

Ine Sunnset Trøen
Nora Ringheim Eldegard

Enzymatisk aktivitet i ensilasje av laks

Enzymatic activity in salmon silage

Bacheloroppgave i Ingeniørfag, Kjemi

Veileder: Lene Østby

Medveileder: Monika Kopczyk

Mai 2024

Ine Sunnset Trøen
Nora Ringheim Eldegard

Enzymatisk aktivitet i ensilasje av laks

Enzymatic activity in salmon silage

Bacheloroppgave i Ingeniørfag, Kjemi
Veileder: Lene Østby
Medveileder: Monika Kopczyk
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for materialteknologi



Kunnskap for en bedre verden

Enzymatisk aktivitet i ensilasje av laks

Enzymatic activity in salmon
silage

Bacheloroppgave

Prosjektnummer: IMA-B-6-2024

Innleveringsdato: 21.05.2024

Gradering: Åpen

Forfattere:

Ine Sunnset Trøen

Nora Ringheim Eldegard

Intern veileder:

Lene Østby

Oppdragsgiver: Scanbio Ingredients AS

Kontaktperson:

Monika Kopczyk



Institutt for materialteknologi

Forord

Bacheloroppgaven er skrevet av to kjemiingeniørstudenter ved Institutt for materialteknologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven er utført for Scanbio Ingredients AS, og tar del i IPN prosjektet EnsilPro som de har i samarbeid med Sintef Ocean. Hensikten med oppgaven var å identifisere beste lagringsforhold for ensilasje laget av K2 laks, dødfisk i merdene, basert på pH og temperatur slik at det oppnås best mulig produktkvalitet, samt hva som skal til for å redusere energiforbruket. Proteolytisk aktivitet, lipolytisk aktivitet og frie fettsyrer ble målt i ensilasje, tilsatt maursyre uten antioksidanter, ved ulik pH. De samme parameterne ble også målt i fiskemasse uten tilsats av syre. Oppgaven har vært spennende og lærerik å gjennomføre.

Alt av laboratoriearbeidet ble utført hos Sintef Ocean. Studentene vil uttrykke en stor takk til senioringeniør Merethe Selnes for ekstraordinær hjelp og oppfølging rundt ensilering og prøveopparbeidelse. I tillegg har hun vært ansvarlig for resultatene knyttet til frie fettsyrer. En takk uttrykkes også til seniorforsker Revilija Mozuraityte for bistand og hjelp knyttet til ensilering og spørsmål underveis. Studentene vil også takke forsker/dr.grads-stipendiat Maria Alquiza Madina for opplæring og rådfølgning vedrørende proteolytisk og lipolytisk aktivitet. Hennes to masterstudenter, Karianne Høie og Odin Besseby, har også vært viktige bidragsytere knyttet til opplæring og spørsmål rundt disse metodene, og takkes også for uvurderlig hjelp. I tillegg takkes professor Turid Rustad for rådfølgning rundt proteolytisk og lipolytisk aktivitet.

Førsteamanuensis og intern veileder Lene Østby takkes for god oppfølging rundt rapportskrivning og veiledning. En stor takk går også til eksternt veileder Monika Kopczyk som ga studentene mulighet til å gjennomføre denne oppgaven, samt hjelp med spørsmål og utforming rundt teori og rapportskrivning. Scanbio Ingredients AS takkes for en hyggelig og lærerik omvisning i deres laboratorier og industri på Bjugn.

Ine S. Trøen

Ine Sunnset Trøen

Nora R. Eldegard

Nora Ringheim Eldegard

Trondheim 21.05.2024

Sammendrag

Norge er verdensledende innenfor oppdrett av laks og dette resulterer i flere hundre tusen tonn restråstoff årlig. I dagens samfunn, hvor det er stort fokus på miljøvennlige og bærekraftige prosesser, er ensilering en sentral prosess som utnytter restråstoffet på en billig og effektiv måte. Optimalisering av ensileringsprosessen er et viktig forskningsområde som kan føre til bedre produktkvalitet og redusering av energiforbruket. Enzymer i fisk spiller en sentral rolle i nedbrytning av restråstoffet, men det er utført lite forskning på hvordan enzymene i fiskeensilasje påvirkes av ulike miljøfaktorer.

Formålet med bacheloroppgaven var å undersøke enzymatisk aktivitet (proteaser og lipaser) i ensilasje laget av hel død laks fra oppdrettsnæringen under ulike lagringsbetingelser. Målet var å identifisere optimale forhold for lagring av ensilasjen over tid, for å oppnå høykvalitetsprodukter samt gjøre prosessen mer energieffektiv. Beste ensileringsforhold ble bestemt ved å undersøke hvordan ulik pH (4, 3,5 og 3) og ulik temperatur (10 °C og 35 °C) påvirket proteolytisk og lipolytisk aktivitet i ensilasjen under en lagringstid på 22 dager. I ensilasje er det ønskelig med høy proteolytisk aktivitet og lav lipolytisk aktivitet.

Ensilasjen ble laget ved å kverne en hel laks og tilsette maursyre. Ulike mengder maursyre ble tilsatt for å lage ensilasjebatcher på henholdsvis pH 4, 3,5 og 3. Uttak fra ensilasjen ble utført på lagringsdag 4, 11, 18 og 22. I tillegg ble det tatt uttak fra fiskemassen på dag 0 før tilsats av maursyre. Proteolytisk og lipolytisk aktivitet i ensilasjen og fiskemassen, fra alle uttaksdagene, ble analysert ved 10 °C og 35 °C. Samtidig ble frie fettsyrer i fiskeoljen fra ensilasjen og fiskemassen analysert for å finne indikasjon på lipaseaktivitet.

Resultatene viste at proteolytisk aktivitet i ensilasjen økte ved minkende pH og lipolytisk aktivitet i ensilasjen økte ved økende pH. Enzymaktiviteten ble også påvirket av temperatur, hvor både proteaser og lipaser i ensilasjen hadde høyere aktivitet ved 35 °C i forhold til 10 °C. Andelen frie fettsyrer var størst i fiskeoljen fra ensilasjen ved pH 4 og økte for hver uttaksdag. En korrelasjon ble observert mellom lipolytisk aktivitet og frie fettsyrer. Det ble konkludert med at ensilasje laget av dødfisk har beste lagringsforhold ved lavere pH ned mot 3,5-3. I tillegg kan ensilasjen oppbevares lengre ved 10 °C og kortere ved 35 °C for å redusere energiforbruket.

Abstract

Norway is world-leading in farming of salmon, resulting in several hundred thousand tons of rest raw material annually. In today's society, where there is a significant focus on environmentally friendly and sustainable processes, ensiling is a central process that utilizes the rest raw material in a cheap and effective way. Optimization of the silage process is an important research area that can lead to better product quality and a reduction in energy consumption. Enzymes in fish play a central role in breaking down the rest raw material, but little research has been conducted on how the enzymes in fish silage are affected by various environmental factors.

The purpose of this bachelor thesis was to investigate enzymatic activity (proteases and lipases) in silage made from a whole dead salmon from the aquaculture industry under different storage condition. The goal was to identify optimal conditions for storing the silage over time to achieve high-quality products and make the process more energy efficient. The best silage conditions were determined by examining how different pH (4, 3.5 and 3) and temperatures (10 °C and 35 °C) affected proteolytic and lipolytic activity in the silage during a storage period of 22 days. High proteolytic activity and low lipolytic activity are desirable in silage.

The silage was made by grinding a whole salmon and adding formic acid. Different amounts of formic acid were added to create silage batches at pH 4, 3.5 and 3, respectively. Samples were taken from the silage on storage days 4, 11, 18 and 22. In addition, samples from the fish mass were taken on storage day 0 before adding formic acid. Proteolytic and lipolytic activity in the silage and fish mass, from all sampling days, was analyzed at 10 °C and 35 °C. Simultaneously free fatty acids in the fish oil from the silage and fish mass were analyzed to find indications of lipase activity.

The results showed that proteolytic activity in the silage increased with decreasing pH, and lipolytic activity in the silage increased with increasing pH. The enzyme activity was also influenced by temperature, with both proteases and lipases in the silage exhibiting higher activity at 35 °C compared to 10 °C. The proportion of free fatty acids was highest in the fish oil from the silage at pH 4 and increased with each storage day. A correlation was observed between lipolytic activity and free fatty acids. It was concluded that silage made from dead fish has the best storage conditions at lower pH levels towards 3.5 - 3. Additionally, the silage can be stored for a longer period at 10 °C and a shorter period at 35 °C to reduce energy consumption.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Innholdsfortegnelse	iv
Forkortelsesliste	vi
Figurliste	vii
Tabelliste	xiii
1. Innledning	1
2. Teori	2
2.1 Restråstoff fra fiskeoppdrett	2
2.2 Fiskeensilasje	4
2.3 Produksjon av fiskeolje og proteinhydrolysat	6
2.4 Fiskens sammensetning	7
2.4.1 Proteiner og enzymer i fisk	8
2.4.1.1 Proteolytisk aktivitet	9
2.4.1.2 Lipolytisk aktivitet	10
2.4.1.3 Enzymaktivitet etter døden	11
2.4.1.4 pH og temperaturpåvirkning på enzymer	11
2.4.2 Lipider i fisk	13
2.4.2.1 Frie fettsyrer (FFA)	16
2.4.2.2 Primær og sekundær oksidasjon av lipider	16
2.4.2.3 Peroksid verdi (PV)	17
2.4.2.4 Anisidin verdi (AV)	18
2.4.2.5 Påvirkningsfaktorer på lipidoksidasjonsprosessen	19
3. Materialer og metoder	20
3.1 Utstyr	20
3.2 Kjemikalier	20
3.3 Fremgangsmåte	21
3.3.1 Ensilering	21
3.3.2 Prøveopparbeidelse for analysearbeid	22
3.3.3 Prøveopparbeidelse for proteolytisk og lipolytisk aktivitet	24
3.3.4 Proteolytisk aktivitet	25
3.3.5 Lipolytisk aktivitet	27
3.3.6 Frie fettsyrer (FFA)	28

4. Resultater	29
4.1 Ensilasjeutvikling.....	29
4.2 Proteolytisk aktivitet	33
4.3 Lipolytisk aktivitet.....	36
4.4 Frie fettsyrer (FFA).....	40
5. Diskusjon	41
5.1 Ensilasjeutvikling.....	41
5.2 Proteolytisk aktivitet	43
5.3 Lipolytisk aktivitet og frie fettsyrer (FFA)	45
5.4 Anbefaling til videre arbeid	47
6. Konklusjon	49
Referanseliste	50
Vedlegg 1: Risikovurdering	I
Vedlegg 2: pH-verdier i ensilasjen og rådata for masse	V
Vedlegg 3: Metoder for tillaging av løsninger	VIII
Vedlegg 4: Rådata og beregninger for proteolytisk aktivitet	XI
Vedlegg 5: Rådata og beregninger for lipolytisk aktivitet	XVI
Vedlegg 6: Rådata og beregninger for frie fettsyrer (FFA)	XXII

Forkortelsesliste

AV	Anisidin verdi
BHA	Butylhydroksyanisol
BSA	Bovine Serum Albumin
DHA	Dokosaheksaensyre
DPA	Dokosapentaensyre
EFSA	European food safety authority
EPA	Eikosapentaensyre
EQ	Ethoxyquin
FFA	Frie fettsyrer
GC-MS	Gasskromatografi-Massespektrometri
K1	Kategori 1 materiale
K2	Kategori 2 materiale
K3	Kategori 3 materiale
L•	Lipidalkylradikal
LH	Lipid
LOO•	Lipidperoksyradikal
LOOH	Lipidhydroperoksid
n-3	Omega-3
NMR	Kjernemagnetisk resonans
PG	Propylgallat
PUFA	Polyumettede fettsyrer
PV	Peroksid verdi
TBA	Tiobarbitursyre
TBARS	Tiobarbitursyre - reaktive stoffer
TCA	Trikloreddiksyre
4-MU	4-methylumbelliferone
4-MUH	4-methylumbelliferylheptanoat

Figurliste

- Figur 1.** Prosentvis fremstilling de ulike fraksjonene i restråstoff utgjør av den totale våtvekten i oppdrettslaks. Modifisert fra [13,14]. 2
- Figur 2.** Mengde restråstoff, i prosentandel og tonn, som ble anvendt til ulike prosesser i 2021. Modifisert fra [7]..... 3
- Figur 3.** En skisse over hvordan et ensileringsanlegg med batchproduksjon kan se ut. Denne type anlegg brukes ved mindre mengder restråstoff, og syretilsats skjer vanligvis manuelt [10]. 5
- Figur 4.** De ulike fasene som befinner seg i fiskeensilasje etter sentrifugering. Fiskeolje er fett i fisken, emulsjonen er blanding av olje og vann, hydrolysat består av proteiner og vann, og sedimenter er bunnfallet. 7
- Figur 5.** Struktur av aminosyrer bundet med peptidbindinger. Modifisert fra [35]. 8
- Figur 6.** pH-påvirkning på aktiviteten til pepsin, trypsin og lipase. Horisontal linje viser krysningspunktene hvor enzymene mister 10 % av aktiviteten fra den høyeste aktiviteten i optimums pH [55]. 12
- Figur 7.** Triglyseridstruktur består av en glyserolgruppe og tre fettsyrer med lange hydrokarbonkjeder. Modifisert fra [57]..... 13
- Figur 8.** Fosfolipidstruktur består av en fosfat-gruppe med en variabel X og to langkjedede fettsyrer. Modifisert fra [57]..... 13
- Figur 9.** EPA, DHA og DPA fettsyrer er essensielle marine lipider i fiskeolje. Modifisert fra [59]. .. 14
- Figur 10.** Skjematisk oversikt over hvordan oksidasjon av lipider forekommer [66]...... 17
- Figur 11.** Hvordan ensilasjebøttene ble merket. K2 indikerer at ensilasjematerialet i bøttene er K2 restråstoff. Tallene 4, 3,5 og 3 representerer henholdsvis at disse bøttene inneholder ensilasje ved pH 4, 3,5 og 3. Bokstaven A etter K2 indikerer at disse bøttene inneholder ensilasje som er tilsatt en blanding av maursyre og antioksidanter. Det ble laget parallelle ensilasjebatcher for hver pH, dermed representerer tall 1 og 2 etter pH-verdien henholdsvis batch 1 med ensilasje og batch 2 med ensilasje. 22
- Figur 12.** Ensilasjeuttak fra én plastbøtte. 2 x 100 g ensilasjeprøve ble inaktivert og sentrifugert, og 2 x 50 g ensilasjeprøve ble overført til plastposer. Prøvenavnene på sentrifugerørene og posene indikerer hvilken bøtte ensilasjen ble tatt ut ifra. Hver prøve får prøvenavn etter bøttenavnet (fra Figur 11) som henspiller hvilken pH ensilasjen hadde, samt «DX» hvor «D» står for dag og «X» representerer hvilken lagringsdag ensilasjen ble tatt ut på (4, 11, 18 eller 22). «A» og «B» angir ensilasjens parallelle. Ensilasjeprøvene i plastposene ble i tillegg merket med LP (lipolytisk/proteolytisk). 23
- Figur 13.** Flytskjema over hvordan ensilasjen ble opparbeidet før videre fortykning. Tilsvarende ble utført for fiskemassen fra dag 0. 24
- Figur 14.** Oppsettet av glassrørene for måling av proteolytisk aktivitet. Rørene øverst til venstre ble brukt først, deretter ble løsningene filtrert over i de korte rørene øverst til høyre. Videre ble rørene

nederst til høyre brukt til Lowry metoden for absorbansmåling. Rørene nederst til venstre ble brukt til standarder. I tillegg var det et ekstra brett for prøvene fortynnet 1:200 og 1:500. Bilde fra Maria A. M. 25

Figur 15. Fremgangsmåte for proteolytisk aktivitet før Lowry metoden og måling av absorbans. 26

Figur 16. Fremgangsmåte for proteolytisk aktivitet ved bruk av Lowry metoden. Absorbansen ble målt ved 750 nm..... 26

Figur 17. Fremgangsmåte for lipolytisk aktivitet ved bruk av et fluorimeter. 27

Figur 18. Kvernet fiskemasse uten syre, til venstre, og kvernet fiskemasse tilsatt syre, til høyre, på dag 0. Ved tilsats av syre forandret fargen på fiskemassen seg fra rød til grå..... 29

Figur 19. Ensilasje av K2 laks, ved pH 3 på lagringsdag 22, uten antioksidanter til venstre og med antioksidanter til høyre. Konsistensen i ensilasjen var forskjellig. 29

Figur 20. Sentrifugert fiskemasse ved pH 6,7 fra dag 0 (til venstre), og sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4 fra henholdsvis lagringsdag 4 (nr. to fra venstre), 11 (nr. tre fra venstre), 18 (nr. to fra høyre) og 22 (til høyre). Alle fraksjonene har et tydelig skille mellom hverandre..... 30

