

10007

10008

Bruk av ultralydbehandling for å forbedre kvalitetsparametere og funksjonelle egenskaper til fiskeproteinhydrolysat ekstrahert fra makrell

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Janna Cropotova

Medveileder: Kristine Kvangarsnes

Mai 2023

10007

10008

Bruk av ultralydbehandling for å forbedre kvalitetsparametere og funksjonelle egenskaper til fiskeproteinhydrolysat ekstrahert fra makrell

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Janna Crobotova
Medveileder: Kristine Kvangarsnes
Mai 2023

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser

Denne bacheloroppgaven ble utført våren 2023 og er skrevet av to bioteknologistudenter ved Norges Teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU) i Ålesund. Etter tre år med spennende studier og erfaringer ved NTNU, har vi bygget et godt kunnskapsgrunnlag til å kunne skrive denne bacheloroppgaven. Oppgaven er en del av BlueBio ERA-NET sitt prosjekt "Impressive- Improved Processing to Enhance Seafood Sidestream Valorization and Exploration" (2022-2026)". Vi sitter igjen mye rikere på lærdom etter denne oppgaven og etter gjennomført studiet, noe vi vil ta med oss videre i fremtidige studier og jobb.

Vi vil gjerne takke våre veileder Janna Cropotova og Kristine Kvangarsnes for deres støtte og oppfølging gjennom hele skriveprosessen, samt utrolig god hjelp under gjennomføring av de ulike analyse utført på laboratoriet og behjelpeligheten deres over e-post. Vi vil også takke familie og venner for deres hjelp med rettskriving og gode råd.

Sammendrag

Fiskeproteinhydrolysat (FPH) fra fiskerestråstoff, produsert via enzymatisk hydrolyse åpner for økt tilgjengelighet av bioaktive og funksjonelle egenskaper sammenlignet med ubehandlet protein. Benyttelse av marint restråstoff, sammen med økende vitenskapelig kunnskap om egenskapene til olje og protein hentet fra fisk, åpner for større og gunstigere produksjon av verdifulle lipider og høyverdige marine proteiner.

Målet med denne oppgaven var å teste om ultralydbehandling av FPH ville føre til ytterligere forbedring av kvalitetsparametere og funksjonelle egenskaper. I denne studien ble det utført flere analyser på ferdig tillaget FPH hentet fra atlantisk makrell (*Scomber scombrus*), inkludert måling av farge, hydrolysegrad, proteininnhold, kvantifisering av thiol- og karbonylgrupper, og total aminosyresammensetning. Alle disse analysene ble sammenlignet med den ferdig tillagde FPH som kontroll.

Hydrolysegraden etter ultralydbehandling viste en lineær økning i samsvar med styrken på behandlingen. Dette bidrar til en høyere proteinløselighet, som er bedre for opptak i kroppen og videre viktig dersom FPH skal benyttes som en ingrediens i matvarer som drikker og supper. En behandling med 600W ga best resultat med en økning på 6%. Resultatene for proteininnhold samsvarte med hydrolysegraden, hvor det beste resultatet også var ved behandling på 600W, som ga 12% økt innhold.

Resultatene fra kvantifisering av thiol- og karbonylgrupper tyder på noe proteinoksidasjon etter ultralydbehandling. Men på grunn av en betydelig økt proteinløselighet, anses dette som å ikke være av betydning. Fargeanalysen viste liten fargeendring, men et noe lysere resultat ved sterkere ultralydbehandling, trolig på grunn av endring av sekundærstruktur og dannelse av emulsjon.

De totale aminosyresammensetningene til de ulike prøvene ble sammenlignet med kontrollen, og det ble vist et signifikant av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ved 600W. Konklusjonen er at ultralydbehandling av FPH bidrar til generell forbedring av kvalitetsparameter og funksjonelle egenskaper, hvor behandling ved 600W gir det beste resultatet.

Abstract

Fish protein hydrolysate (FPH) from fish byproducts produced through enzymatic hydrolysis allows for increased availability of bioactive and functional properties compared to untreated protein. The utilization of marine byproducts, along with increasing scientific knowledge of the properties of oil and protein extracted from fish, opens up for greater and more beneficial production of valuable lipids and high-quality marine proteins.

The goal of this study was to test whether ultrasound treatment of FPH would lead to further improvement of quality parameters and functional properties. To determine this, several analyses were performed on premade FPH obtained from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), including measurement of color, degree of hydrolysis, protein content, quantification of thiols and carbonyl groups, and total amino acid composition. All these analyses were compared to the premade FPH as a control.

The degree of hydrolysis after ultrasound treatment showed a linear increase in accordance with the strength of the treatment. This contributes directly to higher protein solubility, which is better for uptake in the body and crucial if FPH is to be used as a food ingredient in drinks, soups, etc. Treatment at 600W gave the best result with a 6% increase. The results for protein content corresponded with the degree of hydrolysis, where the best result was also at 600W, which gave a 12% increase in content.

The results from quantification of thiols and carbonyl groups suggest some protein oxidation after ultrasound treatment, but due to a significantly increased protein solubility, this is not considered of importance. In addition to solubility, the color of FPH is also an important quality parameter. Color analysis showed little change in color, but a slightly lighter result with stronger ultrasound treatment, as this is likely related to changes in secondary structure and formation of an emulsion.

The total amino acid compositions of the different samples were compared to controls, where the highest content of both essential and non-essential amino acids was shown at 600W. It can be concluded that ultrasound treatment of FPH contributes to a general improvement of quality parameters and functional properties, with treatment at 600W giving the best result.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
Forkortelser	6
Begrensinger	7
1. Introduksjon	8
2. Teori	9
2.1 <i>Atlantisk makrell (Scomber scombrus) som råstoff</i>	9
2.2 <i>Produksjon av fiskeproteinhydrolysat ved enzymatisk hydrolyse</i>	10
2.3 <i>Funksjonelle og bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat</i>	11
2.3.1 <i>Funksjonelle egenskaper</i>	12
2.3.2 <i>Bioaktive egenskaper</i>	13
2.4 <i>Fiskehydrolysat som ingrediens i matindustrien</i>	14
2.5 <i>Helseeffekter av FPH</i>	15
2.6 <i>Utfordringer ved bruk av FPH</i>	15
2.6.1 <i>Proteinoksidasjon</i>	15
2.6.2 <i>Bitterhet</i>	17
2.7 <i>Innovative teknologier for forbedring av funksjonelle egenskaper til FPH</i>	17
2.7.1 <i>Pulserende elektrisk felt</i>	17
2.7.2 <i>Høytrykksprosessering</i>	18
2.7.3 <i>Ultralyd</i>	18
2.7.4 <i>Ultralyd effekten på funksjonelle egenskapene til proteiner</i>	20
2.7.5 <i>Ultralyd effekten på kjemiske og bioaktive egenskapene til proteiner</i>	21
3. Materialer og metode	22
3.1 <i>Ultralydbehandling</i>	22
3.2 <i>Fargemåling ved kolorimetri</i>	23
3.3 <i>Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering</i>	23
3.4 <i>Lowry-metoden – Bestemmelse av vannløselig protein</i>	25
3.5 <i>Kvantifisering av karbonylgrupper og thiol</i>	26
3.5.1 <i>Kvantifisering av karbonylgrupper</i>	26
3.5.2 <i>Kvantifisering av thiol</i>	27
3.6 <i>Total aminosyresammensetning</i>	28
3.7 <i>Statistisk analyse</i>	28
4. Resultat	29

4.1	<i>Fargemåling ved kolorimetri</i>	29
4.2	<i>Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering</i>	30
4.3	<i>Lowry – metoden – Bestemmelse av vannløselig protein</i>	31
4.4	<i>Kvantifisering av karbonylgrupper og thiol</i>	32
4.4.1	<i>Kvantifisering av karbonylgrupper</i>	32
4.4.2	<i>Thiolgrupper</i>	33
4.5	<i>Total aminosyresammensetning</i>	34
5.	Diskusjon	35
5.1	<i>Fargemåling</i>	35
5.2	<i>Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering</i>	35
5.3	<i>Lowry-metoden – Bestemmelse av vannløselig protein</i>	36
5.4	<i>Kvantifisering av karbonylgrupper og thiol</i>	36
5.4.1	<i>Kvantifisering av karbonylgrupper</i>	36
5.4.2	<i>Kvantifisering av thiol</i>	36
5.5	<i>Total aminosyresammensetning</i>	37
5.6	<i>Videre arbeid</i>	37
6.	Konklusjon	38
	Referanseliste	39
	Vedlegg	43
A.	<i>Reagenser</i>	43
B.	<i>Eksempel på utregning for bestemmelse av hydrolysegrad</i>	44
C.	<i>Eksempel på utregning for bestemmelse av andel vannløselig protein</i>	45
D.	<i>Eksempel på utregning for kvantifisering av karbonylgrupper og thiol</i>	46
E.	<i>Fargemåling med kolorimetri</i>	48
F.	<i>Bestemmelse av hydrolysegrad</i>	49
G.	<i>Lowry – Bestemmelse av vannløselig protein</i>	51
H.	<i>Kvantifisering av karbonylgrupper</i>	54
I.	<i>Kvantifisering av thiolgrupper</i>	55
J.	<i>Total aminosyresammensetning</i>	56

Forkortelser

ACE	angiotensin-konverterende enzym
Ala	alanin
Cys	cystein
DH	hydrolysegrad
DNP	dinitrofenylhydrazin
DTNB	ditiobisnitronebzosyre
FPH	fiskeproteinhydrolysat
Glu	glutaminsyre
Gly	glycin
His	histidin
HPLC	high-performance liquid chromatography
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Met	metionin
PEF	pulserende elektrisk felt
PH	proteinhydrolysat
Phe	fenylalanin
PI	protein isolat
Pro	prolin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

Begrensinger

Bestillingstid på utstyr utgjorde en begrensning for gjennomførelsen av denne studien, da alle videre analyser utført i denne studien var avhengig av dette utstyret. Laboratoriearbeid kunne bare gjennomføres på hverdager, mellom 08:00 og 16:00. Dette måtte planlegges og avtales med veileder, samt andre som skulle benytte laboratoriet. Begrenset tilgang på enkelte reagenser førte til færre paralleller for de ulike analysemetodene, som ga videre et begrenset datasett for gjennomsnittet benyttet for utføringen av t-tester. Begrenset tilgang på reagenser og materialer for ulike analysemetoder førte også til en redusert mulighet for å gjøre enkelte analyser på nytt dersom resultatet ga for store avvik. Til slutt ble studien begrenset ved at det ble utført analyser på tre ultralydstyrker (300W, 450W, 600W). Resultat og bidrag fra denne studien og dens begrensninger peker fram mot muligheter for videre arbeid diskutert i delkapittel 5.6.

1. Introduksjon

Med en stadig økende befolkningsvekst, øker også behovet på tilgjengelige ressurser og at disse blir utnyttet maksimalt. Innen 2050, er det forventet en fordobling av proteinetterspørsel på global basis (1). Det vil derfor være nødvendig å ta utnytte av alle restråstoffressurser tilgjengelig, på en bærekraftig måte, for å kunne dekke disse økende behovene, samt å bistå med å oppfylle FNs andre bærekraftsmål, «Utrydde sult» (2).

Marint restråstoff omfatter vanligvis; fiskehodet, skinnen og huden, innvoller, bein og avskjær, og kan defineres som «Det som ikke er primære hovedprodukt ved anvendelse av et råstoff» (3). Også fisk som er blitt ødelagt og ikke lenger kan benyttes til humant konsum, kan kategoriseres som restråstoff. Ut ifra hvilket hovedprodukt man er ut etter, vil restråstoffet da være de biproduktene man sitter igjen med (4).

Benyttelse av marint restråstoff, sammen med en økende vitenskapelig kunnskap om egenskaper hos olje og protein hentet fra fisk, åpner for større og gunstigere produksjon av både verdifulle lipider og marine proteiner. Prosessering av restråstoffmateriale skjer ofte ved benyttelse av en prosessteknologi kjent som hydrolyse, som resulterer i en rekke aktuelle produkter. Dette inkluderer olje- og proteinprodukter, som blant annet aminosyrer, enzymer, bioaktive peptider, gelatin og kollagen (5). Fiskeproteinhydrolysat produseres av flere tonn restråstoff i Norge hvert år (6). FPH er et ettertraktet høyprotein, grunnet de ernæringsmessige-, funksjonelle- og bioaktive egenskapene (7). Ved å benytte restråstoff med høyere innhold av protein og omdanne dette til FPH, vil dette resultere i produkter av merverdi (8).

Formålet med denne bacheloroppgaven er å bestemme om ultralydbehandling av FPH vil gi ytterligere forbedring av kvalitetsparametere og funksjonelle egenskaper og dermed skape en økt verdiskapning av marint restråstoff.

Resten av denne oppgaven er strukturert som følger: I kapittel 2 gis den teoretiske bakgrunnen for studien og videre beskrives gjennomføringen av prosedyrer og metoder, hvor resultatet fra disse legges fram i kapittel 4. Til slutt blir resultatene diskutert i kapittel 5, før vi i kapittel 6 kommer frem til en konklusjon og avslutter så studien med referanseliste og vedlegg.

2. Teori

I dette kapitlet beskriver vi relevant teoretisk bakgrunn for oppgaven. Her presenteres råstoffet benyttet i denne bacheloroppgaven, etterfulgt av enzymatisk hydrolyse og fordeler og utfordringer rundt dette. Videre blir det lagt fokus på innovative teknologier og effekten ultralyd har på proteinegenskaper.

2.1 Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) som råstoff

Atlantisk makrell (Figur 1), kategoriseres som en fet, pelagisk fisk spredt i et stort utbredelsesområde. De svømmer i stim fra blant annet Norskehavet, langs norskekysten, til Middelhavet i Nord-Afrika og/eller til nordlige deler av Barentshavet (9)((10).



Figur 1 Illustrasjon av *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758. Hentet fra artsdatabanken.no (11).

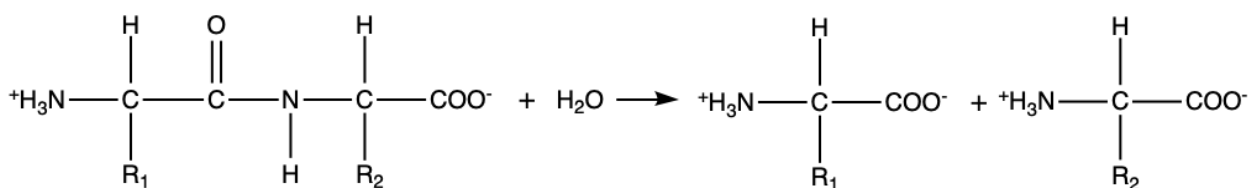
Selv om det forekommer variasjoner av fettinnhold ved de ulike sesongene, er makrellen en av de feteste fiskeartene. Lavest fettinnhold er å finne hos makrellen på våren, på rundt 3%, mens det øker til nærmere 30% på høsten. Den fete såkalte «høstmakrellen» skyldes et større konsum av mat etter gyting i juni. I vinterhalvåret derimot, når makrellen konsumerer betraktelig mindre mat, holder den til nær havbunnen sør-vest av norskekysten (9).

Fiskemuskel kan deles inn i enten mørk eller lys muskulatur. Makrellen, på lik linje med andre pelagiske fisker, har den størst andel av fett deponert i mørk muskulatur. Dette skyldes at det

foregår aerob forbrenning med god blodforsyning. Dette blir videre benyttet som en energikilde og et energilag på samme tid, da den kontinuerlige energitilførselen muliggjør svømming over lengre distanser, selv om tilgangen på mat er begrenset. Grunnet faktorer som blant annet sesongvariasjoner, vekst- og reproduktive sykluser, tilgang på mat, biosyntese og ulike miljøpåvirkninger, vil det være tydelige variasjoner i makrellens kjemiske sammensetning gjennom årstidene (12, 13).

2.2 Produksjon av fiskeproteinhydrolysat ved enzymatisk hydrolyse

Sammenlignet med det opprinnelige proteinet hentet fra fiskeråstoff, har proteinhydrolysat (PH) som et produkt av enzymatisk hydrolyse vist bedre funksjonelle, bioaktive og ernæringsmessige egenskaper. Disse egenskapene blir videre utdypet i delkapittel 2.4. Hydrolyse er en effektiv metode for å skape merverdi av proteiner i restråstoff, da proteinenes brytes ned til peptider og frie aminosyrer, som resulterer blant annet i at det lettere vil kunne løses i vann (14). Hydrolytisk kløyving av proteinets peptidkjede vises i figur 2.



Figur 2 Modifisert visning av hydrolytisk kløyving av peptidkjede fra Coultate (2009)(15).

