aminosyre fjernes. I tillegg spaltes disulfidbindinger med tap av flere aminosyrer via ß-elimineringsreaksjoner. Disse elimineringsreaksjonene kan føre til dannelse av giftige stoffer som lysinoalanin, ornitinoalanin, lantionin og ß-amino alanin, som er uønskede i mat [19-21].

1.3. Biokjemisk hydrolyse

Biokjemisk hydrolyse med bruk av enzymer er en annen metode som benyttes for å produsere PH. Denne hydrolysemetoden foretrekkes fremfor kjemisk hydrolyse da enzymhydrolyse resulterer i produkter med høy funksjonalitet og næringsverdi [22].

1.3.1. Enzymatisk hydrolyse

I enzymatisk hydrolyse benyttes proteaser som hydrolyserer peptidbindinger med tilsats av vann. Dette er en av de mest forekommende og viktigste enzymatiske modifikasjonene av proteiner [23]. Proteasene kan deles inn i fem ulike grupper: serin-, threonin-, cystein-, aspartyl- og metalloproteaser. Serinproteaser angriper peptidbindingen i substratet ved å bruke hydroksylgruppen i sidekjeden av aminosyren serin som befinner seg i det katalytiske setet. Threoninproteaser har en liknende reaksjonsmekanisme. Cysteinproteaser benytter svovel-hydrogenbindingen i en cysteinenhet for å initiere spalting av peptidbindingen. I aspartylproteaser vil de sure karboksylgruppene i to aspartylenheter utføre den katalytiske handlingen. Metalloproteaser har et zinkatom i det katalytiske setet [24]. Hvilket enzym som benyttes i hydrolysen har dermed stor innvirkning på hydrolysatets funksjonelle egenskaper.

Med fokus på forbedret enzymteknologi er potensialet for å utnytte næringsmiddelmolekyler til stede i restråstoff fra fisk svært høyt [10, 25]. Denne metoden for ekstraksjon av proteiner er et godt alternativ sammenliknet med kjemiske behandlinger som ofte skader produktene og reduserer produktutbyttet. En annen fordel er at enzymer er aktive ved lave konsentrasjoner, under nøytral pH og temperatur og fører dermed til færre uønskede bieffekter under produksjon [25].

FPH kan produseres enzymatisk ved bruk av proteolytiske enzymer allerede tilstede i fiskeinnvoller og -muskler (endogene proteaser), eller ved å tilsette enzymer fra andre kilder (eksogene proteaser) [11]. Generelt er resultatet av enzymatisk hydrolyse er et amorft proteinpulver som består av små peptider og aminosyrer (81-93 %), fett (< 5 %), aske (3-8 %) og vann (1-8 %)[26]. I denne oppgaven ble enzymene papain og bromelain benyttet. Papain er et eksogent enzym som stammer fra papayafrukt. Det er en cysteinprotease som har høy optimal

temperatur (65 °C) og er aktiv over et bredt pH-spekter (5-8) [27, 28]. Bromelain er et proteolytisk enzym som stammer fra ananas og angriper de interne peptidbindingene i peptidkjeden [29, 30].

1.4. Faktorer som påvirker kvaliteten av FPH

Det er mange fordeler med bruk av FPH som tilskudd til både dyrefôr og matprodukt sett fra et framtidsrettet, økonomisk og næringsmessig perspektiv. Som tidligere nevnt benyttes både kjemisk og biokjemisk produsert FPH til dyrefôr, ensilasje, bioenergi og humant konsum. Enzymatisk hydrolyse er enklere å kontrollere og egner seg best for å produsere FPH til humant konsum, men i dag er det kun en liten andel FPH som går til dette markedet. Årsaken til dette er noen av de negative fysiokjemiske og sensoriske egenskapene til FPH som beskrives i dette kapittelet.

1.4.1. Enzymvalg

Enzymatisk hydrolyse av fiskeproteiner benyttes for å endre og forbedre proteinenes kjemiske og funksjonelle egenskaper som er viktige for at FPH skal kunne benyttes som ingredienser i mat. Prosessen øker noen kvalitetsparametere ved at den genererer en blanding av frie aminosyrer, ulike typer peptider og øker antallet polare grupper og dermed løseligheten av proteinene [11]. Enzymvalget er en av flere faktorer som påvirker de fysiokjemiske egenskapene hos FPH. Substrat og hydrolysegrad (%DH) vil også påvirke disse egenskapene [31]. Valget av enzym er viktig fordi ulike enzymer har ulike aktiviteter og optimale reaksjonsparametere, og vil ha stor påvirkning på utfallet av molvektsfordelingen og hydrofobisiteten til proteinene i hydrolysatet [32, 33]. Dersom enzymet har høy spesifisitet vil peptider med høy molekylvekt dannes og motsatt for enzymer med lav spesifisitet [31]. Omfanget av hydrolysen, dvs. hydrolyseforhold, temperatur, enzymkonsentrasjon, inaktivering av enzym og type protein som hydrolyseres vil påvirke kjedelengden av peptidene [34].

Enzymene som benyttes i hydrolyse av FPH må inaktiveres når den ønskede %DH er oppnådd for å forhindre videre hydrolyse av proteinene og peptidene. Inaktivering av enzymene kan utføres enten kjemisk eller termisk. Ved termisk inaktivering blir blandingen med enzymene overført til et vannbad der de utsettes for temperaturer mellom 75 og 100°C i fem til 30 minutter avhengig av type enzym. [11].

1.4.2. Lipidoksidasjon

Fisk er en kilde til flerumettede, essensielle fettsyrer som omega-3- og omega-6-fettsyrer som har vist gode helseeffekter mot hjerte- og karsykdommer, diabetes og kreft. I umettede fettsyrer er karbonatomene bundet sammen dobbeltbindinger som gjør dem svært mottakelige for oksidasjon [35] og dermed redusert næringsverdi og kvalitet. Lipidoksidasjon av flerumettede fettsyrer i fisk kan fremmes av lys, varme, tilstedeværelse av metallioner, radikale forbindelser og prooksidanter og fører til at det dannes harsk smak, bismak og flyktige komponenter [36, 37]. Den viktigste mekanismen under lipidoksidasjon er autooksidasjon [38] som fører til dannelse av frie radikaler. Den klassiske prosedyren i autooksidasjon er initiering (produksjon av lipid frie radikaler), forplantning og terminering (produksjon av ikke radikale produkter) [39]. Hemoglobin og myoglobin (Mb) er også komponenter som kan øke lipidoksidasjonen i fiskeprodukter [40]. For å motvirke de negative effektene av lipidoksidasjon tilsettes antioksidanter. Det finnes mange typer antioksidanter som blokkerer oksidasjon via ulike mekanismer; BHT blokkerer forplantningsfasen i autooksidasjon mens karotenoider reagerer med $^1O_2$ (reaktiv) til $^3O_2$ (ikke-reaktiv) for å motvirke dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS). Antioksidanter beskrives nærmere i kapittel 1.4.4.

Enzymatisk produksjon av FPH har vist seg å være effektiv i separasjon av lipidfraksjonen fra PH produsert fra marint restråstoff [41]. Dersom deler av lipidfraksjonen ikke fjernes vil lipidoksidasjon i FPH kunne føre til begrenset lagringstid [42]. Dersom lipidene blir utsatt for peroksidasjon kan peroksidproduktene reagere med spesifikke aminosyrer og på denne måten føre til tap av ernæringsverdi [36], fargeendringer [11] og dannelse av kryssbindinger [43] som igjen vil påvirke sensoriske egenskaper og forbrukeraksept. I FPH som inneholder mer enn 1 % fiskefett bør lipidfraksjonen fjernes med løsemiddelekstraksjon eller stabiliseres med antioksidanter [44].

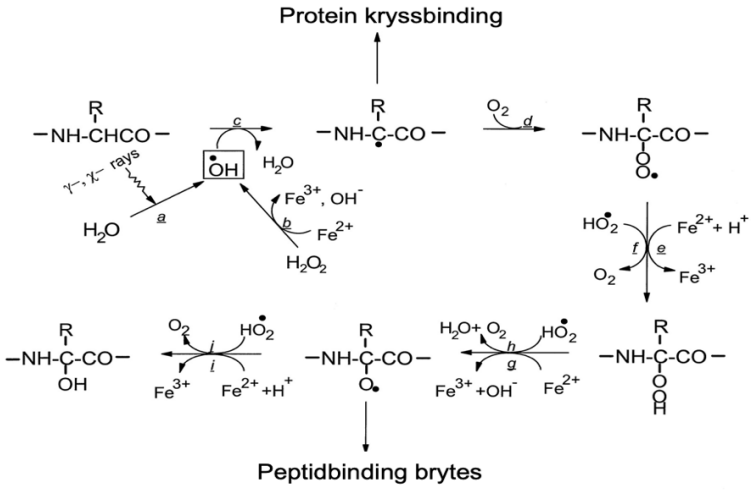
1.4.3. Proteinoksidasjon

Dannelse av ROS og frie radikaler kan også føre til proteinoksidasjon og redusere deres næringsverdi. Både lipid- og proteinoksidasjon indusert av frie radikaler tilstede i matvarer er viktige årsaker til kvalitetsendringer under behandling og lagring av matprodukt og kan forklare noen av endringene assosiert med kvalitetsendringer under frossen lagring av fisk [38, 45] og lagring av FPH som inneholder fett. Oksiderte proteiner akkumulerer under lagring og oksidativt stress, noe som har rettet fokuset mot fysiologiske og ikke-fysiologiske mekanismer for dannelsen av ROS og hvordan disse påvirker biologiske molekyler [46, 47]. Omfanget av

oksidasjonsprosessene bestemmes av tilgjengeligheten av ROS og sammen kan disse føre til oksidasjon av aminosyresidekjeder, dannelse av protein-protein kryssbindinger og oksidasjon av proteinryggraden som fører til kjedebrudd. [48]. Proteinoksidasjon kan direkte initieres av frie radikale og reaktive nitrogenforbindelser eller av produkter dannet i lipidoksidasjon [49].

Oksidasjon av proteinryggraden

ROS dannet fra blant annet overgangsmetaller og enzymer kan angripe proteinryggraden og føre til fragmentering og konformasjonsendringer i den sekundære og tertiære proteinstrukturen [50]. Oksidativt angrep av ryggraden initieres av abstraksjon av α-hydrogenet i en aminosyreenhet for å danne en karbonsentrert radikal (Figur 1.4-1, reaksjon c). OH som inngår i denne reaksjonen kan oppnås ved radiolyse av vann eller ved metallkatalysert spaltning av H_2O_2 (reaksjon a og b). Den dannede karbonsentrerte radikalen reagerer raskt med O_2 for å danne et intermediat bestående av en alkylperoksylradikal (reaksjon d), som kan gi opphav til alkylperoksid (reaksjon f), etterfulgt av dannelse av en alkoksylradikal (reaksjon h) som kan omdannes til et hydroksylproteinderivat (reaksjon j). Mange av trinnene i denne reaksjonsveien som medieres ved interaksjoner med $HO\cdot_2$ kan også katalyseres av Fe^{2+} (reaksjon e, g og i) eller av kobberioner (ikke vist) [47].



Figur 1.4-1: ROS-mediert oksidasjon av proteiner [47]

Oksidasjon av aminosyresidekjeder

Noen av de oksidative modifikasjonene av proteiner som skjer i sidekjedene i aminosyrer i FPH inkluderer tioloksidasjon, aromatisk hydroksylering og dannelse av karbonylgrupper [51, 52]. Alle aminosyreenheter i proteiner er utsatt for oksidasjon av ·OH, men produktene som dannes i oksidasjonen av noen av disse enhetene er ennå ikke oppdaget. Tabell 1.4-1 gir en oversikt over noen av produktene som dannes under oksidasjon av enhetene som er mest utsatt for oksidasjon [46].

Tabell 1.4-1: Aminosyrene som er mest mottakelige for oksidasjon [47].

Aminosyrer	**Oksidasjonsprodukt**
Cystein	Disulfider, cysteinsyre
Metionin	Metioninsulfoksid, metioninsulfon
Tryptofan	2-, 4-, 5-, 6-, og 7-hydroksytryptofan, nitrotryptofan,
Fenylalanin	2,3-dihydroksyfenylalanin, 2-, 3-, og 4-hydroksyfenylalanin
Tyrosin	3,4-dihydroksyfenylalanin, tyrosin-tyrosin kryssbindinger, Tyr-*O*-Tyr, kryssbundet nitrotyrosin
Histidin	2-oksohistidin, asparagin, asparaginsyre
Arginin	Glutamin semialdehyd
Lysin	α-aminoadipisk semialdehyd
Prolin	2-pyrrolidon, 4- og 5-hydroksyprolin pyroglutaminsyre, glutamisk semialdehyd

Cys og Met er mest utsatt for oksidasjon av tioler fordi de inneholder reaktive svovelatom [50]. Aromatiske aminosyrer som Trp, Tyr, His og Phe er også svært utsatt for oksidasjon og oksidasjon av disse genererer fenoksylradikale [53, 54]. Alifatiske aminosyrer som ikke inneholder svovel som Pro og Arg oksideres på en annen måte. I denne typen aminosyrer skjer oksidasjon ved at et H-atom fjernes fra α-karbonet slik at en karbonsentrert radikal dannes (C·) [55]. Oksidasjon katalysert av metallioner er også en type oksidasjon som kan forekomme i proteiner. I slike reaksjoner oksideres sidekjedene i hovedsakelig Lys, Pro og Arg [56].

Disulfidbroer, dityrosinbroer og andre intermolekylære broer indusert av oksidasjon kan resultere i proteinaggregering [57, 58]. Dette skyldes hovedsakelig en oksidasjonsindusert utbrettingsprosess som øker hydrofobisiteten i overflaten av det oksiderte proteinet [59]. Disse endringene kan påvirke hydrolysatenes fysiske og kjemiske egenskaper som løselighet, hydrofobisitet og geldanningsevne [60, 61]. I tillegg kan endringer indusert av proteinoksidasjon minke biotilgjengeligheten av aminosyreenheter og modifisere fordøyeligheten av proteiner, som har en negativ påvirkning på næringsverdien av FPH [49].

Metoder for påvisning av proteinoksidasjon

Som tidligere nevnt dannes karbonylgrupper som resultat av oksidativ modifikasjon av sidekjeder i aminosyrer. Tilstedeværelse av karbonylgrupper i proteiner har derfor blitt brukt som markører for ROS-mediert proteinoksidasjon og flere sensitive metoder for kvantifisering av proteinkarbonylgrupper har blitt utviklet [62]. Disse metodene har vist at proteinoksidasjon assosieres med lagring og oksidativt stress [47]. En annen metode for å påvise proteinoksidasjon er å kvantifisere mengden tioler, som fins i blant annet aminosyrene Cys og Met. *In vivo* er den viktigste rollen til tiolforbindelser deres funksjon som cellulære redoksbuffere som regulerer protein tiol/disulfid-sammensetningen [63]. Disulfidbindinger er essensielle for vedlikehold av den strukturelle stabiliteten, funksjonaliteten og stabiliteten hos mange løselige proteiner, men kan være ødeleggende for andre [64]. Tioler har negativt standard reduksjonspotensiale og er dermed elektronakseptorer. Ved oksidant-tiol-interaksjon nøytraliseres oksidanten til et mindre skadelig biprodukt på bekostning av tiolens reduserende egenskap, som selv oksideres til en disulfid (R-S-S-R). Tap av H-atomer fra tiolene danner en tiylradikal (R-S·) som også er svært ustabilt og vil danne korresponderende disulfid. I biologiske systemer resirkulerer reduktaser disulfider til reduserte tioler via NADPH eller NADH slik at cellemetabolisme bidrar til å vedlikeholde et stabilt redoksmiljø for tioler [63].

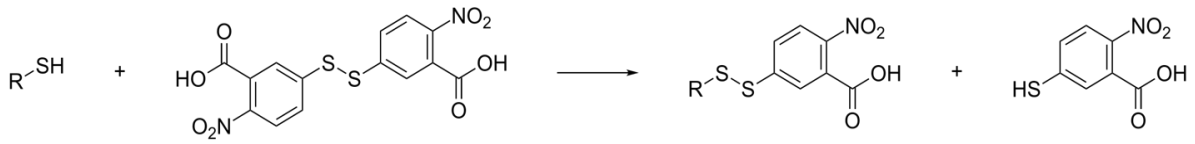
Den generelle likevektsreaksjonen mellom tioler og disulfider er vist nedenfor [63]:

$$2\,R - SH \leftrightarrow R - SS - R + 2e^{-} + 2H^{+}$$

Alternativt kan spesifikke tiolforbindelser produseres ved blandede disulfidreaksjoner [63]:

$$R - SH + R' - SS - R' \leftrightarrow R - SS - R' + R' - SH$$

I metoden beskrevet i 2.3 tilsettes kjemikaliet Ellmans reagens, også kalt 5,5´´ditiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB). DTNB er en symmetrisk aryldisulfid som reagerer med en fri tiol og gjennomgår en tiol-disulfid interbyttereaksjon. Denne reaksjonen resulterer i dannelsen av en disulfid og TNB [65], som vist i Figur 1.4-2.



Figur 1.4-2: Dannelsen av disulfid og TNB fra en tiol og DTNB.

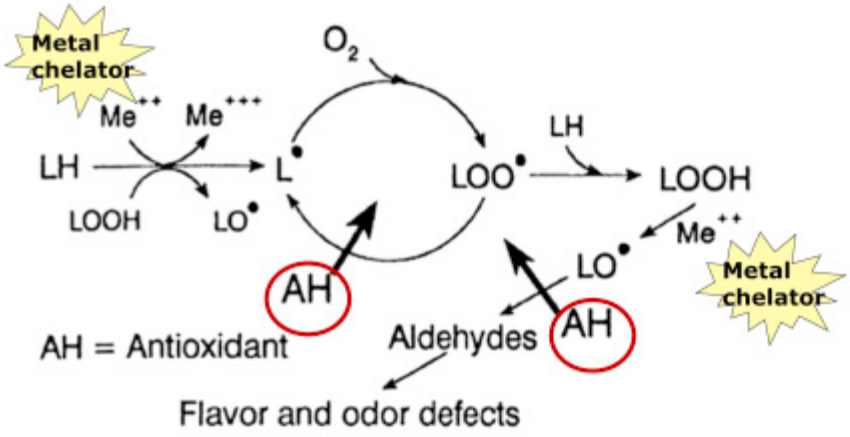
TNB-dianionet har en intens absorbans ved 412 nm sammenliknet med begge disulfidene. Siden støkiometrien av protein-tiol:TNB dannet er 1:1 kan dannelsen av TNB benyttes for å kvantifisere antall tioler tilstede i råstoff og FPH. Reaksjonen er sensitiv til basisk pH (-OH konkurrerer med R-S), sur pH (disulfider kan brytes opp), oksygen (reoksidasjon av R-SH) og temperatur. På grunn av dette utføres reaksjonen med overflødig DTNB i forhold til protein, ved nøytral pH i romtemperatur [65].

1.4.4. Antioksidanter

Som tidligere nevnt er oksidasjon av lipider og proteiner prosesser som er skadelige for matprodukter og skjer under prosessering, lagring, distribusjon og sluttbehandling av matvarer. Videre fører disse oksidasjonsprosessene til andre endringer i matproduktet som påvirker dets næringskvalitet, farge, smak og tekstur. For å beskytte matkvaliteten tilsettes antioksidanter, som kan avbryte oksidasjonsprosessen ved å reagere med frie radikale, binde katalytiske metaller og ved å fungere som fri radikalfanger [39]. De fleste organismer kan produsere bestemte antioksidanter selv (endogene antioksidanter), mens de som organismen ikke kan syntetisere må inntas i dietten (eksogene antioksidanter).

Antioksidanter klassifiseres som primære eller sekundære antioksidanter basert på virkningsmekanisme. Primære antioksidanter kan reagere direkte med frie radikale og omdanne dem til mer stabile, ikke-radikale produkt. Dette gjør at de spiller en primær rolle i å motvirke lipid- og proteinoksidasjon fordi de forhindrer videre nedbrytning av makromolekylene [66]. I produkter med en tilsatt og/eller naturlig tilstedeværende antioksidantkonsentrasjon vil mengden antioksidant være avgjørende for holdbarheten til produktet [67].

De viktigste fri radikalfangerne er fenolforbindelser med én eller flere hydroksylgrupper fordi de kan donere hydrogenatomer til frie radikale. I initierings- og forplantningstrinnene reagerer antioksidanter med lipid-, peroksyl- og alkoksylradikale og danner et antioksidantradikal. Antioksidantradikalet som dannes er resonnansstabilisert slik at videre nedbrytning til aldehyder og andre flyktige oksidasjonsprodukter forhindres [68]. Disse antioksidantmekanismene er vist i Figur 1.4-3. Fenolforbindelser og noen av deres derivater er svært effektive i å forhindre autooksidasjon; likevel er det kun noen få fenolforbindelser som er tillatt å benytte som antioksidanter i mat. De viktigste egenskapene som må tas i betraktning for aksept av slike antioksidanter er deres aktivitet og potensielle toksisitet. De tillatte fenoliske antioksidantene har blitt nøye studert, men toksikologien av nedbrytningsproduktene er fortsatt uklar [39].



Figur 1.4-3: Antioksidantmekanismer initierings- og forplantningsreaksjoner under oksidasjon [68].

Sekundære antioksidanter er viktige forebyggende antioksidanter som fungerer ved å forsinke forplantningsreaksjoner [69]. Flere mekanismer inkludert kompleksbinding av overføringsmetaller og oksygenfjerning kan utføres av disse sekundære antioksidantene [66]. Noen sekundære antioksidanter har synergistisk effekt sammen med primære antioksidanter ved at de gjendanner disse og dermed gjenoppretter antioksidantaktiviteten. I matprodukt med høyt innhold av jern og andre metaller er de sekundære antioksidantenes egenskaper som kompleksbindere viktig for å motvirke metallindusert lipidoksidasjon [68]. Multifunksjonelle antioksidanter er antioksidanter som innehar både primære og sekundære antioksidantegenskaper. [66]

Syntetiske fenolforbindelser som BHT og PG er effektive, kjedebrytende antioksidanter og er mye brukt som konserveringsmidler i mat. Noen naturlig forekommende fenolforbindelser som askorbinsyre (AA) benyttes også som kjedebrytende antioksidanter, men er vanligvis mindre effektive sammenliknet med syntetiske. Syntetiske antioksidanter er vanligvis også billigere enn naturlig forekommende antioksidanter. På den annen side har restriksjoner i bruk av syntetiske antioksidanter blitt forsterket på grunn av mulig helserisiko og toksisitet. På grunn av matsikkerhet, økt bevissthet blant forbrukere og mulige helsefordeler er det derfor en økt interesse for å erstatte syntetiske antioksidanter med naturlige [66].

Syntetiske antioksidanter

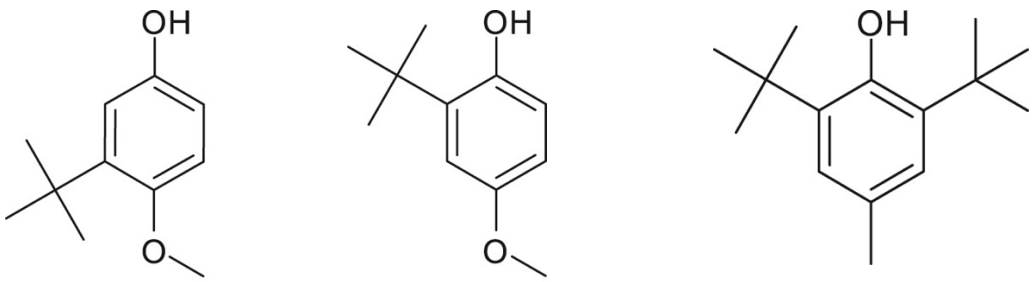
Moderne antioksidantteknologi ble et viktig forskningstema for omtrent 60 år siden da det ble oppdaget at frie radikale var ansvarlige for celleskade og redusert holdbarhet i matvarer [70]. Effektiviteten som radikalfangere til hundrevis av naturlige og syntetiske antioksidanter har blitt vurdert. BHA, BHT og propylgallat (PG) er mye brukte syntetiske antioksidanter, og

mye arbeid har blitt lagt i å designe nye syntetiske antioksidanter som skal forsinke effektene av skade indusert av frie radikale. Antioksidantaktiviteten til antioksidanter er i seg selv utilstrekkelig for å kunne benyttes industrielt fordi alle antioksidanter har styrker og svakheter. For å velge optimal antioksidant bør spesifikke faktorer som effektiv konsentrasjon, termisk stabilitet og synergisme vurderes. Alvorlige helseeffekter har blitt rapportert ved bruk av noen syntetiske antioksidanter. Disse sikkerhetstestes og må godkjennes før de kan tilsettes matprodukt [71].

BHT

BHT (butylert hydrolksytoluen) er en syntetisk antioksidant som blir kjemisk syntetisert fra p-cresol og isobutylen i en reaksjon katalysert av svovelsyre. [72, 73]. Resultatet er en fenol hvor fenolringen inneholder di-*tert*-butylgrupper som forårsaker steriske hindringer i molekylet [74]. Slike "hindrede" fenoler inhiberer kjedereaksjoner som forårsakes av frie radikale [75]. BHT er et hvitt krystallinsk pulver med likende egenskaper som BHA (butylert hydroksyanisol) [76], men er mindre stabil under termisk behandling [74]. Disse antioksidantene er svært lipofile og benyttes ofte i olje-i-vann-emulsjoner. De likende kjemiske strukturene til BHA og BHT er vist i Figur 1.4-4.

BHA og BHT kan også brukes sammen for å oppnå en synergistisk effekt [77]. Den synergistiske mekanismen involverer BHA som interagerer med peroksyradikaler for å danne en BHA fenoksyradikal. Videre antas det at BHA fenoksyradikalen kan abstrahere et H-atom fra hydroksylgruppen i BHT. Deretter overføres et H-atom fra BHT til BHA slik at antioksidanteffekten regenereres. BHT-radikalen kan så reagere med en peroksyradikal og fungere som en kjedeterminator [78].



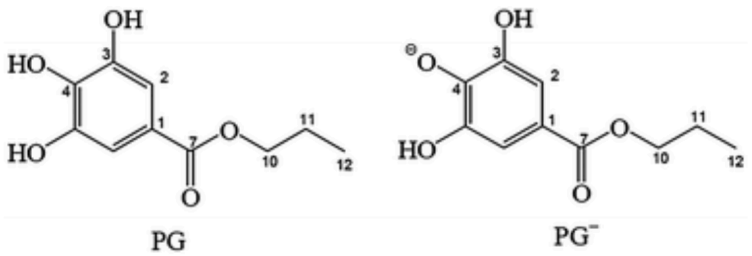
I II III

Figur 1.4-4: Kjemiske strukturer av BHA isomere (I og II) og BHT (III) [71].

BHT ble patentert i 1947 og har siden blitt benyttet i både mat-, fôr- og farmasøytisk industri i tillegg til farmakologi og plastikkproduksjon [71, 79]. I dag er BHT en av antioksidantene som benyttes mest i matindustrien. Anvendelsesområder for BHT er matvarer med lite fett, fiskeprodukt, emballasje og mineraloljer [80]. BHT er også mye brukt i kombinasjon med andre antioksidanter som PG og CA for stabilisering av oljer og i fettrik mat [81].

Propylgallat

PG, eller propyl 3,4,5-trihydroksybenzoat er et syntetisk esterderivat av den naturlig forekommende antioksidanten gallinsyre. PG syntetiseres i en kondensasjonsreaksjon mellom gallinsyre og propanol og har siden 1948 blitt tilsatt matprodukt som inneholder oljer og fett for å forhindre oksidasjon [82]. PG brukes i matprodukt der BHA og BHT ikke kan benyttes [77]. PG og andre gallatderivater som oktylgallat og heksadekylgallat er polyfenoler og er mye brukt i matindustrien grunnet deres antioksidant- og antibakterielle egenskaper. Gallatestere er hydrofobe moieteter som er fettløselige og delvis vannløselige. De kan interagere med alifatiske sidekjeder i aminosyrer i proteiner eller med fosfolipider og sukker gjennom hydrofobe interaksjoner [82, 83].



Figur 1.4-5: Kjemiske strukturer og reaksjonsseter for nøytral (PG) og deprotonert (PG^-) form av PG [83].

Som andre fenoliske antioksidanter er gallatestere reduserende forbindelser som inhiberer lipidperoksidasjon ved å overføre et H-atom fra en fenolisk hydroksylgruppe til lipidradikaler ($L^{\cdot}$) eller lipidperoksylradikaler ($LOO^{\cdot}$) [83]:

$$LH\ (lipid) + R^{\cdot}(fri\ radikal) \rightarrow L^{\cdot}(lipid\ fri\ radikal) + RH$$
$$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}\ (lipid\ peroksyradikal)$$
$$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow LOOH\ (lipid\ hydroperoksid) + L^{\cdot}$$

PG reagerer hovedsakelig med lipid peroksyradikaler ($LOO^{\cdot}$) slik at den radikale sekvensen termineres ved dannelse av stabile komplekser (PG-PG) eller nye radikaler ($PG^{\cdot}$) som ikke fortsetter kjedereaksjonen som vist nedenfor. De stabile kompleksene som dannes er årsaken til at gallater er effektive antioksidanter [83, 84].

$$PG + LOO^{\cdot} \rightarrow LOOH + PG^{\cdot}$$
$$PG^{\cdot} + PGH \rightarrow PG - PG$$

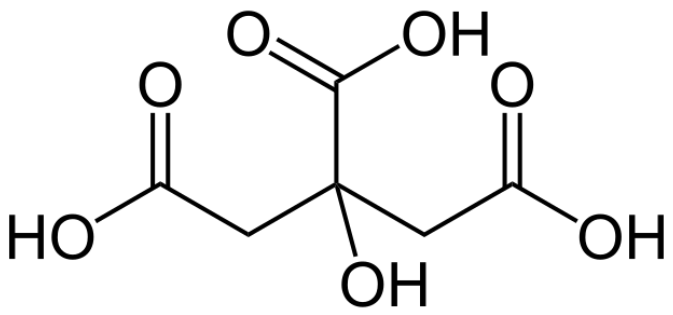
Gallater selges som blandinger med kompleksbindere fordi de vil danne uønskede, mørke komplekser med jern og kobber [85]. Sammen med primære og noen sekundære antioksidanter har gallater en synergistisk effekt [77]. De siste årene har de skadelige effektene av syntetiske antioksidanter i mat blitt diskutert. En studie utført av EFSA i 2014 konkluderte med at bruk av PG som konserveringsmiddel i mat ikke er av sikkerhetshensyn [86]. En annen studie fant at PG er en østrogenantagonist og at det bør utvises en viss forsiktighet i bruk av PG i mat [87].

Naturlige antioksidanter

Naturlige antioksidanter anses som gunstige komponenter i frukt og grønnsaker og viser et stort spekter av biologiske effekter. Naturlige antioksidanter kan være betennelsesdempende og de har vist positiv effekt i forebygging av åreforkalking og kreft [88].

Sitronsyre

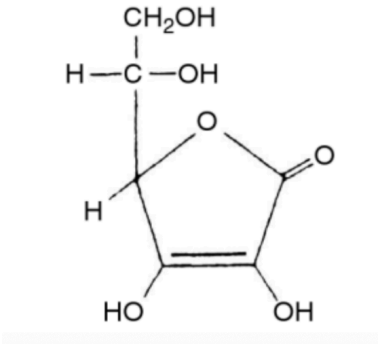
CA (2-hydroksy-1,2,3-propantrikarboksylsyre) er en svak organisk syre som fins i frukt og grønnsaker. CA er en antioksidant og benyttes som konserveringsmiddel i matprodukt. Studier av CA viste at citrat begrenser overflødig dannelse av ROS og reaktive nitrogenmetabolitter [89]. CA tilsettes som bindingsmiddel for å danne komplekser med metall som jern og kobber som er uønskede i oljer fordi de fremmer lipidoksidasjon. Kompleksbindere reduserer oksidasjon ved å forhindre metallredokssykluser, danne uløselige metallkompleks eller forårsake sterisk hindring mellom metall- og matkomponenter eller mellomprodukter i oksidasjonen [90]. Den kompleksbindende aktiviteten gjør at CA har synergistiske egenskaper som promoterer aktiviteten av andre antioksidanter [91, 92]. Det er antatt at karboksylgruppene (se Figur 1.4-6) er de funksjonelle gruppene i CA som binder metaller. CA og andre karboksylsyrer benyttes som tilsetningsstoffer i mat som suhetsregulerende forbindelser [77]. EDTA og CA er de vanligste kompleksbinderne i matprodukt [72].



Figur 1.4-6: Kjemisk struktur av CA [93].

Askorbinsyre

L-Askorbinsyre (AA), eller vitamin C, er et monosakkarid som fins naturlig i dyr og planter og store mengder produseres syntetisk for industriell bruk. AA er attraktiv som antioksidant fordi den har GRAS-status (Generally Recognized as Safe) uten bruksgrenser. I varmebehandlede matprodukt kan AA involveres i ikke-enzymatisk bruning og kan degraderes gjennom reduksjonsreaksjoner [77].



Figur 1.4-7: Kjemisk struktur av L-askorbinsyre [77].

AA er en redokskatalysator som kan redusere, og dermed nøytralisere ROS [94, 95]. Den kan fungere som primær antioksidant ved å donere H-atomer og som sekundær antioksidant der den kan være fri radikalfjerner, skifte redokspotensiale, agere synergistisk med kompleksbindere og regenerere primære antioksidanter [77]. Antioksidanter som er reduserende forbindelser kan også virke som prooksidanter. AA fungerer som prooksidant i nærvær av overføringsmetaller og redusere dem til frie radikale gjennom Fentonreaksjonen, som vist nedenfor. Reduksjonen av overføringsmetaller fører til økt produksjon av H_2O_2 og OH· [88, 96, 97].

$$2\,Fe^{3+} + Askorbat \rightarrow 2\,Fe^{2+} + Dehydroaskorbat$$
$$2\,Fe^{2+} + 2H_2O_2 \rightarrow 2\,Fe^{3+} + 2\,OH\cdot\ + 2\,OH^-$$

AA og saltformer av askorbat som natriumaskorbat, kalsiumaskorbat og kaliumaskorbat er vannløselige og har en begrensning som antioksidanter i fett og oljer. Askobylpalmitat derimot, som også har GRAS-status, har høy fettløselighet i forhold til AA og benyttes derfor i fettrike matvarer [72, 77].

1.4.5. Bitterhet

Hovedårsaken til at FPH ikke i større grad benyttes som matingrediens er at det under hydrolyseprosessen dannes bitre peptider. Bitter smak skyldes kjemiske stoffer som har en hydrofob og en hydrofil region som befinner seg 0,3 nm fra hverandre [98]. Hydrofobisiteten kan måles for molvekter lavere enn 6000 Da og det viser seg at de mest bitre peptidene har verdier over 1400 kcal/mol. Ikke-bitre peptider har verdier lavere enn 1300 kcal/mol [99].

Når proteiner hydrolyseres eksponeres de hydrofobe gruppene til overflaten av peptidet og det er disse gruppene som interagerer med smaksløkene og som gjør at vi oppfatter bitter smak. Dersom proteinhydrolysat hydrolyseres videre til frie aminosyrer minker bitterheten av disse peptidene fordi hydrofobe peptider er mer bitre enn en blanding av frie aminosyrer. På den annen side er ikke frie aminosyrer funksjonelt sett ønsket fordi de absorberes dårligere under fordøyelse. For å motvirke utviklingen av bitter smak og retensjon av funksjonelle egenskaper bør hydrolyseprosessen termineres ved relativt lave %DH [11].