Figur 21. Sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 3,5 fra henholdsvis dag 11 (til venstre), 18 (i midten) og 22 (til høyre). Alle fraksjonene har et tydelig skille mellom hverandre, men emulsjonslaget er litt diffust..... 30

Figur 22. Sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 3 fra henholdsvis dag 11 (til venstre), 18 (i midten) og 22 (til høyre). Noen emulsjonspartikler har diffundert ut i hydrolysatlaget, slik at det ser grumsete ut..... 30

Figur 23. Fraksjonerte hydrolysatlag som var i ensilasjen av K2 laks uten antioksidanter ved dag 22. Hydrolysat ved pH 4 på øverste rekke, ved pH 3,5 på midterste rekke og ved pH 3 på nederste rekke. 31

Figur 24. Fraksjonerte fettprøver som var i ensilasjen av K2 laks, henholdsvis med og uten antioksidanter, ved dag 18. De to prøvene til venstre er ved pH 3, de to i midten ved pH 3,5 og de to til høyre ved pH 4..... 31

Figur 25. Utvikling av pH i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 0 til 22. De parallelle ensilasjebatchene har omtrentlig samme utvikling i pH. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 32

Figur 26. Utvikling av pH i ensilasje av K2 laks med antioksidanter fra lagringsdag 0 til 22. De parallelle ensilasjebatchene har omtrentlig samme utvikling i pH. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 32

Figur 27. Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i mg peptider per g løselige proteiner. Fiskemasse uten tilsatt syre ved pH 6,7 er vist ved dag 0. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 33

- Figur 28.** Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i mg peptider per g løselige proteiner. Fiskemasse uten tilsatt syre ved pH 6,7 er vist ved dag 0. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 34
- Figur 29.** Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i mg peptider per g våtvekt ensilasje. Fiskemasse uten tilsatt syre med pH 6,7 er vist ved dag 0, målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 35
- Figur 30.** Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i mg peptider per g våtvekt ensilasje. Fiskemasse uten tilsatt syre med pH 6,7 er vist ved dag 0, målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 35
- Figur 31.** Lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 ved 10 °C og 35 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner). 36
- Figur 32.** Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner). Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 37
- Figur 33.** Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner). Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 37
- Figur 34.** Lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 ved 10 °C og 35 °C. Målt i nmol per g våtvekt fiskemasse·min. 38
- Figur 35.** Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i nmol per g våtvekt ensilasje·min. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 39
- Figur 36.** Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i nmol per g våtvekt ensilasje·min. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier. 39
- Figur 37.** Prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4 (blå søyle), 3,5 (oransje søyle) og 3 (grå søyle) fra henholdsvis lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Prosentandel FFA i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 fra dag 0 er vist i rød søyle. 40

Figur I. Absorbansverdier som ble brukt til å lage standardkurven BSA for ensilasjeprøvene fra lagringsdag 0, 4 og 22.....	XI
Figur II. Absorbansverdier som ble brukt til å lage standardkurven BSA for ensilasjeprøvene fra lagringsdag 11 og 18.....	XI
Figur III. Standardkurve BSA som ble brukt til å beregne Lowry proteininnhold i hver ensilasjeprøve, samt proteolytisk aktivitet for hver ensilasjeprøve, for prøver fra lagringsdag 0, 4 og 22.	XI
Figur IV. Standardkurve BSA som ble brukt til å beregne Lowry proteininnhold i hver ensilasjeprøve, samt proteolytisk aktivitet for hver ensilasjeprøve, for prøver fra lagringsdag 11 og 18.	XI
Figur V. Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon ved hjelp av Lowry metoden i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 0, 4 og 22.	XII
Figur VI. Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon ved hjelp av Lowry metoden i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 11 og 18.	XII
Figur VII. Beregningsformler for kolonne C i Figur V. Kolonne D-I er beregnet på samme måte.	XIII
Figur VIII. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C fra lagringsdag 0, 4 og 22. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje. Målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse for fiskemassen fra dag 0.....	XIV
Figur IX. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C fra lagringsdag 11 og 18. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje.....	XIV
Figur X. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C fra lagringsdag 0, 4 og 22. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje. Målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse for fiskemassen fra dag 0.....	XIV
Figur XI. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C fra lagringsdag 11 og 18. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje.....	XV
Figur XII. Beregningsformler for kolonne C i Figur VIII. Kolonne D-P er beregnet på samme måte. ‘Lowry raw material (0,4,22)’ er verdien hentet fra excelarket hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.	XV
Figur XIII. Fluorescensverdiene som ble målt og brukt til å lage standardkurven 4-MU.....	XVI
Figur XIV. Standardkurve 4-MU som ble brukt til å beregne lipolytisk aktivitet.....	XVI
Figur XV. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra fiskemassen ved dag 0.....	XVII
Figur XVI. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 4.	XVII

Figur XVII. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 11.	XVII
Figur XVIII. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 18.	XVII
Figur XIX. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 22.	XVII
Figur XX. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7, ved 10 °C og 35 °C, fra dag 0. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt fiskemasse·min.	XVIII
Figur XXI. Beregningsformler for kolonne B i Figur XX, og kolonne C er beregnet på samme måte. ‘Lowry raw material (0,4,22)’ er verdien hentet fra exceldokumentet hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.....	XVIII
Figur XXII. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 4. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.	XIX
Figur XXIII. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 11. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.	XX
Figur XXIV. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 18. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.	XX
Figur XXV. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 22. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.	XXI
Figur XXVI. Beregningsformler for kolonne B i Figur XXII, og kolonne C-G er beregnet på samme måte. ‘Lowry raw material (0,4,22)’ er verdien hentet fra exceldokumentet hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.....	XXI
Figur XXVII. Prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter, fra to ensilasjebatcher, ved pH 4 (de blå søylene), 3,5 (de oransje søylene) og 3 (de grå søylene) fra henholdsvis lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Prosentandel FFA i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 fra dag 0 er vist i rød søyle.....	XXII
Figur XXVIII. Absorbansverdier for tillaging av standardkurve med oljesyre, og standardkurven benyttet til å beregne prosentandel FFA, i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks og ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved en lagringstid på 22 dager.....	XXIII
Figur XXIX. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra fiskemasse av K2 laks uten antioksidanter ved pH 6,7, fra dag 0.....	XXIII

- Figur XXX.** Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 4. XXIV
- Figur XXXI.** Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 11. XXIV
- Figur XXXII.** Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 18. XXV
- Figur XXXIII.** Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 22. XXV
- Figur XXXIV.** Beregningsformler som ble brukt for å beregne prosentandel FFA i fiskeolje for en av parallellene i Figur XXIX, samt gjennomsnittsverdien av prosentandel FFA og standardavvik.... XXVI

Tabelliste

Tabell 1. Kjemisk sammensetning av proteiner, fett og vann i våtvekt fiskekjøtt for ulike fiskearter [33].	7
Tabell 2. Fettsyresammensetning i oppdrettslaks. Analysen er utført av Sintef Industry i 2024 [60]. 15	
Tabell 3. Masse fett, emulsjon, hydrolysat og sedimenter fraksjonert fra 100 g inaktivert ensilasjeprøve. Tabellen viser resultater fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter.	31
Tabell I. Masse fiskemasse overført til hver bøtte, volum tilsatt syre og pH-verdier i ensilasjen. Syre _T : Syre tilsatt, pH ₀ : pH før tilsatt syre, Syre _T tot _F : Syre tilsatt totalt før uttak , Syre _T tot _E : Syre tilsatt totalt etter uttak (300 g).....	V
Tabell II. pH-verdier som ble brukt til tillaging av Figur 25 og 26. Det ble brukt gjennomsnittsverdier av pH for ensilasjeprøvene som hadde varierende pH på målingene.	V
Tabell III. Merking av alle prøvene, mengde inaktivert ensilasje, masse fett, hydrolysat, sedimenter og emulsjon og %-avvik fra innveid masse ensilasje. Masse _I : Masse ensilasje inaktivert, Fett _B : Fett + bunnfall, B: Bunnfall emulsjon, Skip: Veieskip, Hyd: Hydrolysat, Sed: Sediment, Em _{uB} : Emulsjon ÷ B, Em: Emulsjon + B, Sum veid: sum av Fett, Hyd, Sed og Em, % avvik: %-avvik fra Masse _I	VI
Tabell IV. Metoder for tillaging av løsninger til proteolytisk aktivitet.....	VIII
Tabell V. Volum som må pipetteres av sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇ , 0,1 M, og dinatriumhydrogenfosfat, Na ₂ HPO ₄ , 0,2 M, for å lage sitronsyre-fosfatbuffer med ulik pH [78].	IX
Tabell VI. Metoder for tillaging av løsninger til lipolytisk aktivitet.....	X
Tabell VII. Metoder for tillaging av løsninger til frie fettsyrer.	X
Tabell VIII. Verdier og standardavvik for prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter, ved pH 4, 3,5 og 3 fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22. I tillegg vises verdien og standardavviket for prosentandel FFA i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7.....	XXII

1. Innledning

Fiskeoppdrett i Norge begynte på 1960-tallet, men fikk det store gjennombruddet med laks i 1970. Siden da har det vært stor vekst, og havbruk har blitt den nest største eksportnæringen i landet [1]. Havbruk bidrar til mange arbeidsplasser over hele landet innenfor oppdrett, slaktning og videreforedling av laks [2]. I dag er Norge størst i verden når det kommer til oppdrett og eksport av laks og regnbueørret, og fisken eksporteres til omtrent 100 land med EU som det viktigste markedet [1,3]. I 2022 var den totale produksjonen av oppdrettsfisk på 1,62 millioner tonn, hvor laks utgjorde 95 %. Fra den totale produksjonen ble det eksportert rundt 1,31 millioner tonn laks og regnbueørret til en samlet verdi på 110,8 milliarder norske kroner [4].

Norge har store ambisjoner om videre vekst innenfor havbruket, og har satt seg som mål å femdoble lakseproduksjonen fra 1 million tonn i 2010 til 5 millioner tonn i 2025 [5]. Et stadig økende produksjonsvolum fører til større mengder restråstoff, og i 2020 var denne mengden like under 450 000 tonn [6]. Dødfisk i merdene utgjør en stor del av restråstoffet fra havbruk (rundt 20 %), og er et stort tap for produksjon til humant konsum [7,8]. I 2022 ble det registrert 58 millioner døde laks i oppdrettsanlegg [9]. Å utnytte dødfisk og annet restråstoff som blant annet hoder og innvoller til verdiskapende produkter er viktig for bærekraftig utvikling [6].

I dag finnes mange prosesser som gir god utnyttelse av restråstoffet, hvor ensilering, som omhandler restråstoff tilsatt syre, er en viktig prosess [7,10]. Det er også mye forskning på restråstoff for å finne måter å utnytte det enda bedre. Scanbio Ingredients AS har som mål å redusere global oppvarming ved å unytte avfall fra sjømatindustrien til å danne verdifulle produkter innenfor bioenergi- og fôrindustrien [11]. EnsilPro er et IPN prosjekt (innovasjonsprosjekt i næringslivet) Scanbio Ingredients AS har i samarbeid med Sintef Ocean, og idéen bak prosjektet er å finne bedre teknologiske løsninger for å optimalisere fiskeolje og fiskeproteinkonsentrater i fiskeensilasje.

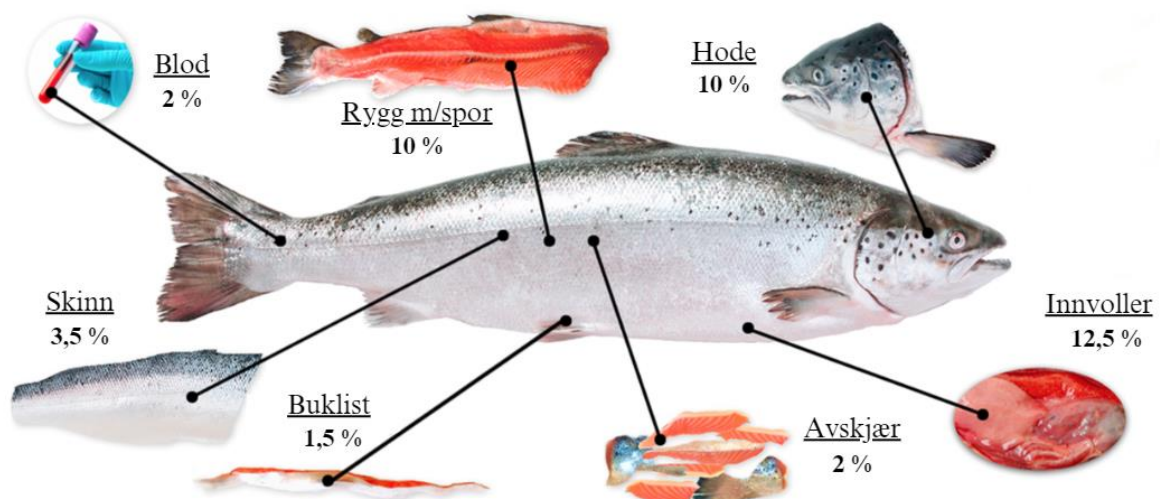
Bacheloroppgaven tar del i IPN prosjektet EnsilPro. Hensikten med oppgaven er å undersøke hvordan ulik pH og temperatur i ensilasje av K2 laks, dødfisk, påvirker hydrolysen og stabiliteten av proteiner og lipider under lagring. Målet er å identifisere beste lagringsforhold for ensilasjen basert på hva som gir optimal produktseparasjon, samt hvordan energiforbruket kan reduseres. Dette skal bestemmes ved å:

- Analysere enzymatisk aktivitet, i form av proteaser og lipaser, ved ulik pH og temperatur.
- Kvantifisere frie fettsyrer for å finne indikasjon på lipaseaktivitet.

2. Teori

2.1 Restråstoff fra fiskeoppdrett

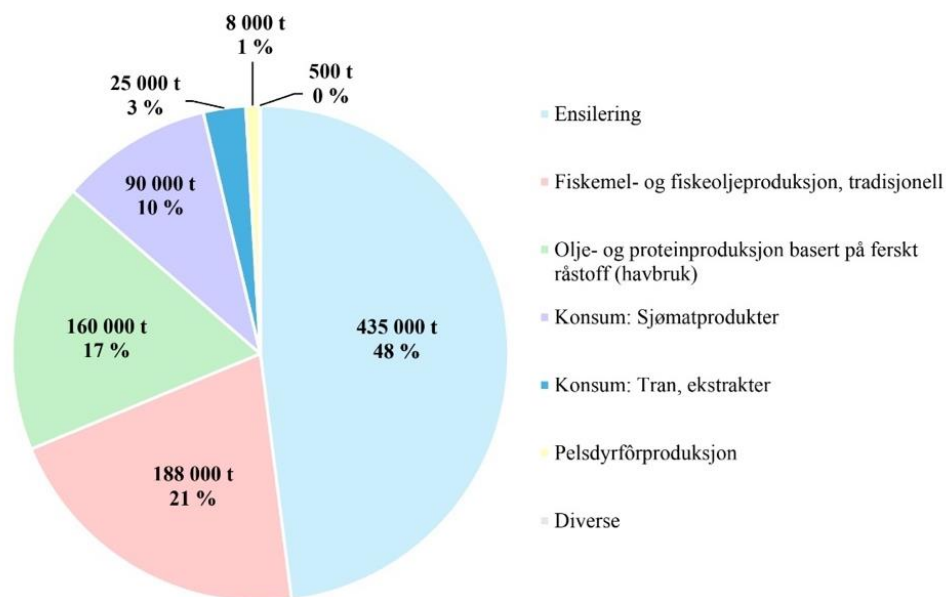
Nærings- og fiskeridepartementet definerer restråstoff fra fisk som: «det som ikke er det primære hovedproduktet etter sløyting og eventuell videre behandling av fisk». Dette inkluderer deler av fisken som skinn, avskjær, hode, rygg, innvoller og blod [12]. Prosentandelen hver av delene utgjør av den totale våtvekten av en oppdrettslaks er vist i *Figur 1*. Til sammen kan restråstoffet utgjøre opptil 41,5 % av våtvekten til laksen [13]. Restråstoffet kan også være hele døde fisk som ikke kan brukes til menneskelig konsum, eller som fôr til matproduserende dyr [7]. Laksen inneholder verdifulle vitaminer, mineraler, proteiner og lipider som kan brukes til flere produkter. Utnyttelse av restråstoff fra fisk er en viktig ressurs i norsk sjømatnæring som både er økonomisk og miljømessig gunstig [7,13].



Figur 1. Prosentvis fremstilling de ulike fraksjonene i restråstoff utgjør av den totale våtvekten i oppdrettslaks. Modifisert fra [13,14].

I Norge ble det registrert 1,1 millioner tonn restråstoff fra fiskeri- og havbruksnæringen i 2021, hvor 905 600 tonn ble utnyttet til verdifulle produkter (83 %). Fra 905 600 tonn var 496 500 tonn restråstoff fra havbruksnæringen (laks og ørret). Innen havbruksnæringen ligger utnyttelsesgraden av restråstoff på 94 %, hvor det kun er blod som ikke blir utnyttet. Majoriteten av restråstoffet fra havbruksnæringen er slo som kommer fra slakteriene eller hele døde fisk fra merdene. Den resterende mengden som ikke ble utnyttet var hovedsakelig fra hvitfisksektoren, og var fisk som ble sløyd eller prosessert direkte om bord på båtene, hvor restråstoffet ikke ble tatt med tilbake til land [7].