Enzymatisk hydrolyse er i stor grad en kontrollerbar prosess gjennom kombinasjon av spesifikke typer enzym og substrat. Dette er to viktige faktorer sammen med substratets egenskaper, for å få et resultat i produksjonen av skreddersydde proteinhydrolysat (16). I tillegg er substratkonsentrasjonen, enzym-substrat-forhold, tid, temperatur og pH-verdi, andre viktige uavhengige variabler som kan ha en effekt på hydrolyseprosessen, foreslått av Adler-Nissen (1984) (17).

Det første steget ved en enzymatisk hydrolyse av restråstoff, er å blande råstoffet, kvernet, med vann. Deretter homogeniseres blandingen og det blir tilsatt enzym. Av disse enzymene, blir proteinet spaltet til mindre peptider, slik at deres funksjonelle egenskaper og deres biotilgjengelighet blir økt. Enzym anvendt ved produksjon av fiskeproteinhydrolysat, er vanligvis fra planter (for eksempel papain og bromelain), av animalsk opprinnelse (f.eks. pepsin) og mikrobielle kilder (f.eks. Alcalase) (18).

Forskjellige enzymer har ulik spesifisitet og krever forskjellige reaksjonsbetingelser, noe som gjør valget av enzymet brukt i hydrolysen, en svært viktig faktor i sammensetningen til produktene (19). Tiden det tar for å fullføre hydrolysen, kan være alt i fra én time til flere timer, ved ulike temperaturer, vanligvis rundt 35-65°C (20). Løsningen blir varmet opp i 5-20 minutter, etter at man har oppnådd en hydrolyse av ønsket grad, til en temperatur rundt 85-95°C, for å inaktivere enzymet (21).

Et ønsket resultat etter fullført hydrolyse, er en høyere grad av løselighet. Dette forekommer når en større andel peptidbindinger brytes. Hydrolysegrad (DH) defineres som den prosentvise andelen spaltede bindinger i proteinet, en kontrollparameter ofte bestemt ved metoden formoltitrering (22, 23). Hydrolysegrad kan uttrykkes prosentvis slik (24):

Formel 1
$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100\%$$

h står for antallet brutte peptidbindinger og h_{tot} står for proteinets totale antall peptidbindinger.

2.3 Funksjonelle og bioaktive egenskaper til fiskeproteinhydrolysat

I næringsmiddelindustrien, er det gunstig å benytte seg av verdifulle og næringsrike proteiner hentet fra fiskerestråstoff, grunnet deres mange gode egenskaper (25). I tabell 1 er en oversikt over viktige funksjonelle, kjemiske og bioaktive egenskaper.

Tabell 1 Funksjonelle og bioaktive egenskaper hentet fra fiskeproteiner (26, 27).

Funksjonelle egenskaper	Bioaktive egenskaper
God løselighet i et bredt pH-spekter	Antihypertensive
Vann- og oljebindingsevne	Antitrombotiske
Emulgerings- og skumegenskaper	Immunmodulerende
Bedre tekstur i mat	Antioksidative
Mulighet for gel dannelse	Antimikrobielle

2.3.1 Funksjonelle egenskaper

De fysikalsk-kjemiske egenskapene til proteiner i mat gjennom prosessering, lagring og konsumering, er det som definerer funksjonelle egenskaper (26). Egenskapene hos proteiner hentet fra restråstoff, kan justeres via kontrollert enzymatisk hydrolyse (28). Eksempelvis kan man øke antallet grupper som kan ioniseres, eller vekten av molekyler kan bli redusert.

Løselighet

Den funksjonelle egenskapen som er sentral i denne bacheloroppgaven, er løselighet. Dersom proteiner skal anvendes som proteinpulver i drikker, eller i supper, er det svært viktig at systemet sin løselighet er av høy grad (22). Proteinløseligheten samsvarer med hydrolysegraden, hvor høy løselighet av proteinet er å finne ved en høyere grad av hydrolyse. Dette resulterer i at proteinene brytes ned til mindre peptidkjeder med redusert molekylvekt, på samme tid som eksponeringen av aminosyrenes ioniserbare amino- og karboksylgrupper blir økt (29, 30). Emulgeringskapasitet og dannelse av gel, er andre funksjonelle egenskaper hvor løselighetsgraden vil ha en påvirkning (31).

Emulgeringsegenskaper

Grunnet de hydrofile og hydrofobe gruppene til proteinhydrolysat, virker disse forbindelsene som overflate-aktive forbindelser, som kan resulterer i økt emulsjon mellom olje og vann (32, 33). Under homogenisering dannes det et beskyttende lag, grunnet de nylig dannede oljedråpene på overflaten som absorberer proteiner. På denne måten hindres dråpene i å gå sammen. For å oppnå best mulige emulgeringsegenskaper hos FPH, er det viktig å kontrollere hydrolysebetingelsene (6). En økt emulgeringskapasitet, ble observert av Slizyte et al. (2005) å bli funnet ved FPH med høyere proteininnhold (34). Økende hydrolysegrad vil føre til at emulgeringskapasiteten reduseres, grunnet dannelsen av mindre peptider. Sammenliknet med proteiner av tyngre molekylvekt, blir reduksjonen av overflatespenningen dårligere av de små peptidene, da de ikke evner å folde seg ut eller bevege seg på samme måte (35).

Oljebindingsevne

Et proteins hydrofobisitet, bestemmer hvor stor mengde olje proteinet evner å binde direkte. Hvor stor denne mengden er, definerer oljebindingsevnen til proteinet (31, 32).

2.3.2 Bioaktive egenskaper

Peptider bestående av biologiske egenskaper er en form for biomolekyler, kjent som bioaktive peptider, som utnyttes i økende grad ved mat- og helseprodukter grunnet deres helsefremmende virkning (36). Ved hjelp av prosesser som enzymatisk hydrolyse, ekstraksjon og mikrobiell fermentering av proteiner, er det vist seg mulig å utvinne og isolere disse bioaktive komponentene fra marint restråstoff (27).

Molekylvekten og peptidets størrelse, er to faktorer som er med å bestemme bioaktiviteten, hvor hvert molekyl som regel består av mellom 2 til 20 aminosyrer (37), hvor molekylvekten ikke overstiger 6000 Da (38). Proteinet som skal hydrolyseres, enzym benyttet og graden av hydrolysen, er flere faktorer som bestemmer strukturen til peptidene, som videre bestemmer deres bioaktive egenskaper. Egenskaper funnet etter en rekke undersøkelser er bl.a. antihypertensive, antitrombotiske, immunmodulerende og antioksidative (39).

Antihypertensive egenskaper

Økning av blodtrykk (hypertensjon), skjer når ACE (angiotensin-konverterende enzym) omdanner inaktive angiotensin-I til aktive angiotensin-II, da dette påfører hjertet en stor belastning og vil øke risikoen for at hjerte- og karsykdommer utvikles (40). For å kunne holde kontroll på blodtrykket, er det essensielt at ACE blir inhibert (27). PH hentet fra fiskerestråstoff, har gjennom en rekke studier, vist å ha en slik ønsket ACE-inhiberende effekt og benyttes i dag i flere produkter ment for å redusere blodtrykket (28).

Antitrombotiske egenskaper

Bioaktive peptider hentet fra FPH har en antikoagulerende effekt, som kan føre til redusert risiko for hjerte- og karsykdommer, da de inhiberer koagulering i blodårer, kjent som trombose (41). Inhiberingsgraden bestemmes av aminosyresekvensen, da en større grad av antitrombotisk aktivitet er å finne ved høyere innhold av aminosyrene leucin (Leu), isoleucin (Ile) og fenyylalanin (Phe) (42).

Immunmodulerende egenskaper

Proteiner hentet fra fiskehydrolysat kan fungere som immunmodulatorer, grunnet høyt innhold av bioaktive sekvenser. Dette betyr at ved å endre enten det medfødte immunforsvaret eller det ervervede, så kan de øke eller redusere immunresponsen. Peptidene med immunmodulerende

egenskaper er vist å ha et høyt innhold av aminosyrene glycin (Gly), Leu, prolin (Pro), Val, Phe, tyrosin (Tyr) og Glu, og er vanligvis satt sammen av mellom 2 og 10 av disse (43).

Immunmodulerende medisiner som finnes og benyttes i dag, egnert seg ikke som behandling av kroniske tilstander, da de er dyre og kan gi giftige bivirkninger. Identifisering av nye forbindelser med immunmodulerende egenskaper er derfor av økende interesse (43, 44, 45).

Antioksidative egenskaper

Ved enzymatisk hydrolyse frigjøres tidligere inaktive peptider, som i ulike oksidative systemer vil kunne ta rollen som antioksidanter, grunnet sine antioksidative egenskaper (28, 46). Virkegraden til peptidene bestemmes av aminosyresammensetningen og hydrofobisiteten (47).

Antioksidative peptider bygges opp av mellom 2 til 16 aminosyrer (48). Disse kan blant annet være aromatiske aminosyrer (His, Tyr, Trp, Phe), som sammen med prooksidanter kan danne kompleksbindinger. Videre kan de være hydrofobe aminosyrer (Ala, Val), som bidrar til at peptider som befinner seg i lipidfasen kan få en økt løselighet. Aminosyrene kan også være svovel-innholdende (Cys, Met), hvor SH-gruppene til Cys kan fjerne frie radikaler og på denne måten hindre oksidasjon (36, 49, 50).

2.4 Fiskehydrolysat som ingrediens i matindustrien

FPH utvunnet ved enzymatisk hydrolyse, som tidligere nevnt, muliggjør forbedring av de funksjonelle og ernæringsmessige egenskapene til proteinene i råstoffet. Graden av vannløselighet og bindingsevne, er viktige egenskaper hos disse fargeløse hydrolysatene dersom de skal kunne benyttes som ingrediens i ulike produkter i matindustrien.

FPH tilsettes blant annet til supper og sauser, grunnet store mengder essensielle aminosyrer, da dette bidrar til et økt proteininnhold (31). Videre, er de gunstige som ingrediens i majones, dressinger og ulike kjøttpålegg, da de har gode emulgeringsegenskaper (51). Næringsdrikker kan også få tilsatt FPH som ingrediens, hvor økt proteintilskudd er ønsket for å opprettholde en sunn kroppsvekt til eldre og syke, eller som en erstatning av proteiner hentet fra meieriprodukter grunnet allergi (1).

Bioaktive peptider ble tidligere hovedsakelig hentet fra meieriprodukter (31). Men, i nyere tid, har bioaktive egenskaper som bl.a. antioksidative og antihypertensive, vekket en økende interesse for å benytte seg av peptider hentet fra marint restråstoff og FPH (52).

Trombose blir den dag i dag behandlet ved hjelp av heparin. Bruken av dette antikoagulerende middelet har vist å kunne medføre ulike bivirkninger. Antikoagulerende peptider fra FPH, som en funksjonell ingrediens i matprodukter, kan virke som et tryggere middel for behandling av trombose siden de ikke er giftige (27).

2.5 Helseeffekter av FPH

Fiskeproteinhydrolysat utgjør en kilde til høykvalitets protein med flere positive helseeffekter. Som tidligere beskrevet, dannes FPH gjennom enzymatisk hydrolyse, hvor de blir brutt ned til kortere peptidkjeder. Sammenlignet med originalt protein, er disse små peptidene mer gunstig for absorpsjon hos konsumenter. FPH er vist å inneholde aminosyrer med positiv helseeffekt (21).

Essensielle aminosyrer er viktige for mennesker fordi kroppen ikke er i stand til å produsere dem selv. Derfor må vi få disse aminosyrene gjennom maten. Disse aminosyrene er nødvendige for å opprettholde og bygge opp celler, muskler og organer. De er også sentrale i produksjonen av hormoner, enzymer og nevrotransmittere. Mangel på essensielle aminosyrer kan føre til svekkelse av muskel- og vevsstrukturer, samt en rekke helseproblemer. Ved benyttelse av fiskeproteinhydrolysat, kan man øke tilgjengeligheten av disse aminosyrene for menneskelig konsum. Dersom markedet i større grad skal benytte seg av FPH-produkter, er det kritisk at disse er trygge for konsumentene. Det er viktig å blant annet hindre allergiske reaksjoner, for høyt innhold av histaminer og vekst av skadelige mikroorganismer (31).

2.6 utfordringer ved bruk av FPH

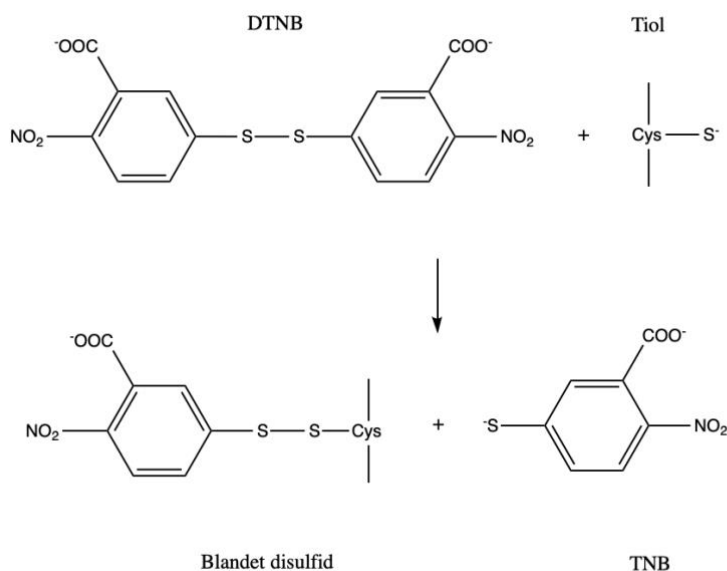
2.6.1 Proteinoksidasjon

Proteinoksidasjon av både råstoff og FPH, kan gi endring av proteinets egenskaper (funksjonelle, biokjemiske og strukturelle), som kan gi negativ effekt på sluttproduktets kvalitet. Oksidasjonen kan forekomme enten direkte eller indirekte (53). Direkte oksidasjon vil oppstå ved at peptidkjeder eller sidegrupper i proteiner/peptider danner reaksjon med reaktive oksygen- eller nitrogenforbindelser. Dette kan videre føre til dannelse av karbonylgrupper og hydrogenperoksider, samt gi kryssbindinger som disulfid- og dityrosinbindinger (54).

Mellomprodukter etter lipidoksidasjon kan reagere med proteiner og på denne måten gi indirekte oksidasjon (53, 54).

Oksidasjon av proteiner bestemmes vanligvis ved hjelp av tre metoder; målinger av enten karbonylgrupper, dityrosin eller tioler (53).

- Ved oksidasjon vil antallet karbonylgrupper økes, da dannelsen av ketoner og aldehyder er et resultat av karbonylering (55). ELISA er en metode som måler mengden karbonylforbindelser. Her benyttes dinitrofenylhydrazin (DNP) til å skape reaksjon med proteinene, slik at bundet DNP videre kan måles og bestemmes kolorimetrisk (Enzo, 2020).
- Kryssbindinger mellom Tyr kan oppstå ved proteinoksidasjon, som fører til dannelsen av dityrosin (56). Ved å bestemme total aminosyresammensetning kan man måle mengden Tyr i FPH (57).
- Oksidasjon av proteiner fører til tap av thiolgruppen til Cys (R-SH), via en tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon (figur 1.4) sammen med Ellmans reagens, ditiobisnitrobenzoyl (DTNB). I reaksjonen dannes TNB-anionet, som ved 412 nm har en sterk absorbans og kan på grunn av dette benyttes til å bestemme innholdet av tioler, da forholdet til TNB-anionet og tioler er 1:1. Absorbansen leses av et spektrofotometer (58, 59).



Figur 3 Modifisert figur av Tiol-disulfid-utvekslingsreaksjon fra Baron & Kjærsgård (59).

2.6.2 Bitterhet

Bitter smak er enda en utfordring som ofte kan forekomme hos FPH som ingrediens i matindustrien. Lav grad av bitterhet på hydrolysat er derfor essensielt og vil ofte være avgjørende for forbrukere. Faktorer som bestemmer bitterheten er blant annet råstoffets sammensetning, hydrolyseprosessen og oppbevaringen (60).

Proteiner kan ved enzymatisk hydrolyse kunne frigjøre bitre peptider (61). Graden av bitterhet til disse, henger sammen med lengden på peptidkjedene, samt innhold av L-aminosyrene Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu og Val, da disse er hydrofobe (15). God kontroll av hele prosessen er derfor viktig for å kunne redusere eller hindre dannelse av bitre peptider (17).