Andre faktorer som påvirker bitterhet i FPH:

- Tamura et. al fant at et par hydrofobe grupper eller en hydrofob og en basisk gruppe som er plassert nært hverandre gir sterk bitterhet [100].
- Enzymvalg: Enzymer har ulike preferanser for aminosyrer. Valget av det mest passende enzymet, for eksempel enzymer som foretrekker hydrofobe aminosyrer vil bidra til å redusere bitterheten [11].
- Aminosyrer som danner bitter smak som Val, Ile, Phe, Trp, Leu og Tyr [101].

Mange teknikker har blitt foreslått for å redusere eller maskere bitterheten i proteinhydrolysat. Dauksas et. al [102] undersøkte effekten av enzymer og kjemikalier og fant at bitterheten ble eliminert eller redusert fra FPH ved å benytte butanol og kolestyramin separat eller i kombinasjon, men at det ga plastsmak på FPH og redusert utbytte. Flavourzyme® hadde

ingen effekt [102]. Andre forsøk har blitt utført ved å forsøke å begrense bitterheten ved å redusere %DH [98], bruk av endopeptidaser fremfor eksopeptidaser i produksjon av FPH [103], og ved å benytte den såkalte plasteinreaksjonen [104]. Disse metodene er foreløpig ikke tatt i bruk ved produksjon av FPH.

1.5. Målet med prosjektet

De siste tiårene har flere aktører fått tillatelse for produksjon av laks og ørret i oppdrettsanlegg og fra 1998 til 2018 økte produksjonen fra 440.000 tonn til 1,3 millioner tonn [105]. Produksjonsøkningen medførte en høy andel restråstoff og det økende fokuset på bærekraft har bidratt til fornyet interesse for videreutvikling av dette. For at dette skal benyttes for humant konsum må nye prosesser, analyser og etterbehandling av råmaterialet forbedres for å sikre produktenes kvalitet [106, 107]. Én måte å utnytte marine ressurser på en mer økonomiske bærekraftig måte er å finne metoder som sørger at næringsstoffer fra marine restråstoff som prosesseres til dyrefor, fiskeensilasje og bioenergi går til humant konsum i større grad enn nå, for eksempel i form av FPH. Dette krever utvikling av teknologi som kan sikre god kvalitet under produksjon og lagring som følgelig vil øke verdien av produktet. De fysiokjemiske og sensoriske egenskapene må ivaretas, som igjen vil ha positiv effekt på forbrukeraksept.

Målet med denne oppgaven var å undersøke hvordan kvalitetsparametere og de funksjonelle og kjemiske egenskapene til enzymatisk produserte FPH tilsatt antioksidantene BHT, PG, CA og AA ble påvirket under lagring i seks måneder. Antioksidantene ble tilsatt sammen med enzymene papain og bromelain under hydrolyse av hoder fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Kjemiske og funksjonelle egenskaper som ble målt var tørrstoff- og askeinnhold, vannløselige proteiner, syreløselige peptider, totalt proteininnhold, frie aminogrupper, %DH, frie aminosyrer, konsentrasjon av tioler, totalt aminosyreinnhold, aminosyresammensetning, molvektsfordelinger og farge.

Kapittel 2

Materialer og Metoder

Det eksperimentelle arbeidet ble utført på råstoff og frysetørkede FPH fra kvernede ørrethoder. Hydrolysatene ble produsert av Kristine Kvangarsnes ved NTNU Ålesund. Det ble totalt laget fem parti med FPH. Disse ble delt i fire ulike parti der det første partiet ikke ble lagret mens de tre andre ble lagret i henholdsvis to, fire og seks måneder ved romtemperatur. FPH ble etter lagringsperioden overført til - 80°C fram til de ble analysert. Av de fem partiene med FPH ble fire tilsatt antioksidanter under hydrolysen mens den femte var en kontroll uten antioksidant. Antioksidantene som ble tilsatt var BHT, PG, CA og AA.

Analysene som ble utført på råstoffet og FPH er markert som "X" i Tabell 1.5-1. Grunnet Covid-19-utbruddet ble det ikke tid til å utføre analysene på de resterende prøvene. Med unntak av analyse av tørrstoff og aske, fargemålinger og formoltitrering har alle analysemetodene blitt gjentatt flere ganger grunnet store avvik i forhold til de andre resultatene eller på grunn av høye standardavvik.

Tabell 1.5-1: Oversikt over analyser utført på råstoff og FPH.

Analyse	***Råstoff***	***0 mnd***	***2 mnd***	***4 mnd***	***6 mnd***
Tørrstoff og aske	X	X	-	-	X
Vannløselig protein - Lowry	X	X	X	X	X
Syreløselige peptider - Lowry	X	X	X	X	X
Proteinoksidasjon – SH-grupper	X	X	X	X	X
%N og totalt protein - Kjeldahl	X	X	-	-	-
Total aminosyresammensetning	X	X	X	X	X
Frie aminosyrer	X	X	X	X	X
Molvektsfordeling - FPLC	X	X	-	-	X
Formoltitrering	X	-	-	X	X
Fargemålinger	-	X	X	X	X

2.1. Råmateriale

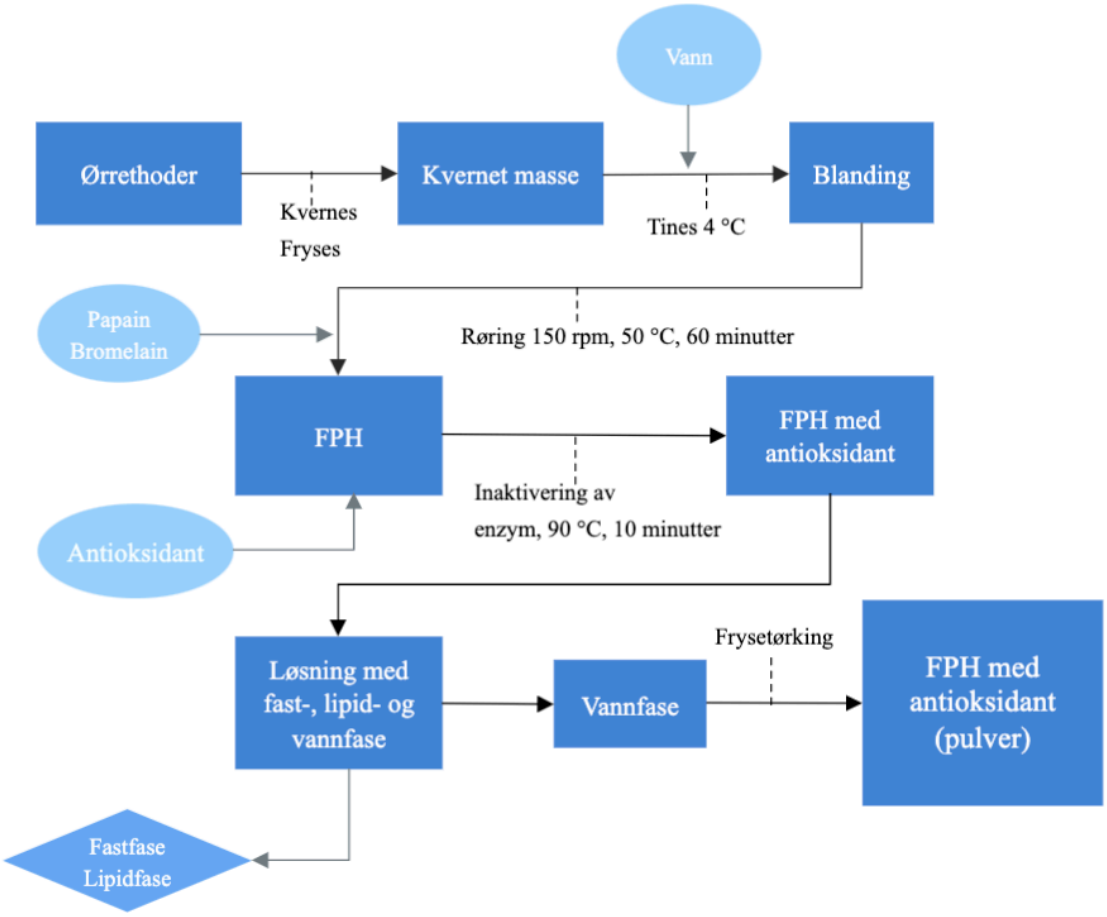
Råmaterialet bestod av hoder fra regnbueørret (*O. mykiss*) med lik kvalitet og ferskhet som ble gitt av oppdrettsanlegget Hofseth i november 2018. Råmaterialet ble først kvernet før det ble fryst i parti på 1 kg. Kverningen ble utført i en HOBART A 200N kverner (Illinois Tool Works Food Equipment Group, USA) med hullstørrelse 4,5 mm.

2.1.1. Frysetørking av råmaterialet

For analyse av total aminosyresammensetning i råmaterialet måtte råmaterialet frysetørkes. Råmaterialet (5 g) ble utveid og overført til en frysetørker (Martin Christ, Tyskland) der prøvene stod i omtrent 2 døgn.

2.2. Hydrolyse

FPH benyttet i dette forsøket ble produsert fra regnbueørrethoder levert av oppdrettsanlegget Hofseth. Hydrolysen ble utført av Kristine Kvangarsnes. Flytskjema for tillaging av FPH med antioksidant er vist i Figur 2.2-1.



Figur 2.2-1: Flytskjema for tillaging av FPH med antioksidant.

De kvernede, frosne ørrethodene ble tint over natten ved 4 °C. Råstoff ble veid inn (2 kg) og blandet med vann (2 l, 50 °C). Hydrolyseforsøket ble utført i to reaktorer med 1 kg råstoff og 1 L vann i hver. Reaktorene ble plassert i CIRCULATOR BATH HEATING ED-33 (JULABO, Tyskland) vannbad ved 52 °C og et HEIDOLPH rotorblad med tre blader rørte i blandingen ved 150 rpm (3 G?). Når temperaturen på blandingen nådde 50 °C ble alle prøvene tilsatt enzym og alle prøvene utenom kontrollprøven tilsatt antioksidant. Mengden tilsatt antioksidant er vist i Tabell 2.2-1 (200 ppm = 200 mg antioksidant/kg råstoff). Enzymene som ble tilsatt var *papain* og *bromelain* (0,1 % (w/w)) av råmaterialet (0,05 % + 0,05 %). Hydrolysereaksjonen ble utført i 60 minutter. Etter hydrolyseperioden ble blandingen tømt over en sil slik at beinrester ble fraskilt før enzymene ble inaktivert ved oppvarming (90 °C, 10 minutter) i en mikrobølgeovn. Etter nedkjøling ble blandingen fordelt i beholdere á 1 liter og sentrifugert (4100 G, 20 °C, 30 minutter) der tre faser ble dannet: lipidfase, proteinfase og grakse. Fasene ble separert ved bruk av en separasjonstrakt og proteinfasen ble oppbevart ved – 80 °C før den ble frysetørket i omtrent tre døgn. Etter frysetørking ble hydrolysatene som ikke skulle lagres fryst ned mens resten ble lagret ved romtemperatur i to, fire og seks måneder.

Tabell 2.2-1: Mengde antioksidant tilsatt råstoff (ppm). Verdien er angitt i forhold til mengde råstoff.

Prøve	***Mengde tilsatt antioksidant (ppm)***
KON	-
BHT	200
PG	1000
AA	500
CA	1000

2.3. Kjemiske analyser

De kjemiske analysene ble utført på Næringsmiddelkjemilabben ved Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap ved NTNU Gløshaugen høsten og våren 2019/20.

2.3.1. Tørrstoff- og askeinnhold

Aske refererer til de uorganiske restene som blir igjen etter forbrenning av organisk materiale i mat og representerer det totale mineralinnholdet i matvaren. Foraskingen foregår ved temperaturer mellom 500-600 °C. I dette temperaturintervallet fordamper vann og flyktige komponenter mens organiske forbindelser forbrennes i nærvær av oksygen i luft til CO_2 og nitrogenoksider [108].

Tørrstoff og askeinnhold i råstoff og FPH ble analysert i henhold til metoden beskrevet av AOAC [109]. For bestemmelse av tørrstoff ble diglene tørket i varmeskap ved 105 °C før de ble veid. Deretter ble ca. 2-4 g FPH innveid og tørket i varmeskap ved 105 °C i 22-24 timer (til konstant vekt). Etter tørking ble prøvene plassert direkte i eksikator for avkjøling til romtemperatur. Til slutt ble prøvene veid.

For bestemmelse av aske ble de samme diglene som i bestemmelse av tørrstoff satt inn i varmeskap ved 550 °C i ca. 22 timer. Etter 22 timer ble ovnen slått av. Etter 30 minutter ble døren åpnet. Etter 30 minutter ble diglene overført til eksikator. Diglene ble veid da de hadde nådd romtemperatur.

2.3.2. Vannløselige proteiner ved Lowrymetoden

For å bestemme mengden vannløselige proteiner i råmaterialet og i FPH ble proteinmengden i en utveid masse kvantifisert ved Lowrymetoden [110]. Metoden involverer reduksjon av Folin-Ciocalteu reagens og oksidasjon av aromatiske enheter (hovedsakelig tryptofan, tyrosin og cystein) som fører til et blåfarget molekyl. Absorbansen av dette blå molekylet måles spektrofotometrisk og brukes videre til å beregne proteinkonsentrasjonen [111].

Det ble laget to paralleller per prøve. FPH (0,5 g) ble løst i vann (10,0 ml) i sentrifugerør og blandet på vortex mikser før sentrifugering ved 5000 G i ti minutter. Etter sentrifugering bestod løsningen av to synlige faser; supernatant og uoppløst stoff. Førstnevnte ble benyttet til å lage fortynninger. Proteinløsningene ble fortynnet 1:400 og 1:500 fordi disse fortynningene ga resultater som befant seg godt innenfor standardkurven. Prøvene ble fortynnet direkte i reagensrør; for prøvene lagret seks måneder ble fortynningene laget i 100 ml målekolber.

Råmaterialet (20,55 g) ble løst i vann (100 ml) og homogenisert med en IKA Ultra Turrax homogenisator før sentrifugering ved 5000 G i 15 minutter. Løsningen ble dekantert gjennom glassull i en 100 ml målekolbe og volumet ble fylt opp med vann til 100 ml. Deretter ble løsningen fortynnet 1:50. Bovine Serum Albumin (BSA) (1 mg/ml) ble benyttet til å lage standardserie med konsentrasjoner fra 12,5 µg/ml til 300 µg/ml. Til slutt ble prøveløsningene analysert ved Lowrymetoden der absorbansen ble målt ved 750 nm i GENESYS 10S UV-VIS Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.3.3. Syreløselige peptider ved Lowrymetoden

Bestemmelse av syreløselige peptider ble utført som beskrevet av Hoyle & Merrit [112] kombinert med Lowrymetoden [110]. For å felle ut peptidene ble trikloreddiksyre (TCA) benyttet der utfellingsmekanismen er hydrofob aggregering som forstyrrer de løselige delene av proteinene og fører til delvis denaturering av proteinene. Peptidmolekylene går altså sammen til større aggregater for å minimere eksponeringen til de hydrofobe regionene i TCA. Dersom aggregatet vokser vil det fortrenge mer vann og øke sin tetthet slik at det dannes en utfelling [113, 114]. I bestemmelse av mengde syreløselige peptider ble peptidene felt ut med 20 % TCA for å få en sluttkonsentrasjon på 10 % TCA for å måle mengden peptider som er løselige i 10 % TCA [115]. De samme prøveløsningene som beskrevet i kapittel 2.3.2 ble benyttet. FPH-løsningene ble fortynnet 1:200 direkte i reagensrør, mens løsningen med råmaterialet ble fortynnet 1:50.

Prøveløsningene (2,0 ml) ble tilsatt TCA (20 % (vekt%), 2,0 ml) og blandet på vortex mixer. Etter 30 minutter ble prøveløsningene filtrert med S&S rundfilter 589[2] WEIßAND Ø 70 mm (Schleicher & Schüll, Tyskland) og supernatanten ble analysert ved Lowrymetoden der absorbansen ble målt ved 750 nm i GENESYS 10S UV-VIS Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.3.4. Kjeldahl

Kjeldahl er en enkel og pålitelig metode for bestemmelse av totalt nitrogen og protein i kjøttprodukter. Prøvene ble analysert ved å bruke en KJELDIGESTER K-449. Destilleringen og kolorimetrisk borsyretitrering ble utført ved å bruke KJELMASTER K-375 sammen med KJELSAMPLER K-376. KJELDIGESTER K-449 ble startet i henhold til parameterne i Tabell 2.3-1. Glycin (0,19 g) ble overført til to 300 ml prøverør. Samtidig ble prøvene klargjort ved å tilsette FPH (0,2-0,5 g) i et 300 ml prøverør. To blankprøver ble klargjort og to titantabletter og

svovelsyre (15 ml, 98 %) ble tilsatt hvert rør. SCRUBBER K-415 ble koblet til K-449 for absorbsjon av røyken fra syra som oppstod under reaksjonen. Stativet med prøvene ble satt i posisjon for avkjøling og sugemodulen ble montert til prøvene før analysen ble igangsatt i henhold til parameterne i Tabell 2.3-1. Når væsken i prøverørene var klar eller blågrønn ble prøvene avkjølt og videre destillert ifølge parameterne listet i Tabell 2.3-1.

Tabell 2.3-1: Temperaturprofil for analyse med K-449.

Trinn	***Temperatur (°C)***	***Tid (minutter)***
1	280	0
2	320	20
3	420	90
Avkjøling	-	35

Tabell 2.3-2: Destillering og titrering med KJELMASTER-systemet K-375/K-376.

Metodeparametre KJELMASTER K-375			
Volum H_2O	50 ml	**Titreringsløsning**	H_2SO_4 (0,1 M)
Volum NaOH	60 ml	**Sensortype**	Kolorimetrisk
Reaksjonstid	5 s	**Titreringsmodus**	Standard
Destillasjonsmodus	Fiksert tid	**Målemodus**	Sluttpunkt pH
Destillasjonstid	180 s	**Sluttpunkt pH**	4,65
Rørehastighet destillasjon	10	**Rørehastighet titrering**	9
Damp ut	100 %	**Startvolum titrering**	4 ml
Titreringstype	Borsyre	**Titreringsalgoritme**	Optimal
Volum mottakerløsning	70 ml		

2.3.5. Kvantifisering av SH-grupper i vannløselige proteiner

Løsning 1, 2 og 3 var hhv. natriumfosfatbuffer (buffer A), 8 M urea og DTNB. Løsning 1 ble laget ved å løse $NaH_2PO_4H_2O$ (3,1010 g) og Na_2HPO_4 (10,0316 g) i vann (800 ml). Deretter ble pH justert til 7,4 før EDTA (triplex III, 0,3089 g) ble tilsatt. Til slutt ble beholderen ble fylt med vann til 1 L. Løsningen ble lagret på kjølerom etter bruk. Løsning 2 ble laget ved å løse urea (47,9803 g) i 40 ml Buffer A under røring med oppvarming. Deretter ble pH justert til 7,4 før beholderen ble fylt med Buffer A til 100 ml. Løsningen ble lagret i romtemperatur etter

bruk. Løsning 3 ble laget ved å løse DTNB (0,1076 g) i Buffer A (50 ml) under omrøring. Deretter ble pH justert til 7,4 før løsningen ble fryst ned i rør á 5 ml.

Prøveløsningene ble laget ved å veie FPH (0,1 g) direkte i sentrifugerør før vann (10,0 ml) ble tilsatt. Videre ble prøvene sentrifugert i 10 minutter ved 5000 g. Deretter ble tre paralleller av prøveløsningene (100 µl) pipettert i EPPENDORF-rør før løsning 2 (800 µl) og løsning 3 (100 µl) ble tilsatt. Videre ble prøvene blandet på vortex i 10 sekunder før de ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter. Til slutt ble prøvene sentrifugert i EPPENDORF 5415 R sentrifuge (Eppendorf AG, Tyskland) i tre minutter ved 11 828 G ved romtemperatur før absorbansen ble målt med GENESYS 10S UV-VIS Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ved 412 nm.

2.3.6. Frie aminogrupper og hydrolysegrad ved formoltitrering

Formoltitrering er en metode som benyttes til å beregne prosentandelen frie aminogrupper og %DH i FPH med hensyn til totalt nitrogeninnhold i prøven. Metoden beskrevet nedenfor er basert på den indirekte metoden beskrevet av Taylor [116] og er basert på reaksjonen mellom formaldehyd og aminogruppen i en aminosyre ved nøytral eller basisk pH. Analyse med den indirekte metoden måler de totale aminogruppene i aminosyrer, peptider, primære og sekundære aminer og ammoniakk [116].

FPH (1,5 g) og råmateriale (5 g) ble veid direkte i 50 ml sentrifugerør før vann ble tilsatt til vekten nådde 50 g. Rørene blandet på vortex mikser til alt var løst før løsningene ble overført til begerglass. Deretter ble pH i prøveløsningene justert til 7,0 med NaOH (0,1 M). Videre ble formaldehyd (10 ml) som hadde blitt justert med NaOH til pH 8,5 tilsatt. Etter fem minutter ble løsningen titrert til pH 8,5 med NaOH (0,1 M) ved bruk av TITROLINE 7000 titrator. Titratoren ble renset tre ganger med NaOH før titreringen startet. Titratoren ble stilt inn til å tilsette NaOH (20,00 ml) før små mengder á 0,100 ml ble tilsatt til pH 8,5 da maskinen stanset automatisk. Volum NaOH brukt under titreringen ble notert.

2.3.7. Total aminosyresammensetning med HPLC

Den totale aminosyresammensetningen ble bestemt som beskrevet av Blackburn [117] med HPLC. FPH og frysetørket råmateriale (100 mg) ble veid ut i glassrør med skrukork og flat bunn. Deretter ble HCl (6 M, 2.0 ml) tilsatt og rørene ble satt i varmeskap ved 105 ºC i 22 timer. Etter hydrolyse ble prøvene avkjølt før prøveløsningene ble overført til 10 ml begerglass. Små mengder deionsiert vann ble brukt for å skylle ut restene i glassrørene. I begerglassene ble

pH justert med NaOH-pellets, NaOH (2,5 M) og HCl (0,1 M + 6 M) til pH mellom 6.5 og 7.5. Videre ble løsningen filtrert gjennom WHATMAN glass microfibre filter GF/C vha. sugefiltrering. Etter filtreringen ble prøvene overført til en 10 ml målekolbe og volumet ble fylt opp med deionsiert vann. Prøvene ble deretter fortynnet 1:500 i to omganger (1:50 og 1:10). Til slutt ble de fortynnede prøvene filtrert gjennom 0,22 µm WHATMAN filter før løsningene (0.205 ml) ble overført til HPLC-rør.

Laboratorieansvarlig Siri Stavrum utførte HPLC-analysene i DIONEX ULTIMATE 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) med RF 2000 FLUORESCENSE DETECTOR (Dionex Corporation, USA). Prøvene ble derivatisert med o-ftalaldehyd (OPA). Kolonnemateriale var WATERS NOVA-PAK C184um 9,9*150mm og metanol og natriumacetat ble brukt som eluenter. Alfa-butyric acid ble brukt som intern standard.

2.3.8. Frie aminosyrer med HPLC

For å bestemme mengden frie aminosyrer i råmaterialet og i FPH ble metoden beskrevet av Osnes og Mohr [118] benyttet. Proteinløsningene som ble beskrevet i kapittel 2.3.2 ble benyttet for både FPH og råmateriale. To paralleller med vannløselig proteinekstrakt (1 ml) ble overført til EPPENDORF-rør og sulfosalisylsyre (10 %, 0,25 ml) ble tilsatt. Deretter ble løsningene blandet på vortex og satt på kjølerom (4 °C). Etter 30 minutter ble prøvene sentrifugert i en EPPENDORF Centrifuge 5415R i 10 minutter ved 9167,6 G. Supernatanten (1 ml) ble overført til et nytt EPPENDORF-rør og metoden ble gjentatt for å kontrollere at alt proteinet hadde felt ut. Etter alt proteinet var felt ut ble supernatanten fortynnet 1:50 med dobbeldestillert vann før et lite volum ble overført til dramsglass og filtrert gjennom 0,22 µm WHATMAN filter. Til slutt ble løsningene (0.205 ml) overført til HPLC-rør. Laboratorieansvarlig Siri Stavrum utførte HPLC-analysene under samme betingelser som beskrevet i kapittel 2.3.7.

2.3.9. Molvektsfordelinger med FPLC

Molvektsfordelingen i FPH og råmateriale ble analysert med gelfiltrering ved bruk av FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). I FPLC kontrolleres strømningshastigheten til den mobile fasen av en pumpe mens den passerer gjennom den stasjonære fasen [119]. I dette forsøket var den mobile fasen natriumacetatbuffer med prøveløsning mens den stasjonære fasen var Superdex® Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Sciences AB, Uppsala, Sverige) som har separasjonsområde for peptider med molekylvekt mellom 100 og 7000 kDa. Proteinkonsentrasjonen måles som absorbans ved 280 nm [120].

Natriumacetatbuffer (0,05 M) ble laget ved å veie inn natriumacetat (4 g) og løse den i destillert vann. pH ble justert til 5 med HCl og flasken ble fylt med destillert vann til 1 L. Løsningen ble filtrert gjennom en NALGENE RAPID-FLOW 75mm Bottle top filter (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) med suging. FPH-løsningene og som ble brukt til analyse av vannløselige proteiner med Lowrymetoden ble benyttet i analysen. Disse ble tint i vannbad, blandet på vortex og overført til dramsglass. Deretter ble løsningene filtrert gjennom 0,22 µm WHATMAN-filter til EPPENDORF-rør. For råstoffet ble 5 g løst i vann (10 ml), homogenisert og sentrifugert ved 5000 rpm i 15 minutter før supernatanten ble filtrert gjennom en 0,22 µm WHATMAN-filter til EPPENDORF-rør.

FPLC-apparatet og UNICORN-programmet på datamaskinen ble startet. En strømningshastighet på 0,5 ml/min ble satt og 100 µl av hver prøve ble injisert i FPLC-maskinen ved hjelp av en injeksjonssprøyte. Løsningene ble ikke analysert i paralleller og hver runde per prøve tok omtrent 70 minutter. Prosessen var lik for alle prøvene.

2.3.10. Fargemålinger ved kolorimetri

L*a*b* er en standard fargeparameter som måles for å bestemme farge på FPH og andre matprodukt [121]. L*a*b* måles av et kolorimeter der absorbansen av bølgelengder fra lys ved en spesifikk frekvens (farge) i en prøve måles. Fargen på FPH bestemmes av flere faktorer, blant annet hydrolysetemperatur, proteinkonsentrasjon, mengde mørk muskel og mengde blod (hemoglobin i råstoffet). Under oppvarming av vev oksideres Mb og oksymyoglobin (MbO_2) til metmyoglobin (MMb), som fører til en fargeendring. [122]. L* indikerer lys der 0-50 indikerer svart farge og 51-100 indikerer hvit farge. På denne måten indikerer reduksjon i L* bruning av matprodukt under prosessering og lagring. En positiv a* indikerer rød farge, mens

en negativ a* indikerer grønn farge. Positiv b* indikerer gult mens negativ b* viser blått [123, 124].

Fargeforskjellene mellom hydrolysatene ble studert både visuelt (se **Feil! Fant ikke referansekilden.** i Vedlegg 4) og eksperimentelt med et kolorimeter. De eksperimentelle fargemålingene ble utført ved å overføre to ts FPH til et utveiingsbeger og deretter måle L*a*b* ved å bruke CHROMA METER CR-400. Målingene ble utført tre ganger per prøve.

Den totale fargeforskjellen (ΔE) mellom kontrollprøven (1) og prøvene (2) tilsatt antioksidanter ble beregnet vha. formel (2.3.) [125].

(2.3.) $$\Delta E_{2,1} = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

2.4. Statistiske analyser

De statistiske analysene ble utført i Microsoft Excel. For forsøkene der flere paralleller ble analysert (n=2; n=3) ble kommandoen STDAV.S brukt for å beregne standardavvik for gjennomsnitt. Denne kommandoen egner seg best ved beregning av standardavvik for et utvalg og ble derfor brukt fremfor kommandoen STDAV.P som brukes for en populasjon. Signifikans ble beregnet med $p < 0,05$. Korrelasjonfaktorer ble beregnet med kommandoen PEARSON.

Kapittel 3

Resultater og Diskusjon

Dette kapittelet er en utvidelse av resultat- og diskusjonskapittelet som ble presentert i prosjektoppgaven der analyser med Lowry for kvantifisering av vannløselige proteiner og syreløselige peptider, total aminosyresammensetning og fargemålinger ble undersøkt. Mange av disse resultatene ble gjentatt og er derfor ikke presentert i denne oppgaven. Noen av resultatene fra prosjektoppgaven er inkludert for å se helheten av analysene. Disse er markert med stjerne i deres tilhørende kapitler. Alle fargemålingene som ble presentert i prosjektoppgaven er presentert i kapittel 3.10. og er ikke markert.

3.1. Tørrstoff- og askeinnhold

Tørrstoff og askeinnhold i råstoff og FPH ble analysert for å få basisinformasjon om prøvene. Grunnet Covid-19 ble ikke tørrstoff- og askeinnhold i FPH lagret to og fire måneder analysert. Rådata er vist i Vedlegg A. Som vist i Tabell 3.1-1 består FPH lagret null måneder av omkring 90 % tørrstoff der den høyeste verdien ble målt for FPH tilsatt PG (92,13 %). FPH tilsatt BHT har høyest mengde aske (10,21 %) mens askemengden i de andre FPH-ene ble målt til 9 %. FPH lagret seks måneder består av opptil 95 % tørrstoff og over 9,32 % aske der FPH tilsatt BHT inneholder både mest tørrstoff (99,33 %) og mest aske (10.78 %). Begge kontrollprøvene inneholder minst mengde tørrstoff (90,14 % 0 mnd og 88,00 % 6 mnd) og var dermed prøvene som inneholdt mest vann.

En betydelig lavere mengde tørrstoff ble målt for råstoffet som består av 42,74 % tørrstoff og 5,74 % aske. Tørrstoff- og askeinnhold i råmaterialet samsvarer med Kendlers [126] funn på tilsvarende råmateriale i hennes undersøkelse av tørrstoff og askeinnhold i ørrethoder. Sathivel et al. [127] fant at råstoff fra hoder av rødlaks (*O. nerka*) inneholdt 30,4 % tørrstoff og 4 % aske. Hydrolysatene fra rødlaks produsert med ulike enzymer inneholdt 94-95 % tørrstoff og 6-7 % aske [127].

Tabell 3.1-1: Tørrstoff- og askeinnhold i råstoff, FPH lagret null og seks måneder. Standardavvik er gitt for n=2. Ulike bokstaver i samme rad og kategori (tørrstoff/aske) indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

	Tørrstoff (%)		***Aske (%)***	
	0 mnd	*6 mnd*	*0 mnd*	*6 mnd*
KON	$90,1 \pm 0,1^a$	$91,7 \pm 0,0^b$	$9,4 \pm 0,1^a$	$9,7 \pm 0,4^a$
BHT	$90,2 \pm 0,2^a$	$91,7 \pm 0,0^b$	$10,2 \pm 0,0^a$	$10,4 \pm 0,7^a$
PG	$92,1 \pm 0,0^a$	$90,8 \pm 0,1^b$	$9,1 \pm 0,3^a$	$8,5 \pm 2,1^a$
CA	$90,8 \pm 0,1^a$	$90,6 \pm 0,1^a$	$9,2 \pm 0,2^a$	$9,6 \pm 0,4^a$
AA	$90,8 \pm 0,0^a$	$91,6 \pm 0,0^b$	$10,0 \pm 0,2^a$	$9,5 \pm 0,1^b$
Råstoff	42,7 ± 0,0		5,7 ± 0,2	

3.2. Vannløselige proteiner

Mengde vannløselig protein (VLP) målt for råstoff og FPH som ikke ble lagret og FPH lagret to, fire og seks måneder er vist i Tabell 3.2-1. Analysematerialet består av to uavhengige innveiinger med tre paralleller. Verdiene i tabellen ble beregnet som gjennomsnitt av vekt% vannløselig protein og refererer til deres tørrvekt. Rådata er vist i Vedlegg B.1.

Mengden VLP i råstoffet ble målt til 2,5 vekt%, som er mye lavere enn den totale mengden proteiner målt med Kjeldahlanalyse (se kapittel 2.3.4.) og skyldes at Lowrymetoden i dette tilfellet kun måler VLP. Siden råstoffet består av 42 % vann og 5,7 % aske kan det tenkes at disse komponentene, i tillegg til noen fosfolipider, utgjør de resterende andelene av råstoffet.

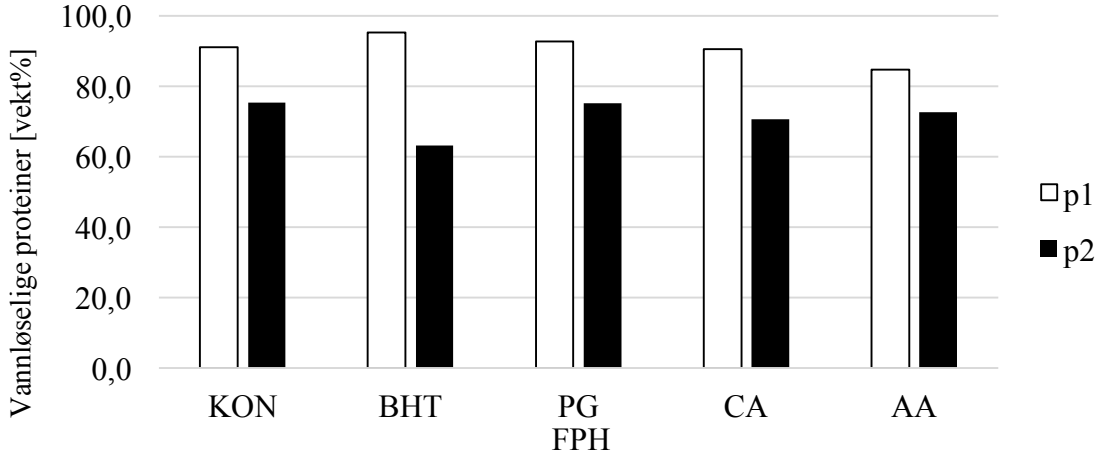
VLP i FPH ble målt til 80-90 vekt% og blir ikke betydelig redusert etter lagring i seks måneder. Dette viser at den enzymatiske hydrolysen av proteiner har ført til en strukturell endring der proteinene ble spaltet til mindre peptider. Under hydrolyse fører økt %DH til økt løselighet av proteinene i FPH. I tillegg eksponeres ioniserbare amino- og karboksylgrupper under hydrolysen som bidrar til økt hydrofilisitet [128, 129]. At VLP er høy betyr at det er mange hydrofile aminosyrer i overflaten av proteinene som bidrar til høy løselighet. Den høye mengden VLP indikerer at det er få hydrofobe aminosyrer som har blitt eksponert til overflaten av proteinene. Få hydrofobe aminosyrer kan indikere at FPH ikke er svært bitre, men dette ble imidlertid ikke målt. Høy løselighet og lite bitterhet er gunstige egenskaper for bruk som matingrediens [102]. Den svake reduksjonen i løselighet etter seks måneder kan skyldes proteinoksidasjon; ved proteinoksidasjon kan intermolekylære broer som disulfidbroer oppstå og resultere i en oksidasjonsindusert konformasjonsendring som øker hydrofobisiteten og reduserer løseligheten [59]. Hydrofobe interaksjoner er hovedfaktoren som påvirker

løseligheten av proteiner fordi disse interaksjonene promoterer protein-protein interaksjoner. som fører til redusert løselighet [130]. En reduksjon i tiolgrupper ble målt mellom FPH uten lagring og FPH lagret seks måneder som bekrefter dette (se kapittel 3.5.). Reduksjonen i mengde VLP kan tyde på at antioksidantkonsentrasjonen minker og dermed bidrar i mindre grad til å motvirke proteinoksidasjon. Dette kan ha ført til økt hydrofobisitet og dermed redusert løselighet [59]. Det var minst VLP både i FPH tilsatt AA uten lagring og FPH tilsatt AA etter lagring i seks måneder som indikerer at AA har en negativ påvirkning på løseligheten av FPH og kan skyldes at AA er en prooksidant [131].