Restråstoff fra fisk er lett bederelig, og må behandles raskt for å utnytte det til produkter av høy kvalitet [15]. Det meste av restråstoffet må gjennom en prosessering, hvor det konserveres før det kan brukes videre i ulike prosesser som til fôr og bioenergi. *Figur 2* viser fordelingen av hvilke prosesser restråstoffet ble anvendt til i 2021. Ensilering er en mye brukt prosess, og i 2021 gikk 48 % av restråstoffet til dette [7]. Det er en økning på 7 % fra 2018 [12]. 17 % av restråstoffet ble anvendt til separering av fiskeprotein og fiskeolje, og kom fra havbruksnæringen. Figuren viser også at 13 % av restråstoffet ble anvendt direkte eller indirekte til konsum i form av sjømatprodukter og tran [7].



Figur 2. Mengde restråstoff, i prosentandel og tonn, som ble anvendt til ulike prosesser i 2021. Modifisert fra [7].

Restråstoff deles inn i tre kategorier basert på risikoen det utgjør for mennesker sin helse, og dermed hva det kan anvendes til [16]. De tre kategoriene håndteres etter animaliebioproduktforskriften [17]. Kategori 1 materiale (K1) har høyest risiko, og restråstoff i denne kategorien brennes for å holde det unna matkjeden. Kategori 2 materiale (K2) innebærer fisk som dør i merdene før slakting. Dødfisk er et annet ord som benyttes, og vanlige bruksområder er produksjon av bioenergi, gjødsel og pelsdyrfôr [18]. Et forbud mot norsk pelsdyroppdrett trer i kraft fra 1. februar 2025, slik at produksjon av pelsdyrfôr snart forsvinner i Norge [19]. Et nyere bruksområde er bruk av fiskeolje fra K2 til skinngarving, noe som er med å erstatter farlige kjemikalier [20]. Fra 2018-2021 var dødfisk den nest største kategorien av type restråstoff på 23 %. K2 er hovedsakelig laks og ørret fra oppdrettsnæringen. Kategori 3 materiale (K3) er restråstoff fra fiskeslakteri eller fiskeforedlingsanlegg [7]. K3 har lavest risiko og kan brukes i fôr til matproduserende dyr [16,18].

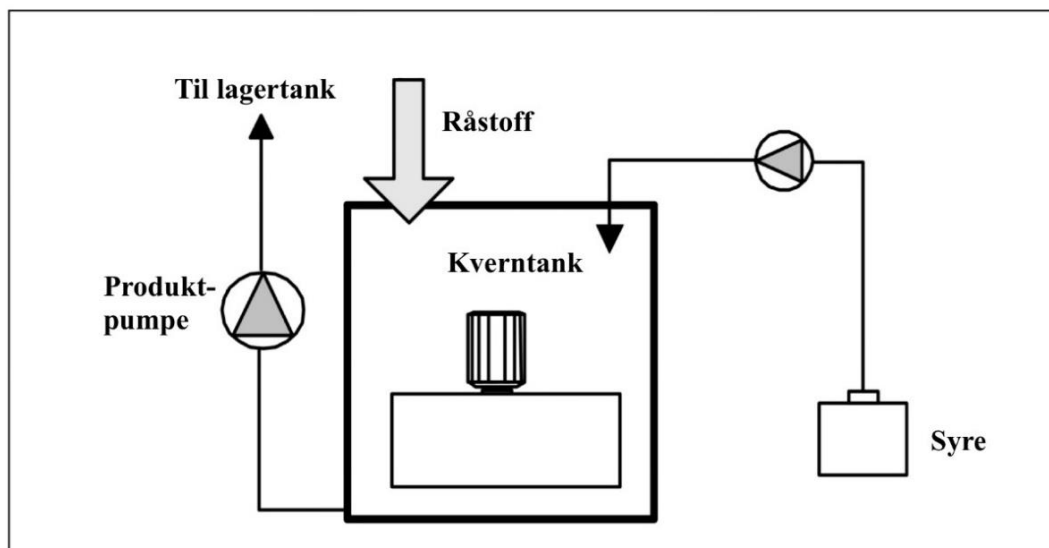
2.2 Fiskeensilasje

Fiskeensilasje er et produkt som består av restråstoff fra fisk tilsatt syre. Maursyre er vanligst å bruke i Norge, og formålet med syren er å senke pH til under 4 for å stoppe bakterieveksten i ensilasjen. Syren fungerer som et konserveringsmiddel og gjør ensilasjen lagringsstabil over en lengre periode. I tillegg kan det tilsettes antioksidanter som hindrer at fett i ensilasjen harskner [10]. Restråstoffet som benyttes er avfall fra filetindustrien, sløyeavfall, eller hele fisk som ikke kan brukes til menneskelig konsum [21].

Produksjon av fiskeensilasje er en enkel og billig prosess for å utnytte restråstoff fra fisk som ellers ville blitt kastet. Dette fører til bedre utnyttelse av ressurser, samt at det er økonomisk gunstig. Restråstoffet inneholder mange gode næringsstoffer som er enkle å fordøye for matproduserende dyr og fisk, og fungerer derfor bra til bruk i fôr [21]. Andre bruksområder er bioenergi, gjødsel og skinngarving [20]. For å sikre god kvalitet på ensilasjen er det viktig at restråstoffet er så ferskt som mulig. Derfor er det vanlig at ensilasjen lages direkte i fiskeforedlingsanleggene som ligger langs kysten for å konservere restråstoffet raskt. Deretter blir ensilasjen hentet av lastebiler eller båter, og fraktet til anlegg som utfører videre behandling [22].

Fiskeensilasje lages ved at restråstoff fra fisk kvernes til en tykk, homogen masse, og maursyre og antioksidanter blandes inn i massen. Når pH kommer under 4 og temperaturen i massen er over 5 °C, vil det starte en hydrolyse. Denne prosessen blir også kalt for "autolyse" da hydrolysen skjer automatisk under de rette forholdene [10]. Under autolysen vil enzymer i restråstoffet bryte ned proteiner til peptider og aminosyrer, noe som gir en tyntflytende ensilasje [21]. Hastigheten på autolysen avhenger av hvor mye enzymer som er til stede og temperaturen i massen. Innvollene i fisk er rik på enzymer, såkalte fordøyelsesenzymer, og dermed vil restråstoff fra sløying være mest optimalt til bruk i ensilasje. Autolysen skjer raskere ved økende temperatur opp til 37-38 °C [10]. For høy temperatur (>40 °C) er ikke ønskelig i denne delen av prosessen da det vil inaktivere de fleste enzymene [21,23].

Når ensilasjen er ferdig laget, pumpes den gjennom rør til tankanlegg for lagring fram til kundelevering og videre behandling. I lagertankene brukes sirkulasjonsanlegg for å holde ensilasjen i kontinuerlig bevegelse slik at bein ikke legger seg i bunnen. Det skilles mellom kontinuerlig produksjon og batchproduksjon, hvor forskjellen er hvor store mengder restråstoff de kan håndtere. Et eksempel på hvordan et ensileringsanlegg for batchproduksjon kan se ut er vist i *Figur 3* [10].



Figur 3. En skisse over hvordan et ensileringsanlegg med batchproduksjon kan se ut. Denne type anlegg brukes ved mindre mengder restråstoff, og syretilsats skjer vanligvis manuelt [10].

Som konserveringsmiddel kan det brukes uorganiske syrer som svovelsyre, saltsyre og salpetersyre, eller organiske syrer som maursyre, eddiksyre og propionsyre. Uorganiske syrer er sterkere enn organiske syrer, og trenger en lavere pH for å gjøre ensilasjen lagringsstabil [10]. Grunnen er at uorganiske syrer ioniserer 100 % i en vandig løsning, mens organiske syrer ikke ioniseres fullstendig. Dette fører til at uorganiske syrer har en høyere konsentrasjon av hydrogenioner i løsningen, noe som gir en lavere pH [24]. Det trengs en større mengde syre for å få en lavere pH i ensilasjen, noe som kan være økonomisk ugunstig. Et problem som kan oppstå ved bruk av syre med lav pH er at de kan ødelegge stålet i anlegget gjennom korrosjon [10]. En lav pH fører også til at produktet må nøytraliseres før videre bruk [25]. Organiske syrer, spesielt maursyre, er å foretrekke da denne er en svak syre, og ensilasjen kan brukes direkte i videre produksjon uten å nøytraliseres først [21]. Organiske syrer har også vist seg å ha antimikrobielle egenskaper, og har evnen til å drepe patogene mikroorganismer som forårsaker sykdom og hindrer vekst hos husdyr [26,27]. Bruk av organiske syrer fører dermed til bedre vekst og mindre dødelighet blant husdyr, og er bedre økonomisk for bedriften [21].

Hvor mye syre som tilsettes i ensilasjen varierer ut fra restråstoffet som benyttes. Inneholder restråstoffet mye bein kreves det mer syre enn om det er lite bein. Dette skyldes at bein består av kalsiumforbindelser som nøytraliserer syren etter hvert som den trekker inn i beinmassen. Tiden syren bruker for å trenge inn i beinene kan skje gradvis over noen dager, og avhenger av hvor godt restråstoffet ble kvernet. Det er viktig å ha kontroll over pH i ensilasjen for å passe på at den ikke blir for høy. I tillegg er det viktig at ensilasjen ikke er for tykk, og at syren er

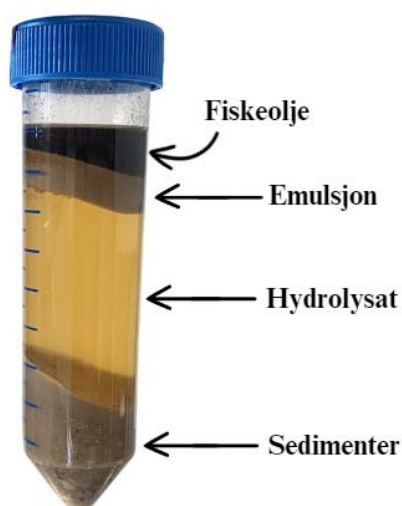
jevnt fordelt og blandet godt inn. Dette er for å unngå at deler av ensilasjen får for høy pH og begynner å råtne, noe som vil ødelegge hele batchen med ensilasje. Måling av pH kan utføres ved bruk av pH-meter eller lakmuspapir. For maursyre er det ønskelig å holde pH mellom 3,5 og 4 [10]. Dette pH-området hindrer bakterievekst, gjør enzymene aktive, og fører til at korrosjon i ståltankene skjer saktere.

Antioksidanter blandes inn med syren før det tilsettes til den kvernede fiskemassen. Formålet med å bruke antioksidanter i ensilasje er å hindre harskning av fett, noe som gir bedre oljekvalitet. Hvor stor mengde antioksidanter som tilsettes varierer og avhenger av fettinnholdet i restråstoffet, men anbefalingen er 1 % av mengden syre som brukes [10]. Tidligere var det vanlig å benytte seg av ethoxyquin (EQ) i fiskeensilasje som er en syntetisk antioksidant. I 2017 ble det derimot vedlagt å utfase bruk av EQ i dyrefôr, da en undersøkelse gjort av European food safety authority (EFSA) ikke kunne konkludere om EQ var trygg for helse og miljø. Det er forsket på bruk av andre antioksidanter og kombinasjoner av antioksidanter i fiskeensilasje [28]. Butylhydroksyanisol (BHA) og propylgallat (PG) er to syntetiske antioksidanter som brukes sammen i fiskeensilasje [29].

2.3 Produksjon av fiskeolje og proteinhydrolysat

Fiskeolje og proteinhydrolysat er to viktige produkter som stammer fra hydrolyseprosessen under ensileringen. Ensilasjen lagres i lagringstanker som råvare ved 10 °C i flere dager. For å få hydrolyseprosessen til å skje raskere føres ensilasjen inn i hydrolysetanker ved 35 °C, og oppbevares der i noen dager. Dette er en energikrevende prosess da det kreves en del energi for å varme opp store batcher med ensilasje fra 10 °C til 35 °C. Videre blir ensilasjen varmebehandlet ved høy temperatur for å inaktivere enzymene. Etter varmebehandling separeres fiskeolje og proteiner ved hjelp av sentrifugalkraft, og løsningene behandles videre til renere produkter. Den ekstraherte fiskeoljen fra K2 kan benyttes til skinngarving, direkte som fyringsolje eller innsatsfaktor i produksjon av biodrivstoff [30].

Figur 4 viser hvordan de ulike lagene i ensilasje av K2 laks legger seg etter sentrifugering. Fiskeolje er det øverste laget og er fiskefettet i ensilasjen. Emulsjon er den andre fasen og består av fiskeolje og vann. Hydrolysat er den tredje fasen og består av vann og proteiner. Sedimenter er bunnfallet og består av komponenter som ikke har løst seg under ensileringsprosessen og vann, deriblant kan dette laget inneholde bein. Hydrolysat og sedimenter brukes sammen som proteinhydrolysat, og kan brukes til produksjon av bioenergi [30].



Figur 4. De ulike fasene som befinner seg i fiskeensilasje etter sentrifugering. Fiskeolje er fettene i fisken, emulsjonen er blanding av olje og vann, hydrolysat består av proteiner og vann, og sedimenter er bunnfallet.

2.4 Fiskens sammensetning

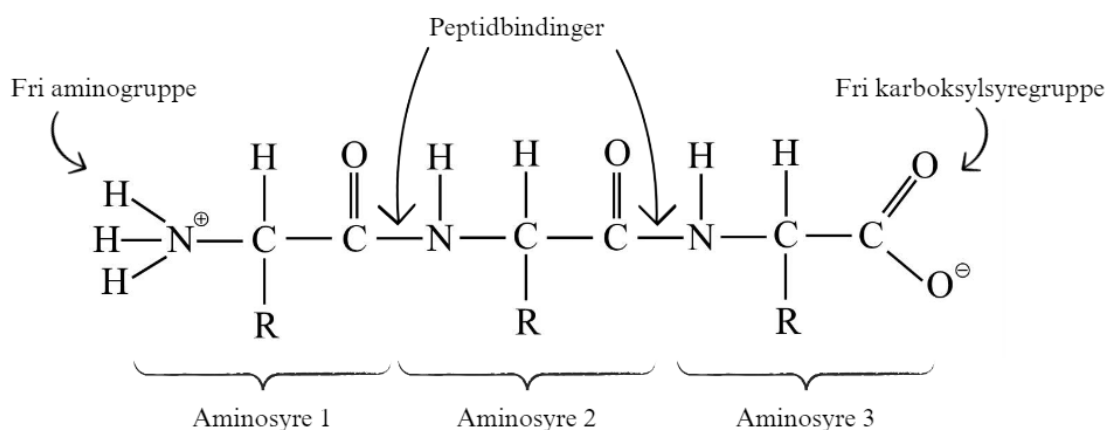
Fisk betegnes som et virveldyr og den kjemiske sammensetningen hos ulike fisketyper varierer fra art til art. Organer og enzymer i fisk er i stor grad lik mennesker sine, men i stedet for muskelbunter og sener er fiskens hovedmuskulatur strukturert i langsgående fileter [31]. Begrepet fiskekjøtt brukes om denne langsgående fileten i fisken [32]. Både fiskens hud og skjell består av levende celler, og epitelceller og slimceller er hovedkomponentene i det ytre hudlaget. Fiskekjøttet består av flere biomolekyler, deriblant proteiner og lipider, og innholdet av disse varierer blant annet basert på type fisk, kjønn, alder og årstid. I tillegg består fisk av en god del mengde med vann. *Tabell 1* viser sammensetningen av disse molekylene i ulike fisketyper [31,33]. Protein-, lipid-, vann- og karbohydratinhold i fiskekjøtt ligger henholdsvis på omtrent 16 - 21 %, 0,5 - 2,3 %, 52 - 82 % og 0,5 % av våtvekten til fisken [34].

Tabell 1. Kjemisk sammensetning av proteiner, fett og vann i våtvekt fiskekjøtt for ulike fiskearter [33].