2.7 Innovative teknologier for forbedring av funksjonelle egenskaper til FPH

Fiskeproteiner, i likhet med alle proteiner får sine funksjonelle egenskaper fra deres aminosyresammensetning og tredimensjonal sammensetning. Disse egenskapene, i tillegg til kjemiske og biokjemiske egenskaper, kan modifiseres ved hjelp av forskjellige behandlingsmetoder. Ved modifisering av proteinene kan man for eksempel sikre at matproduktene har ønskede egenskaper eller produsere funksjonell mat. Dette kan videre brukes til å redusere utvikling av kroniske sykdommer og påvirke generell folkehelse på en positiv måte. Behandlingsmetodene kan deles inn i genetiske, fysiske, kjemiske og enzymatiske metoder. For å forbedre behandlingsmetodene, minke bekostning og øke utbytte jobbes det hele tiden med utarbeidelse av nye innovative teknologier. De siste årene har metodene som ultralyd, pulserende elektrisk felt og høytrykksprosessering vært i fokus.

2.7.1 Pulserende elektrisk felt

Pulserende elektrisk felt (PEF) er en teknologi som på grunn av sin ikke-termiske egenskaper, lav energi forbruk og kort reaksjonstid har i det siste årene fått mye oppmerksomhet, det er også en mulig alternativ for pasteurisering brukt i matprosessering. Ved protein ekstraksjon ved hjelp av PEF vil tilføring av eksterne elektriske feltene til råstoffet forårsake elektro-porasjon av cellemembranen og bidra til økning av diffusjon. Prosessen ødelegger cellemembranen fysisk, uten bruk av temperatur eller andre reaksjoner som kunne endre proteinets struktur og funksjon. PEF behandling på peptider etter ekstraksjonen gir oss muligheten for å forbedre peptidenes biologiske aktivitet som for eksempel deres antioksidant egenskaper (62). For ganola protein isolat førte PEF behandling til en økning av frie sulfhydryl grupper, mens antall sulfhydrylgruppen

minket. PEF forårsaker ionisering og elektrostatiske interaksjoner mellom kjemiske grupper i proteinene, endrer sekundær og tertiær struktur til protein og fører til tap av α -heliks og β -plate. Dette vil ende proteinets funksjonelle egenskaper som er avhengig av molekylets kompaktet (63).

2.7.2 Høytrykksprosessering

Høytrykksprosessering er en fysisk prosesserings teknologi der væske under trykk blir presset gjennom en liten åpning og strømmen akselerer til svært høye hastigheter. Dette vil føre til en gradvis ødeleggelse av molekylene i væsken ved skjærkrefter, turbulens og kavitasjon. Metoden kan blant annet brukes for å omgjøre utilgjengelige planteproteiner til funksjonelle proteiningredienser. Ong (2022) viste at høytrykksprosessering av erteprotein førte til nedbrytning av uløselige protein komplekser, som ga partikler av mindre størrelse (64). Dette førte igjen til økning av overflate ladning og proteinløselighet. Også behandlingen av MPI med HPH førte til økninger i proteinløselighet, emulsjonsegenskaper og skumdannelse (65). Ved behandlingen av peanøtt proteiner ble mikrostrukturen av proteinene modifisert og man så en forbedring i funksjonelle egenskaper som emulgerende aktivitetsindeks, skumdannelse og vannholdende kapasitet (66).

2.7.3 Ultralyd

Ved ultralyd behandlinger brukes det lydbølger med frekvensen høyere enn 20kHz. Ut ifra intensiteten deles ultralyd inn i lav- og høy intensitets ultralydbehandling. Lav intensitets ultralydbehandling (<1 W) brukes i medisinsk ikke-destruktiv testing, ultralyddetektorer og ultralydmikroskoper, mens høy intensitets ultralydbehandling (>10W) brukes hovedsakelig innenfor mat prosessering (67).

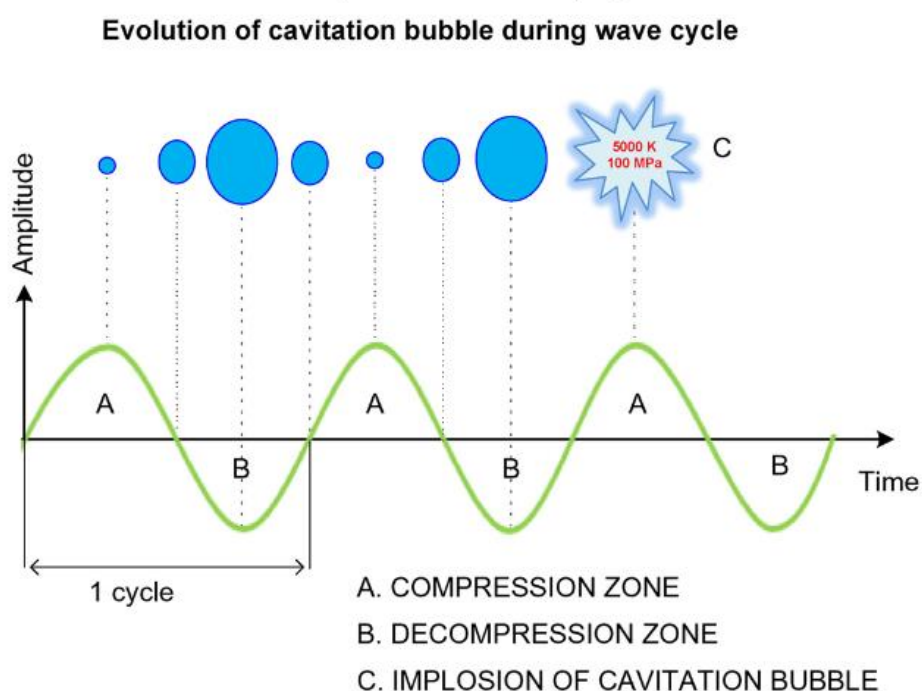
Studie om høy-intensitet ultralydbehandling setter søkelys på hvordan behandlingen endrer systemets eller materialets fysiske, kjemiske og biologiske egenskaper. En typisk egenskap ved metoden er å fremme forskjellige reaksjoner i ulike medier, for eksempel i vannsystemer vil det forårsake partikkel oppdeling mens for gass-systemer vil behandlingen føre til agglomerasjon. Ulike resultater for behandlingen er avhengige av mekanismene so blir aktivert, disse igjen vil være forskjellige fra medie til medie (68).

Høy intensitets ultralydbehandling har mange forskjellige bruksområder og blir blant annet brukt for å fremme reaksjoner for ekstraksjonen av aktive ingredienser fra naturlige produkter, det har

blitt foreslått at metoden endrer proteinene ved kavitasjon. Mekanismen er basert på at lydbølgene som instrumentet gir ut forårsaker områder med lav og høy trykk, som er direkte proporsjonel med mengde energi tilført til mediet (69).

Kavitasjon

Kavitasjon oppstår når trykket i en væske synker til under damptrykket. væsken gjennomgår da en faseforandring fra væske til damp og det dannes gassbobler. Disse boblene kan vokse ved rettet diffusjonsmekanisme, grunnet at gassen beveger seg fra væsken og inn i boblen, i den delen av syklusen der trykket er negativt. Når trykket blir positivt, går gass-strømmen i motsatt retning og boblen vil minke i størrelsen. Ved tilfellene der man har vellykkede kompresjon- og dekompresjonssyklus vil man få fenomenet som kalles for stabil kavitasjon og gassboblen vil oppnå en stabil størrelse. Hvis vekstsyklusen til boblen er større enn reduksjonssyklusen vil veksten til boble være hurtig og resultere i en kollaps. Denne kollapsen vil øke temperatur og trykk i kavitasjons-område, som videre danner frie radikaler som kan reagere og modifisere andre molekyler, som proteiner, i løsningen.



Figur 4 Syklusen av ev kavitasjon bobbel. Hentet fra Ozuna, (67).

Temperaturøkningen ved kavitasjon induserer protein degradingen. Flere hydrolysesteder blir da tilgjengelig for enzymer, som resulterer i økte nivåer av hydrolyse og økt biologisk aktivitet.

Ultralyd behandlingen sammen med enzymatisk hydrolyse har viste å blant annet øke

emulgerbarheten til proteinene fra soya. Effektiviteten av høy-intensitet ultralyd behandlingen er avhengig av virkningen til selve systemet. Innenfor dette applikasjonssystemet er det to systemer som skiller seg ut, ultralydbad og sondetype systemer (67).

2.7.4 Ultralyd effekten på funksjonelle egenskapene til proteiner

Som nevnt tidligere har proteiner funksjonelle egenskaper avhengig av deres aminosyresammensetning og struktur. Ved ultralydbehandling blir disse endret, og man får da også endring av de funksjonelle egenskapene. Bruk av behandlingen kan gi produkter med ønskede egenskaper, som forbedring av skumdannelse og økt tilgjengelighet for menneskelig konsum. Videre settes det søkelys på egenskaper som proteinløselighet, skumdannelse, emulgeringsegenskaper og gel dannelse.

Proteinløselighet

Flere studier har vist at ultralydbehandling gir en økning av proteinløselighet. Dette kan være et resultat av følgende: endringer ved proteinets struktur og sammen folding, bidrar til økt mengde ladde sidegrupper som kan reagerer med vann. Mindre proteinpartikkelstørrelse fører til sammenlagt større areal av proteiner som reagerer med vann (70). Man kan ofte se en lineær sammenheng mellom økning i løselighet og ultralydbehandlingens tid og amplitude. Behandling ved for høy styrke eller over for lang tid kan skade proteiner og forårsake denaturering og tap av funksjonalitet (69). Dette skyldes re-aggregering av dissosierte proteiner som danner store klumper (64).

Skumdannelse

Anvendelse av ultralydbehandling på proteiner fører til, grunnet mindre partikkelstørrelse, økt stabilitet og bedre skumdannelse. Dette vises å stemme ved behandlingen av 10% v/v whey protein konsentrat og protein hydrolysat ved 20 kHz for 15 og 30 minutter. Årsaken til dette er tenkt til å delvis være denaturering av proteinene. Også temperatur for prosessen har vist seg å være av betydningen for endringer av skumdannelse. Generelt er det vist en forbedring i form av skumdannelse etter behandling med ultralyd (69).

Emulgeringsegenskaper

Emulgeringsegenskaper er en viktig aspekt i matteknologi, spesielt ved produkter som supper, majones og andre dressinger. Disse produktene er ofte ustabile og på grunn av dette er man hele tiden på utgikk etter nye teknologier som klarer å forbedre egenskapene ved disse produktene.

Behandlingen med ultralyd endrer egenskapene som emulgeringen er avhengig av og dermed får man også endringer ved både emulgerings aktivitet og stabilitet. Effekten av behandlinger vil hovedsakelig være avhengig av amplituden og pH. Høy-effektivitet ultralyd-behandling har vist seg til å forbedre både stabiliteten og dannelse til emulsjoner fra melk protein isolater, som kan direkte kobles til endringer i proteinets sekundær og tertiære strukturelle endringer. Dermed må det være en balanse mellom eksponering av hydrofobiske grupper og aggregering av proteinmolekyler (64).

Gel dannelse

Studier om ultralyd-behandling på gel dannelse, med proteiner fra melk og whey protein, har vist å gi en sterkere gel, med bedre vannbindingsevne. Resultatene var ikke pH-avhengig og gelene hadde forbedret egenskaper ved forskjellige pH-nivåer (69).

2.7.5 Ultralyd effekten på kjemiske og bioaktive egenskapene til proteiner

Til vår informasjon finnes det lite forskning på høy effektivitet ultralyd sin effekt på kjemiske og bioaktive egenskaper til proteiner. Cuevas-Acuna (71) brukt ultralyd behandlingen på gelatin og så økning i antioksidant aktivitet. Behandlinger med høyere intensitet viste seg for å gi bedre resultater enn mindre intens behandling. Økning av antioksidantaktiviteten kom fra tilføring av elektroner til radikaler som derved ble stabilisert. Det trenges mer forskning for å finne ut de spesifikke endringer ved kjemiske og bioaktive egenskaper til proteiner ved bruk av denne behandlingsmetoden (71).

3. Materialer og metode

I dette kapitlet beskrives de materialer og metoder benyttet i studien, trinnene til de ulike prosedyrene, beskrivelse av den praktiske gjennomførelsen og bearbeidelse av resultat. Reagenser og utstyr benyttet for de ulike metodene er vist i vedlegg A.

3.1 Ultralydbehandling

Frysetørket hydrolysat av makrellråstoff vist i figur 5, ble veid ut og fortynnet til 400 ml i tre prøver. Videre ble hver parallell behandlet med ultralyd av ulik styrke, ved benyttelse av instrumentet Ultrasound Processor VCX 1500, fremvist i figur 6. Instrumentets Max styrke er på 1500W, som tilsvarer 100% ytelsesgrad. I denne studien ble det bestemt å teste en ytelsesgrad på 20%, 30% og 40%. Den første parallellen ble behandlet med 300W (20%), den andre med 450W (30%) og den siste ble utsatt for 600W (40%). Hver prøve ble bestrålt i 5 sekunders intervaller med 5 sekunders pause, i totalt 10 minutter hver. Den reelle behandlingstiden ble da på 5 minutter.



Figur 5 Frysetørket FPH



Figur 6 Ultralydbehandling av fortynnet FPH

Etter behandling av prøveløsningene, kunne en fargeforskjell observeres, vist i figur 7, i tillegg til ulik dannelse av toppsjikt.



Figur 7 Fortynnet FPH behandlet ved hjelp av ultralyd ved 300W (venstre), 450W (midten) og 600W (høyre)

3.2 Fargemåling ved kolorimetri

For å bestemme fargen på fiskeproteinhydrolysat måles en standard fargeparameter, $L^*a^*b^*$, definert av CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). Metoden benytter kolorimetri ved målingen av $L^*a^*b^*$, hvor det tas målinger av absorbansen av bølglengdene til lys av prøvenes spesifikke frekvenser. L^* har en skal fra svart (0) til hvit (100) og indikerer prøvens lyshet/mørkhet. a^* indikerer grønn(-)/rød(+), mens b^* indikerer blå(-)/gul(+) (Konica Minolta, Japan). Fargen på FPH ble avlest ved hjelp av et CR-400-kolorimeter, som før avlesning hadde blitt kalibrert med en hvit plate. I et plastveieskip, ble det så utført fargemålinger i tre paralleller av hver prøve.

3.3 Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering

Hvor stor andel spaltede peptidbindinger det er å finne i et hydrolysat, er det som defineres som hydrolysegraden (%DH). Hydrolysegraden bedømmer størrelsen av proteolyse ved en hydrolyse, samtidig som prosentandelen av peptidbindinger og frie aminogrupeer måles. Spaltingen av protein resulterer i at peptider og frie aminosyrer vil gi fra seg en fri aminogruppe. Denne vil videre være i stand til å danne reaksjon med formaldehyd, og deretter analyseres ved å benytte seg av proteinets totale antall aminogrupeer.

Under formoltitrering, blir proteinhydrolysat løsningen tilsatt formaldehyd. Dette grunnet at tilsetning av formaldehydet fører til at likevekten mellom aminosyrer hvor aminoendene er protoniserte og aminosyrer hvor aminoendene ikke er protoniserte, blir forskjøvet mot NH₂. Formaldehyd vil skape reaksjon med NH₂- og aminogruppene i lysin og arginin sine sidekjer. Methyloderivater vil dannes som et resultat av dette, samtidig som H⁺-ioner vil bli frigjort. Formaldehyden titreres til pH 8,5 med NaOH, hvor mengden NaOH brukt og antall aminogrupper, vil være proporsjonale. Hydrolysegrad-verdien måles fra 0-100%, hvor en verdi på 0% tilsier at proteinene er intakte, mens en verdi på 100% tilsier fullstendig hydrolyse av et protein til frie aminosyrer (72).

I henhold til Taylor (1957), ble %DH til FPH ved forskjellig ultralydstyrke bestemt og tatt ut ifra proteininnholdet til kontrollprøven. Det ble utført analyse av tre paralleller for hver prøve. Det ble veid opp 1,5 gram av hydrolysatet, som videre ble tilsatt destillert vann, slik at totalvekten kom på 50 gram. Blandingen ble godt blandet med en magnetrører, før den så ble nøytralisert med 1 M NaOH, til en pH-verdi lik 7,0. Deretter ble det tilsatt 10 ml formaldehyd i løsningen. Etter 5 minutter ble løsningen titrert til en pH-verdi lik 8,5 med 1 M NaOH, ved å benytte en TitroLine® 7000 (Xylem Analytics, USA). Mengden NaOH benyttet til kvantifisering, ble skrevet ned. Utregning av %DH ble utført i henhold til Taylor (1957) der det ble først regnet ut % frie aminogrupper (%D) ved hjelp av formel 2 (73).

Formel 2

$$\%D = \frac{A * B * 14.007}{C * 1000} * 100\%$$

D er frie aminogrupper A er ml NaOH brukt, B er konsentrasjon av NaOH (1M NaOH) og C er innveid prøve i gram. Deretter ble %D brukt for å regne ut %DH ved hjelp av formel 3.