Tabell 3.2-1: Vannløselig protein [vekt%] av tørrvekt for FPH fortynnet 1:400. Standardavvik er gitt for n=2.

	0 mnd	**2 mnd**	**4 mnd**	**6 mnd**
KON	96,7 ± 2,4	92,5 ± 6,3	93,0 ± 7,8	83,2 ± 11,1
BHT	96,7 ± 0,4	76,4 ± 6,2	88,6 ± 3,7	79,2 ± 22,8
PG	97,3 ± 3,5	89,0 ± 3,1	89,7 ± 1,9	83,9 ± 12,4
CA	92,1 ± 0,4	86,1 ± 3,1	80,8 ± 3,9	80,6 ± 14,1
AA	82,7 ± 2,3	78,2 ± 10,4	76,5 ± 3,9	78,7 ± 8,5
Råstoff	2,5 ± 0,1			

Standardavvikene for alle målingene befinner seg stort sett innenfor 1-4 % med unntak av standardavvikene for hydrolysatene lagret seks måneder. Dette skyldes at selv etter gjentatte forsøk lå parallell 1 rundt 90 vekt% mens parallell 2 lå rundt 70 vekt% som vist i Figur 3.2-1. De store forskjellene i parallellene fra samme prøve kan indikere at FPH-ene har blitt mer inhomogene under lagring, selv om klumpene i pulverne ble unngått under innveiing.



Figur 3.2-1: Forskjellene i vannløselige proteiner [vekt%] i FPH lagret seks måneder målt for parallell 1 og 2 (p1 og p2).

Gjermstad [132] fant at mengden VLP i tilsvarende FPH produsert fra laksehoder varierte mellom 60-70 vekt% for prøver fortynnet 1:200 og 50-60 vekt% for prøver fortynnet 1:100. Analysene på FPH fra laksehoder Gjermstad utførte er de samme som ble uført i denne oppgaven og hans resultater er ellers svært like resultatene i denne oppgaven. Siden disse prøveløsningene ble fortynnet 1:400 kan det tenkes at fortynningene kan ha hatt noe å si for hvordan andre stoffer interfererer med Lowry slik at dette har påvirket avlesningene. Det kan dermed tenkes at proteinløsningene fra ørret ble fortynnet for mye og at mengden VLP i FPH fra ørret hadde vært lavere dersom disse også ble fortynnet 1:100 eller 1:200. Dette bør undersøkes i videre arbeid. Kendler [126] fant at mengden VLP i FPH produsert fra råstoff fra regnbueørret tilsatt BHT var omtrent 86 ± 5,4 vekt% som er noe lavere enn i denne undersøkelsen.

3.3. Syreløselige peptider

Syreløselige peptider i råstoff (fortynnet 1:50) og i FPH lagret fra null til seks måneder (fortynnet 1:200) er presentert i Tabell 3.3-1. Resultatene er angitt som vekt% av tørrvekt. Rådata for beregning av syreløselige peptider er vist i Vedlegg B.2. Verdiene i tabellen ble beregnet som gjennomsnitt av to paralleller for FPH der standardavvik er gitt for n=2. Verdiene som også ble presentert i prosjektoppgaven [133]er merket med stjerne. Etter gjentatte forsøk ble forskjellene mellom de to parallellene urimelig høye og dermed ble kun én parallell benyttet til å beregne gjennomsnittet. Disse er markert i blått og standardavvik er gitt for n=3. Gjennomsnittsverdiene for syreløselige peptider varierer for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret to, fire og seks måneder. Mengden syreløselige peptider viser at peptidbindingene hadde blitt spaltet under hydrolyseprosessen slik at proteinene ble delt opp i mindre peptider [128]. Mengde syreløselige peptider øker og minker i hele lagringsperioden og ligger jevnt mellom 30 til 40 vekt%. At mengden øker og minker under lagring kan antyde at FPH er inhomogene. Tidligere studier viser at mengden syreløselige peptider er omkring 27-33 % i FPH fra laksehoder (*Salmo salar*) [132] som er lik mengden i FPH fra ørrethoder med og uten BHT som ble funnet til å være 28 % [126]. Disse resultatene er noe lavere enn for FPH og råstoff undersøkt i denne oppgaven og kan tyde på at hydrolysatene i denne undersøkelsen har blitt brutt ned på en annen måte.

Tabell 3.3-1: Mengde syreløselige peptider i vekt% våtvekt for FPH og råstoff fortynnet. Standardavvik er gitt for n=2 (svart) og n=3 (blå). Verdier som også ble presentert i prosjektoppgaven med samme tittel [133] er markert med stjerne.

	0 mnd	**2 mnd**	**4 mnd**	**6 mnd**
KON	34,0 ± 0,6	43,9 ± 0,2	37,6 ± 3,3*	41,9 ± 0,5
BHT	31,7 ± 2,8*	33,7 ± 1,9	36,5 ± 2,0	27,7 ± 0,5
PG	34,5 ± 3,4*	46,3 ± 2,9	33,6 ± 0,1*	30,0 ± 0,1
CA	33,5 ± 2,8*	33,9 ± 1,9	34,5 ± 0,6*	32,5 ± 0,2
AA	30,0 ± 2,2*	32,4 ± 0,9	32,4 ± 0,9*	41,3 ± 2,7
Råstoff	0,3 ± 0,0			

3.4. Totalt protein- og nitrogeninnhold

Resultatene ble beregnet som % nitrogen (%N). Rådata og beregning av totalt protein- og nitrogeninnhold er vist i Vedlegg C. Resultatene fra Kjeldahlanalyse er presentert i Tabell 3.4-1. %N ble målt til omtrent 13 % for alle FPH der det var mest %N i FPH tilsatt PG. Totalt proteininnhold ble beregnet til å være 83 % i FPH og 14 % i råstoffet. Disse verdiene av proteininnhold er høyere enn proteinmengden målt med Lowrymetoden fordi den totale proteinmengden kontra VLP ble målt. At %N og total protein var lavere i råstoffet enn i FPH skyldes hydrolyseprosessen.

Safari et al. [134] hevder at totalt nitrogeninnhold var omtrent 11-12 % i tunfiskhoder (*Thunnus acbacares*), som er noe lavere enn i denne studien. I FPH fra ørrethoder og i ørrethoder har total nitrogen og totalt proteininnhold blitt funnet til å være henholdsvis 13 % og 2,3 % [126], som samsvarer med resultatene i denne oppgaven.

Tabell 3.4-1: Nitrogen og Total Protein [vekt%] i FPH som ikke ble lagret. Standardavvik er gitt for n=2.

	Nitrogen (vekt%)	***Total Protein (vekt%)***
KON	13,17 ± 0,02	82,30 ± 0,15
BHT	13,31 ± 0,00	83,21 ± 0,03
PG	13,64 ± 0,01	85,25 ± 0,09
CA	13,34 ± 0,01	83,39 ± 0,04
AA	13,13 ± 0,02	82,03 ± 0,15
Råstoff	2,31 ± 0,10	14,47 ± 0,63

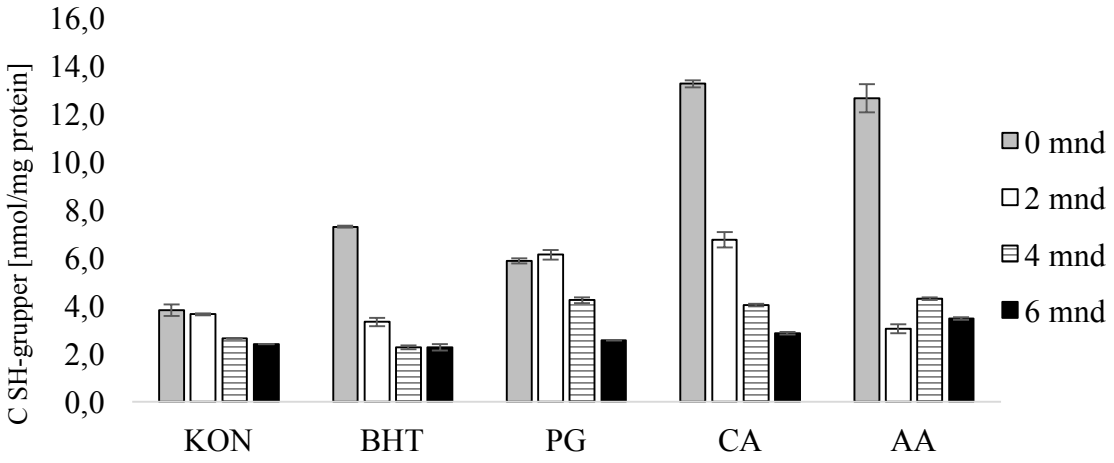
3.5. SH-grupper i vannløselige proteiner

Som tidligere nevnt benyttes DTNB til å kvantifisere tioler der en reduksjon i tiolkonsentrasjon er et mål på oksidasjon som følge av oksidativt stress. Tiolene reagerer med DTNB slik at disulfid og TNB dannes. Siden støkiometrien av tiol:TNB dannet er 1:1 kan dannelse av TNB brukes til å si noe om mengde tioler tilstede i råstoff og i FPH. Siden løsningene ikke bestod av 100 % protein ble konsentrasjonen av vannløselige proteiner fra Lowry benyttet i utregningen. Rådata for beregning av konsentrasjonen av tioler er vist i Vedlegg D. Konsentrasjon av tioler i vannløselige proteiner i råstoff og i FPH er vist i Tabell 3.5-1 og Figur 3.5-1.

Det er store forskjeller i tiolkonsentrasjonen mellom KON og prøvene med antioksidant for prøvene som ikke ble lagret. For KON var tiolkonsentrasjonen 3,8 nmol/mg protein mens for FPH med antioksidant varierte konsentrasjonen mellom 5,8 til 13,2 nmol/mg protein. Dette kan skyldes at KON har blitt oksidert allerede i løpet av hydrolyse- og tørkeprosessen og at antioksidantene har motvirket dette i de andre prøvene. Tiolkonsentrasjonen i råstoffet er mye høyere enn i FPH uten lagring og ble beregnet til 53,8 nmol/mg protein. Under lagringsperioden minker konsentrasjonen av tioler for alle hydrolysatene, som tyder på at tiolene har oksidert til SS-grupper. Metionin, som har en tiolgruppe, er en essensiell aminosyre og oksidasjon av den vil redusere næringsverdien av FPH. Etter seks måneder er SH-konsentrasjonen relativt lik for alle prøvene og varierer mellom 2,3 (FPH tilsatt BHT) og 3,5 nmol/mg protein (FPH tilsatt AA). Siden konsentrasjonen av tioler er relativt lik etter lagring i seks måneder tyder det på at antioksidantene er brukt opp og det kan dermed sies at mengden tilsatt antioksidant ikke var høy nok til å motvirke proteinoksidasjon under lagring i seks måneder.

Tabell 3.5-1: Mengde tioler i vannløselig protein [nmol/mg protein] i råstoff og FPH lagret fra null til seks måneder. Standardavvik er gitt for n=3. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

	0 mnd	***2 mnd***	***4 mnd***	***6 mnd***
KON	$3{,}8 \pm 0{,}2^{a}$	$3{,}6 \pm 0{,}0^{a}$	$2{,}6 \pm 0{,}0^{b}$	$2{,}4 \pm 0{,}0^{c}$
BHT	$5{,}0 \pm 0{,}2^{a}$	$3{,}3 \pm 0{,}2^{b}$	$2{,}3 \pm 0{,}1^{c}$	$2{,}3 \pm 0{,}1^{c}$
PG	$5{,}8 \pm 0{,}1^{a}$	$6{,}1 \pm 0{,}2^{a}$	$4{,}2 \pm 0{,}1^{b}$	$2{,}6 \pm 0{,}0^{c}$
CA	$9{,}6 \pm 0{,}7^{a}$	$6{,}7 \pm 0{,}3^{b}$	$4{,}0 \pm 0{,}1^{c}$	$2{,}8 \pm 0{,}1^{d}$
AA	$5{,}6 \pm 1{,}0^{a}$	$3{,}0 \pm 0{,}2^{a}$	$4{,}3 \pm 0{,}1^{b}$	$3{,}5 \pm 0{,}1^{c}$
Råstoff	$53{,}8 \pm 0{,}9$			



Figur 3.5-1: Konsentrasjon av tioler [nmol/mg protein] i FPH. Standardavvik er vist som feilbarer.

3.6. Frie aminogrupper og hydrolysegrad

Beregninger og rådata for frie aminogrupper og %DH er vist i vedlegg E. Det ble antatt at %N ikke endret seg under lagringsperioden slik at %N fra Kjeldahlanalyse ble benyttet ved beregning av %DH for råstoff og FPH. Grunnet Covid-19-utbruddet ble det ikke rukket å formoltitrere FPH som ikke ble lagret og FPH lagret to måneder. Resultatene for de frie aminogruppene og %DH er vist i Tabell 3.6-1. Både mengden frie aminogrupper og %DH er lavere for råstoffet enn for hydrolysatene som skyldes at antall peptidbindinger ble redusert i hydrolyseprosessen. I tabellen kan det også ses at mengden frie aminogrupper er svært like i alle FPH lagret fire måneder og varierer fra 2,03 til 2,09 vekt%. Det samme gjelder for FPH lagret seks måneder som er noe høyere og varierer fra 2,11 til 2,28 vekt%. %DH er dermed også svært lik for prøvene og varierer fra 14,99 til 15,84 vekt% for FPH lagret fire måneder og fra 15,86 til 17,11 vekt% for FPH lagret seks måneder. Mengden frie aminogrupper og %DH øker noe under lagring, som kan indikere at det har oppstått kjedebrudd på grunn av proteinoksidasjon [50]. Resultatene som har blitt diskutert hittil har antydet at antioksidantene her blitt brukt opp og det kan tenkes at dette har bidratt til de signifikante forskjellene mellom FPH lagret fra fire til seks måneder, med unntak av FPH tilsatt BHT. Høy løselighet for FPH med %DH rundt 15 % har blitt rapportert for FPH fra torsk (*Gadhus morhua*) [135], laks [136] og *Aristichthys noblis [137].* Høy %DH i FPH er uønsket fordi det kan gi bitter smak grunnet eksponeringen av hydrofobe aminosyrer og har blitt rapportert å redusere emulgeringsevnen til FPH [11].

Tabell 3.6-1: Frie aminogrupper og %DH (vekt%) bestemt med formoltitrering. Standardavvik gitt for frie aminogrupper og %DH; (n=2 FPH; n=3 råmateriale). Ulike bokstaver i samme rad og kategori (frie aminogrupper/%DH) indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

	Frie aminogrupper (vekt%)		***%DH***	
	4 mnd	*6 mnd*	*4 mnd*	*6 mnd*
KON	$2{,}05 \pm 0{,}00^{a}$	$2{,}17 \pm 0{,}01^{b}$	$15{,}58 \pm 0{,}02^{a}$	$16{,}47 \pm 0{,}05^{b}$
BHT	$2{,}09 \pm 0{,}01^{a}$	$2{,}11 \pm 0{,}03^{a}$	$15{,}68 \pm 0{,}05^{a}$	$15{,}86 \pm 0{,}21^{b}$
PG	$2{,}05 \pm 0{,}01^{a}$	$2{,}22 \pm 0{,}02^{b}$	$14{,}99 \pm 0{,}07^{a}$	$16{,}28 \pm 0{,}12^{a}$
CA	$2{,}11 \pm 0{,}01^{a}$	$2{,}28 \pm 0{,}00^{b}$	$15{,}84 \pm 0{,}07^{a}$	$17{,}11 \pm 0{,}01^{b}$
AA	$2{,}03 \pm 0{,}01^{a}$	$2{,}12 \pm 0{,}01^{b}$	$15{,}50 \pm 0{,}11^{a}$	$16{,}16 \pm 0{,}04^{b}$
Råstoff	$0{,}11 \pm 0{,}01$		$4{,}63 \pm 0{,}32$	

3.7. Aminosyreprofiler

3.7.1. Totalt aminosyreinnhold

Det totale aminosyreinnholdet (TAI) i råstoff og FPH er vist i Tabell 3.7-1. Rådata for beregning av TAI er vist i Vedlegg F. Resultatene i tabellen refererer til mg/g FPH tørrvekt og ble beregnet som et gjennomsnitt av summen av de individuelle aminosyrene i tre paralleller. Ved store forskjeller ble én parallell fjernet og noen standardavvik er dermed gitt for n=2. Rådata er vist i Vedlegg 2.

Tabell 3.7-1 viser at TAI for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret to, fire og seks måneder ligger mellom 320 og 440 mg/g FPH som er en stor forskjell i forhold til råstoffet som ble målt til 211,9 mg/g råstoff. Dette skyldes at råstoffet blant annet består av andre komponenter som fett, beinrester og kollagen. De høyeste mengdene fra null til seks måneders lagringstid ble målt for FPH tilsatt PG som ikke ble lagret, FPH tilsatt BHT lagret to måneder, FPH tilsatt PG lagret fire måneder og FPH tilsatt BHT lagret seks måneder, noe som viser at TAI varierer mye fra måned til måned. TAI i FPH både øker og minker under lagringsperioden med unntak av FPH tilsatt CA som hadde en jevn økning under lagring i seks måneder fra 321,6 til 389,9 mg/g FPH etter seks måneder.

Standardavvikene er også relativt høye for flere av prøvene. De høye standardavvikene skyldes at det ble målt store forskjeller mellom enkelte aminosyrer i de tre parallellene, noe som indikerer at FPH ikke er homogene. Det ble ikke målt signifikante endringer i TAI under lagringsperioden noe som tyder på at antioksidantene hadde en positiv effekt på å bevare aminosyreinnholdet i FPH.

Tabell 3.7-1: Summen av TAI angitt i mg/g FPH og mg/g råstoff. Standardavvik er gitt for n=2 (blå) og n=3 (svart). Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

TAI i mg/g prøve

	0 mnd	*2 mnd*	*4 mnd*	*6 mnd*
KON	390,3 ± 12,8^{a}	353,7 ± 23,5^{a}	367,7 ± 21,4^{a}	392,6 ± 6,4^{a}
BHT	397,8 ± 47,0^{a}	392,4 ± 35,4^{a}	385,2 ± 25,6^{a}	454,9 ± 25,9^{a}
PG	443,3 ± 45,0^{a}	344,9 ± 40,9^{a}	405,9 ± 26,2^{a}	425,2 ± 28,5^{a}
CA	321,6 ± 49,7^{a}	343,9 ± 30,6^{a}	375,1 ± 19,2^{a}	389,9 ± 42,0^{a}
AA	377,1 ± 4,1^{a}	330,2 ± 12,6^{a,b}	353,3 ± 49,2^{a}	422,6 ± 26,9^{a}
Råstoff	211,9 ± 7,4			

TAI er et mål for proteininnhold. Mengden protein i FPH som ikke ble lagret er listet følgende fra høyest til lavest: FPH tilsatt PG (> 85 %), FPH tilsatt CA og FPH tilsatt BHT (> 83 %), KON og FPH tilsatt AA (>82 %) og råstoff (>14 %). Sammenlikning av totalt protein i prøvene med TAI vist i Tabell 3.7-1 viser at FPH tilsatt CA og FPH tilsatt BHT som inneholder en like stor andel protein også inneholder relativt lik mengde aminosyrer; FPH tilsatt BHT inneholder 397,8 ± 47,0 mg/g aminosyrer mens FPH tilsatt CA inneholder 321,6 ± 49,7 mg/g aminosyrer. Det samme gjelder KON og FPH tilsatt AA som inneholder 82 % protein og henholdsvis 390,3 ±12,8 mg/g og 377,1 ± 4,1 mg/g. For råstoffet med en protein% på omtrent 14 var TAI 211,9 ± 7,4 mg/g. Den høyeste proteinmengden på > 85 % og høyeste TAI ble målt til 443,3 ± 45,0 mg/g for FPH tilsatt PG. Dette kan indikere at totalt proteininnhold og totalt aminosyreinnhold korrelerer og blir nærmere diskutert i kapittel 3.11.

3.7.2. Total aminosyresammensetning

Aminosyreprofiler har en sammenheng med FPHenes struktur, funksjonalitet og næringsverdi [138]. Rådata for beregninger av total aminosyresammensetning (TAS) er vist i Vedlegg F. TAS for råstoffet er presentert i Tabell 3.7-2. Aminosyren med lavest innhold var Ile (< 2 %) mens det var høyest innhold av Glu (> 13 %) og Gln (> 15%). Sammenliknet med aminosyreprofilen funnet i ørrethoder undersøkt av Li et. al [7] er aminosyreinnholdet stort sett høyere for råstoffet undersøkt i dette forsøket med unntak av Asp, Met, Val, Phe, Ile og Leu. Disse forskjellene i aminosyreinnhold kan skyldes ulikheter i ørretråstoffene. I motsetning til Li et al. [7] ble det ikke funnet cystein i råstoffet. Li et al. [7] beskriver ikke hvordan aminosyreanalysene ble utført, men mangelen på cystein i råstoffet skyldes trolig at aminosyren ble ødelagt under hydrolysen med HCl [139]. Asn og Gln omdannes til Asp og Glu under

syrehydrolyse [17]. Det er derfor merkelig at det er høye verdier av både Gln og Glu og svært lave verdier av Asp og Asn i råstoffet sammenliknet med både resultatene til Li et al. og mengdene målt i FPH (dette beskrives senere i rapporten). Siden råstoffet har et høyere lipidinnhold enn hydrolysatene kan den lave mengden Asn og Asp skyldes at Asn har blitt dekarboksylert av lipidoksidasjonsprodukter [140, 141]. Det var høyest innhold av aminosyrene Gln (> 15 %), Glu (> 13,7 %), Ala (10,7 %) og Lys (10,6 %), som også har blitt rapportert å utgjøre store andeler av aminosyreprofilen i hoder fra rødlaks [127], hoder fra atlantisk laks [142], hoder fra regnbueørret og tunfisk (*Katsuwonus pelamis*) [7].

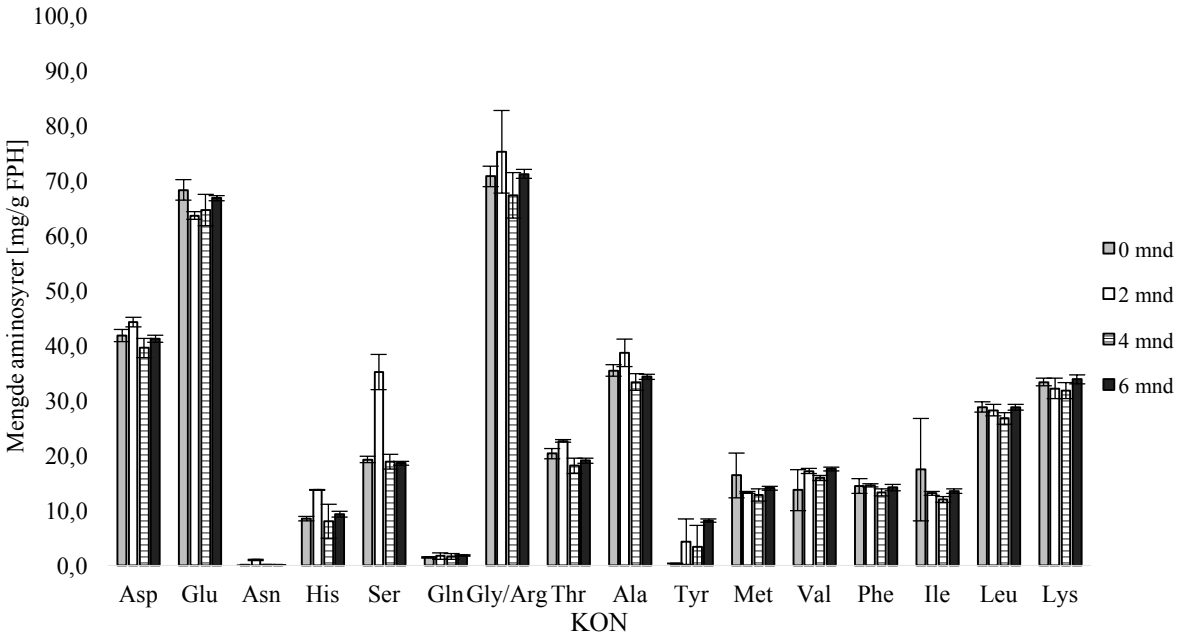
Tabell 3.7-2: Aminosyreprofil gitt som vekt% av TAI for råstoff sammenliknet med aminosyreprofilen for ørrethoder undersøkt av Li et. al [7]. Standardavvik gitt for n=3.

Aminosyrer	***% av TAI i råstoff fra ørrethoder***	***% av TAI i ørrethoder [7]***
Asp	2,4 ± 0,1	10,3 ± 0,8
Glu	13,7 ± 0,4	15,6 ± 0,8
Asn	0,1 ± 0,0	-
His	8,4 ± 0,5	7,3 ± 0,2
Ser	4,7 ± 0,4	3,3 ± 0,1
Gln	15,6 ± 0,5	-
Gly/Arg	9,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2/6,2 ± 0,3
Thr	6,3 ± 0,5	3,8 ± 0,1
Ala	10,7 ± 0,3	6,0 ± 0,4
Phe/Tyr	3,1 ± 0,1/3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,4/2,4 ± 0,1
Met	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1
Val	3,9 ± 0,1	6,2 ± 0,3
Ile	1,8 ± 0,0	5,6 ± 0,3
Leu	3,6 ± 0,1	8,4 ± 0,4
Lys	10,6 ± 0,3	10,2 ± 0,7

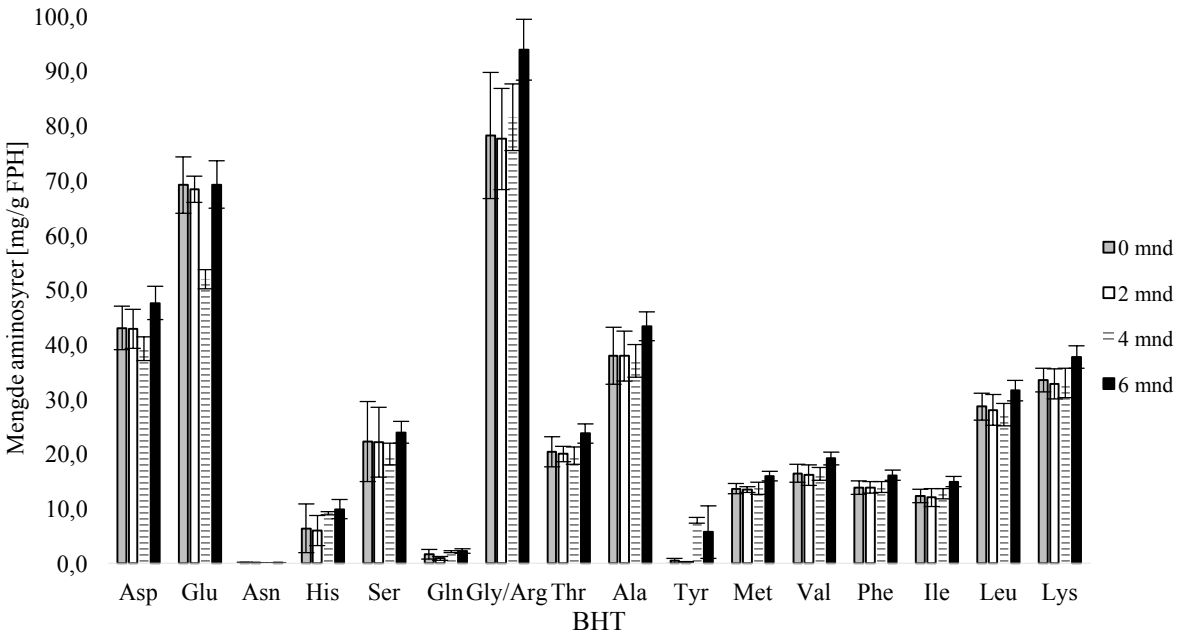
TAS for FPH lagret fra null til seks måneder er vist i Figur 3.7-1, Figur 3.7-2, Figur 3.7-3, Figur 3.7-4 og Figur 3.7-5. De høyeste verdiene ble målt for Gly/Arg, Glu, Asp, Ala, Lys og Leu i alle lagringsperiodene. Årsaken til de høye mengdene Gly er at denne aminosyren utgjør 33 % av kollagen som det fins mye av i blant annet skinn og ben [143]. De høye verdiene av Glu og Asp skyldes at verdiene for disse viser summen av Glu/Gln og Asp/Asn. Det ble målt lavest mengde av aminosyrene Asn, Gln, Tyr, Met og His i FPHene. Den lave mengden Asn og Gln skyldes at disse omdannes til Asp og Glu under syrehydrolyse [17]. Analysen ga ikke

resultat for den essensielle aminosyren tryptofan eller cystein siden disse aminosyrene ødelegges i hydrolyse med syre [17, 139] .

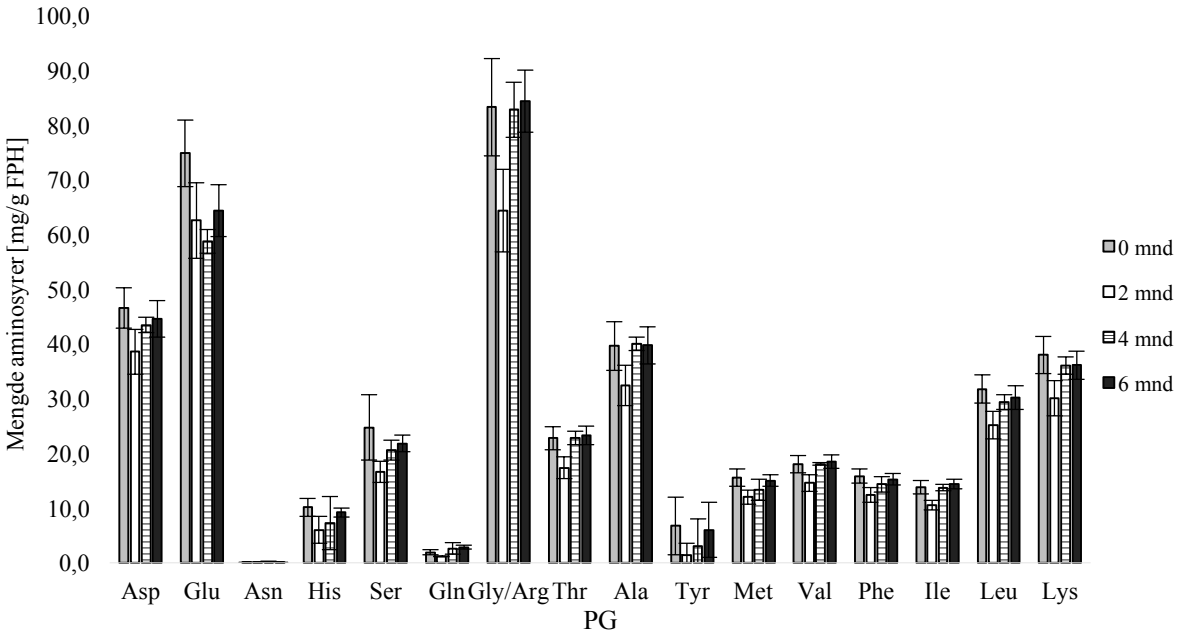
For hydrolysatene som ikke ble lagret øker mengden aminosyrer fra null til seks måneder for FPH tilsatt BHT, FPH tilsatt CA og FPH tilsatt AA mens den er lik for KON og FPH tilsatt PG etter lagring i seks måneder. Under lagring fra null måneder til to og fire måneder både øker og minker mengden aminosyrer. Reduksjonen i mengde aminosyrer kan skyldes at lipidoksidasjonsprodukt har reagert med proteiner og ført til dannelse av kryssbindinger og/eller kjemisk modifikasjon av sidekjedene i proteinene [144]. Siden standardavvikene er relativt høye og overlapper med hverandre for samme aminosyre kan det ikke påstås at mengden aminosyrer har endret seg mye under lagring.



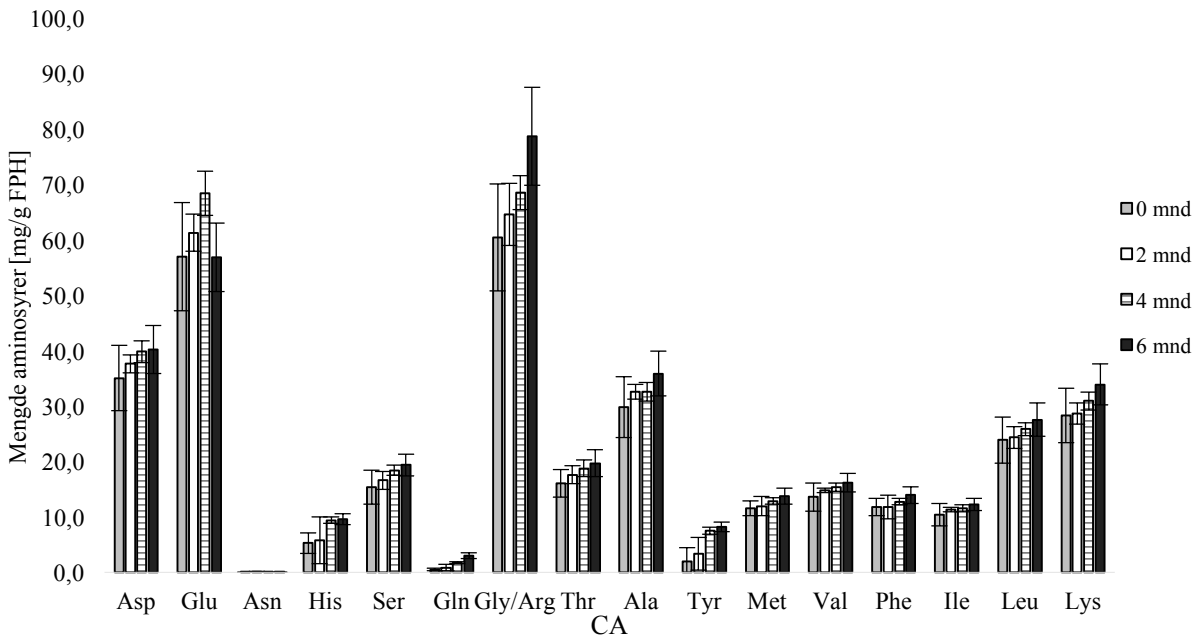
Figur 3.7-1: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for KON under lagringsperioden.



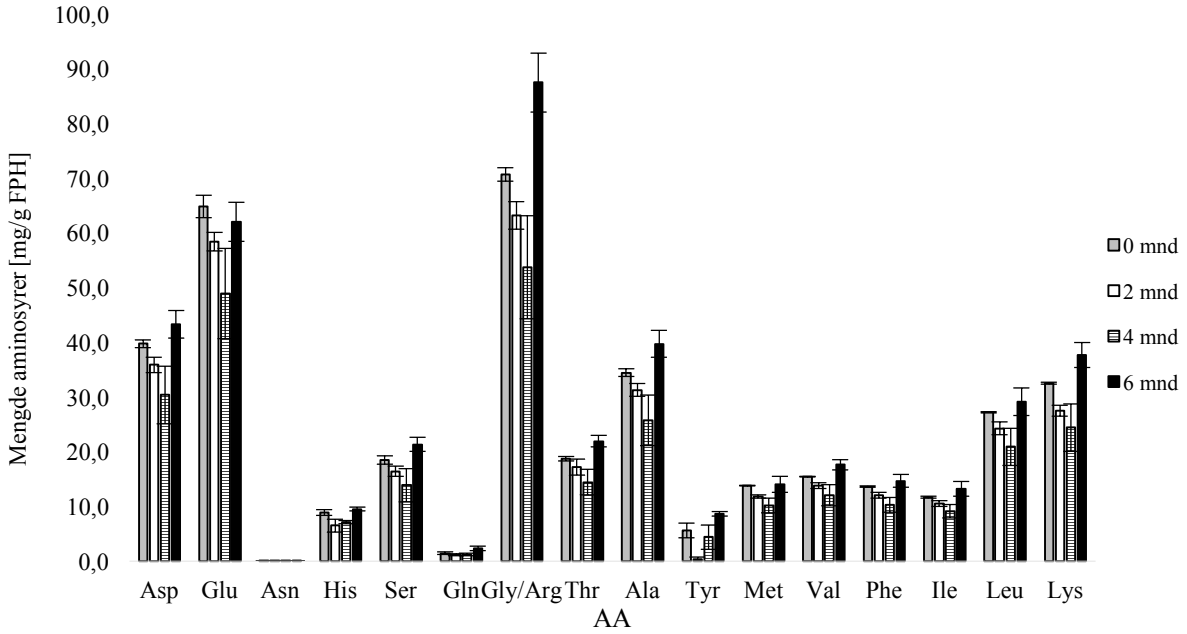
Figur 3.7-2: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt BHT under lagringsperioden.