Fiskeart	Proteininnhold [%]	Fettinnhold [%]	Vanninnhold [%]
Kolmule	13,8 – 15,9	1,9 – 3,0	79 – 80
Torsk	15,0 – 19,0	0,1 – 0,9	78 – 83
Ål	14,4	8,0 – 31,0	60 – 71
Sild	16,0 – 19,0	0,4 – 22,0	60 – 80
Rødspette	15,7 – 17,8	1,1 – 3,6	81
Laks	21,5	0,3 – 14,0	67 – 77
Ørret	18,8 – 19,1	1,2 – 10,8	70 – 79

2.4.1 Proteiner og enzymer i fisk

Enzymer er globulære proteiner, som er bygd opp av mange aminosyrer, og katalyserer alle livsnødvendige reaksjoner i levende organismer. En aminosyre består av en aminogruppe (NH_2^-) bundet til et karbonatom med en R-gruppe og en karboksylsyregruppe (COOH). Aminosyrene utgjør proteinenes primære struktur og er bundet sammen ved hjelp av kovalente peptidbindinger. Bindingene er mellom aminogruppen i en aminosyre og karboksylsyregruppen i en annen aminosyre, slik som *Figur 5* viser. N-terminal ende er den frie karboksylsyregruppen og C-terminal ende er den frie aminogruppen. Oligopeptider inneholder få aminosyrer, mens polypeptider og proteiner inneholder flere tusen aminosyrer. Aminosyrene kan foldes sammen til vannløselige tredimensjonale strukturer [35].



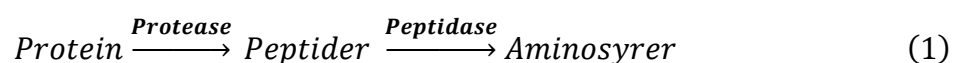
Figur 5. Struktur av aminosyrer bundet med peptidbindinger. Modifisert fra [35].

I tillegg til enzymer kan proteiner også fungere som muskelproteiner, immunoglobuliner og transportproteiner [36]. Fisk består av ulike proteiner som deles opp i de tre hovedgruppene myofibriller, sarkoplasmproteiner og stromaproteiner. Innholdet av disse i fiskekjøtt er henholdsvis på 70 - 80 %, 20 - 30 % og 3 % av totalt proteininnhold i fiskemuskel [34]. Myofibriller er hovedkomponentene i muskelfibrene, og aktin og myosin er eksempler på slike proteiner. Postmortale endringer i fiskemuskel, postmortal pH og proteolyse fører til nedbrytning av myofibrillene. Myogen og myoalbumin er vannløselige sarkoplasmproteiner som finnes fritt i muskelcellens sarkoplasma. Bindevevsproteinene kollagen, elastin og retikulin løses verken i saltløsning eller i vann. Denaturering av proteiner vil si å endre konformasjonsstrukturen til proteinene slik at de blir mindre løselige og felles ut av løsningen. Proteinene kan felles ut med blant annet høye saltkonsentrasjoner, etanol, syre, varme eller mekanisk røring [33,34].

Enzymer deles opp i seks hovedgrupper; oksidoreduktaser, transferaser, hydrolaser, lyaser, isomeraser og ligaser [37]. Hydrolaser er enzymer som katalyserer hydrolyseaksjoner, reaksjoner som spalter to molekyler ved å addere vann, og er den største gruppen enzymer [37–39]. Eksempler på hydrolaser er proteaser, lipaser, esteraser, glykosidaser, amidaser, nukleotidaser og fosfater [40]. De får navnet sitt etter hvilket substrat de hydrolyserer og endingen -ase. Mange av hydrolasene tar del i fordøyelse av næringsstoffer ved å bryte bindinger mellom C-O, C-N eller C-C [37].

2.4.1.1 Proteolytisk aktivitet

Proteaser katalyserer spalting av peptidbindinger i proteiner til mindre peptider, og peptidaser katalyserer oppdeling av disse til frie aminosyrer som vist i *Ligning 1*. Alle eukaryote og prokaryote organismer, deriblant fisk, inneholder proteaser og peptidaser som er viktige for metabolismen [41,42]. Proteolytiske enzymer finnes i alle vev, men har høyest aktivitet i innvoller [43]. Nedbryting av proteiner til aminosyrer skjer i magetarmsystemet. Når proteiner når magesekken vil mageslimhinnen stimuleres og skille ut gastrin. Gastrin er et hormon som videre aktiverer utskillelse av HCl og proenzymet pepsinogen fra veggen i magesekken [41]. HCl bidrar til et surt miljø som gjør det lettere å bryte ned proteiner, dreper bakterier, og omdanner pepsinogen til proteasen pepsin [44]. Videre i tynntarmen vil det sure mageinnholdet aktivere utskillelse av sekretin. Når sekretin er til stedet i blodet blir mageinnholdet nøytralisert ved hjelp av hydrogenkarbonat (HCO_3^-) som skilles ut fra bukspyttkjertelen. Det nøytrale miljøet omdanner trypsinogen, kymotrypsinogen og prokarboksypeptidaser til henholdsvis peptidasene trypsin, kymotrypsin og karboksypeptidase [41].

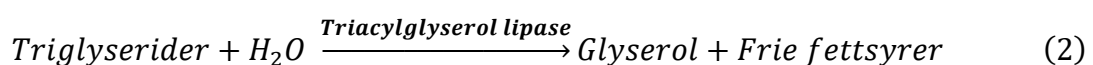


Proteaser deles inn i eksopeptidase og endopeptidase. Endopeptidaser kutter bindingen mellom aminosyrer inne i peptidkjeden. De kategoriseres basert på hvor i aminosyresekvensen spaltingen foregår; serin-, aspartat-, cystein-, threonin-, eller glutamatpeptidaser [39,42]. Eksopeptidaser kutter aminosyrer fra enden (N-terminal eller C-terminal) av peptidkjeden. Aminopeptidaser er eksopeptidaser som kutter ved N-terminal ende, og karboksypeptidaser kutter ved C-terminal ende [45].

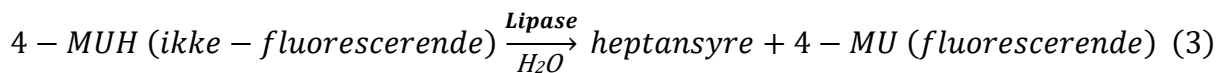
Generell proteolytisk aktivitet ble først målt i fiskevev hvor Bovine hemoglobin ble brukt som substrat [46], da dette substratet har god stabilitet ved alkalisk og sur pH. Proteasene i ekstraktet spalter peptidbindingene i hemoglobin under de rette inkubasjonsbetingelsene. Kasein kan også brukes som substrat, men denatureres ved lav pH under 4 - 5 [46]. Protein- og peptidinnholdet i ekstraktet kan kvantifiseres ved hjelp av Lowry metoden [47]. I fiskevevs-eksperimentet ble ekstraktene fortynt før inkubasjon med substratet, for å få omtrentlig samme enzymkonsentrasjon, samt oppnå korrespondanse mellom trikloreddiksyreløselige (TCA) proteiner og standardkurven i Lowry metoden [46]. I tillegg ble nullprøver laget og subtrahert fra de enzymaktive prøvene for å finne totalt hvor mange peptider som ble spaltet. Bovine serum albumin (BSA) ble benyttet til å lage standardkurven i Lowry, og absorbansen ble målt ved 750 nm. Sammenligning av proteolytisk aktivitet fra forskjellige forsøk er vanskelig da den analytiske prosedyren avhenger av råstoffet som benyttes, samt at peptidene er sensitiv til utstyret [46].

2.4.1.2 Lipolytisk aktivitet

Lipaser deles inn i flere grupper, deriblant triacylglycerol lipaser, bukspyttkjertel lipaser, bile salt-dependent lipaser, og lipoprotein lipaser [48]. De katalyserer hydrolyse av esterbindinger i ulike substrater som triglyserider, kolesterylestere og vitaminestere [49]. Eksempelvis vil triacylglycerol lipase spalte triglyserider til glyserol og frie fettsyrer som vist i *Ligning 2*. Lipaser finnes i nesten alt vev i fisk, blant annet i lever, bukspyttkjertelen og fordøyelseskanalen, og spiller en viktig rolle i fordøyelsen av fett [49–51]. Fett er et svært hydrofobt substrat og uløselig i vann [44]. Lipaser må derfor kunne jobbe effektivt ved et olje-vann-grensesnitt for at reaksjonen skal skje. For å klare dette må lipasen ha molekylære egenskaper som forhindrer inaktivering ved grensesnittet, og de må opprettholde sin struktur i det aktive setet [51]. Fra leveren blir det produsert gallesalter (natriumsalter av glykocholat og taurocholat) som reduserer overflatespenningen til fett, og gjør at fett emulgerer til mindre fettdråper. Dette gjør at fett kan brytes ned av lipaser [44]. Å kontrollere lipolytisk aktivitet i restråstoff fra fisk er viktig for å minimere nedbrytning av verdifullt fett, og for å oppfylle retningslinjene som kreves for fiskeolje [48].



Lipolytisk aktivitet kan bestemmes ved hjelp av en fluorescensmetode som omhandler frigjøring av fluorescerende lys av et ikke-fluorescerende substrat ved hydrolyse. 4-methylumbelliferylheptanoat (4-MUH) brukes som et ikke-fluorescerende substrat i en liposomal dispersjon av soyalecitin. Lipase spalter 4-MUH til heptansyre og 4-methylumbelliferone (4-MU), som er fluorescerende, i henhold til *Ligning 3*. Hvert 4-MU molekyl som dannes indikerer hydrolysen av ett molekyl fettsyre ved hjelp av lipase. Metoden er mer spesifikk og sensitiv for lipaser i sure miljø [48].



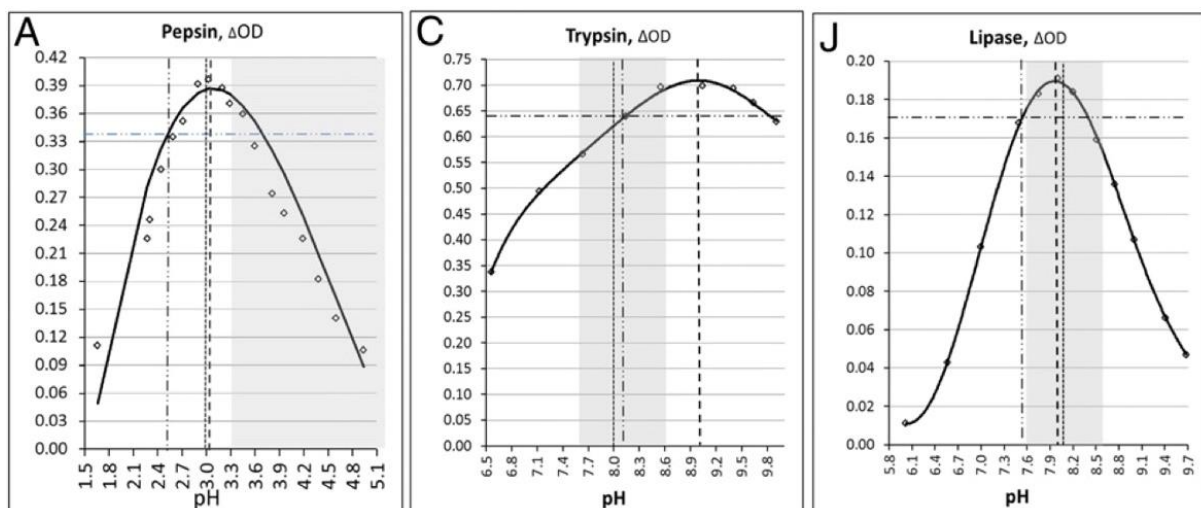
2.4.1.3 Enzymaktivitet etter døden

Enzymaktiviteten i fisk er fremtredende i mage og tarm hvor pepsin, trypsin og lipase er de viktigste fordøyelsesenzymene. Ved fiskens død vil mekanismene som styrer enzymene slutte å virke, og fordøyelsesenzymene vil starte å bryte ned fisken ved å gå løs på tarminnhold, tarmvegger og bukveggen [31]. Lysosomene i fisken inneholder enzymer (lysozymer) som blant annet proteinspaltende katepsiner. Enzymene i lysosomene har som oppgave å løse opp døde celler [45]. Etter fiskens død vil lysosomene frigjøre disse enzymene som bidrar til nedbrytning av proteiner i fiskemuskelen, noe som fører til en bløt muskulatur [45,52]. Enzymer i lysosomene regnes som de viktigste muskelenzymene [45]. Ordet blodranda brukes om nyrene til fisken og er det viktigste blodproduserende organet. I blodranda finnes det også proteolytiske enzymer som ødelegger vannbindingsevnen og spalter proteiner. I tillegg vil det etter døden dannes gunstige omgivelser for bakterier i fisken som er med å øke enzymkonsentrasjonen. Fisk inneholder også enzymer, kalt amylase, som spalter karbohydrater til glukose. Enzymene er aktive lenge etter fiskens død, og fører til rask ødeleggelse av usløyd fisk [31]. Grunnet overflod av enzymer, vil restråstoff fra fisk være utsatt for oksidasjon som kan føre til harsk lukt og smak [53].

2.4.1.4 pH og temperaturpåvirkning på enzymer

Hvor stor enzymaktiviteten er i fisk avhenger av type fisk og mageinnhold. I tillegg har pH og temperatur en stor påvirkning [54]. Ved temperaturer under 20 °C vil det være lav proteolytisk aktivitet uavhengig av fiskeart, vevsfraksjon og pH [43]. Fordøyelsesenzymene har høyere proteolytisk aktivitet enn muskelenzymene. Katepsin D i lysosomene spalter proteiner til peptider og katepsin A, B og C spalter disse videre [54]. Katepsin B har en optimums pH

mellom 5,5 - 6,5 og optimums temperatur mellom 45 - 55 °C. Katepsin D har en optimums pH mellom 2,5 - 3,8 og optimums temperatur 37 - 55 °C. Aktiviteten for katepsin B synker raskt ved en pH over 7 - 7,5 og under 4 - 5 [48]. I fisk er Katepsin D tilpasset til å kunne jobbe ved lave temperaturer [45]. Et forsøk gjennomført på enzymer fra fordøyelsessystemet hos Atlantisk laks (*Salmo salar*) kom frem til at pepsin har en optimums pH på 3,05, og trypsin har en optimums pH på 8,98 [55]. Hvor sensitiv aktiviteten av pepsin og trypsin i laks er til endringer i pH er vist i *Figur 6*. Ved en økning eller minking av pH fra optimums pH, vil enzymaktiviteten endre seg mye [55]. Optimums temperaturen til pepsin ligger mellom 35 - 40 °C. For trypsin er det stor variasjon i optimums temperaturen for ulike fiskeslag, og ligger i området mellom 35 - 63 °C [48].



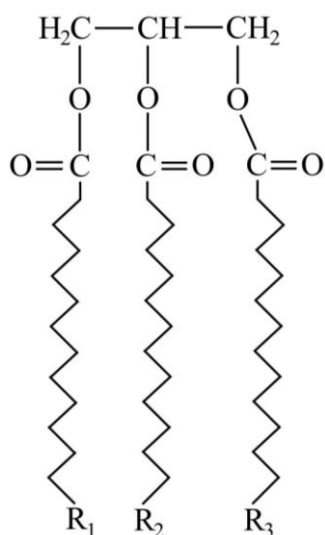
Figur 6. pH-påvirkning på aktiviteten til pepsin, trypsin og lipase. Horisontal linje viser krysningspunktene hvor enzymerne mister 10 % av aktiviteten fra den høyeste aktiviteten i optimums pH [55].

Trypsin har en autokatalytisk aktivering hvor ferdigdannet trypsin aktiverer dannelsen av mer trypsin. Jo større mengde trypsin som dannes i tarmene, jo raskere skjer aktiveringen [45]. I tillegg aktiverer trypsin omdannelsen av kymotrypsinogen til kymotrypsin [48]. Kymotrypsin i laks har optimums pH på 7,63 og en optimums temperatur mellom 45 - 55 °C. For fisk tilpasset kaldt vann vil trypsin og kymotrypsin være mer aktiv ved lave temperaturer, og ustabil ved en pH under 5. I fisk har de lipolytiske enzymerne et optimum mellom pH 7 - 8 og temperatur 25 - 37 °C [48,55]. Ett studie gjort på laks viser at optimums pH for lipaser i fordøyelsessystemet i laks ligger på pH 7,95. Hvordan aktiviteten for lipaser endrer seg ved ulike pH er vist sammen med pepsin og trypsin i *Figur 6* [55]. En liten endring i pH gir en stor reduksjon i lipaseaktiviteten. Noen enzymer i fisk kan være aktive ved temperaturer under -20 °C [56].

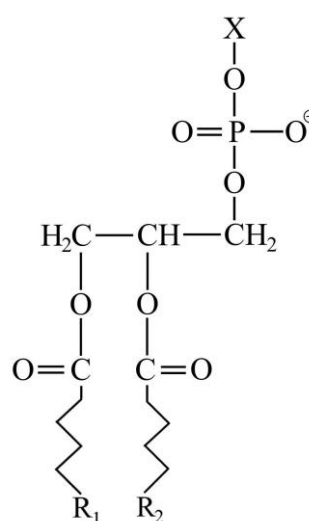
2.4.2 Lipider i fisk

Lipider er essensielle biomolekyler for alle levende organismer. De klassifiseres som hydrofobe eller amfipatiske forbindelser, og er løselige i upolare organiske løsemidler. Fettsyrer er den enkleste formen for lipider, og inneholder en karboksylsyrergruppe (COOH) og en lang hydrokarbonkjede (R). De har enten ingen, en eller flere dobbeltbindinger mellom karbonatomene i kjeden og kalles henholdsvis for mettede fettsyrer, monoumettede fettsyrer og polyumettede fettsyrer (PUFA). I naturen finnes det lite *trans*-fett, hvor hydrogenatomene befinner seg på hver side av dobbeltbindingen, og hovedmengden av fettsyrene er *cis*-fett, hvor hydrogenatomene befinner seg på samme side av dobbeltbindingen. En omega-3 (n-3) fettsyre har den siste dobbeltbindingen tre karbonatomer bort fra slutten av hydrokarbonkjeden [57].