Formel 3

$$\%DH = \frac{\%D}{E} * 100\%$$

E er (% protein) / 6.25 = 12.9632.

3.4 Lowry-metoden – Bestemmelse av vannløselig protein

Lowry-metoden for protein kvantifisering, baserer seg på en Biuret og Folin – Ciocalteu reaksjon. Ved Biuret-reaksjonen reagerer peptidbindingene fra proteinene med en alkalisk kobberreagens og danner Cu^+ . Cu^+ reagerer med Folin reagenten og får Folin-Ciocalteu reaksjonen, som fører til at løsningen blir blå, proporsjonal med mengde løst protein i prøven. Deretter avleses absorbansen ved passende bølgelengde avhengig av antatt proteinmengde (74).

I henhold til Oliver H. Lowry (1951) ble det laget 7 standardløsninger av protein standard Bovine Serum Albumin (BSA), med konsentrasjoner fra 12.5 – 300 $\mu\text{g/ml}$. Én blank løsning og 3 paralleller av hver av de 3 prøveløsninger (75). Startsmengde i alle rørene var 0.5 ml, tilsvarende H_2O , standardløsning eller fortynnet prøvemateriale. Deretter ble de tilsatt 2.5 ml alkalisk kobberreagens og rørene ble blandet med engang. Etter 10 minutter inkubasjon ved romtemperatur ble det tilsatt 0.25 ml Folin-Ciocalteu reagens og rørene ble igjen blandet med engang. Etter ytterligere 30 minutters inkubasjon ved romtemperatur ble absorbansen avlest ved 750nm. Fra absorbansverdiene til standardløsningene ble det laget en lineær standardkurve ($Y = 0.001X + 0.0015$). Proteinkonsentrasjonen $\mu\text{g/ml}$ i prøveløsninger med ukjent innhold av vannløselig protein ble så regnet ut. For dette ble formel 4 brukt.

Formel 4

$$X = (1 * A) * (Y - B)$$

Der A (stigningstallet) er 0.01, B (konstantledd) er 0.0015 og Y er absorbansen av prøveløsningen ved 750nm. Både A og B er konstante verdier. Konsentrasjonen $\mu\text{g/ml}$ i prøveløsninger brukes for å regne ut $\mu\text{g/ml}$ i ufortynnet ekstrakt, dette ved hjelp av formel 5.

Formel 5

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt} = \text{fortynning} * X$$

Deretter regnes ut løst protein % våt vekt ved hjelp av formel 6.

Formel 6

$$\% \text{ våtvekt} = \frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt} * (\text{ml}) \text{ ekstrakt}}{(\text{g}) \text{ FPH} * 1000 * 1000} * 100\%$$

3.5 Kvantifisering av karbonylgrupper og tioler

For bestemmelse av proteinoksidasjon, ble to metoder benyttet; En ELISA-metode og en måling av thiolgrupper basert på Ellmans reagens. Ved oksidasjon av proteiner, vil andelen karbonylgrupper øke, mens andelen av thiolgrupper reduseres (76).

3.5.1 Kvantifisering av karbonylgrupper

Antall karbonylgrupper ble bestemt ved å benytte OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit. Analysemetoden er en «enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA) som er basert på gjenkjenning av proteinbundet dinitrofenylhydrazin (DNP) med et anti-DNP-antistoff.

Prøveløsningene og BSA standardløsningene ble forberedt i henhold til OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit. 100 µL av hver prøve ble flyttet til en proteinbindende ELISA-plate og videre inkubert ved 4 grader Celsius over natta. Proteinene fra prøveløsningen ble uspesifikt bundet til brønnene i ELISA platen. Brønnene ble deretter vasket 3 ganger med 250 µL 1X PBS, for å vaske bort molekylene som ikke fikk festet seg. Etter vasking ble brønnene så tilsatt 100 µL DNPH for så å bli inkubert i mørket for 45 minutter. Brønnene ble så vasket med 250 µL 1X PBS/Etanol (1:1, v/v) og inkubert på en orbital shaker i 5 minutter, totalt 6 ganger. Videre ble de vasket 2 ganger med 250 µL 1X PBS og tilsatt 200 µL blokkeringsløsning, før inkubasjon på orbital shaker i ca. 70 minutter, ved romtemperatur.

Brønnene ble igjen vasket, nå 3 ganger med 250 µL 1X vaskebuffer med grundig aspirasjon mellom vaskerundene. Etter siste vask ble brønnene tømt over et papirhåndkle for å fjerne overflødig 1X vaskebuffer. Brønnene ble så tilsatt 100 µL fortynnet anti-DNP antistoff og inkubert 1 time ved romtemperatur på en orbital shaker. Brønnene ble igjen vasket tre ganger med 1X vaskebuffer, likt som før tilsetning av anti-DNP-antistoff. Deretter ble de tilsatt 100 µL fortynnet HRP, konjugert sekundært antistoff, og ble så inkubert i 1 time ved romtemperatur på en orbital shaker. Brønnene ble deretter vasket 5 ganger med 250 µL 1X vaskebuffer og tilsatt substratløsning og videre inkubert mellom 2-30 minutter, til fargeforandring. For å stoppe reaksjonen ble brønnene tilsatt 100 µL stopp løsning. Resultatene ble avlest ved 450 nm som den primære bølgelengden. Den fullstendig redusert BSA standarden ble brukt som blank verdi.

For utregning av proteinkarbonylderivater ble det først laget til en lineær standardkurve fra absorbansen til standardløsningene, som videre ble brukt for å regne ut proteinkarbonylderivater nmol/mg. Dette ble gjort ved hjelp av formel 4.

Formel 4

$$X = (1 * A) * (Y - B)$$

Der A (stigningstallet) er 0.07796, B (konstantledd) er 0.133196 og Y er absorbansen av prøveløsningen ved 450nm. Både A og B er konstante verdier.

3.5.2 Kvantifisering av thiol

Antall thiolgrupper ble bestemt basert på Ellmans reagens (1959), DTNB. Oksidasjon av proteiner vil føre til reduksjon av thiol, nærmere beskrevet i delkapittel 2.6.1 (76).

For kvantifiseringen av thiol, ble det pipetert ut 100µl av hver prøve over til eppendorf rør, i tre paralleller. Det ble i tillegg laget en blank prøve av destillert vann. Videre ble det tilsatt 800µl urea, samt 100µl DTNB, til alle rørene. Dette ble godt blandet og videre satt til inkubasjon i 30 minutter, ved romtemperatur, for så å bli sentrifugert i 3 minutter, 13300 rpm. Til slutt ble absorbansen avlest ved 412nm. For utregning av antall thiolgrupper nmol/mg ble det først brukt formel 7 for å regne ut konsentrasjonen (C) i M.

Formel 7

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

Der A er absorbansen av prøveløsningen ved 412nm, b er kuvette lengde i cm og E som ekstinksjonskoeffisient til TNB. Deretter ble verdiene for protein mg/ml i ufortynnet ekstrakt fra lowry analyse brukt for å gjør om resultatene til nmol/mg. Dette ble gjort ved hjelp formel 8.

Formel 8

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} = \frac{C * 1000 * 1000}{\text{protein } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt}}$$

3.6 Total aminosyresammensetning

For bestemmelse av total aminosyresammensetning ble High Performance Liquid Chromatography (HPLC) brukt som separasjonsmetode. Prinsippet baserer seg på at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom en mobil og stasjonær fase. For å kunne separere stoffer i en blanding er det viktig å velge en riktig kombinasjon av de eksperimentelle betingelser som påvirker separasjonen som type mobil og stasjonær fase, lengde og diameter på kolonnen, trykk, temperatur og flere. Stoffene vil på grunn av sine fysiske og kjemiske egenskaper reagere forskjellig med kolonnens faser og bevege seg dermed gjennom systemet med forskjeller i hastighet. På grunn av dette vil stoffene som beveger seg gjennom kolonnen bli separert. Resultatene fra kromatografi kan så sammenlignes med kontroll verdiene for kjente stoffer og deretter bestemme hvilke komponenter den ukjente prøven består av (Greibrokk, 2005).

For å klargjøre prøvene for kromatografi ble ca 50mg av FHP tilsatt 2ml 6M HCl. Dette for å bryte ned proteinene til frie aminosyrer. Blandingen ble hydrolysert for 24h ved 105 grader Celsius og deretter avkjølt. Deretter ble prøvene fortynnet 1:50 og 300 µl av prøven ble overført til et glassrør. Denne ble deretter tilsatt 600 µl 0.4M boratbuffer (pH 9) og 600 µl 9-Fluornylmethoxykarbonyl klorid (FMOc), 15mM, i acetonitril. Prøvene ble deretter satt på en orbital shaker for 10 minutter. For å stoppe reaksjonen i glassrøret ble blandingen tilsatt 600 µl 1-adamantanamin, 60mM, i acetonitril:vann 1:4 (ADAM). Deretter ble prøvene filtrert gjennom en 0.22 µl filter og ca. 1ml av prøvene ble overført til HPLC hetteglass. Det ble utført analyse av 2 paralleller for hver prøve.

Aminosyrene ble analysert med en Shimadzu Nexera XR HPLC system, utstyrt med en PDA-detektor med bølgelengde på 263nm og en solvent gradient (Shimadzu). Separering av aminosyrene ble utført i en Restec ARC-18 kolonne (10mm x 2.1mm, 2.7 µm partikkel størrelse) ved 30°C. Den mobile fasen var 0,1 % maursyre med 20 mM ammoniumformiat (mobil fase A) og 0,1 % maursyre med 10 mM ammoniumformiat i 90:10 acetonitril:vann (mobil fase B) i gradientmodus, med en strømningshastighet på 0,8 ml/ min.

3.7 Statistisk analyse

Alle resultat ble analysert ved å benytte programvaren Excel. Først ble det regnet ut gjennomsnitt og standardavvik ut ifra paralleller av prøvene ved de ulike analysemetodene. Videre gjennomsnittene av parallellene benyttet som data for utføring av tosidig T-test av alle analysene,

med unntak av metoden for total aminosammensetning, da det bare var mulighet for en parallell. Hvert enkelt gjennomsnitt av prøvene ble satt opp imot gjennomsnittet av kontrollprøven ved hver analyse, dette for å kunne vurdere signifikansen til resultatene. Alle statistiske analyser ble utført med et signifikansnivå på 0.05 ($p \leq 0.05$). Resultat blir fremstilt i påfølgende kapittel, kapittel 4.

4. Resultat

Dette kapitlet presenterer resultatene fra alle utførte analysemetoder.

4.1 Fargemåling ved kolorimetri

Måling av farge på FPH ble målt ved metoden $L^*a^*b^*$ (CIE), som beskrevet i delkapittel 3.2. Resultatene er vist som gjennomsnitt i tabell 2, verdiene til hver parallell og utregning er vist i figur 12, vedlegg E.

Tabell 2 Fargemåling av frysetørket FHP. Standardavvik er gitt for $n=3$.

	Kontroll	300 W	450 W	600 W
Lyshet (L^*)	71.40 ± 1.53	79.70 ± 0.79	79.46 ± 0.56	80.14 ± 0.11
Rød/Grønn (a^*)	1.92 ± 0.22	-0.40 ± 0.10	-0.47 ± 0.04	-0.40 ± 0.04
Gul/Blå (b^*)	22.39 ± 0.63	17.82 ± 0.95	17.16 ± 0.24	17.05 ± 0.14

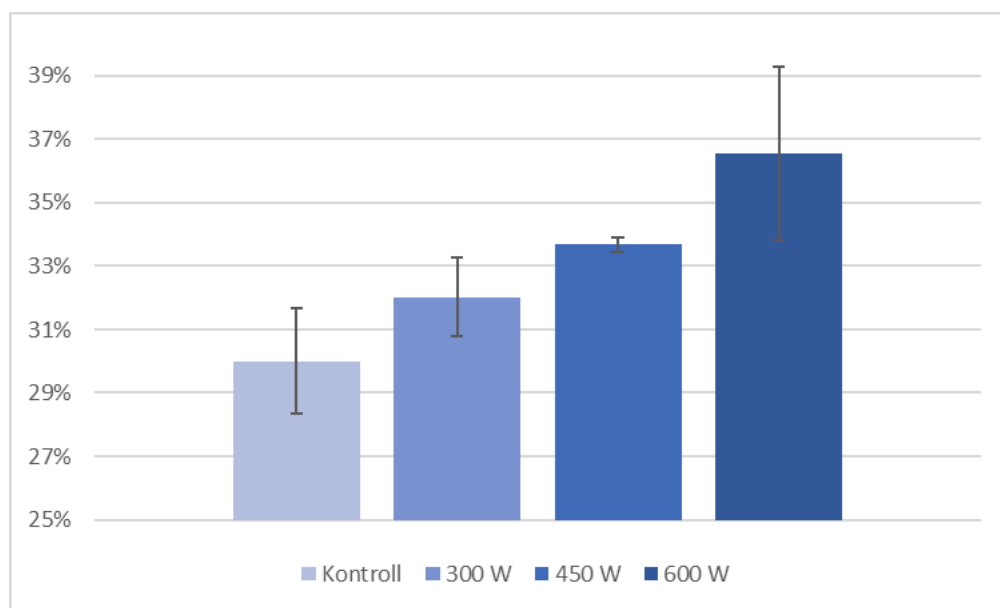
Tabellen tilsier at høyest L^* -verdi ble oppnådd ved 600 W, sammenlignet med kontroll. Rødhet er høyere på kontroll, hvor verdiene går mer mot grønn etter behandling, men med lite forskjell mellom de ulike behandlingsstyrkene. Tabellen viser en høyere gulhet på kontroll og en økning i blåhet mot 600 W.

Tabell 3 Tosidig t-test fargemåling, med $p \leq 0.05$. T-test er gjort opp mot kontroll for hver av de enkelte ultralydstyrkene. Signifikante forskjeller er vist ved stjerne*

T-test	300 W	450 W	600 W
Lyshet (L^*)	0.05*	0.05*	0.04*
Rød/Grønn (a^*)	0.003*	0.003*	0.003*
Gul/Blå (b^*)	0.03*	0.01*	0.01*

Tabell 3 viser resultatene etter utført tosidig t-test, hvor alle resultatene kan ses på som signifikante, med størst signifikant endring hos 600W. Figur 13, vedlegg E, viser hver parallell benyttet som data for utføringen av tosidig t-test.

4.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltrering



Figur 8 Prosentandel vannløst protein (y-aksen), gjennomsnitt og standardavvik er vist, $n = 3$.

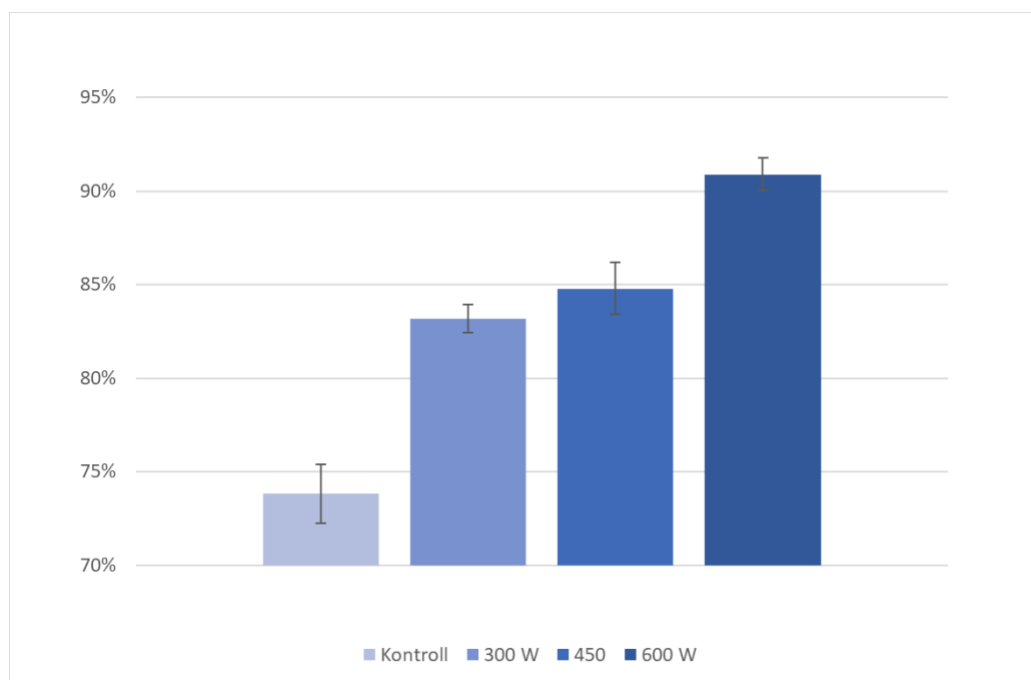
Formoltrering i henhold til Taylor (1957), ble benyttet for å bestemme hydrolysegraden til hydrolysaten (73). Resultatene er vist i figur 8, som viser en oversikt over hydrolysegrad % av kontroll prøve (vakuumpakket makrell FPH), FPH behandlet ved 300W, 450 W og 600W. Verdier benyttet i analysen er gitt i figur 14 i vedlegg E, med eksempel på beregninger i vedlegg B.