Figur 3.7-3: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt PG under lagringsperioden.



Figur 3.7-4: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt CA under lagringsperioden.



Figur 3.7-5: Total aminosyresammensetning angitt i mg/g FPH for FPH tilsatt AA under lagringsperioden.

Liknende resultater ble funnet både i Kendlers studie av FPH fra regnbueørret [126] og Gjermstads undersøkelse av effekten av antioksidanter tilsatt FPH produsert fra laks [132] . Begge fant at FPH hovedsakelig bestod av aminosyrene Gly/Arg, Glu, Ala, Asp, Lys og Leu og at det var minst av Asn, Gln og Tyr. Likhetene mellom Kendlers resultater og disse resultatene var forventet siden FPH ble produsert fra samme råstoff og ved samme hydrolysebetingelser. Likhetene mellom Gjermstads resultater og disse resultatene viser at det

er små forskjeller i aminosyresammensetning i hoder fra laks og ørret, som samsvarer med resultatene til Wilson & Cowey [145] i deres sammenlikning av TAS i ørret og laks.

En oversikt over fraksjonene av essensielle aminosyrer (EAS) (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr og Val) er angitt i prosent av TAI i FPH og råstoff og er vist i Tabell 3.7-3. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom ∑EAS under lagringsperioden. Det anbefalte dagsbehovet for essensielle aminosyrer for en normalvektig person foreslått av World Health Organization (WHO) varierer mellom 262,5 og 1050 mg avhengig av type aminosyre [146]. For FPH som ikke ble lagret varierer mengden EAS fra 30,6 til 32,6 % der det ble målt mest i FPH tilsatt AA og minst i KON. EAS øker gjennom hele lagringsperioden og etter lagring i seks måneder varierer mengden EAS fra 37,2 til 38,3 %. Disse mengdene tilsvarer mellom 150 til 169 mg/g FPH oppfyller det anbefalte dagsbehovet av EAS for en normalvektig person dersom det inntas mer enn ett gram FPH. Selv om økningen i EAS i FPH ikke er signifikant er mengden tilstede gunstig for bruk av FPH som matprodukt og øker næringsverdien av hydrolysatene. Det totale innholdet av EAS i råstoffet er 40 %. Tilsvarende verdier ble funnet for ørret- (41 %) og tunfiskhoder (40 %) [7], biprodukt fra atlantisk laks (38 %) [142] og hoder fra rødlaks [127]. Et høyt innhold av EAS er gunstig fordi de små proteinene og peptidene i FPH absorberes enklere enn større proteinmolekyl og øker tilgjengeligheten av aminosyrer i plasma sammenliknet med deres opprinnelige proteinform i råstoffet. Et høyere innhold av EAS i FPH sammenliknet med råstoffet beviser at hydrolyse kan ha en positiv effekt på å forbedre aminosyreinnholdet i FPH.

Forholdet mellom EAS og NEAS (ikke-EAS) sier noe om mengden EAS i forhold til aromatiske aminosyrer (AAS) og hydrofobe aminosyrer (HAS) og er en parameter som har blitt undersøkt i forhold til optimalisering av dietter til mennesker og dyr [147, 148]. Under hele lagringsperioden er forholdet mellom disse omkring 0,97 i FPH og 0,90 for råstoffet. Disse verdiene er mye høyere enn forholdstall funnet for regnbueørret (0,75), havbrasme (*Pargus major*) (0,77) og makrell (*Scomber japonicus*) (0,77) [149]. På grunn av de høye standardavvikene kan man ikke si at disse forholdstallene er høyere enn forholdstallene i disse undersøkelsene.

Prosentandeler av HAS er vist i Vedlegg F.2. Mengden HAS øker også under lagringsperioden som indikerer at hydrofile aminosyrer ødelegges under hydrolyse som kan bidra til bitter smak på FPH. På den annen side har det blitt rapportert at tilstedeværelse av HAS som His, Pro, Met, Cys, Tyr, Trp og Phe kan forbedre antioksidantaktiviteten til peptidene tilstede i FPH [150].

Kendler [126] undersøkte også fraksjonene av EAS og HAS i oksidert råstoff fra ørret og FPH produsert fra oksidert råstoff fra ørret tilsatt BHT. Kendler fant at mengden HAS var 36 %, mengden AAS var 11 % og mengden EAS 40 % i oksidert restråstoff og at HAS, AAS og EAS var hhv. 33 %, 6 % og 36 % i FPH. Dette samsvarer med resultatene i denne rapporten.

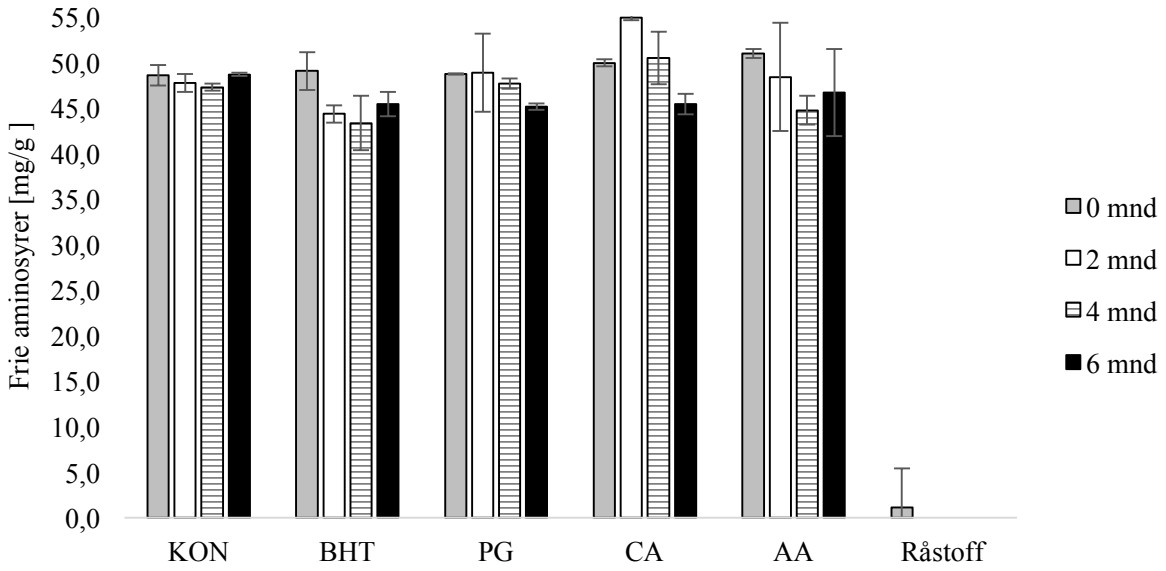
Tabell 3.7-3: Summen av EAS gitt som prosent og forholdet mellom EAS og NEAS i FPH som ikke ble lagret og FPH lagret.

	∑EAS (%)				***EAS/NEAS[1]***			
	0 mnd	**2 mnd**	**4 mnd**	**6 mnd**	**0 mnd**	**2 mnd**	**4 mnd**	**6 mnd**
KON	30,6 ± 9,9	43,8 ± 6,8	37,7 ± 6,5	38,3 ± 1,9	0,99 ± 0,55	0,96 ± 0,38	0,98 ± 0,59	0,93 ± 0,10
BHT	31,5 ± 12,8	36,3 ± 9,9	37,8 ± 7,3	37,2 ± 6,2	1,06 ± 0,99	1,00 ± 0,62	0,91 ± 0,32	0,95 ± 0,50
PG	32,3 ± 10,7	37,1 ± 12,7	38,1 ± 7,5	38,0 ± 7,2	0,99 ± 0,77	1,00 ± 0,76	0,99 ± 0,82	0,96 ± 0,54
CA	32,5 ± 16,6	36,8 ± 10,1	36,8 ± 5,5	37,8 ± 11,5	1,04 ± 1,06	0,96 ± 0,82	0,93 ± 0,26	0,92 ± 0,51
AA	32,7 ± 1,2	37,4 ± 4,4	30,7 ± 15,2	37,4 ± 6,9	0,99 ± 0,16	1,01 ± 0,27	0,95 ± 0,89	0,93 ± 0,32
Råstoff	39,9 ± 4,0				0,90 ± 0,17			

[1] NEAS betyr ikke-EAS.

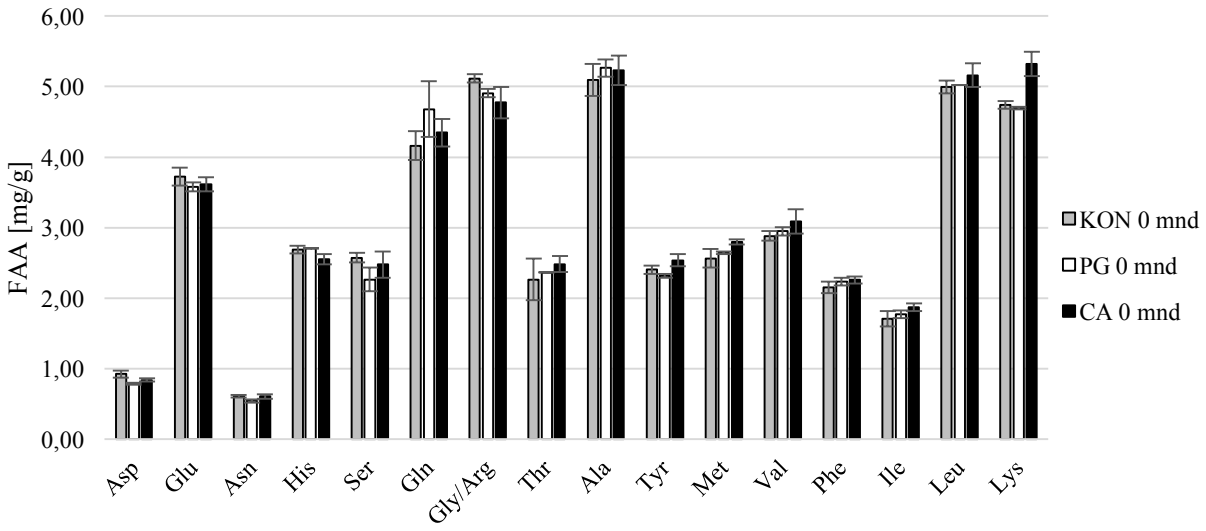
3.8. Frie aminosyrer

Under hydrolyse brytes proteiner og aminosyrer ned til frie aminosyrer og det forventes dermed at mengden frie aminosyrer avhenger av %DH. Endringer i størrelse, mengde og sammensetning av frie aminosyrer og små peptider påvirker den antioksidative aktiviteten i FPH [151]. Rådata for beregninger av frie aminosyrer er vist i Vedlegg G. Det totale innholdet av frie aminosyrer (FAA) i FPH lagret fra null til seks måneder og i råstoffet er presentert i Figur 3.8-1. At det er mer FAA i hydrolysatene enn i råstoffet skyldes at peptidbindingene ble spaltet under hydrolysen og dermed frigjort aminosyrer. Mengden FAA i FPH som ikke ble lagret varierte lite i de ulike hydrolysatene og den høyeste og laveste mengden ble målt til henholdsvis 51,0 mg/g (AA) og 48,6 mg/g (KON). FAA varierte for FPH lagret to og fire måneder. Etter lagring i seks måneder var FAA lavere enn i FPH som ikke ble lagret og varierte mellom 45,2 mg/g og 48,7 mg/g. Reduksjonen i FAA kan skyldes at radikale oksidasjonsprodukter har reagert med FAA og dannet proteinaggregater gjennom kryssbindinger, noe som har en negativ effekt på næringsverdien av aminosyrene [152]. Det ble målt signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom FAA i FPH tilsatt PG og FPH tilsatt CA etter lagring i seks måneder som betyr at PG og CA var antioksidantene som var dårligst til å ivareta mengden FAA under lagring.

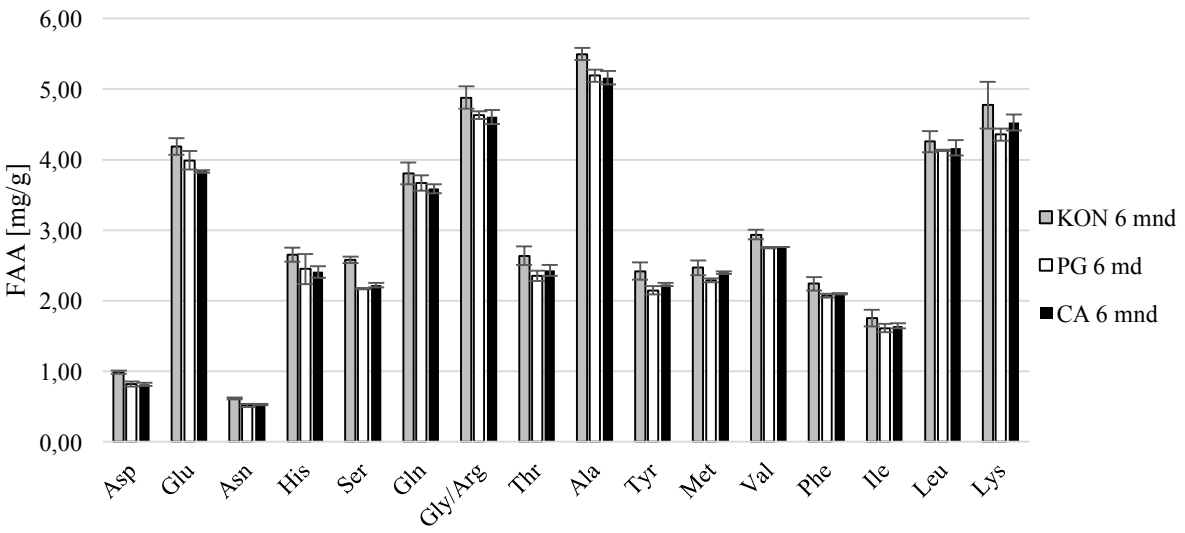


Figur 3.8-1: Innhold av frie aminosyrer i råstoff og i FPH lagret fra null til seks måneder [mg/g]. Standardavvik er gitt for n=2.

Aminosyreprofilen til FAA for utvalgte FPH uten lagring og FPH lagret seks måneder er vist i Figur 3.8-1. Verdiene viser til deres våtvekt og ble beregnet som et gjennomsnitt av to uavhengige innveiinger med to paralleller. Ala var aminosyren som dominerte i alle FPH gjennom lagringsperioden. Sammenliknet med FPH lagret seks måneder økte ∑EAS for FPH tilsatt AA og minket for KON og FPH tilsatt PG som ikke ble lagret. Økningen i FAA i FPH tilsatt AA kan være et resultat av at peptidbindinger har blitt spaltet pga. oksidasjon og på denne måten frigjort flere aminosyrer fra proteinene. Dette kan ha skjedd dersom AA har blitt oppbrukt noe resultatene diskutert i hittil også tyder på.



Figur 3.8-2: Aminosyreprofilen til FAA [mg/g] i FPH uten lagring.

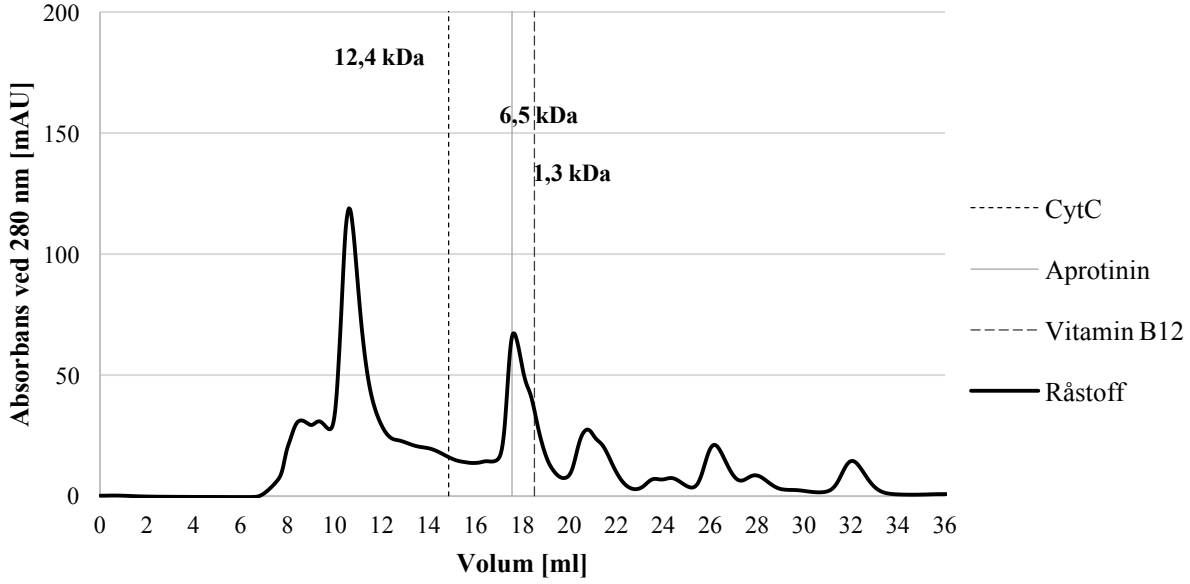


Figur 3.8-3: Aminosyreprofilen til FAA [mg/g] i FPH lagret seks måneder.

3.9. Molvektsfordelinger

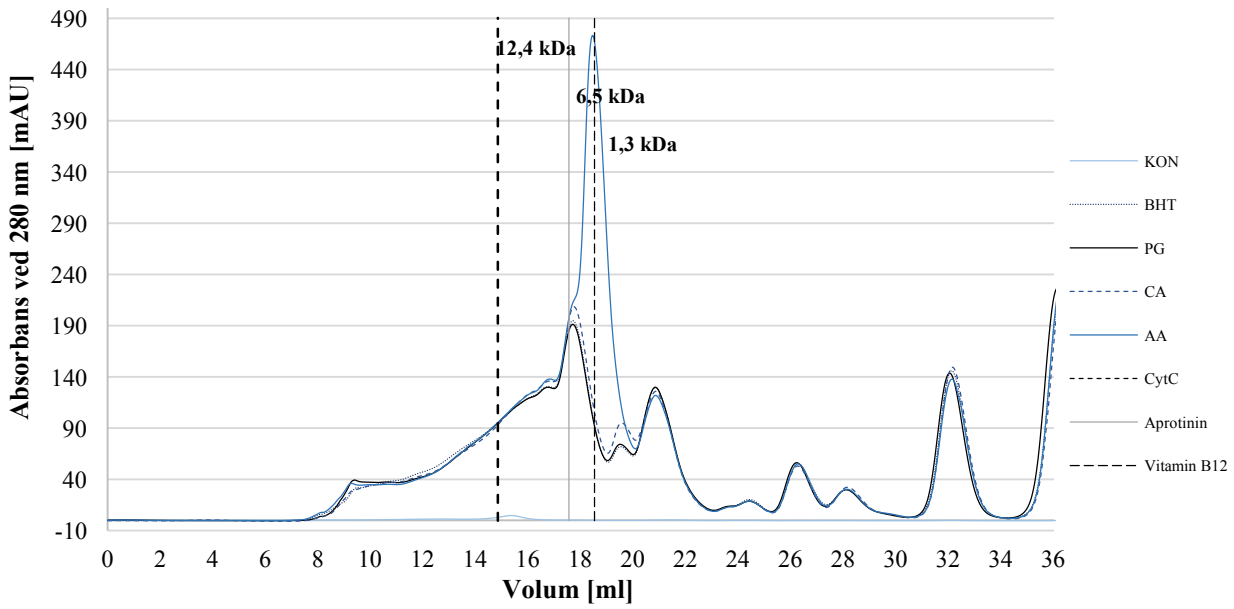
Gelfiltreringskromatogram for standarder er vist i vedlegg H. Gelfiltreringskromatogram for råstoff, FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder er vist i Figur 3.9-1, Figur 3.9-2 og Figur 3.9-3. Grunnet Covid-19-utbruddet ble det ikke rukket å analysere molvektsfordelingen for FPH lagret to og fire måneder. Kolonnen hadde et separasjonsområde fra 100 til 7000 Da og en eksklusjonsgrense på 20 000 Da, som betyr at peptider med molvekt større enn 20 000 Da ikke inngikk i systemet.

Gelkromatogrammet for råstoffet viser en topp ved ~8,3 og ~10,5 ml som betyr at råstoffet har en høy tetthet med peptider større enn den kjente standarden cytokrom C med molvekt 12,4 kDa. Kromatogrammet viser også en topp ved ~17,5 ml som indikerer peptider med molvekt lik den kjente standarden aprotinin på 6,5 kDa. De fleste toppene befinner seg ved elueringsvolum ~20,6 ml, ~26,0 ml og ~31,8 ml som indikerer at råstoffet inneholder flest peptider med molvekt mindre enn den kjente standarden vitamin B12 med molvekt 1,3 kDa. Gelkromatogrammet for råstoff fra ørret i Kendlers studie [126] viser også topper ved ~8 ml og ~11 ml, men målte en høyere absorbans for, og dermed høyere tetthet av, peptidene med molvekt mindre enn 1,3 kDa.



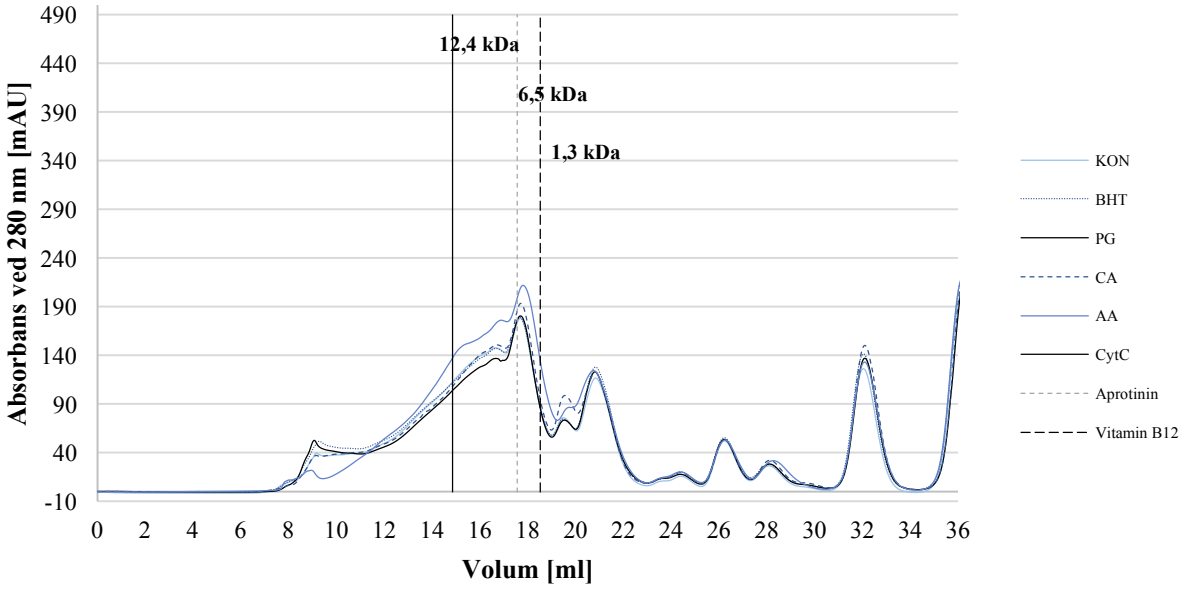
Figur 3.9-1: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for råstoff sammenliknet med kjente standarder.

Gelkromatogrammet for FPH som ikke ble lagret viser at molvektsfordelingene for KON, BHT, PG, CA og AA er svært like. Ingen absorbanstopper ble målt mellom start og elueringsvolum ~14,9 ml, som indikerer at det ikke er store peptider med molekylvekt mellom 20 kDa og 12,4 kDa i noen av FPH. For alle FPH er det en absorbanstopp ved elueringsvolum ~17,5 ml. Dette betyr at alle FPH inneholder middels store peptider med molekylvekt omkring 6,5 kDa. Den høyeste absorbansen ble målt for FPH tilsatt AA ved elueringsvolum ~18,4 ml som betyr at peptider med molekylvekt som er litt større enn standarden vitamin B12 ble retentert med molvekt omkring 1,3 kDa. Den høye toppen for FPH tilsatt AA kan skyldes at AA også har en absorbans ved 280 nm [153]. De fleste absorbanstoppene ble målt etter ~18,4 ml av den mobile fasen hadde blitt eluert og ble målt ved elueringsvolum ~19,8, ~20,8, ~26,1, ~28,0 og ~32,0 ml. Sammenliknet med molvektsfordelingen for råstoffet betyr dette at hydrolysen har brutt ned proteinene til små peptider med molekylvekt lavere enn 1,3 kDa. Lav molekylvekt i peptider i FPH er viktig fordi det påvirker funksjonelle egenskaper som løselighet, vannholdingskapasitet og emulgeringsevne og skummingsegenskaper [154]. Liknende resultater har blitt rapportert for FPH fra hvitting (*Micromesistius poutassou*) [155] og for FPH fra ørret med og uten BHT [126].



Figur 3.9-2: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for FPH som ikke ble lagret sammenliknet med kjente standarder.

Gelkromatogrammet for FPH lagret seks måneder viser at molvektsfordelingen for kontrollprøven og FPH tilsatt antioksidant er svært like målingene fra FPH som ikke ble lagretmåneder. Toppene befinner seg ved samme elueringsvolum som for FPH som ikke ble lagret ved ~17,5, ~19,6, ~20,8, ~26,1, ~28,0 og ~32,0 ml men viser en noe lavere absorbans ved seks måneder. Siden det ikke har oppstått nye topper i kromatogrammet for FPH lagret seks måneder kan reduksjonen i absorbans i lagringsperioden indikere at proteinene har blitt oksidert til uløselige peptider eller til peptider med lavere molvekt enn kolonnens separasjonsområde på 100 Da. Den største forskjellen er absorbansen som ble målt for FPH tilsatt AA ved elueringsvolum ~18,4 ml som er mye lavere for FPH lagret seks måneder enn FPH som ikke ble lagret. Reduksjonen i absorbansen for FPH tilsatt AA fra 473 mAU til 211 mAU og kan indikere at AA som prooksidant har blitt oppbrukt og dermed bidrar i mindre grad til absorbans ved 280 nm.



Figur 3.9-3: Gelfiltreringskromatogram som viser molvektsfordelinger for FPH lagret 6 mnd sammenliknet med kjente standarder.

3.10. Fargemålinger

Målingene av L*a*b* i FPH som ble lagret fra null til seks måneder er vist i Tabell 3.10-1. L*a*b* verdiene målt for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret to og fire måneder er de samme som ble presentert i prosjektoppgaven [133]. Rådata er vist i Vedlegg I. Bilder av FPH er vist i Vedlegg J. De høyeste L* verdiene ble målt for FPH som ikke ble lagret og varierte mellom 86,5 og 90,6. De minkende L* verdiene viser at FPH har blitt mørkere og dermed mer brune under lagringsperioden og etter lagring i seks måneder er alle målingene av L* for FPH signifikant ulike målingene for FPH som ikke ble lagret. Hoyle & Merrit [112] fant også at FPH fra sildefilet ble mørkere over tid. Bruningen av FPH kan skyldes lipidoksidasjon som fører til bruning ved å interagere med proteiner og føre til proteinoksidasjon. Oksidasjon av aminosyrer kan bidra i bruningsreaksjoner og aminosyrene som er mest utsatt for autooksiderende lipider er Cys, Met, Tyr, Ala og proteinbundet lysin. [156]. Tannenbaum et al. [157] fant at hydrolysatenes fargeintensitet økte med lagringstiden og at intensiteten av bruningen var proporsjonal med reduksjonen av Met. Siden det ikke er en stor reduksjon av hverken mengde Lys eller Met under lagringsperioden (se kapittel 3.7.2) er det trolig at det er andre årsaker som førte til bruningen; i nærvær av oksygen oksideres Mb (Fe^{II}) til MMb (Fe^{III}) som har brun farge. En annen konsekvens av oksidasjon av Fe^{II} til Fe^{III} er at det dannes en superoksid fri radikal som kan initiere kjedereaksjoner i lipid autoksidasjon og proteinoksidasjon [158]. Siden det er

mye blod i ørret kan det tenkes at dette har ført til bruningen av hydrolysatene og oksidasjon av proteinene.

Der er ønskelig å bevare den lyse fargen av FPH for bruk i matprodukter. FPH tilsatt PG hadde den laveste reduksjonen i L* fra 90,3 til 88,2 etter lagring i seks måneder som indikerer at PG var antioksidanten som var best til å motvirke bruning av FPH. Den høyeste reduksjonen i L* ble målt for FPH tilsatt AA og ble redusert fra 87,1 til 77,7. Siden FPH tilsatt AA var hydrolysatet som ble mest brunt under lagring tyder det på at AA var brukt opp.

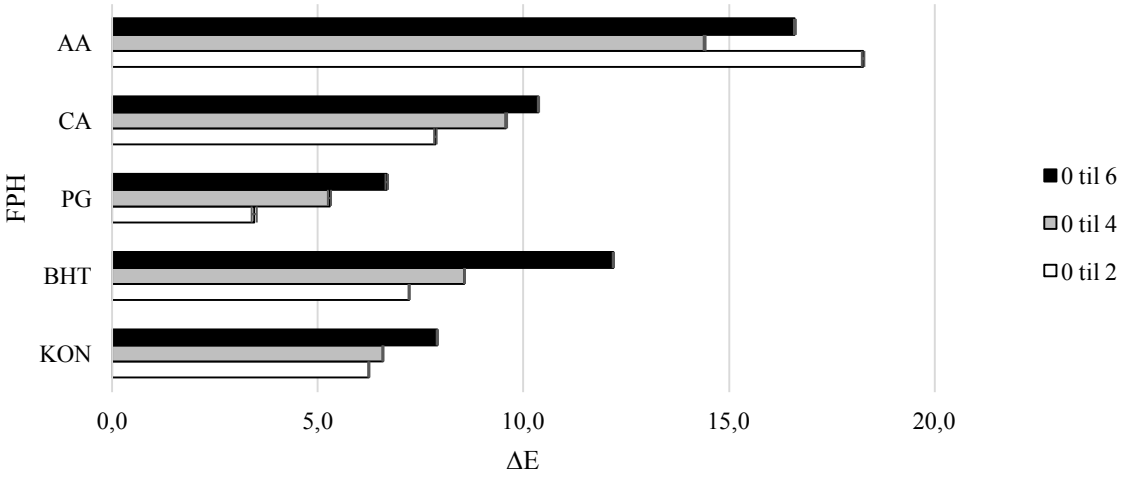
a* verdiene som ble målt for FPH som ikke ble lagret varierte fra -1,1 til 1. Den største endringen i rødfarge i de fleste FPH oppstod etter lagring i to måneder der signifikante forskjeller i forhold til FPH som ikke ble lagret ble målt for alle FPH unntatt FPH tilsatt PG. Etter lagring i to måneder har FPH tilsatt AA den største endringen i a* fra 1,0 til 7,2 som indikerer at prøven har blitt rødere, som også er synlig i **Feil! Fant ikke referansekilden.** i Vedlegg 4. Økningen i a-verdier kan skyldes at røde oksidasjonsprodukter har blitt dannet og kan indikere at hydrolysatene har oksidert. I ørrethoder er det mye blod som består av blant annet hem-jern i myoglobin (Mb). Giulivi & Cadenas [159] undersøkte reaksjoner med AA og de ulike redoksstadiene av Mb (MMb og MbO_2) og fant at det dannes askorbyl radikale og H_2O_2 som kan initiere oksidasjon. De fant også at AA oksiderer Mb til MbO_2, et rødt pigment som kan være årsaken til den høye økningen i a*. Tilsats av AA til kjøttprodukt har også gitt rødere farge under lagring [160]. Økningen i a* kan også skyldes retensjon av lipider og lipidløselige pigment [127]. Det er ikke signifikante forskjeller i a* mellom lagring to til seks måneder for hverken kontrollprøvene, FPH tilsatt CA eller FPH tilsatt AA. Den laveste endringen i a* etter lagring i seks måneder ble målt for FPH tilsatt PG.

Store forskjeller kan observeres for b* for FPH som ikke ble lagret der verdiene varierte fra 13,9 til 20,5 der den laveste og høyeste verdien ble målt for henholdsvis FPH tilsatt PG og kontrollprøven. Under lagringsperioden øker b* for alle FPH som betyr at FPH blir mer gule under lagring. At FPH blir mer gule under lagring har også blitt påvist i undersøkelser av FPH fra ulike fiskearter som *Decapterus maruadsi* (round scad), regnbueørret og laks [132, 161, 162]. b* målt for FPH tilsatt BHT og FPH tilsatt AA økte mest etter seks måneder og økte til henholdsvis 30,4 og 30,6, som var signifikant forskjellig fra b* målt for tilsvarende prøver som ikke ble lagret. Dette kan skyldes at BHT danner et gulfarget kompleks i nærvær av jernioner [163]. Siden AA benyttes for å motvirke at marin fisk blir gulere [163] kan økningen i b* indikere at antioksidanten er brukt opp under lagringsperioden. Kontrollprøven var hydrolysatet som hadde den laveste endringen i b* etter lagring i seks måneder.

Tabell 3.10-1: Fargemålinger for FPH lagret fra null til seks måneder. Standardavvik er gitt for n=3. Ulike bokstaver i samme rad indikerer signifikant forskjell (p < 0,05).