Fettsyrer er byggesteiner for mer komplekse lipider som triacylglyseroler (triglyserider) og glyserofosfolipider (fosfolipider). Triglyserider fungerer som intracellulært lagringsmolekyl for metabolsk energi, er veldig hydrofobe, og består av tre fettsyrer forestret til glyserol (C₃H₈O₃), som vist i *Figur 7*. Fosfolipider er hovedkomponenten i biologiske membraner og består av et polart hode og en upolar hale. Strukturen til fosfolipidene består av glyserol bundet til to fettsyrekjeder ved hjelp av en esterbinding, samt en fosfatgruppe bundet til den siste OH-gruppen. Fosfatgruppen er videre bundet til en variabel gruppe X. *Figur 8* viser grunnstrukturen til fosfolipider [57].

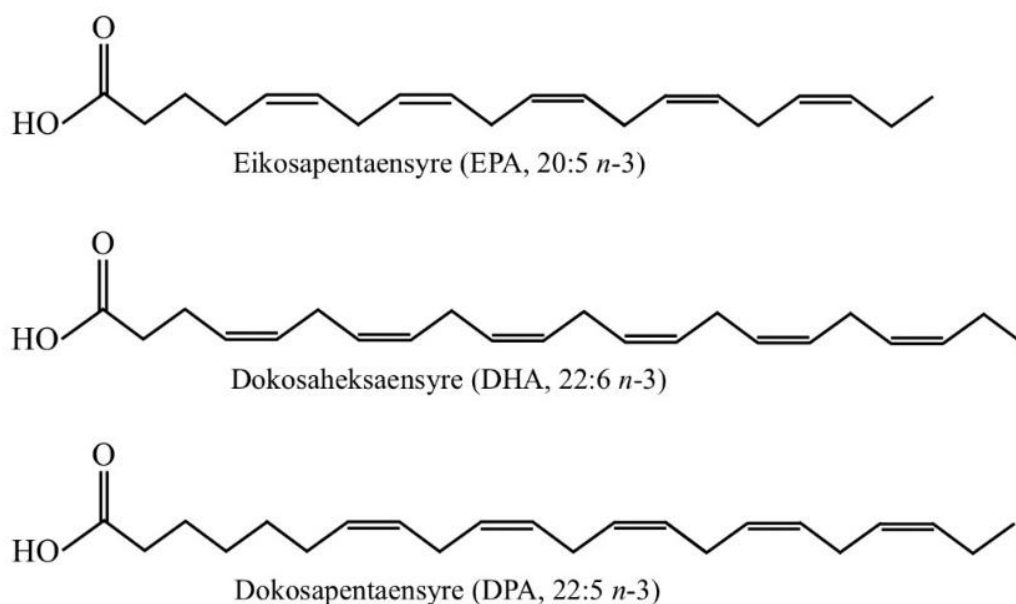


Figur 7. Triglyseridstruktur består av en glyserolgruppe og tre fettsyrer med lange hydrokarbonkjeder. Modifisert fra [57].



Figur 8. Fosfolipidstruktur består av en fosfatgruppe med en variabel X og to langkjedede fettsyrer. Modifisert fra [57].

Omega-3 fettsyrer er ifølge forskning forebyggende mot hjerte- og karsykdommer [58]. Fiskeolje inneholder rikelige mengder med n-3 PUFA med lange kjeder, og har derfor dokumentert effekt mot kardiovaskulære og inflammatoriske sykdommer. *Figur 9* viser strukturen av eikosapentaensyre (EPA), dokosaheksaensyre (DHA) og dokosapentaensyre (DPA) som er essensielle marine n-3 fettsyrer [58,59]. Linolsyre og linolensyre er også viktige fettsyrer, men utgjør bare 2 % av fiskefettet i motsetning til EPA og DHA som kan utgjøre opp til 30 %, avhengig av art [33].



Figur 9. EPA, DHA og DPA fettsyrer er essensielle marine lipider i fiskeolje. Modifisert fra [59].

Torsk inneholder 0,3 % fett i muskelen, og rundt 50 – 70 % fett i leveren. Laks har en ujevn fettfordeling i muskulaturen og lite fett i leveren, samt mest fettinnhold i finnefestene og bukveggen. Fettet i fisken består av flest triglyserider med 12 til 24 karbonatomer i fettsyrene, og mange av disse er umettede fettsyrer med 1 til 6 dobbeltbindinger [33]. Sintef Industry analyserer ofte fettsyresammensetning i laks, og *Tabell 2* viser fettsyresammensetning i oppdrettslaks fra en analyse utført i 2024 [60]. Mengde n-3 fettsyrer i fisk stammer i hovedsak fra deres kosthold, og det varierer derfor hvor mye n-3 fettsyrer det befinner seg i oppdrettslaks avhengig av hvilket fôr de inntar [61].

Tabell 2. Fettsyresammensetning i oppdrettslaks. Analysen er utført av Sintef Industry i 2024 [60].

Fettsyre	[%]	Fettsyre	[%]
6:0	< 0,1	18:4 n-3 SDA	0,72
8:0	< 0,1	20:0	0,36
10:0	< 0,1	20:1 n-7	0,43
11:0	< 0,1	20:1 n-9	3,86
12:0	< 0,1	20:2 n-6	1,09
13:0	< 0,1	20:3 n-6	0,30
14:0	1,94	21:0	< 0,1
14:1 n-5	< 0,1	20:4 n-6 ARA	0,29
15:0	0,19	20:3 n-3	0,58
15:1 n-5	< 0,1	20:4 n-3 ETA	0,83
16:0	8,6	20:5 n-3 EPA	2,62
16:1 n-7	2,45	22:0	0,17
17:0	0,14	22:1 n-11	2,4
17:1	< 0,1	22:1 n-9+n-7	0,46
18:0	2,61	22:2 n-6	< 0,1
18:1 n-9 (cis og trans)	38,8	21:5 n-3	0,23
18:1 n-7 (cis)	2,87	22:4 n-6	< 0,1
18:1 n-5	0,15	22:5 n-6	0,27
18:2 n-6 LA	13,57	22:5 n-3 DPA	1,06
18:2 n-6 (trans)	< 0,1	24:0	< 0,1
18:3 n-6 GLA	0,13	22:6 n-3 DHA	4,8
19:0	0,18	24:1	0,38
18:3 n-3 ALA	6,86		
Sum mettede fettsyrer	14,2	Forhold n-6/n-3	0,88
Sum monomettede fettsyrer	51,7	Sum EPA + DHA	7,4
Sum PUFA (n-6)	15,65	Sum identifiserte fettsyrer	99,3
Sum PUFA (n-3)	17,7	Sum uidentifiserte fettsyrer	0,7
Sum total-PUFA	33,3		

I tillegg til triglyserider og fosfolipider inneholder også fisk blant annet steroler [33]. Steroler er steroider som inneholder en hydroksylgruppe (OH-), og steroider er lipider som består av fire karbonringer [62]. Kolesterol er en type sterol som har en viktig rolle innenfor animalske plasmamembraner hvor den har i oppgave å forsterke og stive av cellemembranen [57]. Fiske-muskel inneholder rundt 0,05 % til 0,07 % kolesterol [33].

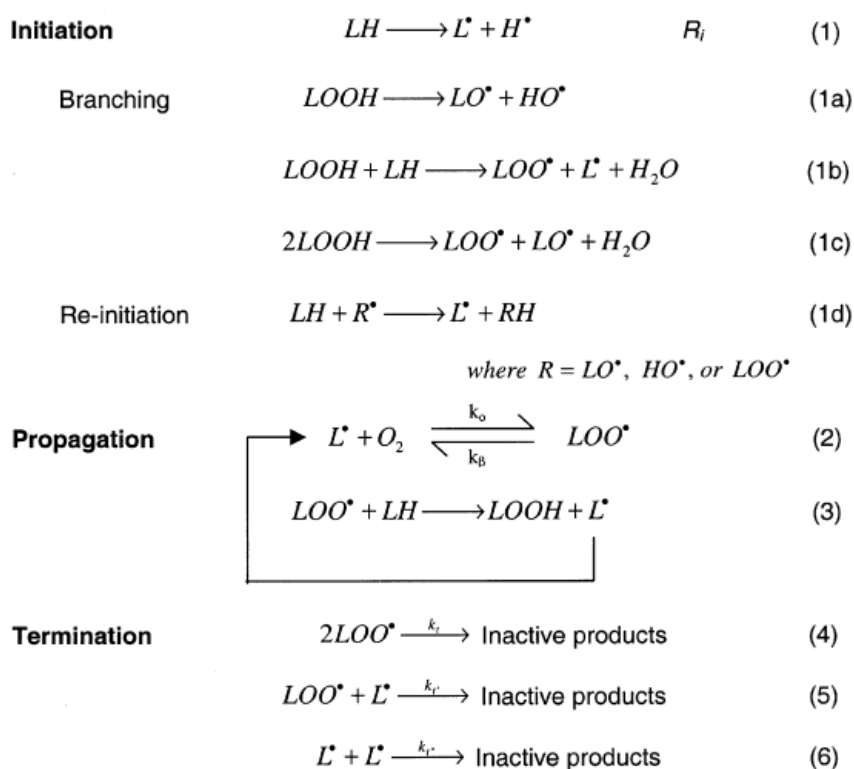
2.4.2.1 Frie fettsyrer (FFA)

Frie fettsyrer (FFA) er fettsyrer som ikke er forestret til glyserol og oppstår ved hydrolytisk spalting av triglyserider, også kalt hydrolytisk harskning. Hydrolysen foregår ved hjelp av lipaser som nevnt i delkapittel 2.4.1.2 og vist i *Ligning 2* [63,64]. Det er små konsentrasjoner av FFA i celler da for høy konsentrasjon kan ødelegge membranen [57]. Ved død dannes det flere frie fettsyrer i fisken da fordøyelsesenzymene har aktivitet lenge etter fiskens død, og innhold av FFA i usløyd fet fisk øker med økende temperatur [31,63]. Dette medfører at mengde FFA i fiskeensilasje kan være høy. Frie fettsyrer kan også dannes ved spalting av fosfolipider ved hjelp av fosfolipase [64].

FFA akselererer harskningsprosessen og reduserer kvaliteten og stabiliteten i fiskeolje. Det er fordi det oppstår flere områder på fettsyrene hvor oksidasjonsprosessen kan begynne. I tillegg har de frie fettsyrene større mulighet til å bevege seg og komme i kontakt med oksiderende midler [59]. Innhold av FFA i fisk kan kvantifiseres ved hjelp av flere ulike metoder, deriblant spektrofotometriske metoder, titeringsmetoder, samt instrumentelle analysemetoder som kjernemagnetisk resonans (NMR) [56,59].

2.4.2.2 Primær og sekundær oksidasjon av lipider

Lipidoksidasjon er en prosess hvor umettede fettsyrer reagerer med oksygen [65]. Prosessen kalles også for oksidativ harskning, og er selvforplantende og selvakselererende når den først har startet [63,65]. Reaksjonen trenger alltid en initiator eller en katalysator for å fjerne et elektron fra lipidet (LH) eller oksygenmolekylet for å danne frie radikaler. Dette innebærer at reaksjonen utløses ved hjelp av varme, lys, spormetaller eller enzymer [59,65]. Mekanismen, som deles inn i initieringsfasen, propageringsfasen og termineringsfasen, vises i *Figur 10*. Initieringsfasen danner lipidalkylradikalet ($L\cdot$), som har abstrahert et hydrogenatom, som videre reagerer med oksygen og danner det reaktive lipidperoksyradikalet, $LOO\cdot$ (1 - 1c). $LOO\cdot$ reagerer med hydrogen og danner det primære oksidasjonsproduktet lipidhydroperoksider ($LOOH$) i propageringsfasen (2 - 3) [65]. De sekundære oksidasjonsproduktene, deriblant aldehyder og ketoner, er ikke-radikale, og dannes videre i termineringsfasen (4 - 6) [65,66].



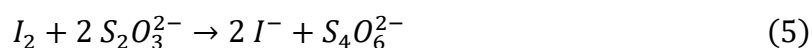
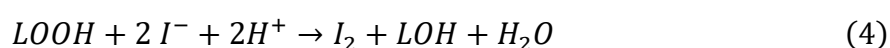
Figur 10. Skjematisk oversikt over hvordan oksidasjon av lipider forekommer [66].

Fiskeolje inneholder lange kjeder med n-3 PUFA og er derfor svært utsatt for autooksidasjon, grunnet mange dobbeltbindinger og karbonatomer med lav aktiveringsenergi for hydrogenetap [59]. Hastigheten på autooksidasjon øker omtrent det dobbelte for hvert hydrogenatom som befinner seg på karbongruppen mellom to dobbeltbindinger. Derfor er reaktiviteten for DHA, med fem slike områder, fem ganger raskere enn linolensyre med bare ett slikt område [67].

2.4.2.3 Peroksid verdi (PV)

De primære oksidasjonsproduktene, LOOH, er smaksløse og luktfrie forbindelser. Jo flere dobbeltbindinger i flerumettede fettsyrer, jo flere komplekse LOOH dannes [59]. Graden av oksidasjon øker ikke proporsjonalt med antall dobbeltbindinger grunnet ulike bøyninger i kjeden [65]. Peroksid verdi (PV) brukes for å kvantifisere de primære oksidasjonsproduktene [59]. Analysen kan utføres ved hjelp av jodometrisk titrering eller spektrofotometrisk analyse av konjugerte diener ved 234 nm. I tillegg kan andre avanserte teknikker som gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS), og NMR brukes for å kvantifisere flyktige oksidasjonsprodukter. Mengden LOOH øker i begynnelsen av oksidasjonsprosessen, men avtar senere ettersom de nedbrytes til de sekundære oksidasjonsproduktene. Over tid er det dermed en større mengde sekundære oksidasjonsprodukter enn primære oksidasjonsprodukter [59,65,68].

Jodometrisk titrering er metoden som oftest brukes ved kvantifisering av de primære oksidasjonsproduktene [59]. Mengde hydroperoksider kvantifiseres ved å løse oljeprøven i en sur blanding. Tilsats av mettet kaliumjodid (KI) fører til at hydroperoksidene oksiderer jodid (I⁻) til jod (I₂), slik som *Ligning 4* viser. Løsningen titreres med natriumtiosulfat (Na₂S₂O₃) som fører til at tiosulfat (S₂O₃²⁻) reduserer jod til jodid, som vist i *Likning 5* [69]. Stivelse blir ofte brukt som indikator for å finne omslagspunktet. Jod og stivelse danner et mørkeblått kompleks, slik at det er lett å observere fargeskiftet fra mørkeblå løsning til blank løsning i titreringen [70]. Ved hjelp av støkiometri kan mengde primære oksidasjonsprodukter kvantifiseres. Metoden kan også utføres ved hjelp av en instrumentell titrator.



2.4.2.4 Anisidin verdi (AV)

Grunnet ulike primære oksidasjonsprodukter for EPA og DHA kan forskjellige flyktige og ikke-flyktige sekundære oksidasjonsprodukter dannes, deriblant aldehyder og ketoner. De flyktige sekundære oksidasjonsproduktene danner den harske smaken og lukten av fisken. Sekundære oksidasjonsprodukter er lett påviselige ved lave oksidasjonsnivåer. Aldehyder er hovedproduktene for sekundær oksidasjon, og derfor kan anisidin verdi (AV) brukes for å kvantifisere mengde sekundære oksidasjonsprodukter. Ved måling av AV i lakseolje kan astaxanthin påvirke resultatene [59]. Astaxanthin er en antioksidant i laks som gir den karakteristiske røde fargen til fisken, og denne antioksidanten får laksen gjennom fôret [71].

Metoden for AV går ut på å blande fettprøven i en løsning bestående av isooktan for deretter å tilsette en blanding av p-anisidin i iseddik. Dette danner et gult reaksjonsprodukt. Absorbansen måles ved 350 nm før og etter tilsatt p-anisidin i iseddik. AV kvantifiseres dermed ut ifra økningen i absorbansen. Dersom fargen på fettene er sterk og absorbansen er høy ved 350 nm, er metoden ikke egnet [72]. I tillegg til AV kan også tiobarbitursyre-reaktive stoffer (TBARS) måles for å kvantifisere mengde sekundære oksidasjonsprodukter. Absorbansen måles for komplekset som dannes mellom tiobarbitursyre (TBA) og oksidasjonsproduktene [73]. Oksidasjonsproduktene som gir dårlig smak kvantifiseres ofte ved hjelp av GC-MS, fordi det oppstår forskjellige forbindelser. NMR brukes også for å finne informasjon om sammen-setningen av fettsyrene og lipidklassene [59].