Tabell 4 Tosidig t-test hydrolysegrad, med $p \leq 0.05$. T-test er gjort opp mot kontroll for hver av de enkelte ultralydstyrkene. Signifikante forskjeller er vist ved stjerne*

T-test	300 W	459 W	600 W
p-verdi	0.09	0.05*	0.01*

Tabell 4 viser resultat fra tosidig t-test mellom gjennomsnittet av tre paralleller fra hver av prøvene satt opp imot kontroll. Verdiene benyttet for t-test er vist i figur 15 i vedlegg F.

4.3 Lowry – metoden – Bestemmelse av vannløselig protein



Figur 9 Proteinløselighet % våt vekt (y-aksen), gjennomsnitt og standardavvik er vist, for 300W n=2, for andre n=3, verdier benyttet for grafisk fremstilling er vist i figur 22 (Vedlegg G).

Prosenten av vannløselige proteiner i prøveløsningene ble bestemt ved hjelp av Lowry-metoden som bruker proporsjonelt forhold mellom løst protein og dannelsen av blåfarge i løsningene, nærmere beskrevet i delkapittel 3.4. En oversikt over resultatene kan ses i figur 9, hvor verdiene og mengder av standardløsninger og BSA er vist i figur 18 i Vedlegg F. Eksempel på beregninger er vist i vedlegg C. Figur 19 (Vedlegg G) viser verdiene etter tre målinger av absorbans ved 750nm for hver av parallellene. Gjennomsnittet for målingene er vist for hver parallell.

Verdier benyttet for tillagning av fortyninger, samt omregninger, er vist i figur 20 (vedlegg G). Videre, blir bestemmelse av % våt vekt protein vist i figur 21 (vedlegg G).

Tabell 5 Tosidig t-test løst protein, med $p \leq 0.05$. Signifikante forskjeller er vist ved stjerne*

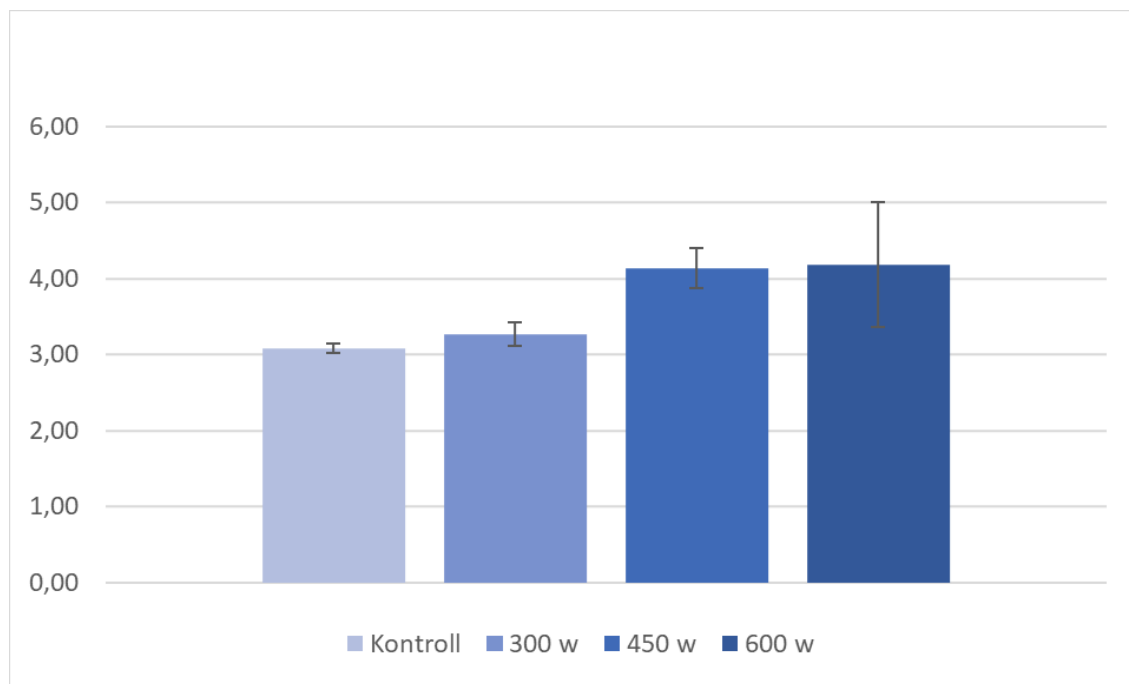
	300 W	450 W	600 W
T-test	0.36	0.01*	0.01*

Tabell 5 viser resultat fra tosidig t-test mellom gjennomsnittet av hver av prøvene satt opp imot kontroll. For 450W og 600W ble gjennomsnittet tatt ut ifra tre paralleller, mens 300W kun hadde

to paralleller grunnet for stort avvik, som videre resulterte i at resultatet for 300W ikke kan regnes som signifikant. Verdiene til hver av parallellene er vist i figur 23 (Vedlegg G).

4.4 Kvantifisering av karbonylgrupper og thiol

4.4.1 Kvantifisering av karbonylgrupper



Figur10 Proteinkarbonyl nmol/mg (y-aksen). Gjennomsnitt og standardavvik er gitt for $n=2$. Y-aksen viser mmol karbonyl/mg protein.

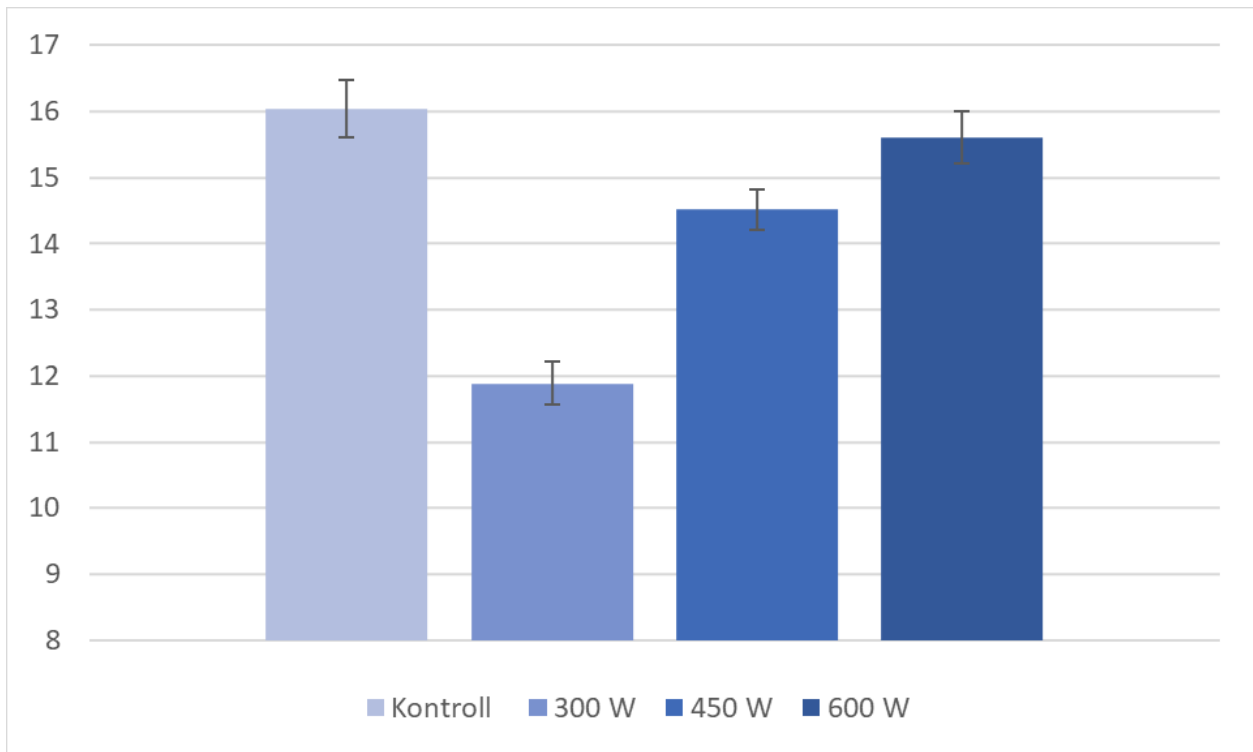
Figur 10 viser antall karbonylgrupper for kontroll (vakuumpakket FPH av makrell) og de ulike prøvene. Verdier for tillagningen av standardløsningene benyttet for analysemetoden er oppgitt i tabell 24 i vedlegg H, videre viser tabell 25 (vedlegg H) verdier for utregning av konsentrasjon karbonylgrupper (nmol/mg). Eksempel på utregning er vist i vedlegg D.1.

Tabell 6 Tosidig t-test på karbonylgrupper oppgitt i p-verdi, med $p \leq 0.05$. Signifikante forskjeller er vist ved stjerne*

	300 W	450 W	600 W
T-test	0.20	0.08	0.29

Tabell 6 gir en oversikt over p-verdier etter utført t-test, hvor alle prøvene ga verdier over 0.05 og kan ikke regnes som signifikante. Verdier benyttet for t-test er vist i tabell 25 (vedlegg H).

4.4.2 Thiolgrupper



Figur 11 Figuren viser konsentrasjon av thiolgrupper i nmol/mg (y-aksen). Gjennomsnitt og standardavvik er g $n=2$ ved 300W og for $n=3$ for resten.

Figur 11 viser verdiene for kontrollprøve og for prøvene ved ulike behandlingsstyrker. Verdiene benyttet er vist i figur 26 i vedlegg I, med eksempel på utregning i vedlegg D.2.

Tabell 7 Tosidig t-test for thiolgrupper oppgitt i p-verdi, med $p \leq 0.05$. Signifikante forskjeller er vist ved stjerne*

	300 W	450 W	600 W
T-test	0.0015*	0.05*	0.09

Utført t-test viser at kun resultatet ved behandling med 300W gir en p-verdi < 0.05 , og er derfor det eneste signifikante resultatet. Figur 27 (vedlegg I) viser verdier benyttet som data for utføringen av tosidig t-test.

4.5 Total aminosyresammensetning

Tabell 8 Sammenligning av aminosyresammensetning fra FPH oppgitt i %, gjennomsnitt og standardavvik er vist, n =1 for kontroll og n=2 for prøvene. Prosentandel essensielle og ikke-essensielle aminosyrer er oppgitt.

Aminosyre	Kontroll	300 W	450 W	600 W
*Arginin (Arg)	3.9	2.20 ± 1.91	1.65 ± 0.66	1.10 ± 0.80
Serin (Ser)	8.32	4.82 ± 5.50	3.27 ± 3.16	3.09 ± 3.46
Asparaginsyre (Asp)	-	-	-	0.14 ± 0.01
Glutaminsyre (Glu)	8.99	4.0 ± 5.56	0.05 ± 0.01	3.34 ± 4.65
*Treonin (Thr)	3.79	3.11 ± 0.39	2.93 ± 1.09	3.32 ± 0.91
Glysin (Gly)	14.85	10.99 ± 0.12	9.48 ± 4.54	11.62 ± 4.75
Alanin (Ala)	8.74	5.12 ± 0.13	4.84 ± 1.74	5.48 ± 1.35
Prolin (Pro)	9.9	24.83 ± 15.14	36.21 ± 4.34	25.02 ± 0.01
*Valin (Val)	0.29	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.17	1.28 ± 0.93
*Fenylalanin (Phe)	2.43	3.0 ± 0.12	2.53 ± 0.21	2.01 ± 0.83
*Isoleucin (Ile)	3.29	2.56 ± 0.20	2.29 ± 0.49	2.44 ± 0.89
*Leucin (Leu)	12.34	13.93 ± 0.90	15.03 ± 0.20	13.83 ± 0.85
Cystin (Cys)	0.53	9.68 ± 0.75	9.42 ± 2.41	6.71 ± 2.65
*Histidine/Cysteine/Tyrosine**	22.65	15.62 ± 1.45	12.11 ± 2.55	14.37 ± 2.55
% Essensielle aminosyrer	26.04	26.63	24.63	30.49
% Ikke-essensielle aminosyrer	51.33	62.95	63.26	63.79

* Essensielle aminosyrer

** Histidin er ikke tatt med i beregningen av % essensielle aminosyrer, grunnet at den cystein og tyrosin, som begge er ikke-essensielle. Da vi ikke vet hvor stor andel hver av disse utgjør, blir også cys og tyr ekskludert fra % ikke-essensielle og ikke vist i beregningene i vedlegg E.

Tabell 8 fremstiller total aminosyresammensetningen til de ulike FPH-prøvene, sammenlignet med kontroll, ut ifra verdier hentet fra HPLC-analyse. Metoden beskrives i delkapittel 2.6. Tabellen fremstiller også en sammenligning av prosentandel essensielle og ikke-essensielle aminosyrer, mellom kontrollen og hver av de tre ultralydbehandlede prøvene. Verdier for hver parallell benyttet til utregning av gjennomsnitt, varians og standardavvik, samt prøvemengde, er oppgitt i figur 28 og figur 29 i vedlegg J.

5. Diskusjon

Oppgavens femte kapittel, diskusjonskapitlet, vil ta seg gjennom og drøfte alle steg, prosedyrer og resultat. Her blir det sett på studiens svakheter, styrker, mulige feilkilder og muligheter for videre arbeid og forbedring.

5.1 Fargemåling

Tabell 2 (delkapittel 3.2) viser en høyere lyshet etter ultralydbehandling. Høyest L*-verdi ble oppnådd ved 600 W. Dette kan være et resultat av blant annet en større proteindenaturering og endring av peptidstruktur (sekundærstruktur), samt økt emulgeringsmuligheter. Emulsjon vil oppstå ved ultralydbehandling, hvor alt ved emulgeringsdannelse kan endre farge. T-test av fargeanalysen viste ingen signifikant endring på L*-verdi etter behandling hos 300W og 450W, mens T-test av L*-verdi av 600W ga signifikante resultater. Lysere hydrolysat tyder ikke på dårligere kvalitet og kan heller være gunstigere ved anvendelser i matindustrien, da forbrukere ofte appelleres mer mot lysere/fargeløse produkt. Videre ga T-test av både a*- og b*-verdi et signifikant resultat hos alle de ultralydbehandlede prøvene.

5.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved formoltitrering

Figur 8 (delkapittel 3.3) viser at ubehandlet FPH har laveste hydrolysegrad, med en lineær økning i samsvar med styrken på ultralydbehandling. Forskjellen mellom kontroll og FPH behandlet ved 600W er ca. 6%. Som nevnt i delkapittel 1.8.4, fører ultralydbehandling til endring av proteinets struktur og funksjonelle egenskaper. Dette tyder på at ved økt behandlingsstyrke av FPH, blir proteinet ytterligere degradert, slik at andelen spaltede peptidbindinger øker. Økt tilgang på mindre peptider er gunstig, da dette også gir økning av funksjonelle- og bioaktive egenskaper. Det er vist at en større hydrolysegrad også resulterer i en høyere grad av løselighet, på grunnlag at mindre partikkelstørrelse vil gi proteinet et større reaksjonsområde i vann. Høy løselighet er essensielt ved produksjon av funksjonell mat. Behandling ved 600 W har gitt høyest hydrolysegrad og da også høyest proteinløselighet. Utførelse av T-test, viste at behandling ved 600W var det eneste resultatet som ga en signifikant forbedring av %DH.

5.3 Lowry-metoden – Bestemmelse av vannløselig protein

Figur 9 (delkapittel 3.4) viser at kontrollprøven har lavest % proteinløselighet, med økende andel løst protein ved høyere grad av ultralydbehandlingsstyrke. Utført T-test viste at behandling ved 450W og 600W ga signifikante resultat, men ikke ved behandling av 300W. Behandlingen ved 600W ga best resultat med tilnærmet 90%. Forskjellen mellom kontrollprøven og prøven behandlet ved 600W er ca. 12%. Resultatene fra formoltitrering i delkapittel 3.2, viste størst hydrolysegrad ved 600W, og da også høyest proteinløselighet. Dette stemmer overens med % løst protein i de ulike prøvene, da høyere grad av hydrolyse vil gi økt innhold av løst protein. Proteinløseligheten øker etter ultralydbehandling og er størst ved 600W.