		0 mnd	***2 mnd***	***4 mnd***	***6 mnd***
	KON	$86,4 \pm 0,4^{a}$	$82,5 \pm 0,3^{a,b}$	$82,5 \pm 0,7^{b}$	$80,3 \pm 0,2^{c}$
	BHT	$89,4 \pm 0,4^{a}$	$85,3 \pm 0,3^{b}$	$84,3 \pm 0,4^{b,c}$	$83,9 \pm 0,5^{c}$
L*	*PG*	$90,3 \pm 0,4^{a}$	$88,2 \pm 1,4^{a,b}$	$88,1 \pm 0,8^{b}$	$88,2 \pm 0,5^{b}$
	CA	$90,6 \pm 0,2^{a}$	$85,8 \pm 0,5^{b,c}$	$86,2 \pm 0,2^{c}$	$85,7 \pm 1,6^{c}$
	AA	$87,1 \pm 0,3^{a}$	$76,3 \pm 0,7^{b}$	$79,2 \pm 0,3^{b,c}$	$77,7 \pm 0,8^{b}$
	KON	$0,3 \pm 0,1^{a}$	$1,9 \pm 0,2^{b}$	$1,9 \pm 0,2^{b}$	$2,2 \pm 0,1^{b}$
	BHT	$-1,1 \pm 0,1^{a}$	$0,4 \pm 0,2^{b}$	$1,6 \pm 0,2^{c}$	$1,4 \pm 0,2^{c}$
a*	*PG*	$0,1 \pm 0,0^{a}$	$-0,4 \pm 0,3^{a,b}$	$-0,3 \pm 0,2^{b}$	$-0,4 \pm 0,0^{b}$
	CA	$-1,0 \pm 0,0^{a}$	$0,1 \pm 0,1^{b}$	$0,7 \pm 0,1^{c}$	$0,6 \pm 0,1^{c}$
	AA	$1,0 \pm 0,1^{a}$	$7,2 \pm 0,3^{b}$	$7,2 \pm 0,1^{b}$	$7,1 \pm 0,2^{b}$
	KON	$20,5 \pm 0,5^{a}$	$25,1 \pm 0,3^{b}$	$25,6 \pm 0,4^{b}$	$25,2 \pm 0,9^{b}$
	BHT	$19,8 \pm 0,2^{a}$	$25,6 \pm 0,4^{b}$	$26,2 \pm 0,3^{b}$	$30,4 \pm 0,9^{c}$
b*	*PG*	$13,9 \pm 0,3^{a}$	$16,6 \pm 0,6^{b}$	$18,7 \pm 0,4^{c}$	$20,2 \pm 1,1^{c}$
	CA	$17,5 \pm 0,5^{a}$	$23,6 \pm 0,8^{b}$	$25,8 \pm 0,1^{c}$	$26,5 \pm 0,7^{c}$
	AA	$18,4 \pm 0,3^{a}$	$31,7 \pm 0,5^{b}$	$28,6 \pm 0,4^{c}$	$30,6 \pm 0,6^{b}$

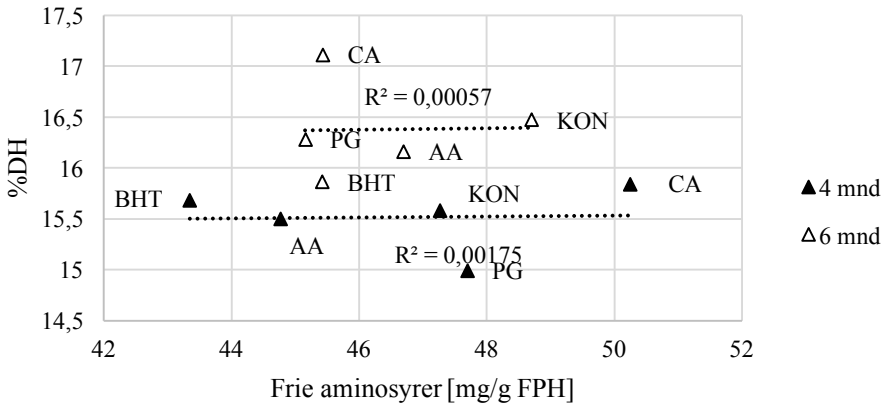
Fargen på matprodukt har stor påvirkning på forbrukeraksept og det er derfor ikke ønskelig at fargeendringene på FPH skal være for store. For å kunne si noe om optimal lagringsperiode er det interessant å se hvor store de totale fargeendringene (ΔE) for FPH var under og etter lagringsperioden. ΔE ble beregnet for alle hydrolysatene i forhold til hydrolysatene som ikke ble lagret vha. Formel (2.3.) og er vist i Figur 3.10-1. Figuren viser at FPH tilsatt AA var hydrolysatene som hadde de største fargeendringene, noe som bekreftes ved de tidligere diskuterte L*a*b*-verdiene. At ΔE for KON er lav viser at oksidasjonsprodukt bidrar i mindre grad til fargeendringer enn de fargede kompleksene som dannes i hydrolysatene tilsatt AA, CA eller BHT. FPH tilsatt PG hadde den laveste totale fargeendringen. Det kan dermed påstås at PG egner seg best til å ivareta fargen på FPH.



Figur 3.10-1: ΔE for FPH lagret to, fire og seks måneder i forhold til FPH som ikke ble lagret.

3.11. Korrelasjoner

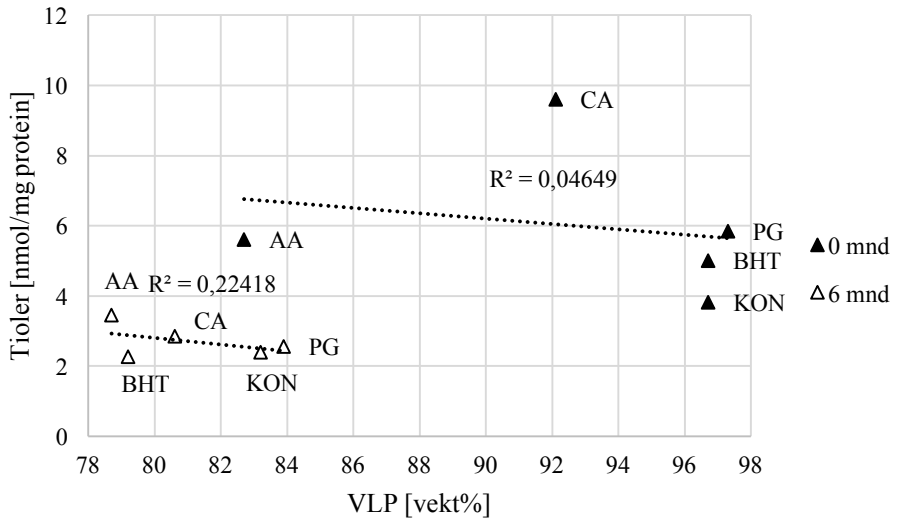
Figur 3.11-1 viser korrelasjonen mellom frie aminogrupper og %DH for FPH lagret fire og seks måneder. Lineær regresjon R^2 = 0,002 er vist i Figur 3.11-1 og tilhørende Pearsonkoeffisient r = 0,04 ble beregnet for FPH lagret fire måneder. Dette viser at %DH og frie aminosyrer ikke korrelerer. Dette endret seg ikke etter lagring i seks måneder da lineær regresjon R^2 = 0,001 og Pearsonkoeffisienten r = 0,02. Dette indikerer at det ikke er en sammenheng mellom en høyere mengde frie aminosyrer og høyere %DH.



Figur 3.11-1: Korrelasjoner mellom frie aminosyrer [mg/g FPH] og %DH for FPH lagret fire måneder og seks måneder.

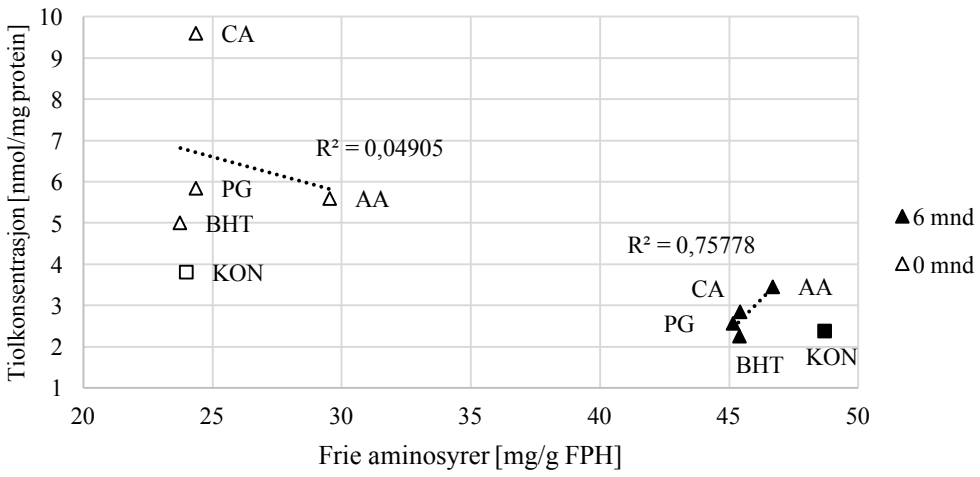
Korrelasjoner mellom konsentrasjonen av tioler og VLP er vist i Figur 3.11-2. En lav negativ korrelasjon ble funnet mellom konsentrasjonen av tioler og VLP for FPH som ikke ble lagret med lineær regresjon R^2 = 0,046 og Pearsonkoeffisient r = - 0,22. Dette indikerer at det

ikke er en korrelasjon mellom mengden VLP og konsentrasjon av tioler i KON og FPH tilsatt antioksidant som ikke ble lagret. Etter lagring i seks måneder korrelerer tiolkonsentrasjonen og mengde VLP mer med lineær regresjon R^2 = 0,224 og Pearsonkoeffisient r = - 0,47. Korrelasjonen er fortsatt lav, men indikerer at konsentrasjonen av tioler og løseligheten minker når antioksidantene brukes opp under lagring.



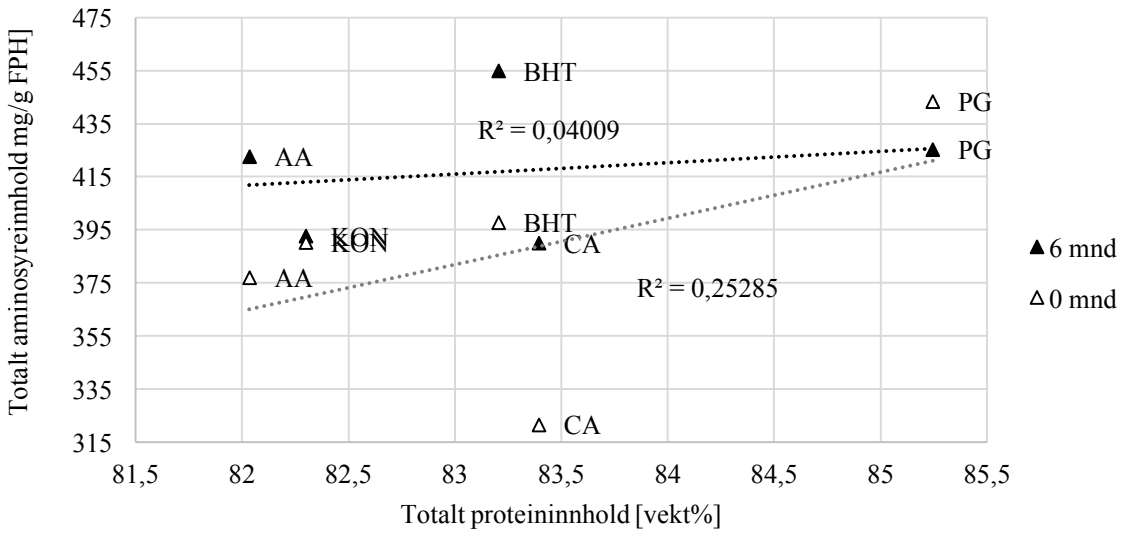
Figur 3.11-2: Korrelasjoner mellom VLP [vekt%] og konsentrasjonen av tioler [nmol/mg protein] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder.

Figur 3.11-3 viser korrelasjonen mellom mengde frie aminosyrer og tiolkonsentrasjonen for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder. Siden KON avvek mye i forhold til de andre hydrolysatene ble den ekskludert fra beregningene. Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom mengde frie aminosyrer og konsentrasjonen av SH-grupper i FPH som ikke ble lagret da lineær regresjon R^2 = 0,049 og Pearsonkoeffisient r = - 0,22. Lineær regresjon R^2 = 0,758 og Pearsonkoeffisient r = 0,87 ble beregnet for FPH lagret seks måneder som viser at mengde frie aminosyrer og tiolkonsentrasjon har en høy, positiv korrelasjon. Dette indikerer at er en sammenheng mellom en høyere mengde frie aminosyrer og lavere tiolkonsentrasjon i FPH tilsatt antioksidant lagret seks måneder. I tillegg kan dette tolkes som at mengden frie aminosyrer øker som følge av proteinoksidasjon. Årsaken til at mengden frie aminosyrer og tiolkonsentrasjonen ikke korrelerer for KON kan skyldes at KON var mer oksidert enn de andre hydrolysatene etter lagring i seks måneder.



Figur 3.11-3: Korrelasjoner mellom frie aminosyrer [mg/g FPH] og tiolkonsentrasjon [nmol/mg protein] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder.

Korrelasjoner mellom totalt proteininnhold målt ved Kjeldahlanalyse for FPH som ikke ble lagret og totalt aminosyreinnhold i FPH som ikke ble lagret og i FPH lagret seks måneder er presentert i Figur 3.11-4. Svært lav korrelasjon ble funnet for begge lagringsperiodene; for FPH lagret fire måneder var lineær regresjon $R^2 = 0,040$ og Pearsonkoeffisient r = 0,50 og for FPH lagret seks måneder var $R^2 = 0,253$ og r = 0,20. Dette indikerer at totalt aminosyreinnhold og totalt proteininnhold ikke korrelerer, noe det helst skal gjøre. Mangelen på korrelasjon kan skyldes at det ble målt store forskjeller i mengde av enkelte aminosyrer selv om økningen i totalt aminosyreinnhold ikke var signifikant under lagringsperioden. Flere av forsøkene måtte også gjentas fordi dert var feil med standarder under analyse med HPLC. Mangelen på korrelasjon indikerer at dette forsøket burde vært analysert med samme standardløsninger ved analyse med HPLC.



Figur 3.11-4: Korrelasjoner mellom totalt proteininnhold [vekt%] fra Kjeldahlanalyse og totalt aminosyreinnhold [nmol/mg FPH] for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret seks måneder.

Kapittel 4

Konklusjon

Resultatene viser at alle hydrolysatene inneholder en høy andel vannløselige proteiner som bidrar til høy løselighet, som er en viktig egenskap for bruk av FPH som matingrediens. Mengden vannløselige proteiner ble noe redusert etter lagring i seks måneder der FPH tilsatt PG var mest løselig mens FPH tilsatt AA var minst løselig. Spaltingen av peptidbindingene under hydrolysen førte til en økt %DH og økt mengde syreløselige peptider, frie aminogrupper og frie aminosyrer. Ingen korrelasjon ble funnet mellom %DH og frie aminosyrer. Etter lagring i seks måneder var det mest syreløselige peptider i kontrollprøven og FPH tilsatt AA og minst i FPH tilsatt BHT. Signifikante forskjeller ble funnet i konsentrasjonen av frie aminosyrer etter lagring i seks måneder. Ingen korrelasjon ble funnet mellom mengde frie aminosyrer og tiolkonsentrasjon for FPH som ikke ble lagret, men en korrelasjon mellom mengde frie aminosyrer og tiolkonsentrasjon ble funnet for FPH tilsatt antioksidant lagret seks måneder. Dette indikerte en sammenheng mellom en høyere mengde frie aminosyrer og lavere tiolkonsentrasjon i FPH tilsatt antioksidant lagret seks måneder. Det kan dermed påstås at økningen i frie aminosyrer skyldes at antioksidantene ikke motvirket proteinoksidajon. Sammenlikning av konsentrasjonen av tioler i hydrolysatene tyder på at kontrollprøven, FPH tilsatt BHT og FPH tilsatt PG ble oksidert under hydrolyseprosessen og at CA og AA motvirket dette i de andre hydrolysatene.

En lav korrelasjon mellom mengde vannløselige proteiner og tiolkonsentrasjon ble funnet for FPH lagret seks måneder og indikerer at tiolkonsentrasjonen og løseligheten minker når antioksidantene brukes opp under lagring.

Summen av essensielle aminosyrer ble ikke endret under lagringsperioden og oppfyller det anbefalte dagsbehovet foreslått av WHO. Det ble ikke observert store endringer i sammensetningen av aminosyrer i hydrolysatene, som indikerer at antioksidantene ikke hadde noen effekt på den totale aminosyresammensetningen. Det totale proteininnholdet varierte mellom 82-85 vekt% i FPH som ikke ble lagret der det var mest protein i FPH tilsatt PG og

minst i FPH tilsatt AA. De høye andelene proteiner, vannløselige proteiner og essensielle aminosyrer viser at hydrolysatene er en god proteinkilde til bruk i matprodukt.

Undersøkelse av molvektsfordelinger i råstoffet og hydrolysatene viste en tydelig endring til mindre peptidfraksjoner for hydrolysatene. Molvektsfordelingene for hydrolysatene som ikke ble lagret liknet molvektsfordelingene for hydrolysatene som ble lagret seks måneder, som indikerer at antioksidantene motvirket nedbrytning av peptidene under lagring.

Fargemålingene viser at hydrolysatene blir mørkere, rødere og gulere under lagringsperioden som også kan skyldes proteinoksidasjon og har negativ effekt på sensoriske egenskaper og forbrukeraksept. PG var antioksidanten som var best til å motvirke fargeendringer i FPH under lagring mens FPH tilsatt AA var dårligst.

For at FPH skal kunne benyttes som matingrediens er det ønskelig at de innehar kjemiske og funksjonelle kvalitetsparametere som høy løselighet, høyt innhold av protein og essensielle aminosyrer tillegg til å ha lys farge. Antioksidantene viser ulik evne til å bevare de ulike kvalitetsparameterne under lagringsperioden. Hydrolysatet tilsatt PG hadde et høyt innhold av aminosyrer og høyest mengde vannløselige peptider, essensielle aminosyrer, frie aminosyrer og mest gunstige L*a*b*-verdier etter seks måneder. Hydrolysatet tilsatt AA hadde den høyeste konsentrasjonen av tioler og høyt aminosyreinnhold etter seks måneder og viste den største reduksjonen i løselighet og L*a*b*-verdier. På denne måten kan det konkluderes med at PG var antioksidanten som var best til å ivareta kjemiske og funksjonelle kvalitetsparametere, mens AA var antioksidanten som var dårligst.

Kapittel 5

Videre arbeid

Tørrstoff- og askeinnhold, frie aminogrupper, %DH, totalt protein ved Kjeldahl og molvektsfordelinger bør analyseres for de lagringsperiodene som ikke ble analysert. Dette er for å være sikker på at antakelsene om at flere av parameterne ikke endret seg mye fra måned til måned. I tillegg bør forsøkene som ga svært høye standardavvik repeteres. Det hadde også vært interessant å gjøre nye analyser med Lowry på mengde vannløselige peptider med lavere fortynninger for å se om det har noen effekt på både løseligheten og standardavvikene. Mengden syreløselige peptider øker og minker fra lagring i to til fire og seks måneder og det kan derfor være fordelaktig å kjøre nye analyser med Lowry for å undersøke dette. Siden forskjellene kan skyldes at det ble brukt ulike løsninger av løsning A og ulike flasker Folin-reagens under analysene i tillegg til at FPH ble mer inhomogene under lagring hadde det vært interessant å eliminere minst en av disse feilkildene.

Flere av resultatene tyder på at hydrolysatene hadde blitt oksiderte og det kunne vært interessant å måle oksidasjon av andre grupper enn tioler, for eksempel oksidasjon av karbonylgrupper. Siden det argumenteres for at antioksidantene hadde blitt brukt opp bør konsentrasjonen av disse måles.

Det er andre parametere enn høy løselighet, høyt innhold av protein og essensielle aminosyrer som bestemmer om FPH kan brukes som matingrediens. For dette formålet bør blant annet sensoriske egenskaper som bitterhet og smak evalueres i tillegg til tilfredsstillelse med tanke på farge. Undersøkelse av lipidinnhold bør også vurderes for å få en mer helhetlig oversikt over hydrolysatene.

Bibliografi

1. Statistisk sentralbyrå. *Akvakultur*. 2018 24.10. [cited 2019 24.10.]; Available from: https://www.ssb.no/fiskeoppdrett.
2. Sjømatråd, N. *Sjømateksport for 99 milliarder i 2018*. 2019 7.01.2019 [cited 2019 06.12.]; Available from: https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018-/
3. SINTEF. *Stadig bedre utnyttelse av marint restråstoff*. 2019; Available from: https://www.sintef.no/siste-nytt/stadig-bedre-utnyttelse-av-marint-restrastoff/.
4. Ocean, S. *Utnyttelse av restråstoff*. 2019 17.09.2019 [cited 2019 29.10.]; Available from: https://www.barentswatch.no/havbruk/utnyttelse-av-restrastoff.
5. Richardsen, R., et al., *Analyse marint restråstoff, 2016-Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge.* 2017.
6. Olafsen, T., et al., *Analyse marint restråstoff, 2013 Analyse av tilgang og anvendelse for marint restråstoff i Norge.* 2014.
7. Li, W., et al., *Proximate Composition and Nutritional Profile of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Heads and Skipjack tuna (Katsuwonus Pelamis) Heads.* Molecules, 2019. **24**(17): p. 3189.
8. Skanderby, M., *Protein hydrolysates: their functionality and applications.* Food Technology International Europe, 1994. **10**: p. 141-144. Ikke sett sitert etter.
9. Neklyudov, A., A. Ivankin, and A. Berdutina, *Properties and uses of protein hydrolysates.* Applied Biochemistry Microbiology, 2000. **36**(5): p. 452-459.
10. Liceaga-Gesualdo, A.M. and E. Li-Chan, *Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (Clupea harengus).* Journal of Food Science, 1999. **64**(6): p. 1000-1004.
11. Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco, *Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000. **40**(1): p. 43-81.
12. Hale, M.B., *Making fish protein concentrate by enzymatic hydrolysis.* National Oceanographic and Atmospheric Technical Report NMFS SSRF-657, Washington, DC, 1972. Ikke sett sitert etter.
13. Blenford, D., *Protein hydrolysates.* International Food Ingredients, 1994: p. 45-45. Ikke sett sitert etter.
14. Webster, J.D., D.A. Ledward, and R.A. Lawrie, *Protein hydrolysates from meat industry by-products.* Meat Science, 1982. **7**(2): p. 147-157.
15. Dave, R., et al., *Protein hydrolysates-A review.* Indian Journal of Dairy Science, 1993. **44**: p. 557-557. Ikke sett sitert etter.

16. Thomas, D. and F. Loffler, *Improved protein functionalities by enzymatic treatment.* Food Market. Technol, 1994. **4**. Ikke sett sitert etter.
17. Williams, A.P., *AMINO ACIDS | Determination*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 192-197. Ikke sett sitert etter.
18. Sikorski, Z.E., M. Naczk, and R.T. Toledo, *Modification of technological properties of fish protein concentrates.* C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1981. **14**(3): p. 201-230. Ikke sett sitert etter.
19. Kinsella, J.E. and N. Melachouris, *Functional properties of proteins in foods: a survey.* Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1976. **7**(3): p. 219-280. Ikke sett sitert etter.
20. Lahl, W.J., *Enzymatic production of protein hydrolysates for food use.* Food Sci., 1994. **48**: p. 68-71. Ikke sett sitert etter.
21. Linder, M., et al., *Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis.* Journal of food science, 1995. **60**(5): p. 949-952.
22. Pigott, G.M., *Enzyme modification of fishery by-products.* Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, Martin RE, Flick GJ, Hebard CE, Ward DR (eds) AVI, Westport, 1982: p. 447-452.
23. Šližytė, R., *Hydrolysis of cod (Gadus morhua) by-products: influence of raw material composition and process conditions*. 2004, Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology, Department of Biotechnology.
24. Pietzsch, J. *Signaling Scissors: New Perspectives on Proteases*. 2003. Background reading for the Horizon Symposium, Brescia, Italy.
25. Guérard, F., *6 - Enzymatic methods for marine by-products recovery*, in *Maximising the Value of Marine By-Products*, F. Shahidi, Editor. 2007, Woodhead Publishing. p. 107-143.
26. Venugopal, V., *Chapter Three - Enzymes from Seafood Processing Waste and Their Applications in Seafood Processing*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, S.-K. Kim and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press. p. 47-69.
27. Storer, A.C. and R. Ménard, *Chapter 419 - Papain*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, N.D. Rawlings and G. Salvesen, Editors. 2013, Academic Press. p. 1858-1861.
28. Singh, P.K., N. Shrivastava, and B.K. Ojha, *Chapter 8 - Enzymes in the Meat Industry*, in *Enzymes in Food Biotechnology*, M. Kuddus, Editor. 2019, Academic Press. p. 111-128.
29. Zengion, A.H. and E. Yarnell, *20 - Herbal and Nutritional Supplements for Painful Conditions*, in *Pain Procedures in Clinical Practice (Third Edition)*, T.A. Lennard, et al., Editors. 2011, Hanley & Belfus: Saint Louis. p. 187-204.
30. Smith, L.G., *PINEAPPLES*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 4567-4575.

31. Mullally, M.M., et al., *Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein hydrolysate characteristics.* Journal of food science, 1995. **60**(2): p. 227-233.
32. Gauthier, S., et al., *Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins.* Journal of Dairy Science, 1993. **76**(1): p. 321-328.
33. See, S., L. Hoo, and A.S. Babji, *Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (Salmo salar) skin by Alcalase.* International Food Research Journal, 2011. **18**(4).
34. Dave, R., et al., *Protein hydrolysates - A review.* Indian Journal of Dairy Science, 1993. **44**: p. 557-557.
35. Tao, L., *Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health.* Adv. Food Technol. Nutr. Sci, 2015. **1**: p. 135-142.
36. Sampels, S., *Oxidation and antioxidants in fish and meat from farm to fork*, in *Food industry*. 2013, IntechOpen.
37. Richards, M.P. and H.O. Hultin, *Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle.* Journal of Agricultural and Food chemistry, 2002. **50**(3): p. 555-564.
38. Hematyar, N., et al., *Relationship between lipid and protein oxidation in fish.* Aquaculture Research, 2019. **50**(5): p. 1393-1403.
39. Shahidi, F., P. Janitha, and P. Wanasundara, *Phenolic antioxidants.* Critical reviews in food science & nutrition, 1992. **32**(1): p. 67-103.
40. Kanner, J., et al., *Natural antioxidants in grapes and wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(1): p. 64-69.
41. Liceaga-Gesualdo, A. and E. Li-Chan, *Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (Clupea harengus).* Journal of Food Science, 1999. **64**(6): p. 1000-1004.
42. Gray, J., E. Gomaa, and D. Buckley, *Oxidative quality and shelf life of meats.* Meat science, 1996. **43**: p. 111-123.
43. Stadtman, E.R. and B.S. Berlett, *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease.* Drug metabolism reviews, 1998. **30**(2): p. 225-243.
44. Mackie, I., *Fish protein hydrolysates.* Process Biochemistry, 1982. **17**(1): p. 26-27. Ikke sett sitert etter.
45. Baron, C.P., et al., *Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(20): p. 8118-8125.
46. Swallow, A.J., *Radiation Chemistry of Organic Compounds: International Series of Monographs on Radiation Effects in Materials*. 2016: Elsevier.
47. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(33): p. 20313-20316.

48. Garrison, W.M., *Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins.* Chemical reviews, 1987. **87**(2): p. 381-398.
49. Lund, M.N., et al., *Protein oxidation in muscle foods: A review.* Molecular nutrition & food research, 2011. **55**(1): p. 83-95.
50. Shacter, E., *Quantification and significance of protein oxidation in biological samples.* Drug metabolism reviews, 2000. **32**(3-4): p. 307-326.
51. Davies, K., M. Delsignore, and S. Lin, *Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids.* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(20): p. 9902-9907.
52. Stadtman, E.R., *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences.* Free Radical Biology and Medicine, 1990. **9**(4): p. 315-325.
53. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
54. Aeschbach, R., R. Amadò, and H. Neukom, *Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues.* Biochimica et biophysica acta, 1976. **439**(2): p. 292-301.
55. Stadtman, E.R., *Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions.* Annual review of biochemistry, 1993. **62**(1): p. 797-821.
56. Amici, A., et al., *Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions.* Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(6): p. 3341-3346.
57. Martinaud, A., et al., *Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(7): p. 2481-2487.
58. Morzel, M., et al., *Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins.* Meat Science, 2006. **73**(3): p. 536-543.
59. Davies, K.J. and M.E. Delsignore, *Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure.* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(20): p. 9908-9913.
60. Srinivasan, S. and Y.l. Xiong, *Gelation of beef heart surimi as affected by antioxidants.* Journal of food science, 1996. **61**(4): p. 707-711.
61. Srinivasan, S. and H.O. Hultin, *Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(2): p. 310-320.
62. Levine, R.L., et al., *Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins*, in *Methods in enzymology*. 1994, Elsevier. p. 346-357.
63. Deneke, S.M., *Thiol-based antioxidants.* Curr Top Cell Regul, 2000. **36**(151-180): p. 447.

64. Winther, J.R. and C. Thorpe, *Quantification of thiols and disulfides.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1840**(2): p. 838-846.
65. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups.* Archives of biochemistry and biophysics, 1959. **82**(1): p. 70-77.
66. Hermund, D.B., *Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances*, in *Bioactive Seaweeds for Food Applications*, Y. Qin, Editor. 2018, Academic Press. p. 201-221.
67. Ware, M. *How can antioxidants benefit our health?* 2018.
68. Jacobsen, C., *Oxidative Rancidity*, in *Encyclopedia of Food Chemistry*, L. Melton, F. Shahidi, and P. Varelis, Editors. 2019, Academic Press: Oxford. p. 261-269.
69. Daramola, B. and G.O. Adegoke, *Chapter 25 - Bitter Kola (Garcinia kola) Seeds and Health Management Potential*, in *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, V.R. Preedy, R.R. Watson, and V.B. Patel, Editors. 2011, Academic Press: San Diego. p. 213-220.
70. Hilton, J.W., *Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods.* The Canadian Veterinary Journal, 1989. **30**(8): p. 682.
71. Yehye, W.A., et al., *Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review.* European journal of medicinal chemistry, 2015. **101**: p. 295-312.
72. Choe, E. and D.B. Min, *Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009. **8**(4): p. 345-358.
73. Fiege, H., et al., *Phenol derivatives.* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.
74. Reische, D.W., D.A. Lillard, and R.R. Eitenmiller, *Antioxidants*, in *Food lipids*. 2002, CRC Press. p. 423-448.
75. Ershov, V. and A. Volod'kin, *Sterically hindered phenols.* Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science, 1962. **11**(12): p. 2057-2060.
76. Buck, D. and M. Edwards, *Antioxidants to prolong shelf-life.* Food Technol. Int, 1997. **2**: p. 29-33.
77. Akoh, C.C., *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 2017: CRC press. 1.
78. Belitz, H., W. Grosch, and P. Schieberle, *Food chemistry. 2009.* Milk and Dairy Products.
79. Stecher, P., *Butylated hydroxytoluene.* The Merck Index, 1968: p. 179.
80. Dacre, J., *The metabolism of 3: 5-di-tert.-butyl-4-hydroxytoluene and 3: 5-di-tert.-butyl-4-hydroxybenzoic acid in the rabbit.* Biochemical Journal, 1961. **78**(4): p. 758.
81. Mukhopadhyay, A.K., *Antioxidants-natural and Synthetic*. 2006: Amani Int'l Publishers.
82. Becker, L., *Final report on the amended safety assessment of Propyl Gallate.* International Journal of Toxicology, 2007. **26**: p. 89-118.
83. Medina, M.E., C. Iuga, and J.R. Alvarez-Idaboy, *Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: a theoretical study.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(31): p. 13137-13146.

84. Gutteridge, J.M. and F. Xiao-Chang, *Enhancement of bleomycin—Iron free radical damage to DNA by antioxidants and their inhibition of lipid peroxidation.* FEBS letters, 1981. **123**(1): p. 71-74.

85. Coppen, P.P., *Use of antioxidants.* APPL. SCI. PUBL. LTD., RIPPLE ROAD, BARKING, ESSEX, UK., 1983: p. 63.

86. Additives, E.P.o.F. and N.S.A.t. Food, *Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive.* EFSA Journal, 2014. **12**(4): p. 3642.

87. Amadasi, A., et al., *Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach.* Chemical research in toxicology, 2009. **22**(1): p. 52-63.

88. *Final Report on the Amended Safety Assessment of Propyl Gallate.* International Journal of Toxicology, 2007. **26**(3_suppl): p. 89-118.

89. Abdel-Salam, O.M.E., et al., *Chapter 16 - Citric Acid an Antioxidant in Liver*, in *The Liver*, V.B. Patel, R. Rajendram, and V.R. Preedy, Editors. 2018, Academic Press: Boston. p. 183-198.

90. Graf, E. and J.W. Eaton, *Antioxidant functions of phytic acid.* Free Radical Biology and Medicine, 1990. **8**(1): p. 61-69.

91. Gupta, M.K., *Chapter 8 - Deodorization*, in *Practical Guide to Vegetable Oil Processing (Second Edition)*, M.K. Gupta, Editor. 2017, AOCS Press. p. 217-247.

92. Bockisch, M., *Chapter 7 - Oil Purification*, in *Fats and Oils Handbook*. 1998, AOCS Press. p. 613.

93. BYJU´S. *Citric acid formula*. 2020; Available from: https://byjus.com/chemistry/citric-acid-formula/.

94. Higdon, J., *Vitamin A. Micronutrient Information Center. Linus Pauling Institute, Oregon State University*. 2003.

95. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention.* Journal of the American college of Nutrition, 2003. **22**(1): p. 18-35.

96. Carr, A. and B. Frei, *Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?* The FASEB Journal, 1999. **13**(9): p. 1007-1024.

97. Stohs, S.J. and D. Bagchi, *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.* Free radical biology and medicine, 1995. **18**(2): p. 321-336.

98. Adler-Nissen, J., *Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology, 1984. **34**(3): p. 215-222.

99. Petersen, B.R., *The Impact of the Enzymic Hydrolysis Process on Recovery and Use of Proteins*, in *Enzymes and Food Processing*, G.G. Birch, N. Blakebrough, and K.J. Parker, Editors. 1981, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 149-175.

100. Tamura, M., et al., *Practical debittering using model peptides and related compounds.* Agricultural and biological chemistry, 1990. **54**(1): p. 41-51.
101. Pedersen, B., *Removing bitterness from protein hydrolysates.* Food technology (USA), 1994.
102. Dauksas, E., et al., *Bitterness in fish protein hydrolysates and methods for removal.* Journal of aquatic food product technology, 2004. **13**(2): p. 101-114.
103. Vegarud, G. and T. Langsrud, *The level of bitterness and solubility of hydrolysates produced by controlled proteolysis of caseins.* Journal of Dairy Research, 1989. **56**(3): p. 375-379.
104. Idowu, A.T. and S. Benjakul, *Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects.* Journal of food biochemistry, 2019.
105. Baklien, A.T. *Nytt toppår for oppdrettslaks*. 2019 24.10.2019; Available from: https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nytt-toppar-for-oppdrettslaks -:~:text=%C3%98kning%20for%20annen%20oppdrettsfisk,4%2C6%20prosent%20for%20verdi.
106. Richardsen, R., et al., *Analyse marint restråstoff, 2015 Analyse av tilgang og anvendelse for marint restråstoff i Norge.* 2016.
107. Nofima. *Restråstoff.* 2019 29.10.2019]; Available from: https://nofima.no/forskningsomrade/marin-bioteknologi/restrastoff/.
108. Marshall, M.R., *Ash analysis*, in *Food analysis*. 2010, Springer. p. 105-115.
109. International, A., W. Horwitz, and G.W. Latimer, *Official methods of analysis of AOAC International*. 2010, Gaithersburg, MD.: AOAC International.
110. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* Journal of biological chemistry, 1951. **193**: p. 265-275.
111. Peterson, G.L., *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.* Analytical biochemistry, 1979. **100**(2): p. 201-220.
112. Hoyle, N.T. and J.H. Merritt, *Quality of fish protein hydrolysates from herring (Clupea harengus).* Journal of food science, 1994. **59**(1): p. 76-79.
113. Corey, R. *Biochemistry: Why is trichloroacetic acid so often used for protein precipitation?* 2015 16.11.2015 [cited 04.05.2020]; Available from: https://www.quora.com/Biochemistry-Why-is-trichloroacetic-acid-so-often-used-for-protein-precipitation.
114. Plank, J., *The Ins and Outs of Protein Concentration–Protein Precipitation*. 2011, BitesizeBio.
115. Rutherfurd, S.M., *Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review.* Journal of AOAC International, 2010. **93**(5): p. 1515-1522.

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

117. Blackburn, S., *Amino acid determination. Methods and techniques.* Amino acid determination. Methods techniques., 1968.

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

119. *Fast Protein Liquid Chromatography*. 2020 07.05.2020]; Available from: https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF.

120. *Fast protein liquid chromatography (FPLC) Protocol*. 2020 07.05.2020]; Available from: https://conductscience.com/fast-protein-liquid-chromatography-fplc-protocol/.