Fiskeolje brukt til menneskelig konsum bør ha en peroksid verdi under 5 mEq/kg og anisidin verdi under 20 AnV. Denne grensen er basert på smaken av fiskoljen og ikke helseeffekten [59]. Grenseverdien for fiskeolje i ensilasjeproduksjon av K2 laks har ingen øvre grense, grunnet skinngarving som bruksområdet. Ved skinngarving kryssbindes de sekundære oksidasjonsproduktene til aminosyrene i proteinfibrene i hudens skinn for å stabilisere hudproteinet [74].

2.4.2.5 Påvirkningsfaktorer på lipidoksidasjonsprosessen

Faktorer som påvirker lipidoksidasjon kan deles inn i flere kategorier, deriblant lipidtype, katalysatorer, tilstedeværelse av inhibitorer, pro-oksidanter, antioksidanter og miljø- og løsemiddelsystemer. Pro-oksidanter er forbindelser som lettere får lipidoksidering til å skje, og kan være metaller som for eksempel jern og kobberioner. I fravær av oksygen kan metallene nedbryte de eksisterende peroksidene, slik at det oppstår en reduksjon av PV og økning i AV. Fisk inneholder pro-oksidanter, som blod, og innvoller med endogene enzymer som fører til en høy utsettelse for oksidasjon. De endogene enzymene bidrar til dannelse av frie fettsyrer som akselererer oksidasjonsprosessen [59,65]. Ved tilstedeværelse av spormengder vann i fiskeoljen, vil overflate lipidhydroperoksider og vannløselige metaller migrere til samme lokasjon på fettsyren, noe som fører til nedbrytning av lipidhydroperoksider [59].

For å forhindre oksidasjonsprosessen kan antioksidanter tilsettes [59]. Primære antioksidanter som BHA, gallater og tokoferol (vitamin E) hemmer dannelsen av frie radikaler og peroksider i initieringsprosessen. Sekundære antioksidanter som sitronsyre, fosforsyre og lactater danner komplekser med tungmetaller for å forsinke oksidasjonen. Antioksidanter som askorbinsyre (vitamin C) fjerner oksygen, og organiske syrer inaktiverer metallioner [63].

3. Materialer og metoder

Det ble benyttet K2 laks fra ScanBio Ingredients AS i forsøket. Risikovurdering for utstyr og kjemikalier brukt i metodene er vist i *Vedlegg 1*.

3.1 Utstyr

- Automatpipetter, 20-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL og 2-10 mL
- Fluorimeter, Spark® multimode microplate reader for high performance cell-based fluorescence assays
- Kjøttkvern, HOBART AE200 med 10 mm hullskive
- Mikroplatebrønn, Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates
- pH-meter, Portable meter ProfiLine pH 3110, og pH-elektrode, SenTix® 41-47 pH Electrodes
- pH-meter, VWR® pHenomenal® pH 1000L, og pH-elektrode, pHenomenal® 211
- Plastkyvette, VWR Cuvettes PS macro
- Rotavapor, Heidolph Laborota 4000 efficient Rotary Evaporator
- Sentrifuge, Eppendorf™ Centrifuge 5804 R
- Spektrofotometer, VWR P4 UV/Vis spectrophotometer
- Sprøytefilter 0,45 µm og 0,22 µm
- Ultralydbad, SONOREX SUPER RK 255
- Varmemodul, Pierce Reacti-Therm Heating block with Reacti-Vap Evaporating unit
- Vortexmikser, WIZARD IR Infrared Vortex Mixer
- Whatman nr. 1 filter

3.2 Kjemikalier

- Bovine hemoglobin Sigma H-2625, CAS 9008-02-0, Sigma Aldrich Norway AS
- Bovine Serum Albumin (BSA), C₈H₂₁NOSi₂, CAS 9048-46-8, Merck Life Science UK Limited/Sigma-Aldrich Company Ltd.
- Dinatriumhydrogenfosfat, Na₂HPO₄, CAS 7558-794, Merck KGaA
- Folinreagens, C₁₀H₅NaO₅S, CAS 521-24-4, Merck Life Science AS/Sigma Aldrich Norway AS
- Metanol, CH₃OH, CAS 67-56-1, Merck KGaA
- Natriumhydroksid pastiller, NaOH, CAS 1310-73-2 xxxx, Merck KGaA
- Natriumkarbonat, Na₂CO₃, CAS 497-19-8, Merck Life Science AS/Sigma Aldrich Norway AS
- Natriumklorid, NaCl, CAS 7647-14-5, Merck KGaA
- Nitrogengass, N₂-gass

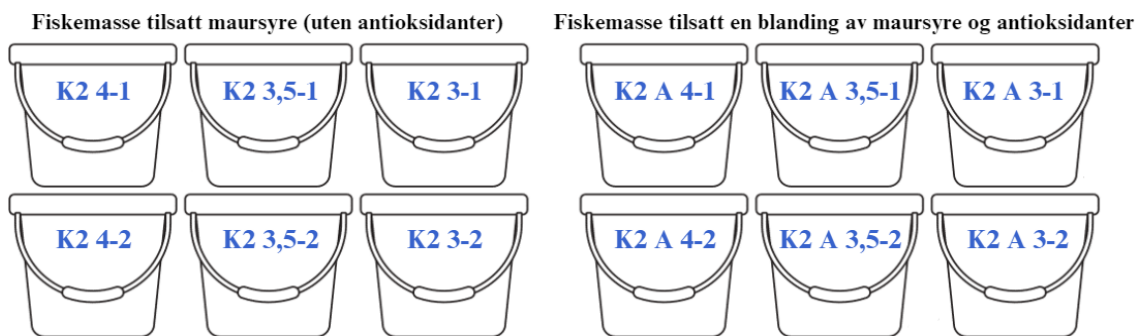
- Isooktan, C₈H₁₈, CAS 540-84-1, Sigma Aldrich Norway AS
- Kaliumnatriumtartrat, KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O, CAS 6381-59-5, Milipore, Merck Life Science AS
- Kloroform, CHCl₃, CAS 67-66-3, Sigma Aldrich Norway AS
- Kobberacetat-monohydrat, Cu(CH₃COO)₂ · H₂O, CAS 6046-93-1, Merck Life Science AS/Sigma Aldrich Norway AS
- Kobbersulfatpentahydrat, CuSO₄ · 5H₂O, CAS 7758-99-8, Merck KGaA
- Maursyre, HCOOH, blandet med antioksidanter, butylert hydroksyanisol (BHA) og propylgallat (PG), CAS 64-18-6
- Maursyre, HCOOH, uten antioksidanter, CAS 64-18-6
- Oljesyre, C₁₈H₃₄O₂, CAS 112-80-1, Merck Life Science AS/Sigma Aldrich Norway AS
- Pyridin, C₅H₅N, CAS 110-86-1, Merck Life Science AS
- Sitronsyremonohydrat, C₆H₈O₇ · H₂O, CAS 5949-29-1, Merck KGaA
- Soyalecitin (L-α-fosfatidylkolin), CAS 8002-43-5, Sigma
- Trikloreddiksyre (TCA), C₂HCl₃O₂, CAS 76-03-9, Merck KGaA
- Tris(hydoksymetyl)aminometanhydroklorid (Tris-HCl), NH₂C(CH₂OH)₃ · HCl, CAS 1185-53-1, Merck Life Science AS
- 4-Methylumbelliferone (4-MU), C₁₀H₈O₃, CAS 90-33-5, Sigma
- 4-Metyllumbelliferylheptanoat (4-MUH), C₁₇H₂₀O₄, CAS 18319-92-1, Sigma Aldrich Norway AS

3.3 Fremgangsmåte

3.3.1 Ensilering

En K2 laks, ca. 17 kg, ble skåret i små biter og kvernet en gang til en fiskemasse ved hjelp av en kjøttkvern med 10 mm hullskive. Fiskemassen ble kvernet en gang til og blandet sammen for hånd i to minutter. 2 x 100 g kvernet fiskemasse ble overført til hvert sitt 250 mL avlangt begerglass og inaktivert i mikrobølgeovn (> 90 °C i 10 minutter). 100 g inaktivert prøve ble deretter overført til 2 x 50 mL sentrifugerør (merket «K2 D0 1» for dag 0 parallell 1) og sentrifugert (40 °C, 4200 rpm i 10 minutter). Den andre 100 g inaktiverte prøven ble overført til 2 x 50 mL sentrifugerør (merket «K2 D0 2» for dag 0 parallell 2) og sentrifugert (40 °C, 4200 rpm i 10 minutter). Sentrifugerørene ble videre fryst ved -78 °C frem til fraksjonering. 2 x 50 g kvernet fiskemasse ble deretter overført til plastposer (den ene merket «K2 D0 1» og den andre merket «K2 D0 2») og fryst ved -78 °C frem til prøveopparbeidelse for proteolytisk og lipolytisk aktivitet. Videre ble den resterende fiskemassen fordelt i tolv plastbøtter med lokk. Hvor mye fiskemasse som ble overført til hver bøtte er vist i *Tabell I* i *Vedlegg 2*.

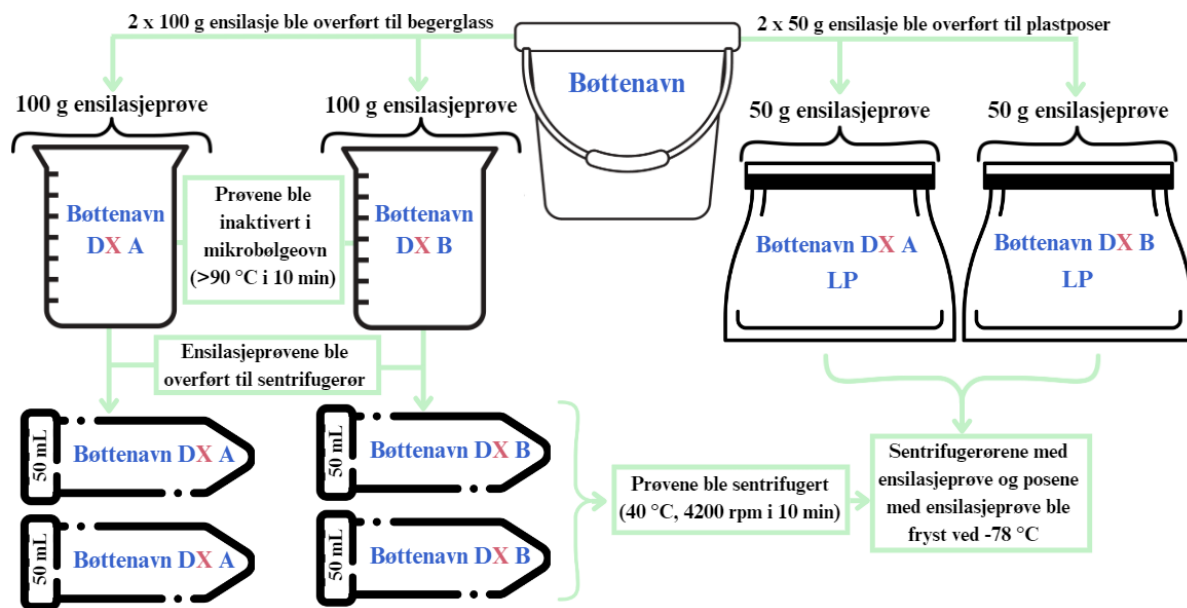
Det ble laget parallelle ensilasjebatcher ved hver pH. To bøtter med fiskemasse ble tilsatt maursyre uten antioksidanter til pH var ved 3,8, to bøtter med fiskemasse ble tilsatt samme syre til pH var ved 3,3 og to bøtter med fiskemasse ble tilsatt samme syre til pH var ved 2,8. To bøtter med fiskemasse ble tilsatt en blanding av maursyre og antioksidanter til pH var ved 3,8, to bøtter med fiskemasse ble tilsatt samme syreblanding til pH var ved 3,3 og to bøtter med fiskemasse ble tilsatt samme syreblanding til pH var ved 2,8. Hvordan bøttene med ensilasje ble merket er vist i *Figur 11*. De tolv bøttene med ensilasje ble oppbevart i kjølerom ved 10 °C. Etter én dag ble pH-økningen som skjedde gjennom natten korrigert med tilsvarende maursyre som ble brukt den første dagen, slik at pH ble justert til 4, 3,5 og 3. Uttak av ensilasje fra hver bøtte ble utført på lagringsdag 4, 11, 18 og 22, og pH ble kontrollert på hver uttaksdag med ett flyttbart pH-meter.



Figur 11. Hvordan ensilasjebøttene ble merket. K2 indikerer at ensilasjematerialet i bøttene er K2 restråstoff. Tallene 4, 3,5 og 3 representerer henholdsvis at disse bøttene inneholder ensilasje ved pH 4, 3,5 og 3. Bokstaven A etter K2 indikerer at disse bøttene inneholder ensilasje som er tilsatt en blanding av maursyre og antioksidanter. Det ble laget parallelle ensilasjebatcher for hver pH, dermed representerer tall 1 og 2 etter pH-verdien henholdsvis batch 1 med ensilasje og batch 2 med ensilasje.

3.3.2 Prøveopparbeidelse for analysearbeid

På hver uttaksdag ble ensilasjen i hver bøtte blandet med hver sin skje før 2 x 100 g ensilasjeprobe fra hver bøtte ble overført til hvert sitt 250 mL avlangt begerglass, og inaktivert i mikrobølgeovn (> 90 °C i 10 minutter). Alle de 100 g inaktiverte prøvene ble deretter overført til hver sine 2 x 50 mL sentrifugerør og sentrifugert (40 °C, 4200 rpm i 10 minutter). Sentrifugerørene ble videre fryst ved -78 °C frem til fraksjonering. I tillegg ble 2 x 50 g ensilasjeprobe fra hver bøtte overført til plastposer, og fryst ved -78 °C frem til prøveopparbeidelse for proteolytisk og lipolytisk aktivitet. Ensilasjeprobene fikk navn etter hvordan ensilasjebøttene fra *Figur 11* ble merket, samt hvilken dag de ble tatt ut og hvilken parallell som ble tatt ut (parallell A eller B). *Figur 12* illustrerer uttaksprosessen, samt prøvenavnene for hver ensilasjeprobe.

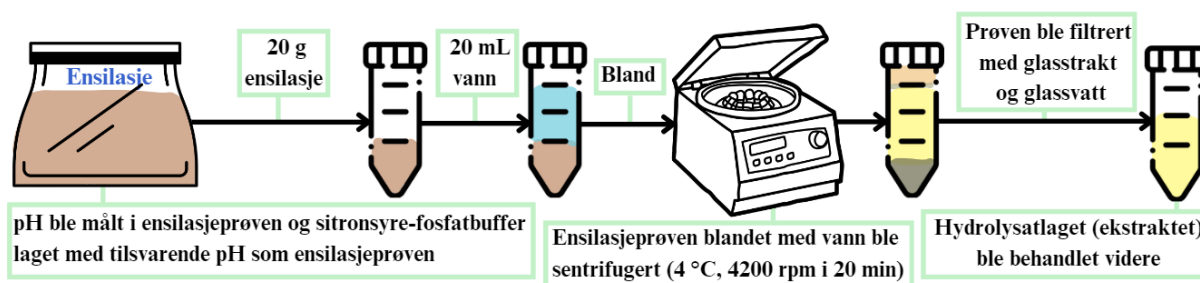


Figur 12. Ensilasjeuttak fra én plastbøtte. 2 x 100 g ensilasjeprøve ble inaktivert og sentrifugert, og 2 x 50 g ensilasjeprøve ble overført til plastposer. Prøvenavnene på sentrifugerørene og posene indikerer hvilken bøtte ensilasjen ble tatt ut ifra. Hver prøve får prøvenavn etter bøttenavnet (fra Figur 11) som henspiller hvilken pH ensilasjen hadde, samt «DX» hvor «D» står for dag og «X» representerer hvilken lagringsdag ensilasjen ble tatt ut på (4, 11, 18 eller 22). «A» og «B» angir ensilasjens parallell. Ensilasjeprøvene i plastposene ble i tillegg merket med LP (lipolytisk/proteolytisk).