5.4 Kvantifisering av karbonylgrupper og thiol

5.4.1 Kvantifisering av karbonylgrupper

ELISA-metoden ble benyttet for å bestemme oksidasjon av proteiner, på grunnlag av karbonylforbindelser, nærmere beskrevet i delkapittel 2.6.1 og 3.5. Større mengde karbonylgrupper tyder på høyere grad av oksidasjon. Figur 10 (delkapittel 4.4.1) viser en større oksidasjon ved høyere styrke på ultralydbehandlingen. Størst tilstedeværelse av proteinkarbonylderivater oppsto ved 600W, på $4,19 \pm 0,83$ nmol/mg. En økning i oksidasjon er kjent å skje ved både hydrolyse og behandling med ultralyd. Begge disse prosessene fører til dannelse av frie radikaler, som kan skape reaksjon med proteiner. På samme tid, grunnet større andel små peptidkjeder, vil proteinene lettere kunne bli oksidert av reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser. T-test viste at ingen av resultatene kunne regnes som signifikante, noe som ses på som positivt i denne sammenhengen, da dette tyder på ingen betydelig oksidasjon.

5.4.2 Kvantifisering av thiol

En annen metode benyttet for bestemmelse av oksidasjon, var måling av thiolgrupper, da oksidasjon gir redusert mengde thiol. Figur 11 (delkapittel 4.4.2) oppgir at kontrollprøven har høyest innhold av thiolgrupper, som viser at ultralydbehandling fører til ytterligere proteinoksidasjon. Basert på resultatene fra ELISA-analysen, var det forventet å få høyest oksidasjon ved 600W og da også lavest antall thiol. Figur 11 viser at dette ikke er tilfellet. Basert på thiolinnhold, vises oksidasjonen å være størst ved 300W, med lavest mengde thiol på $11,88 \pm 0,33$ nmol/mg.

Økningen av karbonylgrupper og reduksjon av thiol, viser til noe oksidasjon av FPH. Figur 8 i delkapittel 4.2 viser en stor økning i proteinløselighet, i samsvar med hydrolysegrad, som tyder på ingen signifikant oksidasjon, da høyere oksidasjon senker løseligheten.

5.5 Total aminosyresammensetning

Ut ifra tabell 8 (delkapittel 4.5), vises det at Pro, His/Cys/Tyr og Leu er blant de aminosyrene som utgjorde størst prosentandel i alle hydrolysatene. Etter behandling har enkelte aminosyrer økt, mens andre er blitt redusert. Størst økning er den ikke-essensielle aminosyren Pro, fra 9,9 hos kontroll til 36,21 ved 450W. Av de essensielle aminosyrene, viser tabellen at Leucin utgjør den største andelen, med en prosentandel mellom 12,35 – 15,03. I protein er Leu blant de vanligste aminosyrene, så en høyere konsentrasjon var forventet. Det vises også at konsentrasjonen økes ytterligere etter behandling med ultralyd, med høyest prosentandel ved 450W.

Tabellen viser et størst innhold essensielle aminosyrer ved 600W. Prosentandel ikke-essensielle, er også å finne ved behandling med 600W. Økningen av de essensielle aminosyrene, er positivt da proteinets kvalitet avhenger av dette. I tillegg vil høyere konsentrasjon av essensielle aminosyrer gi en økt proteinfordøyelighet og en høyere biologisk verdi (77).

5.6 Videre arbeid

I denne bacheloroppgaven ble det vist at behandling av ultralyd kan føre til bedring av proteiners egenskaper. Behandling med 600W ga best resultat. I videre arbeid kan det være interessant å teste flere ulike ultralydstyrker, for å optimalisere metoden, og i tillegg se om behandlingstid er en viktig faktor for resultatet. Det er kjent at hydrolyse gir en økt tilgang på bioaktive peptider og deres funksjonelle egenskaper, men at det på samme tid kan føre til økt grad av oksidasjon.

Flere resultater viste noe oksidasjon av proteiner, så det kan være tenkelig å tilsette en antioksidant før behandling med ultralyd, for å kunne redusere eller forhindre dette. Et eksempel på en antioksidant man kan benytte i denne sammenhengen, er rosmarinekstrakt (E-392), en naturlig antioksidant som blant annet beskytter kroppen mot frie radikaler (78).

Optimalisering av ulike parameter, større tilgang på reagenser, utstyr og metoder for innsamling av større data, vil også være aktuelt å sette søkelys på ved videre arbeid.

6. Konklusjon

Målet med bacheloroppgaven var å undersøke om bruken av ultralyd ville forbedre kvalitetsparameter og funksjonelle egenskaper hos FPH ekstrahert fra makrell. Ved anvendelse av FPH i matindustrien er det sentralt at de inneholder høy løselighet og høyere andel av essensielle aminosyrer, i tillegg til at en lys farge ofte er ønskelig. Eventuell forbedring ble bestemt ved å sammenligne ubehandlet proteinhydrolysat med ultralydbehandlede hydrolysater av ulik styrke. Analysene benyttet for denne sammenligningen var måling av farge, hydrolysegrad, innhold av vannløselig protein, kvantifisering av thiol- og karbonylgrupper og total aminosyresammensetning.

Hydrolysegraden etter ultralydbehandling, ble vist å ha en lineær økning i samsvar med styrken på behandlingen. Dette bidrar direkte til en høyere proteinløselighet, som er bedre for opptak i kroppen og videre svært viktig dersom FPH skal benyttes som en matingsrediens i drikker, supper etc. En behandling med 600W ga best resultat med en økning på 6%. Resultatene for vannløselig protein samsvarte med hydrolysegraden, hvor det beste resultatet her også var ved behandling på 600W, som ga 12% økt andel løst protein.

Resultatene fra kvantifisering av thiol- og karbonylgrupper tyder på noe proteinoksidasjon etter ultralydbehandling, men grunnet en betydelig økt proteinløselighet blir denne da ikke sett på som signifikant. I tillegg til løselighet, er fargen på FPH også en viktig kvalitetsparameter.

Fargeanalysen viste lite fargeendring, men et noe lysere resultat ved sterkere ultralydbehandling, da det trolig henger sammen med endring av sekundærstruktur og dannelse av emulsjon.

De totale aminosyresammensetningene til de ulike prøvene ble sammenlignet opp mot kontroll, hvor det ble vist et størst innhold av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ved 600W.

Oppsummert kan det konkluderes med at ultralydbehandling av FPH bidrar til generell forbedring av kvalitetsparameter og funksjonelle egenskaper, hvor behandling ved 600W viste seg å være mest adekvat.

Referanseliste

1. Aspevik T, Oterhals Å, Rønning SB, Altintzoglou T, Wubshet SG, Gildberg A, et al. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. *Top Curr Chem* (Cham). 2017;375(3):53.
2. FN-sambandet. Utrydde sult 2023 [Available from: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal/utrydde-sult>].
3. Richardsen R. Analyse marint restråstoff, 2016 - Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge. 2016.
4. Šližyte R, Daukšas E, Falch E, Storrø I, Rustad T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*. 2005;40(3):1415-24.
5. vasudevan ramakrishnan V, Ghaly A, Brooks MS, Budge SM. Extraction of proteins from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*. 2013;3:2-9.
6. Kristinsson H, Rasco B. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2000;40:43-81.
7. Slizyte R, Grimsmo L, Storrø I, editors. Prosessering av biråstoff fra sild til olje og proteinhydrolysat. Laboratorieforsøk med ulike proteaser og pilotforsøk med ultraferskt råstoff 2010.
8. Aspino SI, Horn SJ, H. Eijnsink VG. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*. 2005;40(5):1957-66.
9. NIFES. Makrell 2014 [Available from: <https://nifes.hi.no/art/makrell/#topp>]
10. Nøttestad L. Tema: Makrell 2019 [Available from: <https://www.imr.no/hi/temasider/arter/makrell>].
11. Fekjan J. Makrell *Scomber scombrus* Linnaeus. <https://www.artsdatabanken.no/taxon/Scomber%20scombrus/43191>: Artsdatabanken; 1758.
12. Bandarra N, Batista I, Nunes M, Empis J. Seasonal variation in the chemical composition of Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*. 2001;212:535-9.
13. Romotowska P, Gudjonsdottir M, Karlsdottir M, Kristinsson H, Arason S. Stability of frozen Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) as affected by temperature abuse during transportation. *LWT - Food Science and Technology*. 2017;83.
14. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem*. 1976;24(6):1090-3.
15. Coultate TP. *Food: the chemistry of its components*: Royal Society of Chemistry; 2009.
16. Pasupuleti VK, Braun S. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. In: Pasupuleti VK, Demain AL, editors. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 11-32.
17. 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):215-22.
18. Guérard F. Enzymatic methods for marine by-products recovery. 2007. p. 107-43.
19. Kristinsson H. Aquatic food protein hydrolysates. 2007. p. 229-48.
20. Petrova I, Tolstorebrov I, Eikevik T. Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*. 2018;10.
21. Zamora-Sillero J, Gharsallaoui A, Prentice C. Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Mar Biotechnol* (NY). 2018;20(2):118-30.
22. Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1976;24(6):1090-3.

23. Rutherford SM. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*. 2010;93 5:1515-22.
24. Adler-Nissen J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*: Elsevier applied science publishers; 1986.
25. Rustad T, Storrø I, Slizyte R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011;46(10):2001-14.
26. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;51:24-33.
27. Kim S-K, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2010;2(1):1-9.
28. Chalamaiah M, Dinesh kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. 2012;135(4):3020-38.
29. Gauthier SF, Paquin P, Pouliot Y, Turgeon S. Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins1. *Journal of Dairy Science*. 1993;76(1):321-8.
30. Shavandi A, Hou Y, Carne A, McConnell MA, Bekhit AEDA. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Advances in food and nutrition research*. 2019;87:187-254.
31. He S, Franco C, Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*. 2013;50(1):289-97.
32. Gbogouri G, Linder M, Fanni J, Parmentier M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of food science*. 2004;69(8):C615-C22.
33. Wilding P, Lillford P, Regenstien JM. Functional properties of proteins in foods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology Biotechnology*. 2008;34:182-9.
34. Šližytė R, Daukšas E, Falch E, Storrø I, Rustad T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*. 2005;40(6):2021-33.
35. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*. 2007;102(4):1317-27.
36. Agyei D, Pan S, Acquah C, Bekhit AEA, Danquah MK. Structure-informed detection and quantification of peptides in food and biological fluids. *J Food Biochem*. 2019;43(1):e12482.
37. Meisel H, FitzGerald R. Biofunctional peptides from milk proteins. Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current pharmaceutical design*. 2003;9:1289-95.
38. Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem*. 2004;52(21):6646-52.
39. Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: A review. *Food quality and safety*. 2017;1(1):29-46.
40. Fuchs FD, Whelton PK. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*. 2020;75(2):285-92.
41. Sabbione AC, Ibañez SM, Martínez EN, Añón MC, Scilingo AA. Antithrombotic and Antioxidant Activity of Amaranth Hydrolysate Obtained by Activation of an Endogenous Protease. *Plant Foods Hum Nutr*. 2016;71(2):174-82.
42. Shimizu M, Sawashita N, Morimatsu F, Ichikawa J, Taguchi Y, Ijiri Y, et al. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thromb Res*. 2009;123(5):753-7.
43. Chalamaiah M, Yu W, Wu J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*. 2018;245:205-22.
44. Wang YK, He HL, Wang GF, Wu H, Zhou BC, Chen XL, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Mar Drugs*. 2010;8(2):255-68.

45. Yang MP, Eoum HY, Na KJ, Araki S, El-Abasy M, Motobu M, et al. Enhanced phagocytic activity of neutrophils caused by administration of egg white derivatives (EWD) in cats injected with cyclophosphamide (CPA). *J Vet Med Sci.* 2001;63(3):269-74.
46. Slizyte R, Mozuraitytė R, Martinez Alvarez O, Falch E, Fouchereau-Peron M, Rustad T. Functional, Bioactive and Antioxidative Properties of Hydrolysates Obtained from Cod (*Gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry.* 2009;44:668-77.
47. Ren J, Zhao M, Shi J, Wang J, Jiang Y, Cui C, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 2008;108(2):727-36.
48. Zhao M, Regenstein J, Ren J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International.* 2010;43:1167-73.
49. Liu R, Xing L, Fu Q, Zhou GH, Zhang WG. A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants (Basel).* 2016;5(3).
50. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides.* 2010;31(10):1949-56.
51. Saha BC, Hayashi K. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnol Adv.* 2001;19(5):355-70.
52. Kim S-K, Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International.* 2006;39(4):383-93.
53. Hematyar N, Rustad T, Sampels S, Dalsgaard T. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. A Review. *Aquaculture Research.* 2019;50:1393-403.
54. Lund M, Heinonen M, Baron C, Estévez M. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular nutrition & food research.* 2011;55:83-95.
55. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(3):323-5.
56. Aeschbach R, Amadoò R, Neukom H. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.* 1976;439(2):292-301.
57. Mukherjee S, Kapp EA, Lothian A, Roberts AM, Vasil'ev YV, Boughton BA, et al. Characterization and Identification of Dityrosine Cross-Linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2017;89(11):6136-45.
58. Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estévez M. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(1):83-95.
59. Baron CP, Kjærsgård IV, Jessen F, Jacobsen C. Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of agricultural and food chemistry.* 2007;55(20):8118-25.
60. Slizyte R, Nguyen J, Rustad T, Storro I. Hydrolysis of Cod (*Gadus morhua*) By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology - J AQUAT FOOD PROD TECHNOL.* 2004;13:31-48.
61. Fu Y, Chen J, Bak KH, Lametsch R. Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review. *International Journal of Food Science & Technology.* 2019;54(4):978-86.
62. Lin D, Zhang Q, Xiao L, Huang Y, Yang Z, Wu Z, et al. Effects of ultrasound on functional properties, structure and glycation properties of proteins: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;61(15):2471-81.
63. Zhang L, Wang L-j, Jiang W, Qian JY. Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of canola protein by pretreating seeds to elevate oil yield. *Lwt - Food Science and Technology.* 2017;84:73-81.

64. Ong KS, Chiang JH, Sim SYJ, Liebl D, Madathummal M, Henry CJ. Functionalising insoluble pea protein aggregates using high-pressure homogenisation: Effects on physicochemical, microstructural and functional properties. *Food Structure*. 2022;34:100298.
65. Yu C, Cha Y, Wu F, Xu X, Qin Y, Li X, et al. Effects of high-pressure homogenisation on structural and functional properties of mussel (*Mytilus edulis*) protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017;53.
66. Song X, Zhou C, Fu F, Chen Z, Wu Q. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*. 2013;43:538–44.
67. Ozuna C, Paniagua-Martínez I, Castaño-Tostado E, Ozimek L, Amaya-Llano S. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*. 2015;77.
68. Gallego-Juárez JA, Graff KF. 1 - Introduction to power ultrasonics. In: Gallego-Juárez JA, Graff KF, editors. *Power Ultrasonics*. Oxford: Woodhead Publishing; 2015. p. 1-6.
69. Higuera-Barraza OA, Del Toro-Sanchez CL, Ruiz-Cruz S, Márquez-Ríos E. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrason Sonochem*. 2016;31:558-62.
70. Mirmoghtadaie L, Shojaee-Aliabadi S, Hosseini SM. Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*. 2016;199:619-27.
71. Cuevas-Acuña DA, Arias-MoscOSO JL, Torres-Arreola W, Cadena-Cadena F, Valdez-Melchor RG, Chaparro-Hernández S, et al. High-Intensity Ultrasound Pulses Effect on Physicochemical and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Gelatin. *Applied Sciences*. 2020;10:1004.
72. Panyam D, Kilara A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*. 1996;7(4):120-5.
73. Taylor WH. Formol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst*. 1957;82(976):488-98.
74. Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*. 2009:7-10.
75. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193:265-75.
76. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82(1):70-7.
77. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *J Nutr*. 2000;130(7):1865s-7s.
78. Mozuraityte R, Kristinova V, Rustad T. Oxidation of Food Components. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 186-90.

Vedlegg

A. Reagenser

Tabell 9 gir oversikt over reagenser benyttet i denne studien med produsent og artikkelnummer.