121. Subhashree, S.N., et al., *Quantification of browning in apples using colour and textural features by image analysis.* Food Quality and Safety, 2017. **1**(3): p. 221-226.

122. Utomo, B.S.B., T.D. Suryanigrum, and H.R. Harianto, *Optimization of enzymatic hydrolysis of fish protein hydrolysate (FPH) processing from waste of catfish fillet production.* Squalen Bulletin of Marine Fisheries Postharvest Biotechnology, 2014. **9**(3): p. 115-126.

123. Kim, B.-S., et al., *Effects of Various Drying Methods on Physicochemical Characteristics and Textural Features of Yellow Croaker (Larimichthys Polyactis).* Foods, 2020. **9**(2): p. 196.

124. PCE-Instruments. *Colorimeter*. [cited 2019 15.11.]; Available from: https://www.pce-instruments.com/english/measuring-instruments/test-meters/colorimeter-kat_159195.htm.

125. Minolta, K., *Identifying Color Differences Using L* a* b* or L* C* H* Coordinates*. 2018.

126. Kendler, S., *Effect of oxidised rest raw materials on the quality of fish protein hydrolysates*. 2019, NTNU.

127. Sathivel, S., et al., *Functional and nutritional properties of red salmon (Oncorhynchus nerka) enzymatic hydrolysates.* Journal of Food Science, 2005. **70**(6): p. c401-c406.

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

129. Gauthier, S., et al., *Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins1.* Journal of Dairy Science, 1993. **76**(1): p. 321-328.

130. Fennema, O.R., *Food Chemistry, Third Edition*. 1996: Taylor & Francis.

131. Duarte, T.L. and J. Lunec, *When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C.* Free radical research, 2005. **39**(7): p. 671-686.

132. Gjermstad, R.S., *Hydrolyse av restråstoff fra laks (Salmo salar) - Effekten av antioksidanter under lagring*. 2019, Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap, NTNU.

133. Simavik, K., *Hydrolyse av restråstoff fra regnbueørret (Oncorhynchus mykiss) - Effekten av antioksidanter på kvalitet under lagring.* . 2019, NTNU.

134. Safari, R., et al., *Use of hydrolysates from yellowfin tuna (Thunnus albacares) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria.* Food and Bioprocess Technology, 2012. **5**(1): p. 73-79.

135. Šližytė, R., et al., *Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (Gadus morhua) by-products.* Process Biochemistry, 2005. **40**(6): p. 2021-2033.

136. Kristinsson, H.G., *Reaction kinetics, biochemical and functional properties of salmon muscle proteins hydrolyzed by different alkaline proteases*. 1998, University of Washington.

137. Yu, S. and S. Fazidah, *Enzymic hydrolysis of proteins from Aristichthys nobilis by protease P'Amano'3.* Tropical science, 1994.

138. Mauer, L., *PROTEIN | Heat Treatment for Food Proteins*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: Oxford. p. 4868-4872.

139. Olcott, H.S. and H. Fraenkel-Conrat, *Formation and loss of cysteine during acid hydrolysis of proteins. Role of tryptophan.* Journal of Biological Chemistry, 1947. **171**: p. 583-594.

140. Hidalgo, F.J., et al., *Asparagine Decarboxylation by Lipid Oxidation Products in Model Systems.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(19): p. 10512-10517.

141. Hematyar, N., et al., *Relationship between lipid and protein oxidation in fish.* Aquaculture Research, 2019. **50**(5): p. 1393-1403.

142. He, S., C. Franco, and W. Zhang, *Characterisation of processing wastes of Atlantic Salmon (Salmo salar) and Yellowtail Kingfish (Seriola lalandi) harvested in Australia.* International journal of food science & technology, 2011. **46**(9): p. 1898-1904.

143. Hema, G., et al., *Comparison of collagen extracted from skin of double spotted queenfish and Malabar grouper.* 2014.

144. Finley, J.W. and P. Given, *Technological necessity of antioxidants in the food industry.* Food and Chemical Toxicology, 1986. **24**(10): p. 999-1006.

145. Wilson, R.P. and C.B. Cowey, *Amino acid composition of whole body tissue of rainbow trout and Atlantic salmon.* Aquaculture, 1985. **48**(3): p. 373-376.

146. Organization, W.H. and U.N. University, *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. Vol. 935. 2007: World Health Organization.

147. Lenis, N.P., et al., *Effect of the ratio between essential and nonessential amino acids in the diet on utilization of nitrogen and amino acids by growing pigs.* J Anim Sci, 1999. **77**(7): p. 1777-87.

148. Romano, C., et al., *Influence of Diets with Varying Essential/Nonessential Amino Acid Ratios on Mouse Lifespan.* Nutrients, 2019. **11**(6): p. 1367.

149. Iwasaki, M. and R. Harada, *Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species.* Journal of Food Science, 1985. **50**(6): p. 1585-1587.

150. You, L., et al., *Purification and identification of antioxidative peptides from loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry.* Food Research International, 2010. **43**(4): p. 1167-1173.

151. Wu, H.-C., H.-M. Chen, and C.-Y. Shiau, *Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus).* Food research international, 2003. **36**(9-10): p. 949-957.

152. Esfandi, R., M.E. Walters, and A. Tsopmo, *Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals.* Heliyon, 2019. **5**(4): p. e01538.

153. Majidi, M. and H. Al-Gubury, *Determination of Vitamin C (ascorbic acid) Contents in various fruit and vegetable by UV-spectrophotometry and titration methods.* Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2016. **9**(4): p. 2972-2974.

154. Halim, N., H. Yusof, and N. Sarbon, *Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review.* Trends in Food Science & Technology, 2016. **51**: p. 24-33.

155. Cudennec, B., et al., *Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells.* Food Chemistry, 2008. **111**(4): p. 970-975.

156. Pokorny, J., *Browning from lipid-protein interactions.* Progress in food and nutrition science, 1981.

157. Tannenbaum, S.R., H. Barth, and J.P. Le Roux, *Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate.* Journal of agricultural and food chemistry, 1969. **17**(6): p. 1353-1354.

158. Coultate, T., *Food The Chemistry of its Components*. 6th ed. 2016, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 599.

159. Giulivi, C. and E. Cadenas, *The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin: antioxidant and prooxidant aspects.* FEBS letters, 1993. **332**(3): p. 287-290.

160. Ahn, D.U. and K.C. Nam, *Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef.* Radiation Physics and Chemistry, 2004. **71**(1-2): p. 151-156.

161. Thiansilakul, Y., S. Benjakul, and F. Shahidi, *Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (Decapterus maruadsi).* Food chemistry, 2007. **103**(4): p. 1385-1394.

162. Taheri, A., et al., *Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (Onchorhynchus mykiss) viscera.* Iranian journal of fisheries sciences, 2013. **12**(1): p. 154-169.

163. Madhavi, D.L., S.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe, *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. 1995: CRC Press.

164. Energy, F.F., *Methods of Analysis and Conversion Factors. Report of a Technical Workshop.* Food Nutrition, 2003. **77**: p. 1-93.

165. Buchi, *Application Note No. 114/2013*

Nitrogen & protein determination in meat products. 2013, Buchi.

Vedlegg A

Tørrstoff- og askeinnhold

A.1. Tørrstoffinnhold

Tørrstoffet ble beregnet vha. (A.1.).

(A.1.) $Tørrstoff\ \% = \frac{D_{tørrstoff} - D}{m_{prøve}} * 100\ \%$

$D_{tørrstoff}$ =vekten av digel og tørrstoff etter tørking

D=vekten av digel

$m_{prøve}$=innveid mengde prøve.

Tabell Vedlegg A-1: Rådata for beregning av tørrstoffinnhold i råstoff og FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***$m_{innveid}$ 1 (g)***	***$m_{innveid}$ 2 (g)***	***Digel + FPH 1 (g)***	***Digel + FPH 2 (g)***	***M etter tørking (g) 1***	***M etter tørking (g) 2***	***Tørrstoff 1 (g)***	***Tørrstoff 2 (g)***	***Snitt tørrstoff (%)***
KON	2,47	2,42	22,65	23,45	22,40	23,21	2,23	2,18	90,14
BHT	2,38	2,69	11,67	12,44	11,44	12,18	2,15	2,43	90,19
PG	2,29	2,35	18,59	22,24	18,41	22,06	2,11	2,16	92,13
CA	2,21	2,23	22,40	21,96	22,19	21,75	2,00	2,03	90,84
AA	2,72	2,67	23,22	21,14	22,97	20,89	2,47	2,43	90,79
Råstoff	2,21	2,42	20,28	22,37	19,02	20,98	0,94	1,03	42,74
6 mnd									
KON	2,74	2,53	22,88	11,74	22,65	11,53	2,52	2,31	91,67
BHT	2,38	2,57	20,49	22,53	20,29	22,32	2,19	2,36	91,73
PG	2,64	2,79	15,10	22,62	14,86	22,36	2,40	2,53	90,75
CA	2,53	2,71	19,28	19,55	19,04	19,30	2,29	2,46	90,63
AA	2,48	2,65	24,79	22,12	24,58	21,90	2,27	2,43	91,60

A.2. Askeinnhold

Tørrstoffet ble beregnet vha. A.2.

(A.2.) $$Aske\ \% = \frac{D_{aske} - D}{m_{prøve}} * 100\ \%$$

D_{aske} = vekten av digel og aske etter tørking; D=vekten av digel; $m_{prøve}$=innveid mengde FPH.

Tabell Vedlegg A-2: Rådata for beregning av askeinnhold i råstoff og i FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***$m_{innveid}$ 1 (g)***	***$m_{innveid}$ 2 (g)***	***Digel + FPH 1 (g)***	***Digel + FPH 2 (g)***	***M etter askeovn(g) 1***	***M etter askeovn (g) 2***	***Aske 1 (g)***	***Aske 2 (g)***	***Snitt aske (%)***
KON	2,47	2,42	22,65	23,45	20,41	21,26	0,23	0,23	9,43
BHT	2,38	2,69	11,67	12,44	9,53	10,02	0,24	0,27	10,21
PG	2,29	2,35	18,59	22,24	16,52	20,10	0,21	0,21	9,08
CA	2,21	2,23	22,40	21,96	20,39	19,93	0,20	0,21	9,18
AA	2,72	2,67	23,22	21,14	20,77	18,73	0,27	0,27	9,95
Råstoff	2,21	2,42	20,28	22,37	18,21	20,09	0,13	0,14	5,74
6 mnd									
KON	2,47	2,42	22,65	23,45	20,40	9,47	0,26	0,25	9,72
BHT	2,38	2,69	11,67	12,44	18,36	20,22	0,26	0,25	10,39
PG	2,29	2,35	18,59	22,24	12,73	20,02	0,26	0,20	8,51
CA	2,21	2,23	22,40	21,96	17,00	17,09	0,25	0,25	9,61
AA	2,72	2,67	23,22	21,14	22,55	19,73	0,24	0,25	9,54

Vedlegg B

Vannløselige proteiner og syreløselige peptider

Mengde vannløselige proteiner og syreløselige peptider ble beregnet fra absorbansen målt ved 750 nm via formel (B.1.) og (B.2.).

(B.1.) $$C_{prot} = \frac{1}{a} * (OD_{750nm} - b)$$

(B.2.) $$Proteiner/peptider\ [vekt\%] = \frac{C_{prot} * fortynning * V_{ekstrakt}}{m_{innveid}} * 100\ \%$$

C_{prot}=konsentrasjonen av protein [µg/ml]

Fortynning=400

$V_{ekstrakt}$=10 ml

$m_{innveid}$=0,5 g.

a og b er stigningstall og konstant i formelen for trendlinjen for standardkurven på formen ax+b.

B.1. Vannløselige proteiner

Tabell Vedlegg B-1: Rådata for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***	***Råstoff***
$m_{innveid}$ (g)	0,5075	-	0,5042	0,5018	0,5029	0,5046	0,5059	0,5044	0,5007	0,5077	20,55
OD 750											
1	0,232	-	0,276	0,271	0,277	0,233	0,276	0,271	0,256	0,246	0,251
2	0,242	-	0,275	0,271	0,269	0,237	0,275	0,271	0,245	0,242	0,257
3	0,239	-	0,279	0,281	0,267	0,241	0,279	0,281	0,256	0,252	0,249
vekt% tørrvekt	96,72	-	96,92	96,43	94,86	99,82	92,34	91,76	84,29	81,05	2,62
Snitt	96,72 ± 2,43		96,68 ± 0,35		97,34 ± 3,51		92,05 ± 0,41		82.67 ± 2,29		2,62 ± 0,05

Tabell Vedlegg B-2: Rådata for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret to måneder.

2 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5062	0,5075	0,5050	0,5077	0,5028	0,5088	0,5016	0,5031	0,5042	0,5016
OD 750										
1	0,296	0,267	0,257	0,225	0,302	0,287	0,263	0,279	0,283	0,236
2	0,292	0,272	0,266	0,230	0,295	0,283	0,279	0,288	0,282	0,243
3	0,291	0,267	0,266	0,230	0,301	0,287	0,272	0,280	0,283	0,226
vekt% tørrvekt	96,97	88,04	95,48	80,61	91,15	86,80	83,97	88,31	85,61	70.85
Snitt	92,50 ± 6,32		88,04 ± 10,51		88,97 ± 3,08		86,14 ± 3,07		78,23 ± 10,43	

Tabell Vedlegg B-3:Rådata for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5060	0,5020	0,5037	0,5079	0,5077	0,5050	0,5033	0,5068	0,5011	0,5043
OD 750										
1	0,294	0,265	0,265	0,276	0,291	0,293	0,263	0,259	0,239	0,260
2	0,305	0,265	0,269	0,284	0,306	0,287	0,287	0,260	0,245	0,265
3	0,300	0,274	0,260	0,282	0,308	0,295	0,277	0,261	0,248	0,263
vekt% tørrvekt	98,47	87,51	85,98	91,14	91,00	88,32	83,54	78,01	73,79	79,24
Snitt	92,99 ± 7,75		88,56 ± 3,64		89,66 ± 1,89		80,77 ± 3,90		76,52 ± 3,85	

Tabell Vedlegg B-4: Rådata for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5010	0,5003	0,5072	0,5034	0,5001	0,5071	0,5076	0,5057	0,5075	0,5092
OD 750										
1	0,269	0,226	0,277	0,194	0,269	0,224	0,264	0,216	0,241	0,209
2	0,265	0,223	0,277	0,197	0,269	0,227	0,266	0,214	0,246	0,215
3	0,263	0,225	0,285	0,190	0,270	0,229	0,272	0,213	0,241	0,215
vekt% tørrvekt	91,08	75,38	95,30	63,02	92,66	75,13	90,53	70,63	84,68	72,68
Snitt	83,23 ± 11,1		79,16 ± 22,82		83,90 ± 12,39		80,58 ± 14,07		78,68 ± 8,48	

B.2. Syreløselige peptider

Tabell Vedlegg B-5: Rådata for syreløselige peptider for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***	***Råstoff***
$m_{innveid}$ (g)	0,5075	-	0,5042	0,5018	0,5029	0,5046	0,5059	0,5044	0,5007	0,5077	20,55
OD 750											
1	0,104	-	0,125	0,111	0,128	0,115	0,125	0,111	0,107	0,105	0,044
2	0,106	-	0,117	0,111	0,128	0,119	0,117	0,111	0,107	0,098	0,042
3	0,106	-	0,120	0,112	0,130	0,117	0,120	0,112	0,116	0,105	0,045
vekt% tørrvekt	33,98		33,62	29,72	36,88	32,02	35,13	31,80	31,54	28,42	0,33
Snitt	33,98 ± 0,55		31,67 ± 2,76		34,45 ± 3,44		33,46 ± 2,35		29.98 ± 2,20		0,33 ± 0,04

Tabell Vedlegg B-6: Rådata for syreløselige peptider for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret to måneder.

2 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5062	0,5075	0,5037	0,5079	0,5028	0,5088	0,5016	0,5031	0,5042	0,5016
OD 750										
1	0,150	0,147	0,127	0,135	0,153	0,167	0,127	0,135	0,115	0,113
2	0,148	0,147	0,129	0,138	0,152	0,168	0,129	0,138	0,117	0,114
3	0,148	0,151	0,125	0,133	0,151	0,165	0,125	0,133	0,117	0,112
vekt% tørrvekt	43,97	43,73	32,37	35,07	44,26	48,35	32,56	35,27	33,03	31,76
Snitt	43,85 ± 0,16		33,72 ± 1,90		46,31 ± 2,89		33,92 ± 1,91		32,39 ± 0,89	

Tabell Vedlegg B-7: Rådata for syreløselige peptider for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5060	0,5020	0,5037	0,5079	0,5077	0,5050	0,5033	0,5068	0,5011	0,5043
OD 750										
1	0,130	0,139	0,127	0,135	0,119	0,119	0,120	0,122	0,115	0,113
2	0,126	0,139	0,129	0,138	0,121	0,119	0,122	0,123	0,117	0,114
3	0,128	0,141	0,125	0,133	0,118	0,120	0,118	0,125	0,117	0,112
vekt% tørrvekt	35,30	39,91	35,09	37,85	33,54	33,72	34,05	34,86	33,03	31,76
Snitt	37,6 ± 3,25		36,47 ± 1,95		33,63 ± 0,12		34,46 ± 0,57		32,39 ± 0,89	

Tabell Vedlegg B-8: Rådata for syreløselige peptider for innveid prøvemengde, absorbansmålinger og vekt% tørrvekt for FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***
$m_{innveid}$ (g)	0,5010	-	0,5072	0,5034	0,5056	0,5063	0,5076	0,5057	0,5075	0,5092
OD 750										
1	0,139	-	0,148	0,147	0,119	0,119	0,171	0,173	0,138	0,129
2	0,137	-	0,151	0,145	0,122	0,121	0,172	0,171	0,138	0,127
3	0,139	-	0,151	0,145	0,119	0,121	0,171	0,172	0,138	0,130
vekt% tørrvekt	41,99	-	28,05	27,39	29,94	30,02	32,32	32,58	43,20	39,37
Snitt	41,99 ± 0,45		27,72 ± 0,47		29,98 ± 0,05		32,45 ± 0,18		41,29 ± 2,70	

Vedlegg C

Protein- og nitrogeninnhold

For å beregne proteininnholdet i prøven ble nitrogeninnholdet multiplisert med proteinfaktor. Gjennomsnittlig %N i proteiner er omtrent 16 % slik at i beregning av proteininnhold multipliseres %N med 6,25 (1/0,16=6,25) [164]. Den nominelle verdien til glycin er 18,66 % nitrogen. Siden gjenvinningene er innenfor spesifikasjonsverdien på ≥ 98 % [165] ble ikke glycinrenheten korrigert i prøveresultatene. Formel (C.1.), (C.2.), (C.3.) og (C.4.) ble benyttet i beregningene av totalt nitrogen- og proteininnhold og for å vurdere renheten av referansestoffet glycin.

(C.1). $Vektfraksjon\ nitrogen, w_n = \frac{(V_{prøve} - V_{blank}) * z * c * f * Mn}{m_{prøve} * 1000}$

(C.2.) $Totalt\ Nitrogen = w_n * 100\ \%$

(C.3). $Totalt\ Protein = w_n * PF * 100\ \%$

(C.4.) $\%N_{Gly} = \frac{\%N * 100}{P}$

Der $V_{prøve}$ = mengde titrant for prøve [ml]
V_{blank} = mengde titrant for blank [ml]
z = molar valensfaktor
c = konsentrasjon av titrant [mol/l]
f = titrantfaktor (1000)
Mn =molekylvekt nitrogen [14,007 g/mol]
$m_{prøve}$ = vekt av prøve [g]
PF = prøvespsesifikk proteinfaktor (6,25)
P = Renhet av referansestoffet glycin [%]

Tabell Vedlegg C-1: Rådata for totalt nitrogen- og totalt proteininnhold for FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***KON1***	***KON2***	***BHT1***	***BHT2***	***PG1***	***PG2***	***CA1***	***CA2***	***AA1***	***AA2***	***R1***	***R2***
$V_{prøve}$	9,906	14,439	24,363	24,191	24,88	25,067	24,204	24,385	24,031	24,069	8,769	8,664
V_{Blank}	0,337	0,337	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,33	0,33
$m_{prøve}$	0,2033	0,3004	0,5054	0,502	0,5044	0,5075	0,5012	0,5047	0,505	0,5071	0,991	1,0405
w_n	0,132	0,132	0,133	0,133	0,136	0,136	0,133	0,133	0,131	0,131	0,024	0,022
%N	**13,19**	**13,15**	**13,32**	**13,31**	**13,63**	**13,65**	**13,34**	**13,35**	**13,14**	**13,11**	**2,39**	**2,24**
%Pr	**82,41**	**82,19**	**83,22**	**83,19**	**85,18**	**85,31**	**83,37**	**83,42**	**82,14**	**81,93**	**14,91**	**14,02**

Vedlegg D

SH-grupper

For å beregne konsentrasjonen av tiolgrupper (C_{SH}) ble formel (D.1.) brukt:

(D.1.) $$C_{SH}\left[\frac{mol}{l}\right] = \frac{A*V_{total}}{b*E*V_{prøve}}$$

A = absorbans

V_{total} = totalt volum i kyvette [ml]

b = lysvei [cm]

E = ekstinsjonskoeffisient for TNB (14290 M^{-1} cm^{-1})

$V_{prøve}$ = volum av prøve i kyvette [ml]

Tabell Vedlegg D-1: Rådata for kvantifisering av SH-grupper for FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***KON***	***BHT***	***PG***	***CA***	***AA***	***Råstoff***
VLP [%]	0,820	0,959	0,973	0,922	0,827	0,025
VLP [mg/ml]	8,76	9,68	10,22	9,68	8,49	25,6875
Absorbans:						
A1	0,046	0,07	0,084	0,125	0,077	0,19
A2	0,051	0,076	0,087	0,13	0,075	0,196
A3	0,046	0,072	0,085	0,143	0,055	0,191
Gjennomsnitt A	0,048	0,073	0,085	0,133	0,069	0,192
SD	0,003	0,003	0,002	0,009	0,012	0,003
C [mol/l]	3,34E-05	7,04E-05	5,97E-05	9,28E-05	4,83E-05	1,35E-04
C [nmol/mg protein]	3,8	5,0	5,8	9,6	5,6	53,84
SD	0,2	0,2	0,1	0,7	1,0	0,90

Tabell Vedlegg D-2: Rådata for kvantifisering av SH-grupper for FPH lagret to måneder.

2 mnd	***KON***	***BHT***	***PG***	***CA***	***AA***
VLP [%] Lowry	0,925	0,763	0,890	0,861	0,782
VLP [mg/ml]	9,36	7,81	9,01	8,90	8,40
Absorbans:					
A1	0,048	0,035	0,076	0,082	0,039
A2	0,049	0,039	0,081	0,09	0,035
A3	0,049	0,037	0,079	0,085	0,035
Gjennomsnitt A	0,049	0,037	0,079	0,086	0,036
SD	0,001	0,002	0,003	0,004	0,002
C [mol/l]	3,41E-05	2,59E-05	5,51E-05	5,99E-05	2,54E-05
C [nmol/mg protein]	3,6	3,3	6,1	6,7	3,0
SD	0,0	0,2	0,2	0,3	0,2

Tabell Vedlegg D-3: Rådata for kvantifisering av SH-grupper for FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***KON***	***BHT***	***PG***	***CA***	***AA***
VLP [%] Lowry	0,930	0,886	0,897	0,808	0,765
VLP [mg/ml]	9,5697	9,73714	9,05073	8,77488	8,37675
Absorbans:					
A1	0,036	0,032	0,053	0,05	0,052
A2	0,036	0,032	0,055	0,051	0,051
A3	0,036	0,03	0,056	0,05	0,051
Gjennomsnitt A	0,036	0,031	0,055	0,050	0,051
SD	0,000	0,001	0,002	0,001	0,001
C [mol/l]	2,52E-05	2,19E-05	3,83E-05	3,52E-05	3,59E-05
C [nmol/mg protein]	2,63	2,25	4,23	4,01	4,29
SD	0,00	0,08	0,12	0,05	0,05

Tabell Vedlegg D-4: Rådata for kvantifisering av SH-grupper for FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***KON***	***BHT***	***PG***	***CA***	***AA***
VLP [%] Lowry	0,832	0,793	0,839	0,806	0,787
[VLP]	8,51	8,45	8,48	8,79	8,04
Absorbans:					
A1	0,029	0,027	0,031	0,035	0,040
A2	0,029	0,029	0,031	0,036	0,040
A3	0,029	0,026	0,031	0,036	0,039
Gjennomsnitt A	0,029	0,027	0,031	0,036	0,040
SD	0,000	0,002	0,000	0,001	0,001
C [mol/l]	2,03E-05	1,91E-05	2,17E-05	2,50E-05	2,78E-05
C [nmol/mg protein]	2,38	2,26	2,56	2,84	3,45
SD	0,00	0,13	0,00	0,05	0,05

Vedlegg E

Hydrolysegrad

I beregning av % frie aminogrupper og %DH ble formel (E.1) og (E.2.) brukt:

(E.1.) $$\%\ frie\ aminogrupper\ (D) = \frac{A*B*14{,}007*100}{C*1000}$$

(E.2.) $$Hydrolysegrad\ (\%) = \frac{D*100}{E}$$

A = Volum NaOH [ml]

B = Konsentrasjonen av NaOH benyttet for titrering (0,1 M)

C= m prøve [g]

E= % Nitrogen (Kjeldahl)

Tabell Vedlegg E-1: Rådata for bestemmelse av frie aminogrupper i FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***m1 FPH [g]***	***m2 FPH [g]***	***V1 [ml]***	***V2 [ml]***	***Frie amino-grupper 1 [%]***	***Frie amino-grupper 2 [%]***	***Snitt frie amino-grupper [%]***	***SD***
KON	1,5064	1,5077	22,0402	22,1003	2,05	2,05	2,05	0,00
BHT	1,5001	1,5082	22,4007	22,4209	2,09	2,08	2,09	0,01
PG	1,5007	1,502	21,8422	21,9977	2,04	2,05	2,05	0,01
CA	1,502	1,5077	22,7318	22,6799	2,12	2,11	2,11	0,01
AA	1,5066	1,5028	21,7713	21,9401	2,02	2,04	2,03	0,01

Tabell Vedlegg E-2: Rådata for bestemmelse av frie aminogrupper i FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***m1 FPH [g]***	***m2 FPH [g]***	***V1 [ml]***	***V2 [ml]***	***Frie amino-grupper 1 [%]***	***Frie amino-grupper 2 [%]***	***Snitt frie amino-grupper [%]***	***SD***
KON	1,5018	1,5085	23,356	23,36	2,18	2,17	2,17	0,01
BHT	1,5040	1,5008	22,879	22,40	2,13	2,09	2,11	0,03
PG	1,5022	1,5092	23,694	24,04	2,21	2,23	2,22	0,02
CA	1,5062	1,5089	24,555	24,58	2,28	2,28	2,28	0,00
AA	1,5007	1,5043	22,688	22,82	2,12	2,12	2,12	0,01

Tabell Vedlegg E-3: Rådata for bestemmelse av hydrolysegrad i FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***%N***	***%DH 1***	***%DH 2***	***%DH***	***SD***
KON	13,17	15,56	15,59	15,58	0,02
BHT	13,31	15,71	15,64	15,68	0,05
PG	13,64	14,95	15,04	14,99	0,07
CA	13,34	15,89	15,79	15,84	0,07
AA	13,13	15,42	15,57	15,50	0,11

Tabell Vedlegg E-4: Rådata for bestemmelse av hydrolysegrad i FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***%N***	***%DH 1***	***%DH 2***	***%DH***	***SD***
KON	13,17	16,54	16,47	16,51	0,05
BHT	13,31	16,01	15,71	15,86	0,21
PG	13,64	16,20	16,36	16,28	0,12
CA	13,34	17,12	17,11	17,11	0,01
AA	13,13	16,13	16,18	16,16	0,04

Vedlegg F

Aminosyreinnhold

F.1. Totalt aminosyreinnhold

Tabell Vedlegg F-1: Rådata for total aminosyresammensetning for KON som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,2491	7,5435	7,1678	41,8	1,1
Glu	10,4468	10,9923	10,5350	68,3	1,9
Asn	0,0091	0,0014	0,0024	0,0	0,0
His	1,1883	1,2585	1,2997	8,5	0,4
Ser	4,5522	4,5110	4,3161	19,3	0,5
Gln	0,2290	0,2522	0,2141	1,5	0,1
Gly/Arg	14,3201	14,9838	14,3335	70,8	1,8
Thr	4,0753	4,2393	3,8482	20,3	1,0
Ala	9,9303	10,3847	9,8271	35,4	1,0
Tyr	0,0524	0,0303	0,0449	0,3	0,1
Met	2,1251	2,1989	2,1113	16,4	4,1
Val	3,2441	3,2913	3,1577	13,7	3,7
Phe	1,9149	1,9027	1,8350	14,4	1,4
Ile	2,1859	2,2358	2,0727	17,5	9,3
Leu	5,0251	5,2115	4,9511	28,8	0,9
Lys	5,2496	5,3523	5,1329	33,3	0,7
Totalt				390,3	12,8

Tabell Vedlegg F-2: Rådata for total aminosyresammensetning for KON lagret 2 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,6746	10,5702	6,6135	44,3	0,8
Glu	9,2931	11,8886	9,3512	63,6	0,7
Asn	0,0009	0,5211	0,0401	1,0	0,2
His	1,2917	3,6417	1,3344	13,8	0,1
Ser	5,4563	15,2216	4,5046	35,2	3,2
Gln	0,2692	0,4000	0,1546	1,7	0,5
Gly/Arg	14,8377	19,7583	12,9385	75,2	7,5
Thr	3,6854	6,5208	3,7026	22,6	0,2
Ala	9,8327	14,9334	9,0181	38,7	2,5
Tyr	0,8030	0,7411	0,0892	4,3	4,1
Met	1,8745	2,5430	1,8769	13,3	0,2
Val	3,0208	4,7737	2,9539	17,2	0,5
Phe	1,7696	2,6370	1,7496	14,6	0,3
Ile	2,0425	3,1577	1,9929	13,1	0,4
Leu	4,6639	6,3077	4,5112	28,2	1,0
Lys	4,7689	6,3381	4,4549	32,2	1,9
Totalt				353,7	23,5

Tabell Vedlegg F-3: Rådata for total aminosyresammensetning for KON lagret 4 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,9201	7,8108	7,0052	39,5	1,7
Glu	10,0739	11,3907	10,2106	64,6	2,8
Asn	0,0242	0,0221	0,0168	0,1	0,0
His	0,6729	1,5046	1,5313	8,0	3,1
Ser	4,3327	5,0872	4,3043	18,9	1,4
Gln	0,1714	0,3548	0,2846	1,6	0,5
Gly/Arg	13,3645	15,7873	14,2795	67,3	4,1
Thr	3,4683	4,2169	3,6766	18,1	1,4
Ala	9,5045	10,6945	9,4829	33,3	1,5
Tyr	0,0337	0,3180	0,9778	3,4	3,8
Met	1,8302	2,2768	2,0639	12,8	1,1
Val	3,2406	3,5906	3,3480	15,9	0,5
Phe	1,7762	2,0468	1,8815	13,3	0,7
Ile	2,0892	2,3740	2,2499	12,0	0,5
Leu	4,7493	5,3486	4,8692	26,8	1,0
Lys	4,9624	5,6535	5,0942	31,8	1,4
Totalt				367,7	21,4

.