På hver fraksjoneringsdag, som skjedde dagen etter ensilasjeuttak, ble hver 100 g prøve i de 2 x 50 mL fryste sentrifugerørene fraksjonert på samme måte. For hver prøve ble det øverste laget, fettlaget, i de 2 x 50 mL fryste sentrifugerørene overført med en skje til ett 15 mL sentrifugerør. Deretter ble de 2 x 50 mL sentrifugerørene plassert i varmt vannbad (ca. 50 °C) i ca. 15 sekunder, før de resterende lagene av prøven ble banket og ristet ut av sentrifugerøret ned på aluminiumsfolie. Lagene, emulsjon (under fettlaget), hydrolysat (under emulsjonslaget) og sediment (nederste laget), ble oppdelt ved hjelp av en skalpell og fordelt i henholdsvis små plastposer, veieskip og store plastposer. Sentrifugerørene på 15 mL, plastposene og veieskipene ble veid på forhånd, og veid på nytt etter prøvetilsetting. Hydrolysatet ble videre smeltet i varmt vannbad (ca. 50 °C), og filtrert med plasttrakter og glassvatt over til 50 mL sentrifugerør. Emulsjonen og hydrolysatet ble fryst ved -20 °C, og sedimentene ble fryst ved -78 °C. Fettet ble så sentrifugert og fryst ved -78 °C frem til måling av FFA. De 15 mL sentrifugerørene, små plastposene, veieskipene og 50 mL sentrifugerørene, og de store plastposene ble merket med tilsvarende prøvenavn som sentrifugerørene i Figur 12. I tillegg ble de små plastposene merket med EM (emulsjon), veieskipene merket med HYD (hydrolysat), og de store plastposene merket med SED (sedimenter). På grunn av tidsbegrensninger ble kun ensilasjeprøver uten antioksidanter analysert videre.

3.3.3 Prøveopparbeidelse for proteolytisk og lipolytisk aktivitet

Ensilasjeprøvene uten antioksidanter, som ble tatt ut fra de tre bøttene øverst til venstre i *Figur 11* i delkapittel 3.3.1, ble prøveopparbeidet. Parallell A av de 2 x 50 g fryste ensilasjeprøvene uten antioksidanter fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22, samt parallell 1 av fiskemassen fra dag 0, ble tint ved romtemperatur. pH ble målt i alle disse prøvene, og sitronsyre-fosfatbuffer ble laget ved pH tilsvarende de målte pH-verdiene i hver ensilasjeprøve og i fiskemassen. Metoden som ble brukt for å lage sitronsyre-fosfatbuffer er vist i *Tabell IV* i *Vedlegg 3*. 20 g ensilasje fra hver pose ble blandet med 20 mL destillert vann i 50 mL sentrifugerør, sentrifugert (4 °C, 4200 rpm i 20 minutter) og filtrert med glasstrakt og glassvatt over i et 50 mL sentrifugerør. Nøyaktig masse filtrat (ekstrakt) ble notert. *Figur 13* viser et flytskjema for denne prosessen.



Figur 13. Flytskjema over hvordan ensilasjen ble opparbeidet før videre fortynning. Tilsvarende ble utført for fiskemassen fra dag 0.

Alle ekstraktene fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22 ble videre fortynnet med destillert vann i forholdet 1:20 til totalt 10 mL i 15 mL sentrifugerør. Ekstraktet fra dag 0 ble fortynnet med destillert vann i forholdet 1:50 til totalt 10 mL i et 15 mL sentrifugerør. Prøvene fortynnet 1:20 og 1:50 ble fortynnet ytterligere med destillert vann i forholdet 1:200 og 1:500 til totalt 10 mL i 15 mL sentrifugerør. Alle prøvene med fortynning 1:20, 1:50, 1:200 og 1:500 ble fryst ved -80 °C frem til måling av proteolytisk aktivitet.

1 mL av ekstraktet fra dag 0, 4, 11, 18 og 22 ble kokt i hvert sitt kimaxrør med kork ved 80 °C i 30 minutter for å lage blankprøvene til lipolytisk aktivitet. Det kokte ekstraktet fra dag 4, 11, 18 og 22 ble så fortynnet med sitronsyre-fosfatbuffer, ved pH tilsvarende den aktuelle ensilasjeprøven, i forholdet 1:20 til totalt 2 mL i 15 mL sentrifugerør. Ekstraktet som ble kokt fra dag 0 ble fortynnet med sitronsyre-fosfatbuffer i forholdet 1:50 til totalt 2,5 mL i et 15 mL sentrifugerør ved pH tilsvarende for fiskemassen. Enzymprøvene ble laget ved å fortynne det ukokte ekstraktet med sitronsyre-fosfatbuffer, ved pH tilsvarende den aktuelle prøven, i forholdet 1:20 for dag 4, 11, 18 og 22, og i forholdet 1:50 for dag 0 i 15 mL sentrifugerør. Blankprøvene og enzymprøvene ble så fryst ved -80 °C frem til måling av lipolytisk aktivitet.

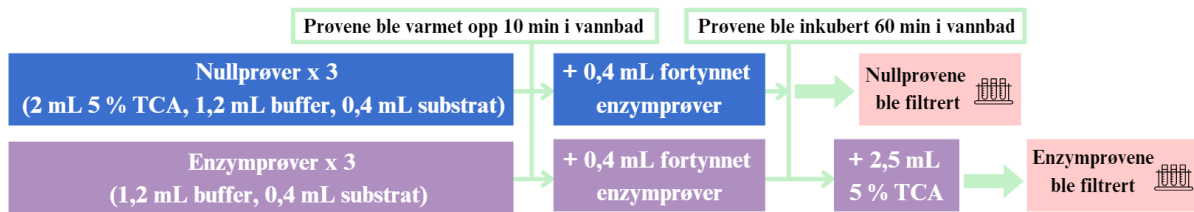
3.3.4 Proteolytisk aktivitet

Ensilasjeprøveekstraktene med fortykning 1:20, 1:50, 1:200 og 1:500 fra delkapittel 3.3.3 ble tint i kaldt vann. For hver prøve ble det laget tre paralleller for nullprøver og tre paralleller for enzymprøver. Det ble laget totalt to serier for hver prøve. Oppsettet for prøverørene for en serie er vist i *Figur 14*. Metodene for tillaging av løsningene som ble brukt ved gjennomføring av proteolytisk aktivitet er vist i *Tabell IV* i *Vedlegg 3*.



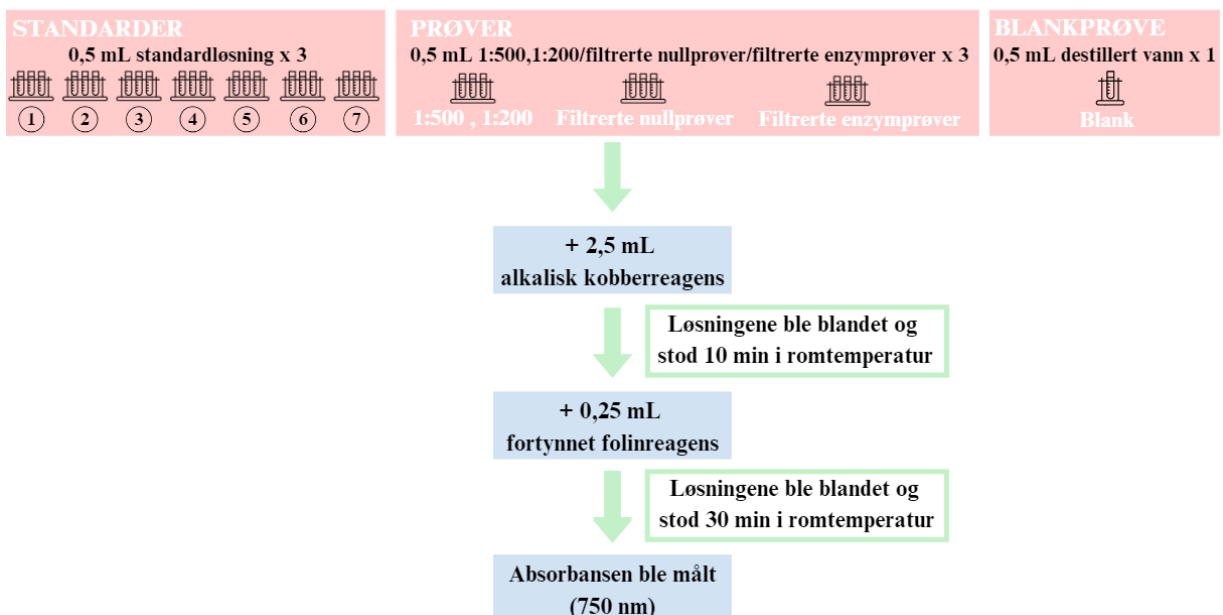
Figur 14. Oppsettet av glassrørene for måling av proteolytisk aktivitet. Rørene øverst til venstre ble brukt først, deretter ble løsningene filtrert over i de korte rørene øverst til høyre. Videre ble rørene nederst til høyre brukt til Lowry metoden for absorpsjonsmåling. Rørene nederst til venstre ble brukt til standarder. I tillegg var det et ekstra brett for prøvene fortyknet 1:200 og 1:500. Bilde fra Maria A. M.

Figur 15 viser fremgangsmåten før Lowry metoden. 2 mL 5 % TCA, 1,2 mL sitronsyre-fosfatbuffer, ved pH tilsvarende den aktuelle prøven, og 0,4 mL substrat (1 % Hemoglobin) ble pipettert med automatpipette over til glassrørene merket nullprøver. Løsningene ble så blandet med en vortexmikser på middels hastighet. 1,2 mL sitronsyre-fosfatbuffer, ved pH tilsvarende den aktuelle prøven, og 0,4 mL substrat (1 % Hemoglobin) ble pipettert med automatpipette over til glassrørene merket enzymprøver, og løsningene ble så blandet med en vortexmikser. Den ene serien med glassrør ble plassert i vannbad ved 10 °C i 10 minutter, og den andre serien med glassrør ble plassert i vannbad ved 35 °C i 10 minutter. 0,4 mL fortyknet prøveløsning i forholdet 1:20 og 1:50, fra delkapittel 3.3.3, ble overført til glassrørene merket nullprøver og enzymprøver for den respektive prøven, og løsningene ble så blandet med en vortexmikser. Glassrørene ble deretter satt i vannbad ved 10 °C og 35 °C i 60 minutter. 2 mL 5 % TCA ble tilsatt i rørene merket enzymprøver og løsningene ble så blandet med en vortexmikser. Etter 10 - 20 minutter ble alle løsningene filtrert med glasstrakt og Whatman nummer 1 filter til nye lave glassrør. Samme filterpapir ble brukt for hver av de tre parallelle nullprøvene og enzymprøvene.



Figur 15. Fremgangsmåte for proteolytisk aktivitet før Lowry metoden og måling av absorbans.

Peptidinnholdet ble bestemt ved hjelp av Lowry metoden [47]. Tillaging av standardprøver på 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL og 300 µg/mL av proteinstandarden 1000 µg/mL BSA er vist i *Tabell IV* i *Vedlegg 3*. *Figur 16* viser hvordan Lowry metoden ble utført. 0,5 mL x 3 paralleller av standardprøvene, 0,5 mL x 3 paralleller av prøvene fortynnet 1:200 og 1:500 fra delkapittel 3.3.3, 0,5 mL x 3 paralleller for filtrerte nullprøver og filtrerte enzymprøver, og 0,5 mL x 1 parallell for blank (til nullstilling av spektrofotometeret), ble overført til hvert sitt glassrør og videre behandlet likt. 2,5 mL alkalisk kobberreagens ble tilsatt, og løsningene ble blandet med en vortexmikser. Etter 10 minutter ved romtemperatur ble 0,25 mL fortynnet folinreagens tilsatt, og løsningene ble blandet med en vortexmikser. Etter 30 minutter ved romtemperatur ble løsningene overført til plastkyvetter, og absorbansen for hver løsning ble målt ved 750 nm ved hjelp av et spektrofotometer.

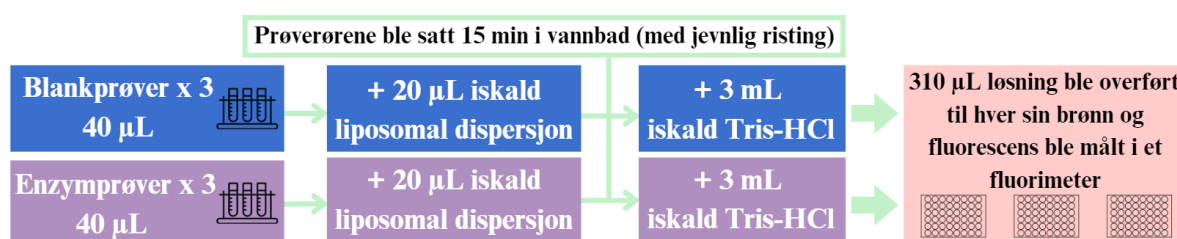


Figur 16. Fremgangsmåte for proteolytisk aktivitet ved bruk av Lowry metoden. Absorbansen ble målt ved 750 nm.

3.3.5 Lipolytisk aktivitet

Liposomal dispersjon ble laget ved å veie ut 10 mg 4-MUH og 27,1 mg soyalecitin i hvert sitt glassrør med kork. Deretter ble 17,3 mL av en 2:1 kloroform og metanol blanding tilsatt ved hjelp av pipette med peleusballong til hvert av glassrørene. Begge løsningene ble blandet i en rundkolbe rett før inndamping til 1 - 2 mL løsning på rotavapor ved 40 °C. Løsningen ble så overført til et kimaxrør ved hjelp av en glasspipette, og fullstendig inndampet med N₂-gass ved 35 °C ved bruk av en varmemodul. Kimaxrøret uten kork ble deretter satt i en eksikator med vakuumsug i minst en time. 8,65 mL 0,15 M natriumklorid, ble så tilsatt til kimaxrøret og korken skrudd på. Løsningen ble blandet godt med en vortexmikser i 20 minutter på maks hastighet, og røret ble satt i ultralydbad i 30 sekunder. Vortex- og ultralydprosessen ble gjentatt fem ganger. Videre ble løsningen først filtrert gjennom et sprøytefilter på 0,45 µm, og deretter gjennom et sprøytefilter på 0,22 µm til et nytt kimaxrør med kork. Den ferdig filtrerte løsningen var blakket. Dispersjonen ble oppbevart i kjølerom ved 4 °C.

Blankprøvene og enzymprøvene fortynnet med sitronsyre-fosfatbuffer fra delkapittel 3.3.3 ble tint i kaldt vann. 40 µL blankprøver og 20 µL iskald liposomal dispersjon ble overført ved hjelp av en automatpipette til reagensrør. 40 µL enzymprøver og 20 µL iskald liposomal dispersjon ble overført ved hjelp av en automatpipette til reagensrør. 3 paralleller ble laget for hver blankprøve og enzymprøve. Det ble laget totalt to serier for hver prøve. Reagensrørene ble dekket med parafilm og de to seriene ble inkubert i hvert sitt vannbad med jevnlig risting i 15 minutter ved henholdsvis 10 °C og 35 °C. Deretter ble 3 mL iskald 1 M Tris-HCl buffer (pH 7,5) tilsatt, og løsningene ble blandet med en vortexmikser. Metoden for tillaging av 1 M Tris-HCl buffer (pH 7,5) er vist i *Tabell VI* i *Vedlegg 3*. Deretter ble 310 µL fra reagensrørene overført til brønner i en mikroplatebrønn. 310 µL av standardserien 4-MU på 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM og 15 µM ble overført til brønner i en mikroplatebrønn. Metoden for tillaging av standardserien er vist i *Tabell VI* i *Vedlegg 3*. Prøvene og standardene ble til slutt målt i et fluorimeter ved eksitasjonsbølgelengde 365 nm og eksitasjonslit 10 nm, emisjonsbølgelengde 450 nm og emisjonsslit 5 nm. *Figur 17* oppsummerer hvordan lipolytisk aktivitet ble utført.



Figur 17. Fremgangsmåte for lipolytisk aktivitet ved bruk av et fluorimeter.

3.3.6 Frie fettsyrer (FFA)

Analysering av frie fettsyrer, for parallell A av de fraksjonerte fettprøvene (ensilasjeprøvene uten antioksidanter i *Figur 11*) fra delkapittel 3.3.1, ble utført av senioringeniør Merethe Selnes hos Sintef Ocean. En standardprøve ble laget ved å overføre 0,2825 g oljesyre til en 10 mL målekolbe, og deretter ble isooktan tilsatt opp til 10 mL merket. Det ble laget en standardserie på sju konsentrasjoner av standardprøven, og metoden for tillaging av standardserien er vist i *Tabell VII* i *Vedlegg 3*. Kobberacetat-monohydratløsning ble laget ved å overføre 5,00 g kobberacetat-monohydrat til en pyrexflaske og 100 mL destillert vann ble tilsatt. Pyridin ble tilsatt dråpevis til pH var 6,0 - 6,2. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap.

Hver fettprøve ble behandlet likt. 0,1 - 0,2 g fettprøve ble overført til et kimaxrør, og det ble benyttet to til tre paralleller per prøve. Deretter ble det overført 5 mL isooktan til hvert kimaxrør, og løsningen ble blandet med en vortexmikser. Videre ble 0,5 mL kobberacetat-monohydratløsning tilsatt til hvert kimaxrør og standardrør, og løsningene ble blandet med en vortexmikser i 30 sekunder. Kimaxrørene ble så sentrifugert (20 °C, 2000 rpm i 5 minutter), og det øverste laget i kimaxrøret ble videre overført til en plastkyvette. Isooktan ble brukt til nullstilling av spektrofotometeret, og absorbansen for hver prøve ble målt ved 715 nm.