Reagens/utstyr	Produsent	Artikkelnummer
Potassium Sodium Tartrate	Merck Life Science AS/Sigma-Aldrich	217255
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck Life Science AS/Sigma-Aldrich	71352
Kobbersulfat (CuSO ₄)	Merck Life Science AS/Sigma-Aldrich	61230
Folin-Ciocalteu fenolreagens	Merck Life Science AS/Sigma-Aldrich	F9252
OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc.	STA-310
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)	VWR	20301
Urea	Merck Life Science AS/Millipore	1.08488
DTNB, Ellman's reagent	ThermoFisher	22582
Etanol, 96%	Univar Solutions AS	NO02257442
NaOH	Merck Life Science AS/Millipore	1.09959
Saltsyre (HCl)	Merck Life Science AS/Millipore	1.09970
Formaldehyde, 37% in aqueous solution	ThermoFisher (Kandel) GmbH	33314
BSA (Bovine Serum Albumin)	VWR	42150
Borate buffer	ThermoFisher	1859833
Fmoc Chloride	Merck Life Science AS/Aldrich	160512
ADAM (1-Adamantaneacetic acid)	Merck Life Science AS/Aldrich	127272
5-Sulfosalisylysyre dihydrat	VWR	10346
0,2 µm sprøyte-filter	VWR	514-0061

B. Eksempel på utregning for bestemmelse av hydrolysegrad

Hydrolysegrad ble bestemt ved formoltitrering (Taylor, 1957), og mengde NaOH brukt ved titrering ble brukt til å beregne konsentrasjonen av frie aminogrupeer:

$$\%D = \frac{A * B * 14.007}{C * 100} \cdot 100\%$$

D er frie aminogrupeer A er ml NaOH brukt, B er konsentrasjon av NaOH (1 M NaOH) og C er innveid prøve i gram. Deretter ble %D brukt for å regne ut %DH.

$$\%DH = \frac{\%D}{E} \cdot 100\%$$

E er (% protein) / 6.25 = 12.9632.

For eksempel ble hydrolysegrad til FPH etter ultralydbehandling ved 300 W beregnet slik (parallell 1):

$$\%D = \frac{4.6533 * 1 * 14.007}{1.5029 * 1000} \cdot 100\% = 4.3369\%$$

$$\%DH = \frac{4.3369}{12.9632} \cdot 100\% = 33.4552\%$$

C. Eksempel på utregning for bestemmelse av andel vannløselig protein

Prosent vannløselige proteiner ble bestemt i henhold til Oliver H. Lowry (1951). Absorbansverdier til prøveløsninger ble brukt for å regne ut for protein konsentrasjonen $\mu\text{g/ml}$.

$$X = (1 * A) * (Y - B)$$

Der A (stigningstallet) er 0.01, B (konstantledd) er 0.0015 og Y er absorbansen av prøveløsningen ved 750nm. Konsentrasjonen $\mu\text{g/ml}$ i prøveløsninger brukes for å regne ut $\mu\text{g/ml}$ i ufortynnet ekstrakt.

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt} = \text{fortynning} * X$$

Deretter regnes ut protein % våtvekt.

$$\% \text{ våtvekt} = \frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt} * (\text{ml}) \text{ ekstrakt}}{(\text{g}) \text{ FPH} * 1000 * 1000} * 100\%$$

For eksempel ble prosenten av løst protein for FPH etter ultralydbehandling ved 300W beregnet slik (parallell 1):

$$(1 * 0.0009) * (0.0698 - 0.0015) = 75.9259 \mu\text{g/ml}$$

$$50 * 75.9259 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 3796.2963 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$\frac{3796.2963 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} * 20 \text{ ml}}{0.1062 \text{ g} * 1000 * 1000} * 100\% = 71.4933\%$$

D. Eksempel på utregning for kvantifisering av karbonylgrupper og thiol

C.1. Karbonylgrupper

Mengde proteinkarbonylderivater (ELISA-analyse) nmol/mg ble regnet ut fra absorbansverdiene til prøveløsningen ved hjelp av standardkurve.

$$X = (1 * A) * (Y - B)$$

Der A (stigningstallet) er 0.07796, B (konstantledd) er 0.133196 og Y er absorbansen av prøveløsningen ved 450nm. Både A og B er konstante verdier.

For eksempel ble proteinkarbonylderivater nmol/mg for FPH etter ultralydbehandling ved 300 W beregnet følgende (parallell 1):

$$(1 * 0.07796) * (0.37 - 0.133196) = 3.0374 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}}$$

C.2. Thiolgrupper

For utregning av antall thiolgrupper nmol/mg ble det først regnet ut konsentrasjonen (C) i M.

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

Der A er absorbansen av prøveløsningen ved 412nm, b er kuvette lengde i cm og E som ekstinksjonskoeffisient til TNB.

Deretter ble verdiene for protein mg/ml i ufortynnet ekstrakt fra lowry analyse brukt for å gjøre om resultatene til nmol/mg.

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} = \frac{C * 1000 * 1000}{\text{protein } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ i ufortynnet ekstrakt}}$$

For eksempel ble thiolgrupper nmol/mg for FPH etter ultralydbehandling ved 300 W beregnet følgende (parallell 2): Først ble det regnet ut for konsentrasjonen av thiolgrupper i M.

$$\frac{0.074 * 1 \text{ (ml)}}{1 * 14290 * 0.1 \text{ (ml)}} = 5.17845E - 05$$

Denne verdien ble så brukt videre for å regne ut resultatene i nmol/mol.

$$\frac{5.17845 E - 05 * 1000 * 1000}{4.4444} = 11.65162106$$

E. Fargemåling med kolorimetri

Fargemåling

300 W						
	Parallell1	Parallell2	Parallell3	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
L	80.21	80.11	78.8	79.71	0.62	0.79
a	-0.51	-0.53	-0.34	-0.46	0.01	0.10
b	18.8	17.75	16.91	17.82	0.90	0.95
450 W						
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
L	80.11	79.15	79.13	79.46	0.31	0.56
a	-0.51	-0.47	-0.43	-0.47	0.00	0.04
b	17.19	17.39	16.91	17.16	0.06	0.24
600 W						
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
L	80.26	80.11	80.04	80.14	0.01	0.11
a	-0.36	-0.4	-0.43	-0.40	0.00	0.04
b	17.19	17.05	16.92	17.05	0.02	0.14
Kontroll						
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
L	69.78	72.83	71.59	71.4	2.35	1.53
a	2.11	1.68	1.98	1.92	0.05	0.22
b	21.67	22.81	22.7	22.39	0.40	0.63

Figur 12: Figuren viser verdiene for hver parallell fra fargemålingen med kolorimetri, etterfulgt av gjennomsnittet, variansen og standardavviket til kontrollen og de ulike prøvene.

T-test					
L	Kontroll	300 W	450 W	600 W	
Parallell 1	66.78	80.21	80.11	80.26	
Parallell 2	72.83	80.11	79.15	80.11	
Parallell 3	71.59	78.8	79.13	80.04	
p-verdi		0.05	0.05	0.04	
a	Kontroll	300 W	450 W	600 W	
Parallell 1	2.11	-0.51	-0.51	-0.36	
Parallell 2	1.68	-0.53	-0.47	-0.4	
Parallell 3	1.98	-0.34	-0.43	-0.43	
p-verdi		0.003	0.003	0.003	
b	Kontroll	300 W	450 W	600 W	
Parallell 1	21.67	18.8	17.19	17.19	
Parallell 2	22.81	17.75	17.39	17.05	
Parallell 3	22.7	16.91	16.91	16.92	
p-verdi		0.03	0.01	0.01	
	Kontroll	300 W	450 W	600 W	
L	71.40 ± 1.53	79.70 ± 0.79	79.46 ± 0.56	80.14 ± 0.11	
a	1.92 ± 0.22	-0.40 ± 0.10	-0.47 ± 0.04	-0.40 ± 0.04	
b	22.39 ± 0.63	17.82 ± 0.95	17.16 ± 0.24	17.05 ± 0.14	

Figur 13: Figuren viser verdiene benyttet for gjennomsnitt og som data for t-tester, i tillegg til resultatet etter utført tosidig t-test.

F. Bestemmelse av hydrolysegrad

Hydrolysegrad

Hydrolysegrad											
mL NaOH brukt ved titrering [A]			Paralell 1			Paralell 2			Paralell 3		
300 w			4.65			4.34			4.37		
450 W			4.72			4.65			4.67		
600 W			5.44			4.68			5.11		
Menge prøve (g) [c]			Paralell 1			Paralell 2			Paralell 3		
300 W			1.50			1.50			1.50		
450 W			1.50			1.50			1.50		
600 W			1.50			1.50			1.50		

Figur 14 Figuren viser mengde NaOH (ml) benyttet under formoltitrering og mengde prøve (g) benyttet hos hver parallell.

% Hydrolysegrad	Gjennomsnitt ± Standardavvik
300 W	32.02 ± 1.25
450 W	33.67 ± 0.25
600 W	36.56 ± 2.73
Kontroll	30.00 ± 1.67

Figur 15 Figuren gir en oversikt over gjennomsnitt og standardavvik for kontroll og de ulike prøvene. Gjennomsnittet er tatt ut ifra tre paralleller for hver av prøvene.

T- test	Kontroll	300 W	450 W	600 W
Parallell 1	31.32	33.46	33.95	39.16
Parallell 2	28.13	31.19	33.47	33.71
Parallell 3	30.57	31.41	33.61	36.82
P -verdi		0.09	0.05	0.01

Figur 16 Paralleller for kontroll og hver prøve benyttet som data til utførelse av t-test

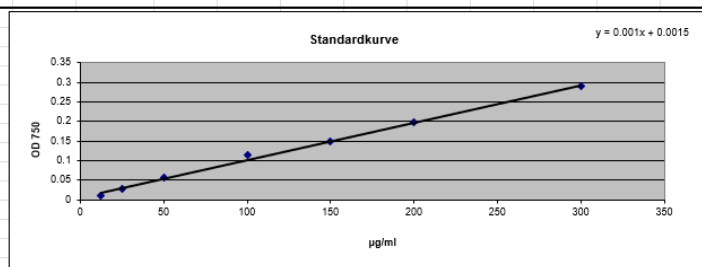
Utregning						
% frie amino grupper [D]	Formel:	$A * B * 14.007 * 100 / C * 1000$				
	A = ml NaOH brukt	B = konsentrasjon NaOH = 1	C = mengde prøve			
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3			
300 W	4.34	4.04	4.07			
450 W	4.40	4.34	4.36			
600 W	5.08	4.37	4.77			
% DH	Formel:	$(\%D * 100) / E$				
	%D = % frie amino grupper	E = % N/ 6.25	%N = 81.02	E =	12.9632	
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
300 W	33.46	31.19	31.41	32.02	1.56	1.25
450 W	33.95	33.47	33.61	33.67	0.06	0.25
600 W	39.16	33.71	36.82	36.56	7.47	2.73

Figur 17 Verdier og utregning av %frie aminogrupeer (D) benyttet for bestemmelse av hydrolysegrad

G. Lowry – Bestemmelse av vannløselig protein

Lowry Resultater

Standardløsninger	Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt	Gjennomsnitt - Blank	µl BSA løsning	Målekolbe	Endelig konsentrasjon
Blank	0.04	0.04	0.04		µl	ml	µg/ml
1	0.05	0.05	0.05	0.01	12.5	1	12.5
2	0.06	0.06	0.06	0.02	25	1	25
3	0.09	0.09	0.09	0.05	50	1	50
4	0.14	0.14	0.14	0.10	100	1	100
5	0.19	0.19	0.19	0.15	150	1	150
6	0.22	0.23	0.22	0.18	200	1	200
7	0.31	0.31	0.31	0.27	300	1	300



Y= AX + B	X =	(Y - B) / A	eller	(1/A) * (Y - B)
A = 0.0009				
B = 0.0015	Y=	Absorbans ved 750		
y-aksen	x-aksen			
0.007	12.5			
0.019	25			
0.046	50			
0.101	100			
0.151	150			
0.183	200			
0.268	300			

Figur 18 Verdier til hver parallell av blank og standardløsninger, gjennomsnitt, mengde BSA løsning benyttet (µ) og endelig konsentrasjon (µg/ml)

Absorbans ved 750					
Prøveløsning	Måling 1	Måling 2	Måling 3	Gjennomsnitt	Gjennomsnitt - Blank
300 W Parallell 1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.07
300 W Parallell 2	0.13	0.12	0.12	0.12	0.08
300 W Parallell 3	0.12	0.12	0.12	0.12	0.08
450 W Parallell 1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.08
450 W Parallell 2	0.12	0.12	0.12	0.12	0.08
450 W Parallell 3	0.12	0.12	0.12	0.12	0.08
600 W Parallell 1	0.13	0.12	0.12	0.12	0.08
600 W Parallell 2	0.12	0.13	0.13	0.13	0.08
600 W Parallell 3	0.12	0.13	0.13	0.13	0.08

Figur 19 Figuren viser verdiene etter tre målinger av absorbansen ved 750nm for hver av parallellene. Gjennomsnittet for målingene er også vist for hver parallell, samt gjennomsnitt – blank..

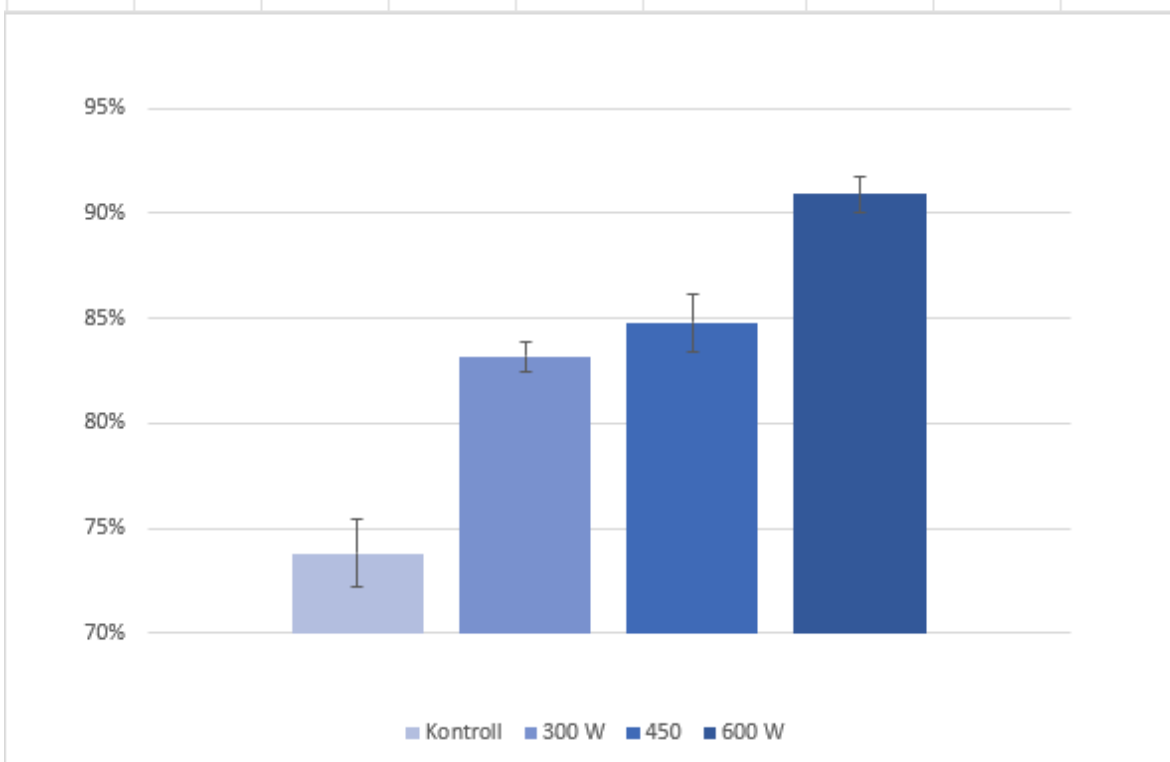
Utregning	300 W	450 W	600 W
Målt inn hydrolysat (g)	0.11	0.10	0.10
Mengde ekstrakt (ml)	20	20	20
Fortynning	50	50	50
Parallell 1 µg/ml	75.93	84.81	90.00
Parallell 2 µg/ml	88.89	85.19	91.48
Parallell 3 µg/ml	87.78	87.41	91.48
Gjennomsnitt	84.20	85.80	90.99
µg/ml ufortynnet ekstrakt			
Parallell 1 µg/ml	3796.30	4240.74	4500.00
Parallell 2 µg/ml	4444.44	4259.26	4574.07
Parallell 3 µg/ml	4388.89	4370.37	4574.07
mg/ml ufortynnet ekstrakt			
Parallell 1 mg/ml	3.80	4.24	4.50
Parallell 2 mg/ml	4.44	4.26	4.57
Parallell 3 mg/ml	4.39	4.37	4.57

Figur 20 Figuren viser en oversikt over mengder hydrolysat(g) og ekstrakt(ml) benyttet til tillagning av fortynninger. Videre vises tre paralleller for verdier til ufortynnet ekstrakt oppgitt i µg/ml og mg/lm.