Tabell Vedlegg F-4: Rådata for total aminosyresammensetning for KON lagret 6 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,3112	7,7879	7,6261	41,3	0,6
Glu	10,6108	11,1393	11,0496	66,8	0,5
Asn	0,0066	0,0081	0,0064	0,0	0,0
His	1,4339	1,5115	1,3652	9,3	0,5
Ser	4,3106	4,6264	4,6144	18,6	0,3
Gln	0,3039	0,3110	0,2839	1,8	0,1
Gly/Arg	14,9109	15,6938	15,4193	71,2	0,8
Thr	3,9768	4,0384	3,9551	19,1	0,5
Ala	9,8792	10,4781	10,2711	34,3	0,5
Tyr	1,0013	1,1132	1,0516	8,1	0,3
Met	2,1954	2,3489	2,2500	14,1	0,3
Val	3,6290	3,8603	3,7355	17,5	0,3
Phe	2,0023	2,1358	1,9797	14,2	0,6
Ile	2,4673	2,6341	2,4788	13,5	0,4
Leu	5,2004	5,5475	5,3689	28,8	0,6
Lys	5,4089	5,7882	5,5581	33,9	0,8
Totalt				392,6	6,4

Tabell Vedlegg F-5: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt BHT som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	8,2434	8,1839	7,1455	43,0	4,0
Glu	11,5472	11,8563	10,4067	69,1	5,1
Asn	0,0009	0,0345	0,0016	0,1	0,1
His	1,4917	0,2294	1,1733	6,4	4,5
Ser	7,1473	4,4955	4,4142	22,3	7,3
Gln	0,4128	0,1643	0,2146	1,6	0,9
Gly/Arg	18,8484	16,3755	14,9883	78,2	11,5
Thr	4,6621	4,3402	3,7252	20,4	2,7
Ala	12,3123	11,5936	9,7721	37,9	5,2
Tyr	0,1173	0,0268	0,0226	0,4	0,4
Met	2,2684	2,1819	2,1133	13,6	0,9
Val	3,5963	3,7642	3,1148	16,4	1,6
Phe	2,0911	2,0207	1,8217	13,8	1,3
Ile	2,4052	2,4278	2,0546	12,3	1,2
Leu	5,5363	5,5752	4,8692	28,6	2,4
Lys	5,6236	5,7364	5,1533	33,5	2,2
Totalt				397,8	47,0

Tabell Vedlegg F-6: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt BHT lagret 2 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	8,1533	7,2669	7,1145	42,8	3,6
Glu	10,9803	10,6168	10,4671	68,4	2,4
Asn	0,0040	0,0014	0,0007	0,0	0,0
His	0,4079	1,0756	1,1698	6,0	2,8
Ser	6,7633	4,4119	4,1778	22,1	6,4
Gln	0,2078	0,1151	0,1171	0,9	0,3
Gly/Arg	17,9962	15,0620	14,8102	77,6	9,2
Thr	4,2861	3,8258	3,8707	20,0	1,4
Ala	12,1354	10,2365	9,9166	37,9	4,5
Tyr	0,0377	0,0349	0,0255	0,3	0,1
Met	2,1500	2,0253	2,0546	13,5	0,5
Val	3,6998	3,0609	3,0916	16,1	1,9
Phe	2,0501	1,8191	1,8425	13,9	1,0
Ile	2,4682	1,9417	2,0352	12,0	1,6
Leu	5,5381	4,6788	4,7788	28,0	2,8
Lys	5,6178	4,9952	4,9027	32,8	2,7
Totalt				392,4	35,4

Tabell Vedlegg F-7: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt BHT lagret 4 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,7940	7,6065	6,8534	39,2	2,2
Glu	7,8978	8,8053	8,4072	51,9	1,7
Asn	0,0047	0,0068	0,0002	0,0	0,0
His	1,3918	1,3986	1,3783	9,2	0,3
Ser	4,5245	5,3647	4,4207	20,0	2,0
Gln	0,3286	0,3326	0,3862	2,1	0,2
Gly/Arg	16,6220	18,8653	16,3486	81,5	6,1
Thr	3,9132	4,4330	3,8094	19,7	1,5
Ala	10,4236	11,8807	10,1910	37,0	3,0
Tyr	0,9655	1,0898	0,9477	7,9	0,6
Met	2,0945	2,3873	2,0409	13,7	1,1
Val	3,3199	3,7184	3,2343	16,3	1,2
Phe	1,9059	2,1377	1,8598	13,9	1,0
Ile	2,2584	2,5300	2,1950	12,7	0,9
Leu	4,8286	5,4350	4,7151	27,2	2,0
Lys	5,1803	5,8625	5,0106	33,0	2,7
Totalt				385,2	25,6

Tabell Vedlegg F-8: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt BHT lagret 6 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	9,2949	8,8033	8,2521	47,5	3,0
Glu	12,0986	11,3664	10,7377	69,2	4,3
Asn	0,0018	0,0025	0,0025	0,0	0,0
His	1,6851	1,1891	1,7439	9,9	1,7
Ser	6,2404	5,9168	5,3575	23,9	2,0
Gln	0,4001	0,2946	0,4206	2,2	0,4
Gly/Arg	21,6333	20,1857	19,2515	93,9	5,6
Thr	5,3827	4,9569	4,6398	23,7	1,8
Ala	13,6870	12,9833	12,2089	43,3	2,7
Tyr	1,2017	0,0304	1,0315	5,7	4,8
Met	2,7648	2,5131	2,4599	15,9	0,9
Val	4,4219	4,0297	3,8984	19,2	1,2
Phe	2,4847	2,2804	2,2074	16,1	0,9
Ile	3,0287	2,7209	2,6732	14,9	0,9
Leu	6,3198	5,8747	5,6191	31,6	1,9
Lys	6,6459	6,1780	5,9677	37,7	2,0
Totalt				454,9	25,9

Tabell Vedlegg F-9: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt PG som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	8,7680	8,6756	7,4202	46,6	3,7
Glu	12,1559	12,6522	10,7754	74,9	6,1
Asn	0,0047	0,0011	0,0008	0,0	0,0
His	1,8050	1,4979	1,2319	10,1	1,6
Ser	7,6257	5,3664	4,5028	24,7	6,0
Gln	0,4015	0,2782	0,2302	1,9	0,5
Gly/Arg	19,4647	17,7609	14,9769	83,3	8,9
Thr	4,9658	4,8143	4,0449	22,7	2,1
Ala	12,5131	12,0095	9,7394	39,6	4,5
Tyr	1,1762	1,2845	0,0811	6,7	5,3
Met	2,3925	2,6480	2,2175	15,5	1,5
Val	3,9014	3,9363	3,3095	18,0	1,6
Phe	2,2657	2,3417	1,9913	15,8	1,3
Ile	2,6177	2,6610	2,2225	13,8	1,2
Leu	5,9879	6,0728	5,1616	31,7	2,6
Lys	6,2112	6,5157	5,4677	38,0	3,4
Totalt				443,3	45,0

Tabell Vedlegg F-10: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt PG lagret 2 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,9084	6,5561	7,6543	38,6	4,1
Glu	10,0473	9,3816	11,0863	62,5	6,9
Asn	0,0085	0,0038	0,0049	0,0	0,0
His	0,6972	0,7163	1,3241	6,0	2,5
Ser	3,9137	3,7044	4,3887	16,6	1,9
Gln	0,1927	0,1719	0,1971	1,1	0,1
Gly/Arg	13,3403	12,8131	15,1996	64,4	7,5
Thr	3,3788	3,4441	3,9793	17,3	2,0
Ala	9,2070	8,9812	10,5191	32,4	3,7
Tyr	0,0232	0,0240	0,4833	1,4	2,1
Met	1,8818	1,7804	2,0887	12,0	1,3
Val	3,0569	2,8639	3,3326	14,5	1,5
Phe	1,7914	1,6019	1,9060	12,4	1,4
Ile	2,0502	1,8074	2,0134	10,5	0,9
Leu	4,7433	4,2813	4,9782	25,1	2,5
Lys	4,8457	4,5765	5,3692	30,1	3,2
Totalt				344,9	40,9

Tabell Vedlegg F-11: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt PG lagret 4 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,9271	8,1368	7,4021	43,4	1,4
Glu	9,7356	9,7697	8,8125	58,7	2,2
Asn	0,0001	0,0182	0,0366	0,1	0,1
His	1,7159	1,3514	0,2640	7,3	4,9
Ser	5,0507	5,3180	4,3395	20,6	1,8
Gln	0,5305	0,5185	0,2160	2,6	1,1
Gly/Arg	18,1371	18,5060	15,9028	82,8	5,1
Thr	4,7062	4,9730	4,3362	22,8	1,2
Ala	11,8101	12,1111	11,0562	39,9	1,2
Tyr	1,1382	0,0201	0,0076	3,0	5,0
Met	2,3507	2,2740	1,7139	13,3	1,9
Val	3,8216	3,8497	3,6409	18,0	0,3
Phe	2,1438	2,1686	1,7521	14,3	1,4
Ile	2,5947	2,6096	2,3330	13,7	0,6
Leu	5,5056	5,6421	5,0051	29,3	1,3
Lys	5,9588	6,1125	5,4247	36,0	1,6
Totalt				405,9	26,2

Tabell Vedlegg F-12: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt PG lagret 6 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	8,1852	7,4960	8,6359	44,5	3,3
Glu	10,4778	9,6553	11,1909	64,3	4,8
Asn	0,0055	0,0020	0,0050	0,0	0,0
His	1,4850	1,3968	1,3324	9,2	0,8
Ser	5,2431	4,8680	5,6200	21,8	1,5
Gln	0,4269	0,4130	0,5439	2,8	0,4
Gly/Arg	18,1564	16,8384	19,0808	84,4	5,6
Thr	4,7210	4,4725	5,2740	23,2	1,7
Ala	11,8432	10,6757	12,6095	39,7	3,4
Tyr	1,1695	1,0674	0,0344	6,0	5,0
Met	2,4329	2,2295	2,5221	15,0	1,1
Val	3,9679	3,6491	4,0971	18,5	1,3
Phe	2,1679	2,0130	2,3213	15,2	1,1
Ile	2,6874	2,5039	2,7889	14,4	0,9
Leu	5,5703	5,1841	6,0051	30,1	2,2
Lys	6,0055	5,4991	6,2012	36,1	2,6
Totalt				425,2	28,5

Tabell Vedlegg F-13: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt CA som ikke ble lagret

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,4024	5,4812	5,7467	35,1	5,9
Glu	10,7381	7,7619	8,4684	57,0	9,8
Asn	0,0142	0,0025	0,0001	0,0	0,0
His	0,4729	0,9149	0,9861	5,3	1,9
Ser	4,4096	3,0270	3,3827	15,4	3,1
Gln	0,0481	0,1042	0,1092	0,5	0,2
Gly/Arg	14,8319	11,0544	11,7651	60,4	9,6
Thr	3,7987	2,7711	3,1649	16,1	2,5
Ala	10,3632	7,4665	7,8711	29,9	5,5
Tyr	0,0387	0,0938	0,6126	2,0	2,5
Met	2,0428	1,6279	1,7414	11,6	1,4
Val	3,4047	2,4086	2,5882	13,6	2,6
Phe	1,8860	1,4789	1,5467	11,8	1,6
Ile	2,2929	1,6106	1,7449	10,5	2,0
Leu	5,1599	3,7647	4,0008	23,9	4,1
Lys	5,4045	3,9719	4,1370	28,3	4,9
Totalt				321,6	49,7

.

Tabell Vedlegg F-14: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt CA lagret 2 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,7437	6,8376	6,7628	37,7	1,6
Glu	9,8170	10,0082	9,6927	61,3	3,3
Asn	0,0017	0,0004	0,0433	0,1	0,1
His	1,1991	1,2306	0,1524	5,8	4,2
Ser	4,0548	4,1334	3,7015	16,7	1,6
Gln	0,2069	0,1773	0,0479	0,9	0,5
Gly/Arg	13,8876	14,1451	12,8952	64,6	5,7
Thr	3,7265	3,7331	3,3876	17,7	1,7
Ala	9,4350	9,5825	9,5154	32,6	1,3
Tyr	0,7563	0,4802	0,0384	3,4	2,9
Met	1,9765	2,0388	1,6632	12,0	1,7
Val	3,0489	3,1127	3,1552	14,8	0,4
Phe	1,7825	1,8193	1,3942	11,9	2,1
Ile	2,0664	2,0806	2,1085	11,4	0,4
Leu	4,3540	4,7140	4,3285	24,4	1,9
Lys	4,6497	4,7723	4,4974	28,7	2,0
Totalt				343,9	30,6

Tabell Vedlegg F-15: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt CA lagret 4 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,5073	7,0594	7,4685	39,9	1,9
Glu	11,6305	10,7308	11,3708	68,5	4,0
Asn	0,0074	0,0068	0,0064	0,0	0,0
His	1,5211	1,4172	1,4405	9,4	0,6
Ser	4,6230	4,3538	4,5093	18,5	0,9
Gln	0,2921	0,3086	0,2642	1,7	0,2
Gly/Arg	15,0740	14,2716	15,1015	68,5	3,1
Thr	4,1777	3,7192	3,9308	18,8	1,5
Ala	9,9584	9,2972	9,9776	32,7	1,7
Tyr	1,0276	0,8929	1,0131	7,5	0,7
Met	2,1339	2,0092	2,1272	12,9	0,6
Val	3,3568	3,1461	3,3805	15,4	0,8
Phe	1,8535	1,7682	1,9172	12,8	0,5
Ile	2,1893	2,0589	2,3043	11,6	0,6
Leu	4,8904	4,6436	5,0237	25,9	1,1
Lys	5,2417	4,8997	5,2377	31,0	1,6
Totalt				375,1	19,2

Tabell Vedlegg F-16: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt CA lagret 6 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,7606	6,6898	7,6195	40,2	4,3
Glu	9,7992	8,4194	9,6129	56,9	6,2
Asn	0,0136	0,0133	0,0016	0,1	0,0
His	1,6065	1,3475	1,4711	9,6	1,0
Ser	4,9688	4,3064	4,8274	19,4	2,0
Gln	0,6073	0,4437	0,4685	3,1	0,5
Gly/Arg	17,8622	15,2435	17,5474	78,7	8,9
Thr	4,2213	3,7107	4,3925	19,7	2,4
Ala	11,2300	9,6119	11,0647	35,9	4,0
Tyr	1,1745	0,9820	1,0590	8,3	0,9
Met	2,3349	2,0120	2,2768	13,8	1,4
Val	3,7153	3,1573	3,5034	16,3	1,7
Phe	2,1320	1,8206	2,0525	14,0	1,5
Ile	2,3551	2,1485	2,3831	12,3	1,1
Leu	5,5136	4,6443	5,2517	27,6	3,0
Lys	5,9945	5,0562	5,6805	33,9	3,7
Totalt				389,9	42,0

Tabell Vedlegg F-17: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt AA som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,9991	*5,4804*	6,8719	39,8	0,7
Glu	10,2782	*8,0687*	9,8820	64,8	2,1
Asn	0,0009	*0,0026*	0,0026	0,0	0,0
His	1,2395	*0,9285*	1,3616	8,9	0,6
Ser	4,3797	*3,2468*	4,1496	18,5	0,8
Gln	0,1954	*0,1015*	0,2561	1,4	0,3
Gly/Arg	14,5918	*11,3248*	14,3233	70,6	1,2
Thr	3,7613	*2,8282*	3,6678	18,7	0,4
Ala	9,8376	*7,5640*	9,6311	34,5	0,7
Tyr	0,5714	*0,7931*	0,8070	5,6	1,3
Met	2,1056	*1,6603*	2,1108	13,8	0,0
Val	3,1341	*2,4676*	3,1222	15,4	0,1
Phe	1,8631	*1,4770*	1,8547	13,6	0,1
Ile	2,0465	*1,6641*	2,1058	11,7	0,2
Leu	4,8319	*3,8200*	4,8288	27,2	0,1
Lys	5,1083	*3,9440*	5,0927	32,5	0,2
Totalt				377,1	4,1

Tabell Vedlegg F-18: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt AA lagret 2 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,4914	6,8200	6,7642	35,9	1,4
Glu	9,5953	9,7903	9,7415	58,4	1,7
Asn	0,0049	0,0049	0,0037	0,0	0,0
His	1,0095	1,2358	0,8239	6,5	1,2
Ser	3,8338	4,1978	4,1256	16,4	0,9
Gln	0,1988	0,2219	0,1645	1,2	0,1
Gly/Arg	13,3634	14,2592	13,9078	63,2	2,5
Thr	3,3557	3,7499	3,8342	17,2	1,5
Ala	9,1459	9,7420	9,4694	31,3	1,2
Tyr	0,0052	0,1119	0,0257	0,4	0,4
Met	1,8931	2,0016	1,8973	11,8	0,3
Val	2,9165	3,0268	3,0257	13,8	0,5
Phe	1,6778	1,8360	1,7494	12,0	0,5
Ile	1,9133	2,0206	2,0380	10,5	0,5
Leu	4,4196	4,7264	4,6712	24,3	1,1
Lys	4,4803	4,7046	4,6454	27,5	1,0
Totalt				330,2	12,6

Tabell Vedlegg F-19: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt AA lagret 4 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,5853	*3,1864*	6,3025	30,4	5,3
Glu	10,9039	*4,5109*	9,1148	48,9	8,3
Asn	0,0095	*0,0006*	0,0012	0,0	0,0
His	1,3983	*0,5945*	1,3598	7,1	0,3
Ser	4,7607	*1,7878*	3,7709	13,9	3,0
Gln	0,2722	*0,1101*	0,2242	1,2	0,2
Gly/Arg	15,8426	*6,4309*	13,1383	53,7	9,5
Thr	4,0888	*1,6905*	3,4547	14,4	2,3
Ala	10,4980	*4,2549*	8,6572	25,7	4,7
Tyr	1,0445	*0,0407*	0,6492	4,4	2,2
Met	2,2096	*0,8960*	1,9277	10,2	1,4
Val	3,4852	*1,4592*	2,9371	12,1	1,9
Phe	1,9520	*0,8650*	1,7037	10,3	1,3
Ile	2,2801	*0,9845*	1,9823	9,2	1,2
Leu	5,2794	*2,2393*	4,4458	20,9	3,4
Lys	5,5005	*2,2796*	4,5552	24,4	4,3
Totalt				353,3	49,2

Tabell Vedlegg F-20: Rådata for total aminosyresammensetning for FPH tilsatt AA lagret 6 måneder.

Aminosyre	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 1***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 2***	***[Aminosyrer] [nmol/ml] 3***	***[mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,5930	8,7953	8,0361	43,3	2,5
Glu	9,6768	11,2137	10,2544	62,0	3,6
Asn	0,0038	0,0070	0,0021	0,0	0,0
His	1,4029	1,5790	1,5175	9,5	0,4
Ser	4,8855	5,7290	5,2684	21,3	1,3
Gln	0,3372	0,4740	0,3543	2,3	0,4
Gly/Arg	17,9300	20,9094	19,0354	87,5	5,4
Thr	4,4104	5,0195	4,6348	21,9	1,1
Ala	11,1189	13,0931	12,0511	39,7	2,5
Tyr	1,0715	1,2162	1,1345	8,6	0,4
Met	2,0087	2,5783	2,3734	14,1	1,4
Val	3,6107	4,1351	3,8014	17,6	0,9
Phe	1,9328	2,3720	2,1694	14,7	1,2
Ile	2,1890	2,8041	2,5797	13,2	1,3
Leu	4,9568	6,1532	5,6298	29,2	2,5
Lys	5,8547	6,8804	6,3510	37,7	2,3
Totalt				422,6	26,9

F.2. Essensielle, aromatiske og hydrofobe aminosyrer

Tabell Vedlegg F-21: Mengde EAS, HAS og AAS [mg/g FPH] i råstoff og i FPH som ikke ble lagret.

0 mnd	***KON [mg/g FPH]***	***SD***	***BHT [mg/g FPH]***	***SD***	***PG [mg/g FPH]***	***SD***	***CA [mg/g FPH]***	***SD***	***AA [mg/g FPH]***	***SD***	***Råstoff [mg/g]***	***SD***
HAS												
Ala	35,4	1,0	37,95	5,2	39,62	4,5	29,90	5,5	34,46	0,66	22,6	0,7
Ile	14,4	1,4	13,84	1,3	15,82	1,3	11,83	1,6	13,62	0,10	3,8	0,1
Leu	17,5	9,3	12,34	1,2	13,82	1,2	10,46	2,0	11,69	0,19	7,6	0,3
Met	0,0	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,00	4,6	0,1
Phe	13,7	3,7	16,43	1,6	17,99	1,6	13,63	2,6	15,44	0,11	6,6	0,2
Tyr	0,3	0,1	0,44	0,4	6,71	5,3	1,97	2,5	5,60	1,33	7,9	0,1
Val	16,4	4,1	13,64	0,9	15,51	1,5	11,61	1,4	13,77	0,03	8,3	0,2
Sum	97,7	11,0	94,63	5,8	109,46	7,5	79,39	7,2	94,58	1,5	61,48	0,9
AAS												
His	8,50	0,4	6,38	4,5	10,10	1,6	5,33	1,9	8,88	0,6	17,9	1,2
Phe	13,70	1,4	16,43	1,3	17,99	1,3	13,63	1,6	15,44	0,1	6,6	0,2
Tyr	0,34	0,1	0,44	0,4	6,71	5,3	1,97	2,5	5,60	1,3	7,9	0,1
Sum	22,54	1,4	23,26	4,7	34,80	5,7	20,92	3,5	29,92	1,4	32,44	1,2
EAS												
His	8,50	0,38	6,38	4,46	10,10	1,62	5,33	1,86	8,88	0,55	17,9	1,2
Ile	14,41	1,36	13,84	1,27	15,82	1,29	11,83	1,57	13,62	0,10	3,8	0,1
Leu	17,46	9,31	12,34	1,24	13,82	1,24	10,46	2,00	11,69	0,19	7,6	0,3
Lys	28,82	0,91	28,63	2,44	31,72	2,57	23,93	4,14	27,21	0,13	22,5	0,6
Met	16,38	4,1	13,64	0,9	15,51	1,5	11,61	1,4	13,8	0,0	4,6	0,1
Phe	13,70	1,36	16,43	1,27	17,99	1,29	13,63	1,57	15,44	0,10	6,6	0,2
Thr	20,33	0,98	20,40	2,74	22,75	2,08	16,10	2,52	18,70	0,41	13,3	1,0
Val	16,38	4,10	13,64	0,90	15,51	1,55	11,61	1,36	13,77	0,03	8,3	0,2
Sum	119,60	11,2	125,30	6,3	143,21	4,8	104,49	6,3	123,12	0,7	84,64	1,7

Tabell Vedlegg F-22: Mengde EAS, HAS og AAS [mg/g FPH] i FPH lagret to måneder.

2 mnd	***KON [mg/g FPH]***	***SD***	***BHT [mg/g FPH]***	***SD***	***PG [mg/g FPH]***	***SD***	***CA [mg/g FPH]***	***SD***	***AA [mg/g FPH]***	***SD***
HAS										
Ala	38,70	2,52	37,91	4,55	32,37	3,66	32,61	1,35	31,3	1,16
Ile	13,11	0,37	12,0	1,64	10,5	0,89	11,4	0,36	10,5	0,5
Leu	28,25	1,00	28,0	2,81	25,1	2,51	24,4	1,94	24,3	1,1
Met	13,31	0,18	13,49	0,51	11,96	1,29	12,01	1,73	11,78	0,28
Phe	14,60	0,3	13,88	1,02	12,4	1,37	11,87	2,1	12,02	0,54
Tyr	4,31	4,1	0,26	0,05	1,4	2,12	3,41	2,9	0,36	0,42
Val	17,16	0,5	16,13	1,88	14,5	1,49	14,84	0,4	13,80	0,54
Sum	129,44	5,0	121,72	6,0	108,32	5,5	110,49	4,7	103,97	1,9
AAS										
His	13,80	0,1	5,99	2,78	6,0	2,50	5,80	4,2	6,51	1,15
Phe	14,60	0,3	13,88	1,02	12,4	1,37	11,87	2,1	12,02	0,54
Tyr	4,31	4,1	0,26	0,05	1,4	2,12	3,41	2,9	0,36	0,42
Sum	32,71	4,1	20,14	3,0	19,76	3,6	21,08	5,5	18,88	1,3
EAS										
His	13,80	0,1	5,99	2,78	6,0	2,50	5,80	4,2	6,51	1,15
Ile	13,11	0,37	12,04	1,64	10,53	0,89	11,37	0,36	10,49	0,54
Leu	28,25	1,00	28,01	2,81	25,12	2,51	24,38	1,94	24,26	1,14
Lys	32,16	1,9	32,83	2,75	30,1	3,24	28,70	2,0	27,50	1,03
Met	13,31	0,18	13,49	0,51	11,96	1,29	12,01	1,73	11,78	0,28
Phe	14,60	0,3	13,88	1,02	12,4	1,37	11,87	2,1	12,02	0,54
Thr	22,64	0,2	20,00	1,41	17,3	2,02	17,66	1,7	17,17	1,47
Val	17,16	0,5	16,13	1,88	14,5	1,49	14,84	0,4	13,80	0,54
Sum	155,03	2,2	142,37	5,7	127,92	5,8	126,63	6,0	123,53	2,6

Tabell Vedlegg F-23: Mengde EAS, HAS og AAS [mg/g FPH] i FPH lagret fire måneder.

4 mnd	***KON [mg/g FPH]***	***SD***	***BHT [mg/g FPH]***	***SD***	***PG [mg/g FPH]***	***SD***	***CA [mg/g FPH]***	***SD***	***AA [mg/g FPH]***	***SD***
HAS										
Ala	33,34	1,5	37,01	2,95	39,9	1,23	32,65	1,7	25,71	4,65
Ile	12,00	0,5	12,66	0,93	13,7	0,57	11,64	0,6	9,17	1,23
Leu	26,76	1,0	27,15	2,00	29,3	1,30	25,87	1,1	20,91	3,38
Met	12,78	1,1	13,71	1,11	13,3	1,91	12,92	0,6	10,20	1,35
Phe	13,27	0,7	13,92	1,01	14,3	1,37	12,81	0,5	10,28	1,34
Tyr	3,44	3,8	7,85	0,57	3,0	5,00	7,52	0,7	4,39	2,19
Val	15,95	0,5	16,32	1,18	18,0	0,25	15,39	0,8	12,07	1,95
Sum	117,55	4,5	128,63	4,2	131,65	5,8	118,82	2,5	92,73	6,8
AAS										
His	8,02	3,1	9,17	0,29	7,3	4,87	9,44	0,6	7,10	0,27
Phe	13,27	0,7	13,92	1,01	14,3	1,37	12,81	0,5	10,28	1,34
Tyr	3,44	3,8	7,85	0,57	3,0	5,00	7,52	0,7	4,39	2,19
Sum	24,73	5,0	30,94	1,2	24,58	7,1	29,77	1,0	21,77	2,6
EAS										
His	8,02	3,1	9,17	0,29	7,3	4,87	9,44	0,6	7,10	0,27
Ile	12,00	0,5	12,66	0,93	13,7	0,57	11,64	0,6	9,17	1,23
Leu	26,76	1,0	27,15	2,00	29,3	1,30	25,87	1,1	20,91	3,38
Lys	31,82	1,4	32,97	2,68	36,0	1,59	30,97	1,6	24,42	4,31
Met	12,78	1,1	13,71	1,11	13,3	1,91	12,92	0,6	10,20	1,35
Phe	13,27	0,7	13,92	1,01	14,3	1,37	12,81	0,5	10,28	1,34
Thr	18,15	1,4	19,70	1,55	22,8	1,24	18,80	1,5	14,43	2,30
Val	15,95	0,5	16,32	1,18	18,0	0,25	15,39	0,8	12,07	1,95
Sum	138,75	4,1	145,59	4,3	154,75	5,9	137,86	2,8	108,58	6,7

Tabell Vedlegg F-24: Mengde EAS, HAS og AAS [mg/g FPH] i FPH lagret seks måneder.

6 mnd	***KON [mg/g FPH]***	***SD***	***BHT [mg/g FPH]***	***SD***	***PG [mg/g FPH]***	***SD***	***CA [mg/g FPH]***	***SD***	***AA [mg/g FPH]***	***SD***
HAS										
Ala	34,33	0,5	43,31	2,66	39,7	3,39	35,92	4,0	39,72	2,49
Ile	13,52	0,0	14,93	0,91	14,4	0,89	12,34	0,0	13,19	1,34
Leu	28,75	0,6	31,58	1,87	30,1	2,15	27,60	3,0	29,17	2,53
Met	14,05	0,3	15,90	0,91	15,0	1,06	13,76	1,4	14,05	1,44
Phe	14,20	0,6	16,08	0,94	15,2	1,07	13,99	1,5	14,68	1,20
Tyr	8,15	0,3	5,70	4,77	6,0	4,99	8,30	0,9	8,61	0,40
Val	17,54	0,3	19,18	1,18	18,5	1,26	16,28	1,7	17,64	0,93
Sum	130,55	1,1	146,67	6,1	138,84	6,8	128,19	5,8	137,05	4,4
AAS										
His	9,33	0,5	9,89	1,74	9,2	0,83	9,61	1,0	9,51	0,36
Phe	14,20	0,6	16,08	0,94	15,2	1,07	13,99	1,5	14,68	1,20
Tyr	8,15	0,3	5,70	4,77	6,0	4,99	8,30	0,9	8,61	0,40
Sum	31,67	0,8	31,67	5,2	30,40	5,2	31,90	2,0	32,79	1,3
EAS										
His	9,33	0,5	9,89	1,74	9,2	0,83	9,61	1,0	9,51	0,36
Ile	13,52	0,00	14,93	0,91	14,36	0,89	12,34	0,00	13,19	1,34
Leu	28,75	0,56	31,58	1,87	30,14	2,15	27,60	3,04	29,17	2,53
Lys	33,86	0,8	37,73	2,03	36,1	2,55	33,94	3,7	37,69	2,31
Met	14,05	0,3	15,90	0,91	15,0	1,06	13,76	1,4	14,05	1,44
Phe	14,20	0,6	16,08	0,94	15,2	1,07	13,99	0,6	14,68	1,20
Thr	19,09	0,5	23,73	1,77	23,2	1,74	19,75	2,4	21,92	1,08
Val	17,54	0,3	19,18	1,18	18,5	1,26	16,28	1,7	17,64	0,93
Sum	150,35	1,4	169,02	4,2	161,69	4,4	147,26	5,9	157,84	4,4

Tabell Vedlegg F-25: Andel HAS, AAS og EAS angitt i prosent i FPH og råstoff.

	KON vekt%	***SD***	***BHT vekt%***	***SD***	***PG vekt%***	***SD***	***CA vekt%***	***SD***	***AA vekt%***	***SD***	***Råstoff vekt%***	***SD***
0 mnd												
HAS (%)	25,0	11,7	23,79	13,3	24,69	12,2	24,68	17,9	25,08	1,9	29,0	3,8
AAS (%)	5,8	7,1	5,85	23,2	7,85	19,2	6,50	22,7	7,93	4,9	15,3	5,1
EAS (%)	30,6	9,9	31,50	12,8	32,30	10,7	32,49	16,6	32,65	1,2	39,9	4,0
NEAS (%)	30,81	13,7	29,63	26,8	32,54	22,8	31,19	28,9	33,01	5,3	44,3	6,3
2 mnd												
HAS (%)	36,60	7,7	31,02	10,3	31,40	12,9	32,13	9,9	31,48	4,2		
AAS (%)	9,25	14,2	5,13	17,3	5,73	21,5	6,13	27,7	5,72	8,0		
EAS (%)	43,83	6,8	36,29	9,9	37,09	12,7	36,82	10,1	37,40	4,4		
NEAS (%)	45,85	16,1	36,15	20,1	37,13	25,1	38,26	29,4	37,20	9,1		
4 mnd												
HAS (%)	31,97	7,0	33,39	7,4	32,44	7,8	31,67	5,5	26,25	15,8		
AAS (%)	6,73	20,9	8,03	7,7	6,06	29,6	7,94	6,2	6,16	18,3		
EAS (%)	37,73	6,5	37,79	7,3	38,13	7,5	36,75	5,5	30,74	15,2		
NEAS (%)	38,70	22,0	41,42	10,7	38,49	30,6	39,61	8,3	32,41	24,2		
6 mnd												
HAS (%)	33,26	1,8	32,25	7,1	32,65	8,3	32,87	11,7	32,43	7,1		
AAS (%)	8,07	3,1	6,96	17,3	7,15	18,3	8,18	12,4	7,76	7,5		
EAS (%)	38,30	1,9	37,16	6,2	38,03	7,2	37,77	11,5	37,35	6,9		
NEAS (%)	41,32	3,6	39,21	18,7	39,80	20,1	41,06	17,0	40,19	10,3		

Vedlegg G

Frie aminosyrer

Tabell Vedlegg G-1: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i KON som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,0577	6,5235	6,7641	6,7949	0,9	0,0
Glu	22,3537	23,4189	23,6937	24,3262	3,7	0,1
Asn	4,1506	4,3742	4,3310	4,5408	0,6	0,0
His	15,6554	15,7941	16,6590	15,6971	2,7	0,1
Ser	22,1883	24,9175	24,0863	24,8520	2,6	0,1
Gln	24,4939	26,4680	26,6161	28,0406	4,2	0,2
Gly/Arg	40,0072	44,0551	42,6336	42,7840	5,1	0,1
Thr	17,1531	15,8897	19,3993	20,3675	2,3	0,3
Ala	53,8413	58,9510	61,2497	58,8629	5,1	0,2
Tyr	11,2804	12,2551	12,0984	12,2849	2,4	0,1
Met	14,4167	16,2636	16,2205	16,7118	2,6	0,1
Val	22,6635	23,8063	23,8736	24,2230	2,9	0,1
Phe	11,1335	11,9854	12,1497	12,2541	2,2	0,1
Ile	10,9983	12,3973	12,6624	12,9507	1,7	0,1
Leu	35,1674	35,6842	36,5619	36,1846	5,0	0,1
Lys	28,2333	31,3783	28,1802	32,4865	4,7	0,1
Totalt					48,6	1,7

Tabell Vedlegg G-2: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i KON lagret to måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,1624	6,8576	7,6099	7,5622	1,0	0,1
Glu	22,8959	47,0490	52,7729	51,8857	6,9	2,0
Asn	3,8225	3,6650	4,0955	3,9313	0,5	0,0
His	12,8437	12,7364	14,3116	14,4214	2,3	0,2
Ser	22,2897	21,2646	23,1758	23,0004	2,4	0,1
Gln	18,4308	19,0561	21,3983	20,9200	3,1	0,3
Gly/Arg	37,5490	36,0169	39,9333	39,9018	4,6	0,3
Thr	17,9415	17,1549	20,4642	18,6046	2,3	0,2
Ala	54,4963	53,3411	60,1184	58,6548	4,9	0,3
Tyr	10,8763	10,5599	11,5175	11,4236	2,2	0,1
Met	13,3894	12,8984	16,0874	13,9981	2,3	0,2
Val	20,8702	20,5895	20,9335	22,8888	2,6	0,1
Phe	10,5141	10,1270	11,0116	11,5682	2,0	0,1
Ile	10,5824	10,5754	11,6930	11,4434	1,5	0,1
Leu	33,9822	31,8232	34,9301	34,3537	4,7	0,2
Lys	27,2854	25,2217	28,2026	27,4488	4,3	0,2
Totalt					47,7	4,5

Tabell Vedlegg G-3: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i KON lagret fire måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,9009	6,9460	8,1162	8,3387	1,1	0,1
Glu	25,3601	25,1663	25,4642	25,3864	2,0	2,8
Asn	4,5927	4,6118	3,9964	4,2927	0,6	0,0
His	14,4108	14,3355	12,9811	14,0644	2,4	0,1
Ser	24,8854	27,0847	23,2149	23,9335	2,7	0,2
Gln	27,0118	27,2639	24,7854	25,9593	4,2	0,2
Gly/Arg	42,7687	44,3909	39,4535	41,4699	5,1	0,3
Thr	21,2400	19,8748	17,9790	19,1379	2,4	0,2
Ala	61,0600	64,0512	58,0153	61,2336	5,4	0,2
Tyr	12,4653	12,7261	11,3494	11,9505	2,4	0,1
Met	15,2106	15,6656	14,1813	15,1858	2,4	0,1
Val	24,8737	25,5201	22,1166	22,8552	2,9	0,2
Phe	13,0712	13,5029	10,8643	11,6153	2,2	0,3
Ile	11,7445	11,4916	11,2387	12,2409	1,6	0,0
Leu	37,0108	35,5720	35,3141	36,7565	5,1	0,0
Lys	30,8889	32,6239	27,5566	28,2611	4,7	0,4
Totalt					47,3	4,9

Tabell Vedlegg G-4: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i KON lagret seks måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,8923	6,7870	6,8099	7,2957	1,0	0,0
Glu	27,4394	26,2586	25,4558	26,0530	4,2	0,1
Asn	4,3639	4,2739	4,3004	4,5851	0,6	0,0
His	15,5390	15,0791	15,6039	16,5558	2,7	0,1
Ser	24,5594	22,9143	24,0072	24,6627	2,6	0,0
Gln	23,7612	23,0801	24,1000	25,3969	3,8	0,2
Gly/Arg	40,1165	38,8307	41,0273	41,4307	4,9	0,2
Thr	20,9048	19,9836	21,4198	22,4032	2,6	0,1
Ala	63,1752	61,0857	63,3072	63,3622	5,5	0,1
Tyr	11,9639	11,2441	12,2962	12,5804	2,4	0,1
Met	15,2819	14,3873	15,6087	15,7964	2,5	0,1
Val	23,9933	23,3561	24,2412	24,5941	2,9	0,1
Phe	12,2813	11,7258	12,6862	12,7273	2,2	0,1
Ile	12,1698	11,8370	13,0385	13,3108	1,8	0,1
Leu	30,2101	29,4029	31,2541	31,1868	4,3	0,1
Lys	28,7563	28,7792	31,4163	31,9474	4,8	0,3
Totalt					48,7	1,6

Tabell Vedlegg G-5: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt BHT som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,3527	7,1250	7,3335	7,3891	1,0	0,1
Glu	26,1210	28,8778	29,5627	31,2891	4,6	0,3
Asn	3,6825	4,0208	4,1794	4,2806	0,6	0,0
His	15,4677	13,6326	15,1455	16,8843	2,6	0,2
Ser	21,1217	22,2032	23,4078	22,8061	2,4	0,1
Gln	22,9695	28,3354	27,5270	30,3066	4,3	0,4
Gly/Arg	36,4789	38,9967	40,2731	42,5391	4,8	0,3
Thr	16,9524	19,2650	19,4129	19,7061	2,4	0,1
Ala	52,1636	57,4432	61,3122	64,5679	5,2	0,5
Tyr	10,8641	11,6825	11,7790	12,2365	2,4	0,1
Met	13,9209	15,8183	16,5556	15,8551	2,5	0,2
Val	21,6533	23,1479	23,4117	25,6762	2,9	0,2
Phe	10,7187	11,7399	12,0203	12,5141	2,1	0,1
Ile	10,1889	10,8128	12,3946	12,1126	1,6	0,2
Leu	32,3267	35,2601	36,2971	36,9448	4,9	0,3
Lys	26,0717	30,1531	30,0624	32,1449	4,7	0,3
Totalt					49,1	3,5

Tabell Vedlegg G-6: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt BHT lagret to måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,1216	6,8751	7,1769	7,5947	1,0	0,1
Glu	20,8892	8,7019	23,2790	25,2873	3,1	1,1
Asn	3,1033	3,8652	4,0983	4,1144	0,5	0,1
His	15,0828	12,7438	14,3290	14,1068	2,4	0,0
Ser	17,3731	19,9464	21,5999	20,9914	2,1	0,2
Gln	26,1908	21,9554	23,5799	23,2062	3,7	0,1
Gly/Arg	35,4528	35,1493	38,1624	37,4438	4,4	0,2
Thr	17,8385	16,2362	18,4104	17,3321	2,2	0,1
Ala	55,4719	55,1005	59,2005	55,7499	4,9	0,1
Tyr	10,5472	10,8426	11,8198	11,5668	2,3	0,1
Met	13,5581	13,6153	15,8416	14,6344	2,3	0,2
Val	20,9696	21,7053	23,0671	23,1081	2,7	0,1
Phe	10,4577	11,1870	12,1087	12,0647	2,1	0,2
Ile	10,1141	10,2608	12,0366	11,7815	1,5	0,2
Leu	32,8711	32,8404	35,3016	34,1387	4,7	0,2
Lys	27,1366	26,1566	27,7120	27,5863	4,3	0,1
Totalt					44,4	2,7

Tabell Vedlegg G-7: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt BHT lagret fire måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,7837	6,9682	6,5735	7,7881	1,0	0,0
Glu	25,7567	24,1892	25,4193		3,0	1,4
Asn	0,0015	3,9447	3,9067	3,5166	0,4	0,2
His	12,1887	12,8155	12,8849	11,3823	2,1	0,0
Ser	22,8737	23,0797	25,2380	21,3244	2,5	0,0
Gln	17,5989	23,0989	22,4862	21,1866	3,3	0,2
Gly/Arg	37,2588	38,6146	39,2335	34,6463	4,5	0,1
Thr	18,1237	17,9862	17,7570	17,0645	2,2	0,1
Ala	56,8798	57,6121	58,1683	53,2195	5,0	0,1
Tyr	11,0995	11,4183	11,5761	10,3408	2,2	0,0
Met	13,6340	13,5883	14,2718	12,9743	2,2	0,0
Val	20,8665	21,8093	21,9134	19,4776	2,6	0,1
Phe	10,2976	10,9056	11,0046	9,9493	1,9	0,0
Ile	10,2125	10,5845	11,2275	10,1401	1,5	0,0
Leu	32,7975	33,5258	34,3174	30,7432	4,6	0,1
Lys	26,7692	28,1014	27,2321	25,2871	4,3	0,1
Totalt					43,3	1,7

Tabell Vedlegg G-8: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt BHT lagret seks måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,0030	6,8459	6,7521	7,7362	1,0	0,0
Glu	25,3161	24,9923	26,4207	27,6190	4,2	0,2
Asn	3,8370	3,7982	4,0126	4,3168	0,6	0,0
His	11,7824	12,6069	12,3251	15,0787	2,2	0,2
Ser	21,7062	21,3262	24,0395	23,6140	2,4	0,2
Gln	20,8059	20,5466	20,2542	21,9463	3,3	0,1
Gly/Arg	36,6883	36,7305	37,5567	39,1585	4,6	0,1
Thr	18,3121	18,6733	18,4848	20,6185	2,4	0,1
Ala	56,9851	57,1860	58,9632	61,1148	5,2	0,2
Tyr	11,0595	10,9121	11,5785	12,3343	2,3	0,1
Met	13,4698	14,0039	14,1255	15,0458	2,3	0,1
Val	22,0312	21,5364	22,6856	23,8614	2,8	0,1
Phe	11,1425	11,1462	11,4509	12,6000	2,1	0,1
Ile	10,8404	11,6741	11,6021	12,8291	1,6	0,1
Leu	27,4211	28,2411	28,0893	29,1112	4,0	0,1
Lys	27,8461	28,1670	28,3641	29,3237	4,5	0,1
Totalt					45,4	1,9

Tabell Vedlegg G-9: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt PG som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,7440	5,0852	5,4691	5,7254	0,8	0,0
Glu	22,1601	21,9470	22,5367	22,7195	3,6	0,1
Asn	3,7471	3,7149	3,9043	3,9572	0,5	0,0
His	15,2885	16,4820	15,8720	15,9547	2,7	0,0
Ser	23,6644	20,4379	21,4844	18,2817	2,3	0,2
Gln	26,1711	29,1784	29,5702	32,8633	4,7	0,4
Gly/Arg	39,6209	40,2509	40,4816	40,9751	4,9	0,1
Thr	19,0595	18,6062	19,6737	18,0976	2,4	0,0
Ala	59,7071	57,6684	60,3980	61,0194	5,3	0,1
Tyr	11,4027	11,2817	11,7005	11,3765	2,3	0,0
Met	16,2965	16,3751	16,1559	16,2115	2,6	0,0
Val	23,5471	23,7184	24,2600	24,4253	2,9	0,1
Phe	12,2065	11,8372	12,3899	12,5298	2,2	0,1
Ile	11,6716	12,9880	12,5021	13,2727	1,8	0,1
Leu	35,5494	35,9244	36,2132	35,3638	5,0	0,0
Lys	29,3857	29,4639	29,3450	29,8967	4,7	0,0
Totalt					48,7	0,7

Tabell Vedlegg G-10: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt PG lagret to måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	7,6864	6,3695	7,0709	8,9307	1,1	0,1
Glu	9,9256	3,4944	21,7103	5,2815	1,6	0,8
Asn	4,1576	4,1106	4,1110	5,3513	0,6	0,1
His	15,1205	15,4038	14,4573	19,5420	2,7	0,2
Ser	20,7940	20,3162	20,3602	26,3423	2,4	0,2
Gln	26,2565	26,3570	25,6254	33,8636	4,5	0,4
Gly/Arg	39,8969	39,7974	38,6890	47,0507	5,0	0,3
Thr	18,3420	18,0310	17,5391	23,4490	2,4	0,2
Ala	59,0569	59,2903	58,7002	77,2823	5,6	0,5
Tyr	11,7942	11,6880	11,4922	14,9455	2,5	0,2
Met	15,7457	15,4282	15,7595	20,0835	2,7	0,3
Val	24,6219	24,6128	23,3567	32,8360	3,2	0,3
Phe	12,5152	12,5413	12,1260	16,0791	2,4	0,2
Ile	12,3699	12,2476	11,5649	15,6087	1,8	0,1
Leu	36,8966	36,5552	36,2583	41,7379	5,3	0,2
Lys	28,4787	28,3891	27,9467	37,2563	4,9	0,5
Totalt					48,9	4,5

Tabell Vedlegg G-11: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt PG lagret fire måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,9821	6,1457	5,9646	6,2120	0,9	0,0
Glu	23,8371	26,7215	24,1710	26,7294	4,0	0,0
Asn	3,7799	3,8536	4,0126	3,9812	0,5	0,0
His	15,0072	14,4519	14,4278	14,6753	2,5	0,0
Ser	21,4046	22,4415	21,8089	22,9824	2,4	0,0
Gln	27,5095	21,0488	26,8157	21,2793	3,8	0,0
Gly/Arg	39,9790	40,3026	40,1506	42,1266	4,9	0,1
Thr	20,2141	21,0522	18,8102	19,4070	2,5	0,1
Ala	59,0222	60,8387	58,5974	61,5794	5,3	0,0
Tyr	11,4159	11,5368	11,3957	11,9151	2,3	0,0
Met	14,7119	15,0929	14,7408	14,9533	2,4	0,0
Val	23,0511	23,4919	22,9002	24,2389	2,9	0,0
Phe	11,5444	11,8331	11,4638	11,9726	2,1	0,0
Ile	12,0774	11,9427	11,7278	12,2507	1,7	0,0
Leu	35,4239	36,3540	35,7779	37,1354	5,0	0,1
Lys	28,1392	29,3756	28,2345	29,2673	4,5	0,0
Totalt					47,7	0,2

Tabell Vedlegg G-12: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt PG lagret seks måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,6065	5,5364	5,7978	6,1139	0,8	0,0
Glu	24,0608	24,8485	24,8915	26,3464	4,0	0,1
Asn	3,5084	3,6472	3,7320	3,8494	0,5	0,0
His	13,3082	13,8743	14,7523	16,0085	2,5	0,2
Ser	19,7655	20,4925	19,7130	20,7668	2,2	0,0
Gln	22,3680	23,0125	23,3038	24,0429	3,7	0,1
Gly/Arg	37,7529	38,0201	38,1004	38,9869	4,6	0,1
Thr	17,9254	18,9186	18,9982	19,5548	2,4	0,1
Ala	57,5324	59,3397	58,4815	61,2629	5,2	0,1
Tyr	10,1905	10,7209	10,5538	11,2105	2,1	0,1
Met	13,5850	14,4409	13,5748	14,9880	2,3	0,0
Val	22,3299	22,5752	22,1716	22,9859	2,8	0,0
Phe	11,1380	11,4262	11,4024	11,6486	2,1	0,0
Ile	11,2748	11,2503	11,4831	12,2335	1,6	0,1
Leu	29,5252	29,5566	29,3893	29,8695	4,1	0,0
Lys	26,6990	27,6050	27,6409	28,2204	4,4	0,1
Totalt					45,2	1,0

Tabell Vedlegg G-13: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt CA som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,8700	6,1681	5,8898	5,7125	0,8	0,0
Glu	22,6109	23,6466	22,5448	21,9072	3,6	0,1
Asn	4,5678	4,3743	4,1794	4,0586	0,6	0,0
His	14,3319	15,2377	15,5080	15,2442	2,6	0,1
Ser	23,6498	24,9088	22,7499	20,8582	2,5	0,2
Gln	29,0100	27,7049	26,3257	26,8494	4,3	0,2
Gly/Arg	40,8080	40,6763	38,6797	37,5030	4,8	0,2
Thr	20,6907	20,3559	19,8716	18,5709	2,5	0,1
Ala	60,7424	61,8943	58,4493	57,2119	5,2	0,2
Tyr	13,0254	12,7593	12,4022	12,1404	2,5	0,1
Met	17,4362	17,4367	17,8682	16,3189	2,8	0,0
Val	25,8020	26,6449	23,9147	24,4624	3,1	0,2
Phe	12,3539	12,9291	12,4067	12,0088	2,3	0,1
Ile	13,4996	13,8199	13,6873	12,5180	1,9	0,1
Leu	38,4016	37,2266	35,8665	36,2571	5,2	0,2
Lys	33,9154	34,9480	33,7670	31,9112	5,3	0,2
Totalt					50,0	1,7

Tabell Vedlegg G-14: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt CA lagret to måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,9398	5,9628	6,3869	6,5117	0,9	0,0
Glu	22,9224	22,5422	25,5614	25,4551	3,9	0,3
Asn	4,4861	4,1222	4,5294	4,5894	0,6	0,0
His	15,6644	15,0720	17,3900	17,9005	2,8	0,3
Ser	24,6472	24,1663	23,8280	26,5585	2,7	0,1
Gln	27,6644	27,0807	34,8292	30,7764	4,8	0,6
Gly/Arg	39,8717	38,9156	44,8889	43,2535	5,1	0,4
Thr	20,5605	20,3748	24,2092	22,6789	2,8	0,3
Ala	62,3828	58,4973	66,5743	67,9600	5,6	0,4
Tyr	13,1658	13,1470	15,7327	15,4717	2,9	0,3
Met	18,2150	18,0345	19,3785	19,4682	3,1	0,1
Val	26,1932	25,5920	31,6492	31,2458	3,5	0,5
Phe	13,2952	13,1085	15,1626	15,1936	2,6	0,3
Ile	14,5248	13,1182	17,1387	15,5338	2,1	0,2
Leu	40,2376	39,9177	42,7540	39,9361	5,7	0,1
Lys	33,2957	32,1750	42,0022	38,0928	5,8	0,8
Totalt					54,9	4,8

Tabell Vedlegg G-15: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt CA lagret fire måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	*7,6834*	6,4635	6,2834	6,4064	1,0	0,1
Glu	*4262,3581*	27,6903	25,1986	26,8380	4,3	0,2
Asn	*4,5156*	4,5467	4,6705	4,4281	0,6	0,0
His	*13,1905*	14,4432	14,1428	14,3444	2,4	0,0
Ser	*24,1813*	25,3876	25,0671	46,7514	3,3	0,8
Gln	*25,3151*	20,8226	25,6271	-	4,5	1,1
Gly/Arg	*38,5151*	41,6262	40,8411	40,9118	4,3	0,8
Thr	*20,4319*	21,4487	21,2700	21,0546	3,9	1,8
Ala	*58,0777*	63,8713	62,6526	62,0281	4,4	1,4
Tyr	*12,4040*	13,5798	13,3797	13,4237	2,4	0,4
Met	*16,0665*	16,2147	17,0351	7,6618	3,1	0,6
Val	*25,6312*	27,9531	27,0733	17,2162	2,9	0,6
Phe	*12,2924*	13,4553	13,9685	26,2847	2,5	0,2
Ile	*13,8556*	14,6131	12,8228	13,0863	2,8	1,2
Leu	*39,2620*	39,7083	38,1220	14,6416	5,3	0,4
Lys	*29,9922*	34,0837	32,7663	39,6477	3,8	1,8
Totalt					50,2	1,8

Tabell Vedlegg G-16: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt CA lagret seks måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,9578	5,6193	5,7554	5,4415	0,8	0,0
Glu	23,8715	23,6356	23,8178	24,3457	3,8	0,0
Asn	3,7660	3,5917	3,7462	3,8622	0,5	0,0
His	15,9022	12,9433	13,1464	14,6129	2,4	0,1
Ser	20,6221	20,7685	20,2564	20,5440	2,2	0,0
Gln	22,8313	21,5856	22,7269	23,1353	3,6	0,1
Gly/Arg	39,6145	36,9170	37,0338	37,6565	4,6	0,1
Thr	18,7698	19,0197	20,3212	19,4226	2,4	0,1
Ala	60,5437	57,6026	57,5439	58,3471	5,2	0,1
Tyr	11,0130	10,7873	10,9683	11,3430	2,2	0,0
Met	15,0984	14,4509	14,6377	14,8320	2,4	0,0
Val	22,5286	22,1938	22,6135	22,4207	2,8	0,0
Phe	11,5636	11,3862	11,4950	11,4981	2,1	0,0
Ile	11,8559	11,0900	11,7049	12,1412	1,6	0,0
Leu	31,1024	29,1040	29,1374	29,3080	4,2	0,1
Lys	29,7477	27,9911	28,0572	28,0499	4,5	0,1
Totalt					45,4	0,4

Tabell Vedlegg G-17: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt AA som ikke ble lagret.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,8087	6,0799	5,5907	5,5935	0,9	0,2
Glu	26,4160	23,1636	23,7139	22,5524	4,2	0,7
Asn	4,4061	4,5199	4,4069	4,3348	0,7	0,1
His	14,2100	16,1766	14,7442	16,0180	3,0	0,6
Ser	22,5606	25,7616	24,5808	23,0395	3,0	0,7
Gln	26,5142	27,8772	27,5159	26,6224	4,9	0,9
Gly/Arg	38,9164	42,5070	41,2989	40,0560	5,7	1,1
Thr	19,2588	21,5033	21,6066	20,8138	3,0	0,5
Ala	59,5344	63,7074	63,0406	59,8920	6,2	1,2
Tyr	11,8440	13,1583	12,5818	13,2784	3,0	0,5
Met	17,6581	17,0809	16,9671	16,6154	3,1	0,5
Val	22,5305	26,4438	25,4884	24,6281	3,6	0,7
Phe	11,9823	13,1507	12,7260	12,5118	2,7	0,5
Ile	12,6521	13,5114	14,5122	12,5959	2,1	0,3
Leu	38,0229	39,5687	39,0854	38,1224	6,2	1,1
Lys	31,8678	32,9783	32,0069	31,9434	5,8	1,1
Totalt					51,0	0,4

Tabell Vedlegg G-18: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt AA lagret to måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	5,1379	-	5,9257	5,1125	0,6	0,3
Glu	20,5985	-	27,3317	23,0409	2,8	1,7
Asn	3,9927	-	4,5319	4,6734	0,5	0,3
His	12,6520	-	15,5202	14,9490	1,8	1,1
Ser	19,2762	-	24,4312	24,8122	1,8	1,1
Gln	25,0759	-	29,0682	28,0515	3,3	1,8
Gly/Arg	36,1293	-	42,6654	42,1999	3,7	2,1
Thr	17,3908	-	21,4293	20,7309	1,9	1,1
Ala	54,9840	-	64,9527	64,0268	4,1	2,3
Tyr	11,3707	-	13,9386	13,9234	2,0	1,2
Met	11,7408	-	14,1217	14,1206	1,6	0,9
Val	22,7178	-	26,9829	27,5278	2,4	1,4
Phe	11,1819	-	13,7028	13,4660	1,7	1,0
Ile	11,2934	-	13,3750	13,7758	1,3	0,8
Leu	34,8701	-	39,9250	37,4170	3,9	2,1
Lys	28,3465	-	35,2221	35,3540	3,9	2,4
Totalt					48,4	5,9

Tabell Vedlegg G-19: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt AA lagret fire måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,3309	5,1785	6,9560	5,5414	0,9	0,0
Glu	-	25,1547	-	25,0608	2,0	0,0
Asn	4,1216	4,1524	4,4919	4,2438	0,6	0,0
His	12,1740	13,1070	13,3355	12,9223	2,2	0,0
Ser	20,1672	21,9007	23,3702	22,6147	2,4	0,1
Gln	23,0550	18,7447	24,9858	19,1965	3,4	0,1
Gly/Arg	35,7063	38,4548	39,7905	37,9118	4,6	0,1
Thr	17,9585	19,3237	19,2242	22,1774	2,5	0,2
Ala	54,9932	58,5225	58,7856	58,9657	5,1	0,1
Tyr	11,3777	12,0593	12,5518	12,3107	2,4	0,1
Met	12,1198	12,6191	13,4640	13,0857	2,1	0,1
Val	21,8864	23,1754	24,4245	24,2997	2,9	0,1
Phe	10,9234	11,5857	12,2958	12,0020	2,1	0,1
Ile	11,4149	12,3914	12,4657	12,7331	1,7	0,1
Leu	35,8739	37,6511	37,7182	37,8013	5,2	0,1
Lys	26,5429	29,0176	29,7069	29,8532	4,6	0,2
Totalt					44,8	1,6

Tabell Vedlegg G-20: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i FPH tilsatt AA lagret seks måneder.

Aminosyre	***[FAA] 1a [nmol/ml]***	***[FAA] 1b [nmol/ml]***	***[FAA] 2a [nmol/ml]***	***[FAA] 2b [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	6,1374	5,5959	4,9314	5,3306	0,8	0,1
Glu	26,4209	25,0198	20,6007	22,3738	3,7	0,5
Asn	4,7890	4,5057	3,7851	4,0503	0,6	0,1
His	15,8700	16,0473	12,4396	13,4358	2,4	0,4
Ser	24,0176	22,4569	18,8944	19,8605	2,3	0,3
Gln	24,5088	22,9176	18,8879	21,2653	3,4	0,4
Gly/Arg	41,8936	40,6602	36,4756	38,1803	4,7	0,3
Thr	22,3156	22,0572	18,1090	18,4616	2,5	0,3
Ala	65,7587	63,8240	55,1181	58,8313	5,3	0,5
Tyr	13,2994	12,8320	10,4403	11,5049	2,4	0,3
Met	14,3415	13,6297	11,1967	12,5716	2,1	0,2
Val	25,9672	25,2236	21,6213	22,9980	2,9	0,3
Phe	13,9162	13,3101	10,9201	11,7941	2,3	0,3
Ile	13,7709	14,5558	11,3273	12,5609	1,8	0,2
Leu	33,1068	32,7855	30,3922	31,6941	4,4	0,2
Lys	33,0674	32,6020	28,6150	29,9441	4,9	0,4
Totalt					46,7	4,8

Tabell Vedlegg G-21: Rådata for konsentrasjonen av frie aminosyrer i råstoffet.

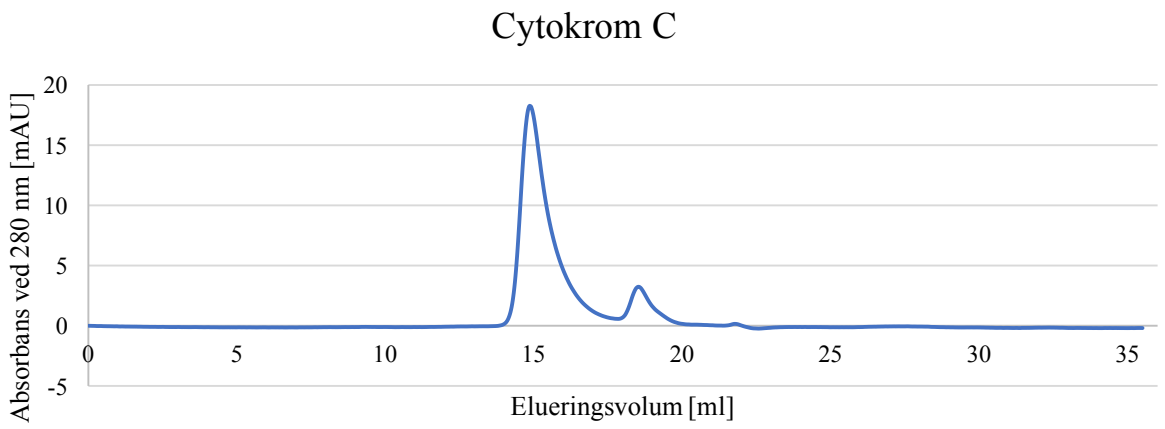
Aminosyre	***[FAA] 1 [nmol/ml]***	***[FAA] 2 [nmol/ml]***	***[FAA] 3 [nmol/ml]***	***FAA [mg/g innveid]***	***SD***
Asp	3,4595	3,4436	3,7573	0,12	0,00
Glu	4,0015	4,0279	4,3636	0,16	0,00
Asn	0,0241	0,0001	0,0002	0,00	0,00
His	0,2863	0,6412	0,7294	0,02	0,01
Ser	1,6548	1,8177	1,9766	0,05	0,00
Gln	0,0797	0,0266	0,1388	0,00	0,00
Gly/Arg	6,5346	7,6170	7,5496	0,21	0,02
Thr	1,8766	1,8197	2,1497	0,06	0,00
Ala	4,2917	4,6763	4,8612	0,10	0,01
Tyr	0,0041	0,3616	0,7233	0,01	0,01
Met	0,8094	1,0238	1,0975	0,04	0,01
Val	1,8554	1,7655	1,9611	0,05	0,00
Phe	1,3134	1,1100	1,1639	0,05	0,01
Ile	1,3660	1,1946	1,4370	0,04	0,00
Leu	2,6078	2,3402	2,7376	0,09	0,01
Lys	2,4455	2,5542	2,8500	0,10	0,00
Totalt				1,1	0,1

Vedlegg H

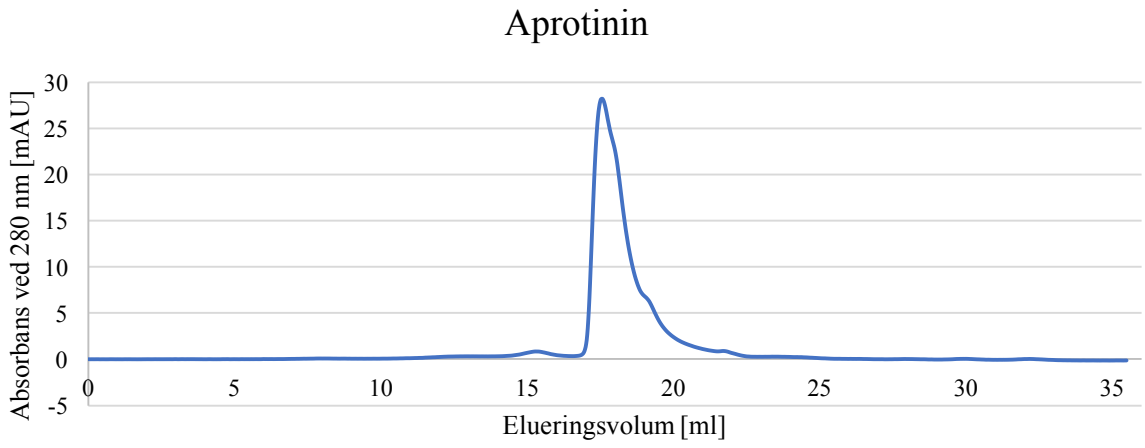
Molvektsfordelinger

Figur Vedlegg H-1: Molekylvekt [kDA] og topper ved elueringsvolum [ml] av standarder brukt i FPLC.

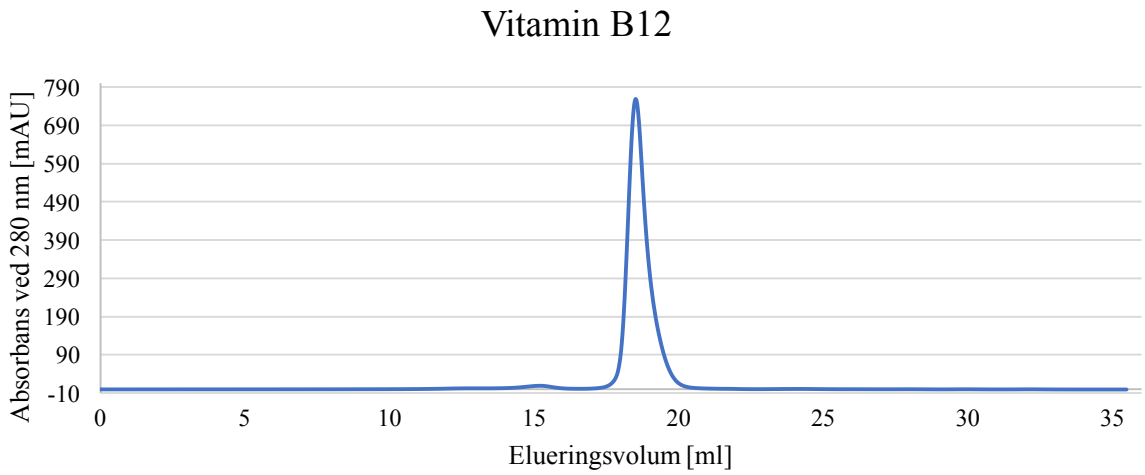
Standard	***Molekylvekt [kDa]***	***Topp [ml]***
Cytokrom C	12,4	14,9
Aprotinin	6,5	17,6
Vitamin B12	1,3	18,5



Figur Vedlegg H-2: Molekylvekt [kDA] og topper ved elueringsvolum [ml] av CytokromC brukt i FPLC.



Figur Vedlegg H-3: Absorbans [mAU] og topper ved elueringsvolum [ml] av Aprotinin brukt i FPLC.



Figur Vedlegg H-4: Absorbans [mAU] og topper ved elueringsvolum [ml] av Vitamin B12 brukt i FPLC.

Vedlegg I

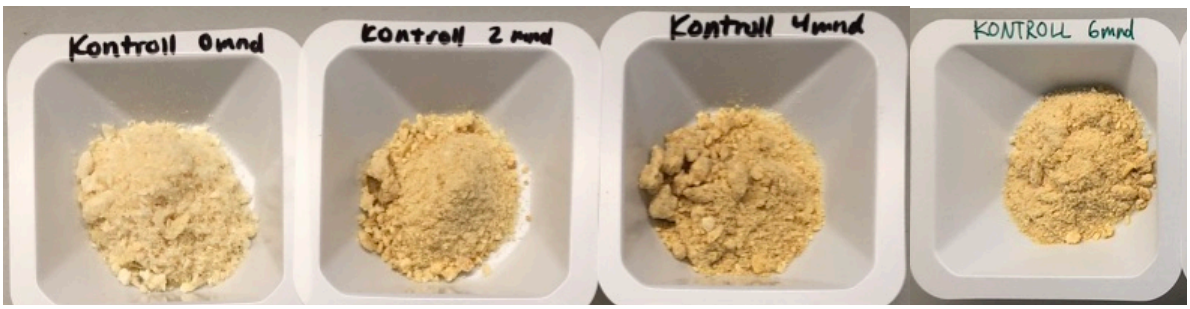
Fargemålinger

*Tabell Vedlegg I-1: L*a*b*-verdier for FPH som ikke ble lagret og FPH lagret i to, fire og seks måneder.*

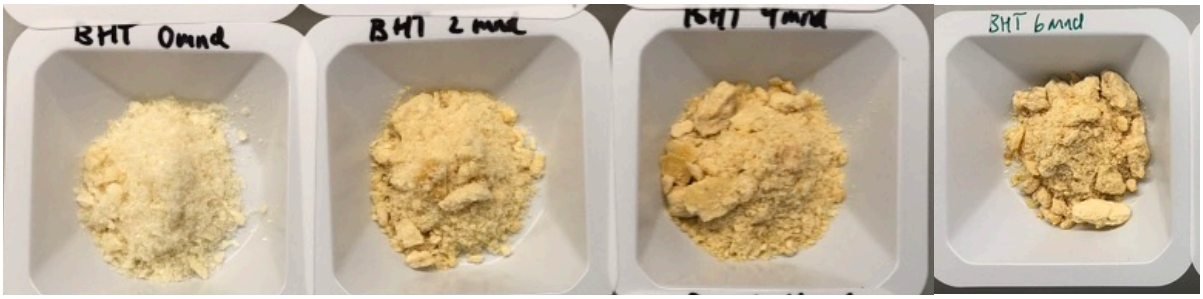
0 mnd	*L1*	*a1*	*b1*	*L2*	*a2*	*b2*	*L3*	*a3*	*b3*	$\bar{L}$	$\bar{a}$	$\bar{b}$
KON	86,71	0,25	20,11	86,56	0,34	20,41	86,04	0,25	21,03	86,44	0,28	20,52
BHT	88,94	-1,02	20,1	89,71	-1,16	19,65	89,41	-1,09	19,7	89,35	1,09	19,82
PG	90,63	0,08	13,68	89,87	0,09	14,18	90,35	0,1	13,78	90,28	0,09	13,88
AA	87,34	1,07	18,72	87,27	0,95	18,17	86,74	0,91	18,17	87,12	0,98	18,35
CA	90,84	-1,03	17,05	90,51	-1,02	17,29	90,36	-1,02	18,05	90,57	1,02	17,46
2 mnd												
KON	82,29	1,99	24,96	82,89	1,65	24,91	82,31	1,92	25,39	82,50	1,85	25,09
BHT	85,21	0,45	25,95	84,96	0,51	25,67	85,62	0,22	25,1	85,26	0,39	25,57
PG	88,97	-0,61	17,17	89,05	-0,61	16,65	86,59	-0,01	15,95	88,20	0,41	16,59
AA	76,56	7,44	32,05	75,51	7,44	31,87	76,77	6,84	31,06	76,28	7,24	31,66
CA	85,45	0,22	23,28	85,6	0,08	22,94	86,3	0,12	24,55	85,78	0,14	23,59
4 mnd												
KON	82,78	2,1	26,07	81,78	1,91	25,37	83,07	1,73	25,24	82,54	1,91	25,56
BHT	83,8	1,84	26,56	84,61	1,42	26,12	84,5	1,53	25,9	84,30	1,60	26,19
PG	88,71	-0,4	18,39	87,15	-0,1	18,46	88,36	-0,46	19,14	88,07	0,32	18,66
AA	79,45	7,18	28,45	78,98	7,06	28,35	79,05	7,35	29,08	79,16	7,20	28,63
CA	86,08	0,88	25,84	86,42	0,6	25,68	86,18	0,65	25,95	86,23	0,71	25,82
6 mnd												
KON	80,25	2,29	26,2	80,56	2,13	24,84	80,21	2,12	24,47	80,34	2,18	25,17
BHT	83,37	1,38	31,43	84,34	1,17	29,67	83,91	1,64	30,14	83,87	1,40	30,41
PG	88,54	-0,33	20,9	88,41	-0,39	20,77	87,53	-0,33	18,92	88,16	0,35	20,20
AA	77,18	7,27	30,99	78,64	7,21	30,84	77,34	6,89	29,9	77,72	7,12	30,58
CA	86,49	0,5	27,03	83,9	0,63	26,62	86,7	0,56	25,75	85,70	0,56	26,47

Vedlegg J

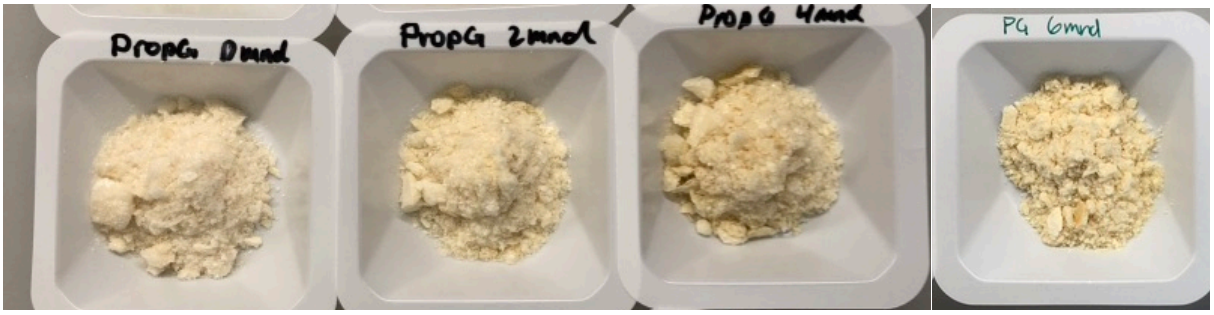
Hydrolysatene



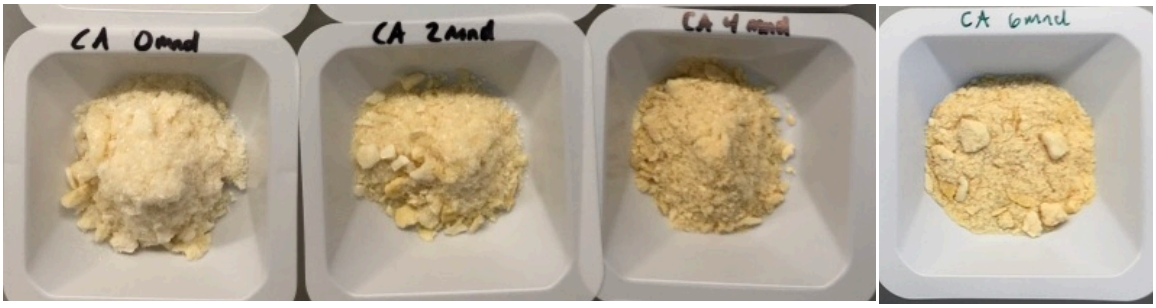
Figur Vedlegg J-1: Fargeforskjeller mellom KON som ikke ble lagret og KON lagret to, fire og seks måneder.



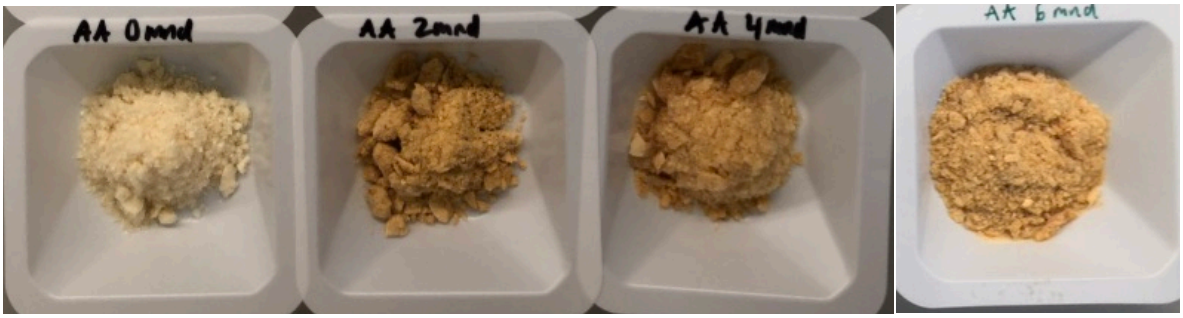
Figur Vedlegg J-2: Fargeforskjeller mellom BHT som ikke ble lagret og BHT lagret to, fire og seks måneder.



Figur Vedlegg J-3: Fargeforskjeller mellom PG som ikke ble lagret og PG lagret to, fire og seks måneder.



Figur Vedlegg J-4: Fargeforskjeller mellom CA som ikke ble lagret og CA lagret to, fire og seks måneder.



Figur Vedlegg J-5: Fargeforskjeller mellom AA som ikke ble lagret og AA lagret to, fire og seks måneder.