Protein % våt vekt				Kontroll
Parallell 1 µg/ml	71.49	83.81	89.91	75.20
Parallell 2 µg/ml	83.70	84.18	91.39	72.09
Parallell 3 µg/ml	82.65	86.37	91.39	74.16
Gjennomsnitt	83.18	84.79	90.90	73.81
Varians	0.55	1.92	0.73	2.51
Standardavvik	0.74	1.39	0.85	1.58
Protein % våt vekt	83.1764 ± 0.7398	84.18 ± 1.39	90.90 ± 0.85	73.81 ± 1.58

Figur 21 Figuren viser bestemmelse av % våt vekt protein. Tre paralleller av hver ultralydstyrke og kontrollen er vist, samt gjennomsnitt, varians og standardavvik.

Til figuren	W	Standardavvik
83.18%	300	0.01
84.79%	450	0.01
90.90%	600	0.01
73.81%	Kontroll	0.02



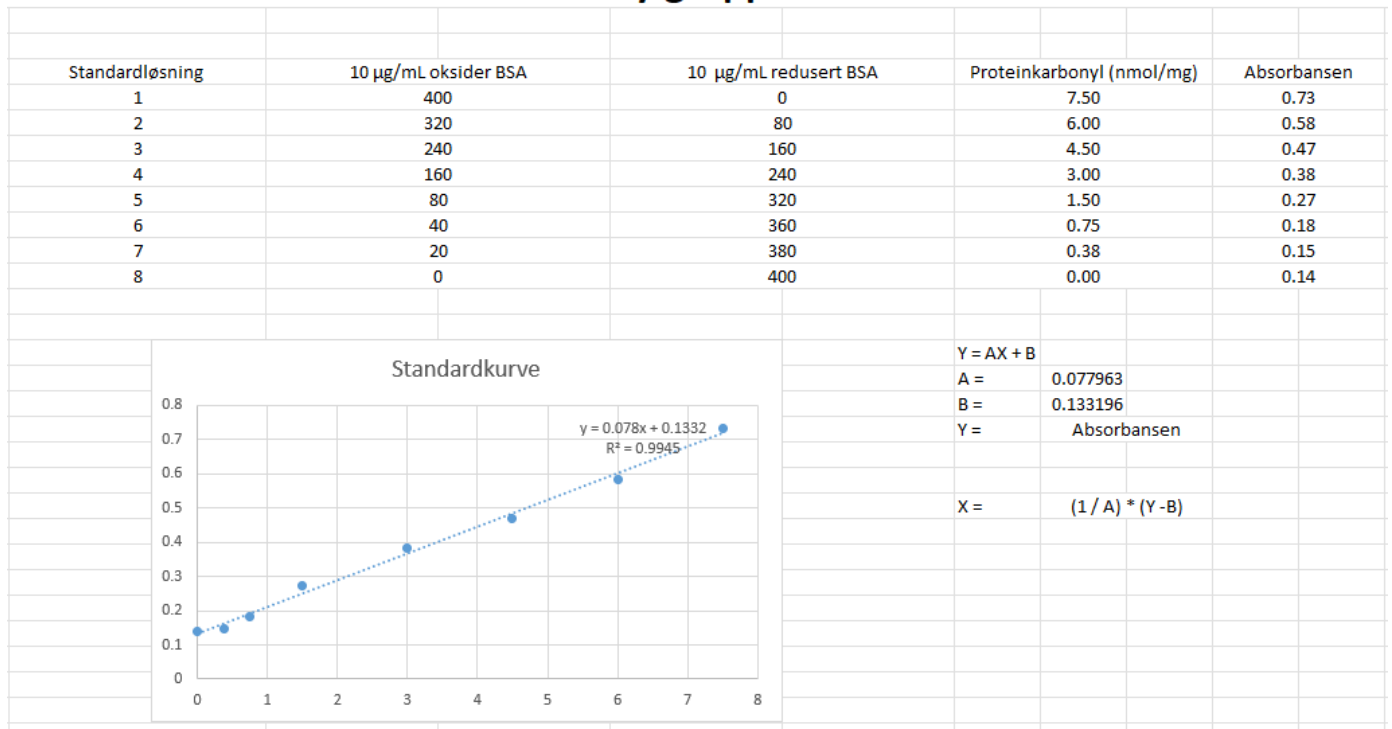
Figur 22 Grafisk fremvisning av andel vannløselig protein (%), med eksakt % og standardavvik for hver prøve og kontroll oppgitt.

T-test	Kontroll	300 W	450 W	600 W
Parallell 1	75.20	71.49	83.81	89.91
parallel 2	72.09	83.70	84.18	91.39
Parallell 3	74.16	82.65	86.37	91.39
p-verdi		0.36	0.01	0.01

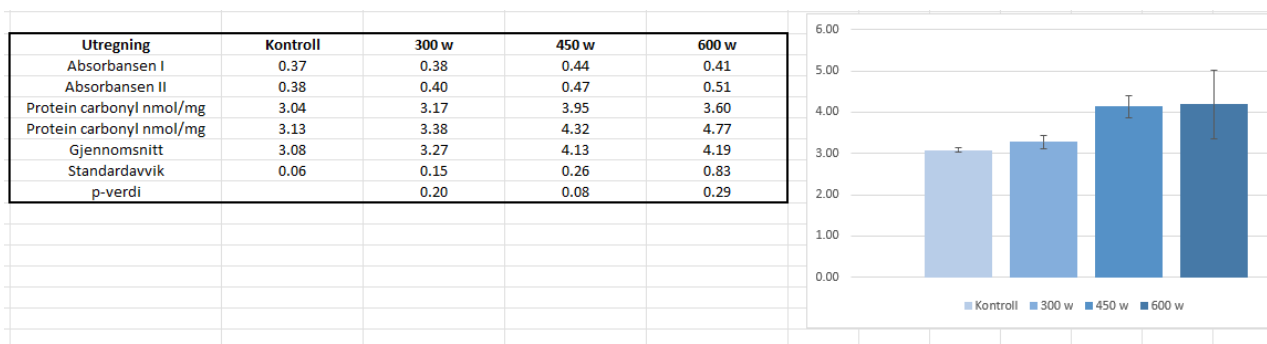
Figur 23 Figuren viser verdiene fra hver parallell benyttet som data for utførelse av t-test og viser resultatet oppgitt i p-verdi.

H. Kvantifisering av karbonylgrupper

Karbonylgrupper



Figur 24 Figuren viser tillagning av standardløsninger (1-8). Den oppgir mengde oksidert- og redusert BSA-løsning (10 µg/ml) benyttet for hver enkelt standardløsning. Konsentrasjonen av proteinkarbonyl (nmol/mg) for de enkelte løsningene, og deres absorbans, er også vist. Ut ifra disse verdiene er det laget en standardkurve.



Figur 25 Figuren viser to paralleller av absorbansen og konsentrasjonen til kontrollen og de tre ultralydstyrkene. Videre er gjennomsnitt og standardavvik bestemt og benyttet som data til t-test, hvor resultatet fra t-test er oppgitt i p-verdi for alle prøvene.

I. Kvantifisering av thiolgrupper

Kvantifisering av Thioler

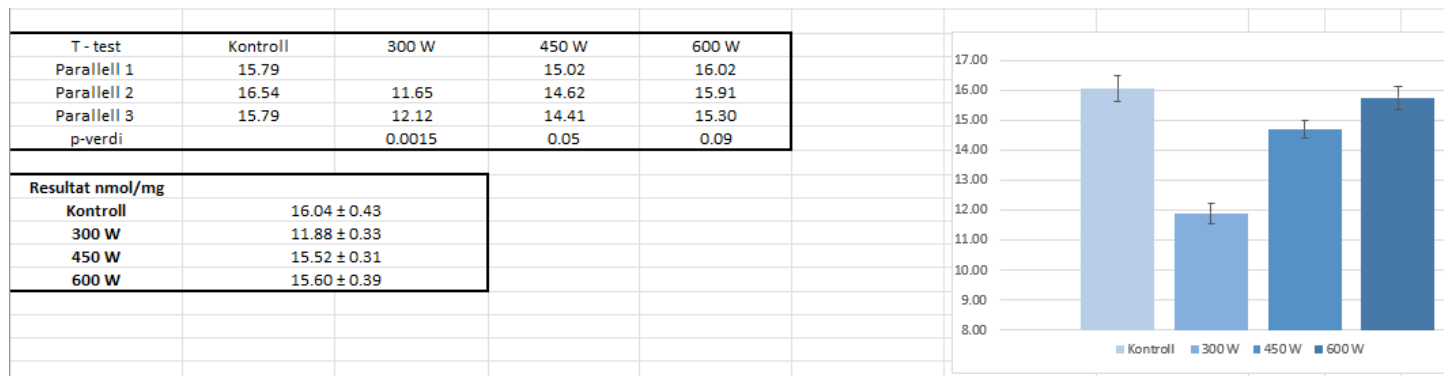
Absorbans ved 412	Paralell 1	Paralell 2	Paralell 3	
300 W	*	0.07	0.08	* Paralell 1 ved 300W ble ikke tatt med grunnet for stor avvik.
450 W	0.09	0.09	0.09	
600 W	0.10	0.10	0.10	

Formel:	C=	A * tot. V i kuvette (ml) / b * E * prøve V i kuvette (ml)
---------	----	--

A =	Absorbans ved 412
tot. V i kuvette (ml) =	1
b (kuvette lengde cm)	1
E (M-1 cm-1) =	14290
prøve V i kuvette (ml)	0.1

Utregning	mg/ml ufortynnet ekstrakt (fra Lowry)						Omgjøring til nmol/mg*	Paralell 1	Paralell 2	Paralell 3
	Paralell 1	Paralell 2	Paralell 3	Paralell 1	Paralell 2	Paralell 3				
300 W		5.17845E-05	5.3184E-05	3.80	4.44	4.39				
450 W	6.36809E-05	6.22813E-05	6.29811E-05	4.24	4.26	4.37		15.02	11.65	12.12
600 W	7.20784E-05	7.27782E-05	6.9979E-05	4.50	4.57	4.57		16.02	14.62	14.41
Kontroll								15.79	15.91	15.30
							1000.0000	15.79	16.54	15.79
							1000.0000			
	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik							
300 W	11.88	0.11	0.33							
450 W	14.68	0.09	0.31							
600 W	15.74	0.15	0.39							
Kontroll	16.04	0.19	0.43							

Figur 26 Verdier benyttet og utregning for konsentrasjon av thiolgrupper (nmol/mg). Gjennomsnitt av paralleller og standardavvik er n=2 ved 300W og for n=3 for resten. Verdier for absorbans målt ved 412nm er også oppgitt (to paralleller for 300W, tre paralleller for 450W og 600W).



Figur 27 Figuren viser verdier benyttet som data for utførelse av tosidig t-test. Resultatene fra t-test er basert på gjennomsnittet av tre paralleller (med unntak av 300W) som så stilles opp imot kontrollprøven, resultatet er så oppgitt i p-verdi. Figuren viser også resultatet av kvantifiserte thiolgrupper (nmol/mg).

J. Total aminosyresammensetning

Total aminosyresammensetning								
Prøvemengde (mg)	Paralell 1	Paralell 2						
300 W	50.2	50.5						
450 W	50.6	50.3						
600 W	50.1	50.2						
Formel:	Amino %	=	(Areal% amino syre / Areal% total aminosyrer) * 100					100
Kromotografi utregning %								
300 W	Navn	Area% Parallell I	Area% Parallell II	Utregning I (%)	Utregning II (%)	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
	Arginine	0.19	0.05	3.55	0.85	2.20	3.64	1.91
	Serine	0.47	0.06	8.71	0.93	4.82	30.22	5.50
	Glutamic acid	0.43	0.00	7.93	0.07	4.00	30.95	5.56
	Threonine	0.18	0.17	3.38	2.84	3.11	0.15	0.39
	Glycine	0.60	0.67	11.08	10.90	10.99	0.02	0.12
	Alanine	0.28	0.31	5.21	5.03	5.12	0.02	0.13
	Proline	0.76	2.17	14.13	35.54	24.83	229.27	15.14
	Valine	0.01	0.01	0.13	0.11	0.12	0.00	0.01
	Phenylalanine	0.17	0.18	3.09	2.92	3.00	0.01	0.12
	Isoleucine	0.13	0.17	2.42	2.70	2.56	0.04	0.20
	Leucine	0.79	0.81	14.57	13.30	13.93	0.81	0.90
	Cystine	0.50	0.62	9.15	10.21	9.68	0.56	0.75
	Histidine/Cysteine/Tyro:	0.90	0.89	16.64	14.59	15.62	2.11	1.45
	Total	5.41	6.1					
450 W	Navn	Area% Parallell I	Area% Parallell II	Utregning I (%)	Utregning II (%)	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
	Arginine	0.11	0.06	2.12	1.18	1.65	0.43	0.66
	Serine	0.28	0.05	5.50	1.03	3.27	10.01	3.16
	Glutamic acid	0.00	0.00	0.06	0.04	0.05	0.00	0.01
	Threonine	0.11	0.19	2.15	3.70	2.93	1.20	1.09
	Glycine	0.32	0.67	6.27	12.69	9.48	20.64	4.54
	Alanine	0.18	0.32	3.60	6.07	4.84	3.04	1.74
	Proline	2.01	1.74	39.28	33.14	36.21	18.84	4.34
	Valine	0.00	0.02	0.08	0.32	0.20	0.03	0.17
	Phenylalanine	0.14	0.13	2.68	2.39	2.53	0.04	0.21
	Isoleucine	0.10	0.14	1.94	2.63	2.29	0.24	0.49
	Leucine	0.76	0.80	14.89	15.17	15.03	0.04	0.20
	Cystine	0.57	0.40	11.13	7.71	9.42	5.83	2.41
	Histidine/Cysteine/Tyro:	0.53	0.73	10.30	13.91	12.11	6.52	2.55
	Total	5.11	5.24					
600 W	Navn	Area% Parallell I	Area% Parallell II	Utregning I (%)	Utregning II (%)	Gjennomsnitt	Varians	Standardavvik
	Arginine	0.03	0.16	0.86	1.67	1.26	0.33	0.57
	Serine	0.28	0.06	9.00	0.65	4.82	34.91	5.91
	Aspartic acid	-	0.01	-	0.14	0.14		0.01
	Glutamic acid	0.00	0.64	0.06	6.61	3.34	21.42	4.63
	Threonine	0.14	0.38	4.34	3.97	4.15	0.07	0.27
	Glycine	0.42	1.44	13.41	14.98	14.19	1.23	1.11
	Alanine	0.23	0.62	7.35	6.43	6.89	0.42	0.65
	Proline	-	2.40	-	25.02	25.02		0.01
	Valine	0.06	0.06	1.93	0.63	1.28	0.84	0.92
	Phenylalanine	0.07	0.25	2.31	2.60	2.46	0.04	0.20
	Isoleucine	0.09	0.30	2.95	3.07	3.01	0.01	0.09
	Leucine	0.74	1.27	23.42	13.23	18.33	51.96	7.21
	Cystine	0.44	0.47	13.95	4.84	9.39	41.46	6.44
	/Histidine/Cysteine/Tyro	0.64	1.55	20.41	16.17	18.29	8.98	3.00
	Total	3.16	9.61					

Figur 28 Figuren viser paralleller og utregninger til gjennomsnitt, varians og standardavvik ved alle ultralydstyrkene for alle registrerte aminosyrer. Prøvemengde (mg) er også oppgitt.

Navn aminosyre	Kontroll	300 W	Standardavvik 300	450 W	Standardavvik 450	600 W	Standardavvik 600
Arginine*	3.9	3.90	1.91	1.65	0.66	1.26	0.57
Serine	8.32	8.32	5.50	3.27	3.16	4.82	5.91
Aspartic acid	-					0.14	0.01
Glutamic acid	8.99	4.00	5.56	0.05	0.01	3.34	4.63
Threonine*	3.79	3.11	0.39	2.93	1.09	4.15	0.27
Glycine	14.85	10.99	0.12	9.48	4.54	14.19	1.11
Alanine	8.74	5.12	0.13	4.84	1.74	6.89	0.65
Proline	9.9	24.83	15.14	36.21	4.34	25.02	0.01
Valine*	0.29	0.12	0.01	0.20	0.17	1.28	0.92
Phenylalanine*	2.43	3.00	0.12	2.53	0.21	2.46	0.20
Isoleucine*	3.29	2.56	0.20	2.29	0.49	3.01	0.09
Leucine*	12.34	13.93	0.90	15.03	0.20	18.33	7.21
Cystine	0.53	9.68	0.75	9.42	2.41	9.39	6.44
Histidine*/Cysteine/Tyrosine	22.65	15.62	1.45	12.11	2.55	18.29	3.00

Figur 29 Figuren viser standardavviket mellom kontroll og hver av ultralydstyrkene for alle aminosyrene registrert under analysen.