4. Resultater

4.1 Ensilasjeutvikling

Under lagringstiden av ensilasjen ble det oppdaget forskjellig ensilasjeutvikling ved ulike pH. Ved tilsats av syre til den kvernedede fiskemassen ble det observert fargeendring fra rød til grå farge, slik som *Figur 18* viser med fiskemassen til venstre og fiskemasse tilsatt syre til høyre. *Figur 19* viser hvordan ensilasjen ved pH 3 så ut på siste lagringsdag. Til venstre i figuren vises ensilasjen ved pH 3 som hadde tilsats av maursyre uten antioksidanter, og til høyre vises ensilasjen som hadde tilsats av blandingen med maursyre og antioksidanter. Ensilasjen som hadde tilsats av maursyre-antioksidantblandingen, hadde en seig og flytende konsistens i forhold til ensilasjen tilsatt maursyre uten antioksidanter. I tillegg hadde ensilasjen med antioksidanter en mer homogen masse enn ensilasjen uten antioksidanter.

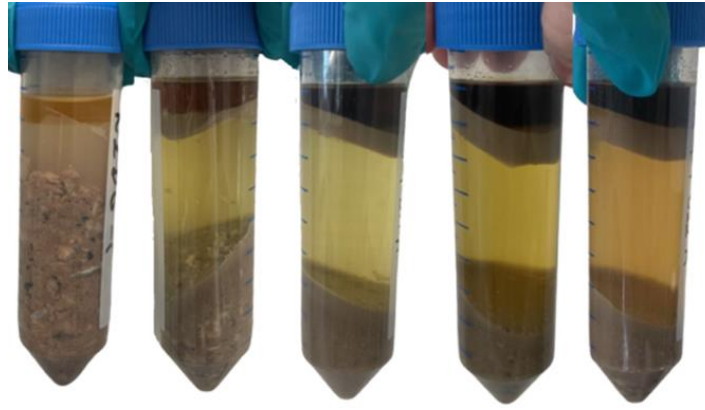


Figur 18. Kvernet fiskemasse uten syre, til venstre, og kvernet fiskemasse tilsatt syre, til høyre, på dag 0. Ved tilsats av syre forandret fargen på fiskemassen seg fra rød til grå.

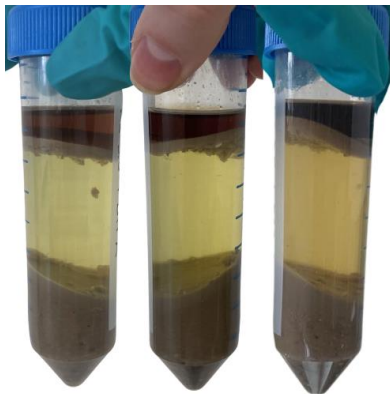


Figur 19. Ensilasje av K2 laks, ved pH 3 på lagringsdag 22, uten antioksidanter til venstre og med antioksidanter til høyre. Konsistensen i ensilasjen var forskjellig.

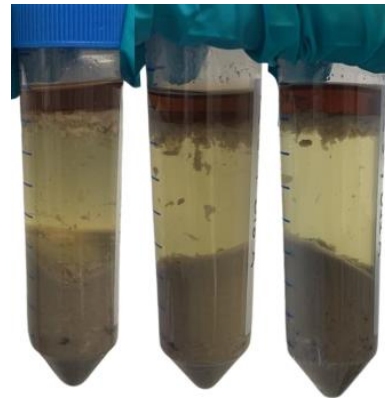
På hver uttaksdag forekom det endringer både i farge og masse for de ulike fraksjonene som befant seg i ensilasjen etter sentrifugering. *Figur 20* viser hvordan fraksjonene for ensilasjen ved pH 4 uten antioksidanter utviklet seg gjennom lagringstiden, samt hvordan fraksjonene i fiskemassen fra dag 0 så ut. I den sentrifugerte fiskemassen ved pH 6,7 (til venstre i *Figur 20*), vises det et stort sedimentlag i forhold til sedimentlagene ved pH 4 (de fire sentrifugerørene til høyre i *Figur 20*). I tillegg vises det at oljelaget i fiskemassen ved pH 6,7 var lysere enn oljelaget i ensilasjen ved pH 4. *Figur 21* og *22* viser hvordan fraksjonene for ensilasjen uten antioksidanter ved henholdsvis pH 3,5 og pH 3 utviklet seg fra lagringsdag 11 til 22. Ensilasjen ved pH 4, både med og uten antioksidanter, hadde en større masse hydrolysat og emulsjon enn ensilasjen ved pH 3,5 og pH 3. I tillegg vises det i *Figur 22* at ensilasjen ved pH 3 hadde mer grums (emulsjonspartikler) i hydrolysatlaget i forhold til hydrolysatlaget i ensilasjen ved pH 4, i *Figur 20*, og pH 3,5, i *Figur 21*.



Figur 20. Sentrifugert fiskemasse ved pH 6,7 fra dag 0 (til venstre), og sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4 fra henholdsvis lagringsdag 4 (nr. to fra venstre), 11 (nr. tre fra venstre), 18 (nr. to fra høyre) og 22 (til høyre). Alle fraksjonene har et tydelig skille mellom hverandre.

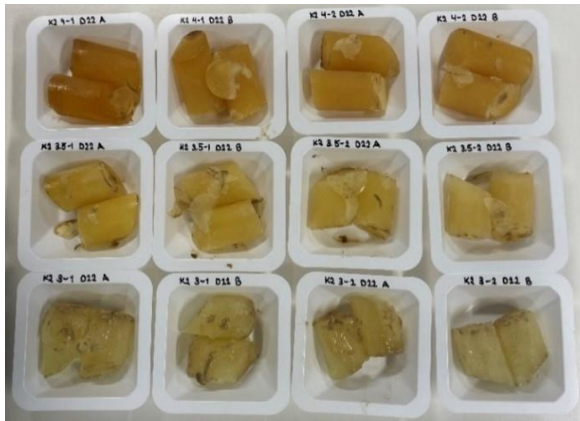


Figur 21. Sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 3,5 fra henholdsvis dag 11 (til venstre), 18 (i midten) og 22 (til høyre). Alle fraksjonene har et tydelig skille mellom hverandre, men emulsjonslaget er litt diffust.

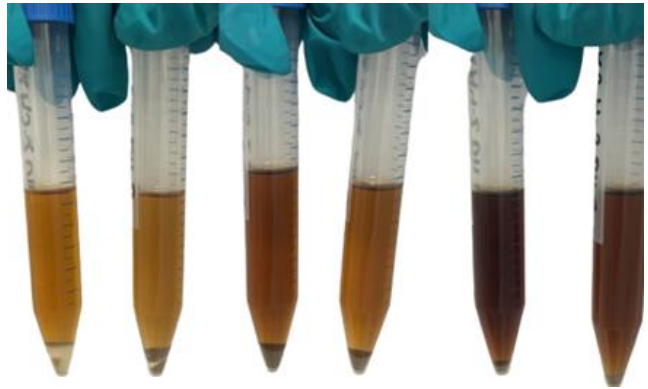


Figur 22. Sentrifugert ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 3 fra henholdsvis dag 11 (til venstre), 18 (i midten) og 22 (til høyre). Noen emulsjonspartikler har diffundert ut i hydrolysatlaget, slik at det ser grumsete ut.

Figur 23 viser de fraksjonerte hydrolysatlagene i ensilasjeprøvene uten antioksidanter fra dag 22. På nederste rekke vises hydrolysatet ved pH 3, i den midterste rekken vises hydrolysatet ved pH 3,5 og den øverste rekken viser hydrolysatet ved pH 4. Fargen på hydrolysatet var lys gul ved pH 3 og ble mørkere gul/oransje ved økende pH. I tillegg ble fargen på hydrolysatet mørkere fra uttaksdag til uttaksdag, slik at fargen på hydrolysatet ved pH 4 fra dag 4 var lysere enn hydrolysatet ved pH 4 fra dag 22. Hydrolysatet ved pH 6,7 fra dag 0 og hydrolysatet ved pH 4 fra dag 22 hadde nesten samme farge, men ved dag 0 hadde hydrolysatet et rosa skjær i stedet for et oransje skjær. Figur 24 viser fargen på fett fra dag 18, og det vises en fargeendring i fett ved pH 3 (venstre) til fett ved pH 4 (høyre) hvor fargen blir mørkere ved økende pH. I tillegg var fargen på fett mørkere for ensilasjen med antioksidanter i forhold til ensilasjen uten antioksidanter. Fargen på fett ble også mørkere fra uttaksdag til uttaksdag.



Figur 23. Fraksjonerte hydrolysatlag som var i ensilasjen av K2 laks uten antioksidanter ved dag 22. Hydrolysat ved pH 4 på øverste rekke, ved pH 3,5 på midterste rekke og ved pH 3 på nederste rekke.



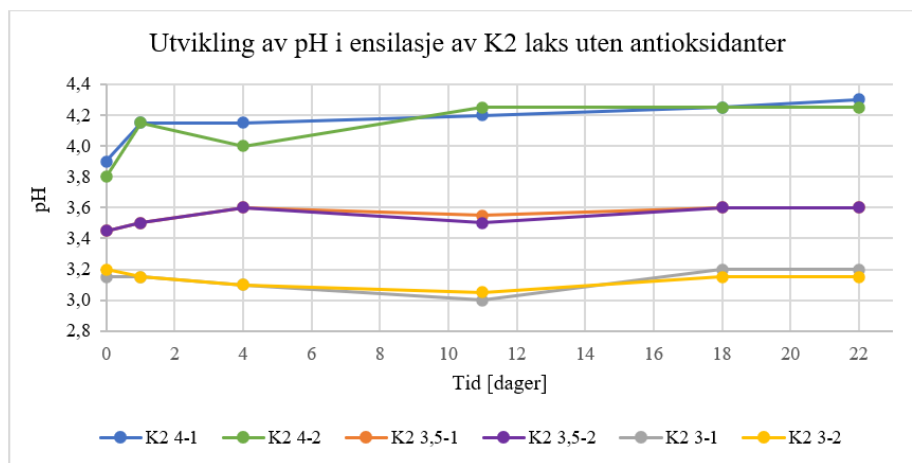
Figur 24. Fraksjonerte fettprøver som var i ensilasjen av K2 laks, henholdsvis med og uten antioksidanter, ved dag 18. De to prøvene til venstre er ved pH 3, de to i midten ved pH 3,5 og de to til høyre ved pH 4.

Tabell 3 viser hvor mye fett, emulsjon, hydrolysat og sedimenter noen av de 100 g inaktiverte ensilasjeprøvene inneholdt. Flere prøver samt veide verdier for sentrifugerør, veieskip og plastposer er vist i Tabell III i Vedlegg 2. Prøve K2 3-1 D11 A ble sentrifugert to ganger. Fra Tabell 3 vises det at masse emulsjon og hydrolysat ble mindre ved minkende pH i ensilasjen, og masse sedimenter ble større ved økende pH i ensilasjen.

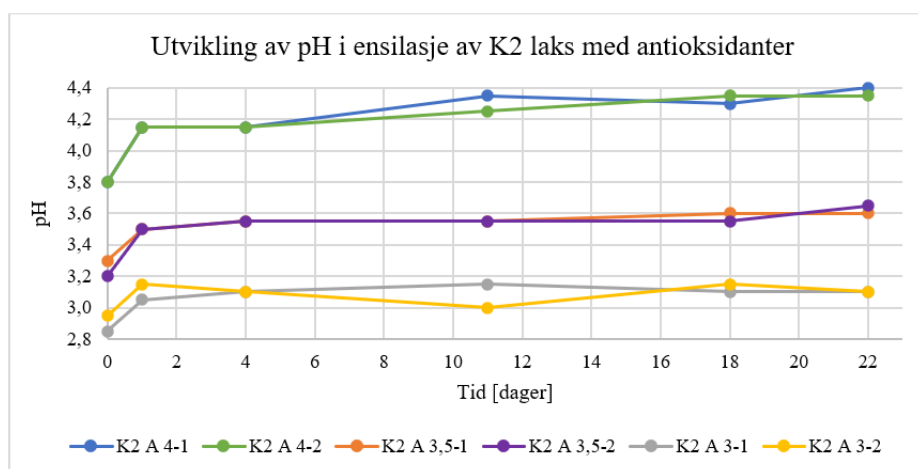
Tabell 3. Masse fett, emulsjon, hydrolysat og sedimenter fraksjonert fra 100 g inaktivert ensilasjeprøve. Tabellen viser resultater fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter.

Prøve	Fett [g]	Emulsjon [g]	Hydrolysat [g]	Sedimenter [g]
K2 D0 1	4,48	0,28	18,19	68,45
K2 4-1 D4 A	5,65	6,52	41,11	39,38
K2 3,5-1 D4 A	5,83	4,50	38,95	40,57
K2 3-1 D4 A	5,86	4,56	35,85	48,41
K2 4-1 D11 A	5,45	8,41	48,54	32,21
K2 3,5-1 D11 A	6,07	5,88	42,50	34,62
K2 3-1 D11 A	5,58	3,19	43,42	45,32
K2 4-1 D18 A	4,75	11,75	50,74	29,13
K2 3,5-1 D18 A	5,86	5,09	44,17	35,53
K2 3-1 D18 A	4,55	5,27	39,46	43,18
K2 4-1 D22 A	4,77	10,47	50,80	29,50
K2 3,5-1 D22 A	5,62	5,87	44,45	33,71
K2 3-1 D22 A	5,27	3,90	42,32	44,08

Volum syre som ble tilsatt til fiskemassen i de ulike bøttene, samt pH i ensilasjen i de ulike bøttene ved hver uttaksdag, er vist i *Tabell I* i *Vedlegg 2*. På lagringsdag 4 var pH litt høy i noen av ensilasjebatchene og mer syre ble tilsatt, som vist i *Tabell I* i *Vedlegg 2*. *Figur 25* og *26* viser hvordan pH utviklet seg gjennom de 22 dagene, for henholdsvis ensilasje uten og med antioksidanter. De to øverste linjene i begge figurene viser ensilasjebatchene ved pH 4, de to linjene i midten viser ensilasjebatchene ved pH 3,5 og de to nederste viser ensilasjebatchene ved pH 3. Begge figurene viser at pH verdien er litt høyere enn hva det optimalt skulle ha vært. Dette medfører at de resterende resultatene ble analysert i ensilasje ved pH 4,3, pH 3,6 og pH 3,2 for enzymatisk aktivitet, men alle data omtales fortsatt som pH 4, pH 3,5 og pH 3. Tallsettet for tillaging av grafene er vist i *Tabell II* i *Vedlegg 2*.



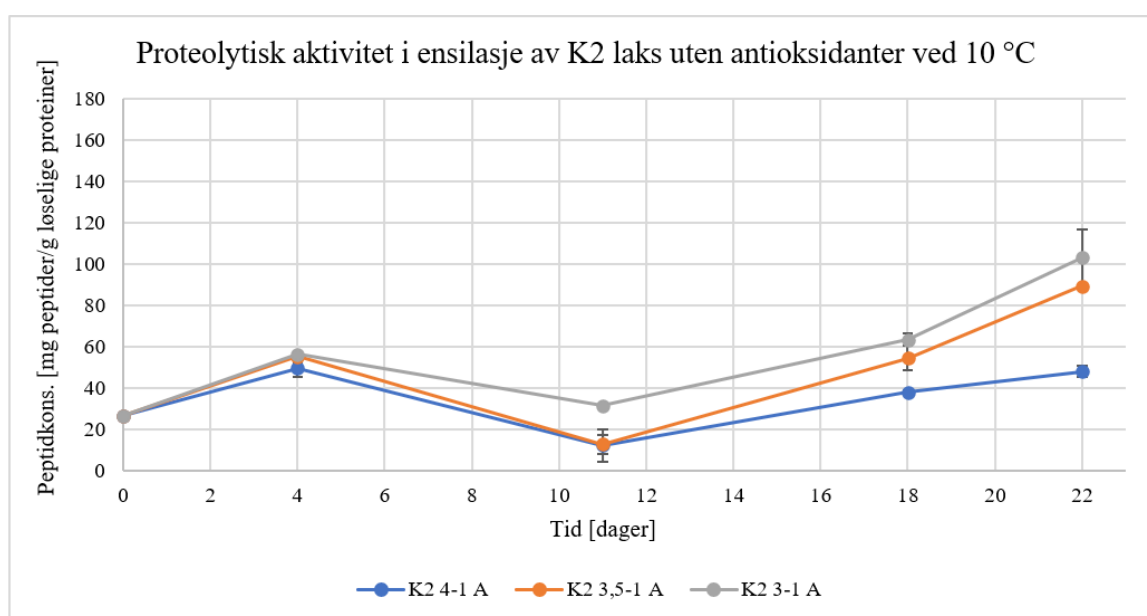
Figur 25. Utvikling av pH i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 0 til 22. De parallelle ensilasjebatchene har omtrentlig samme utvikling i pH. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.



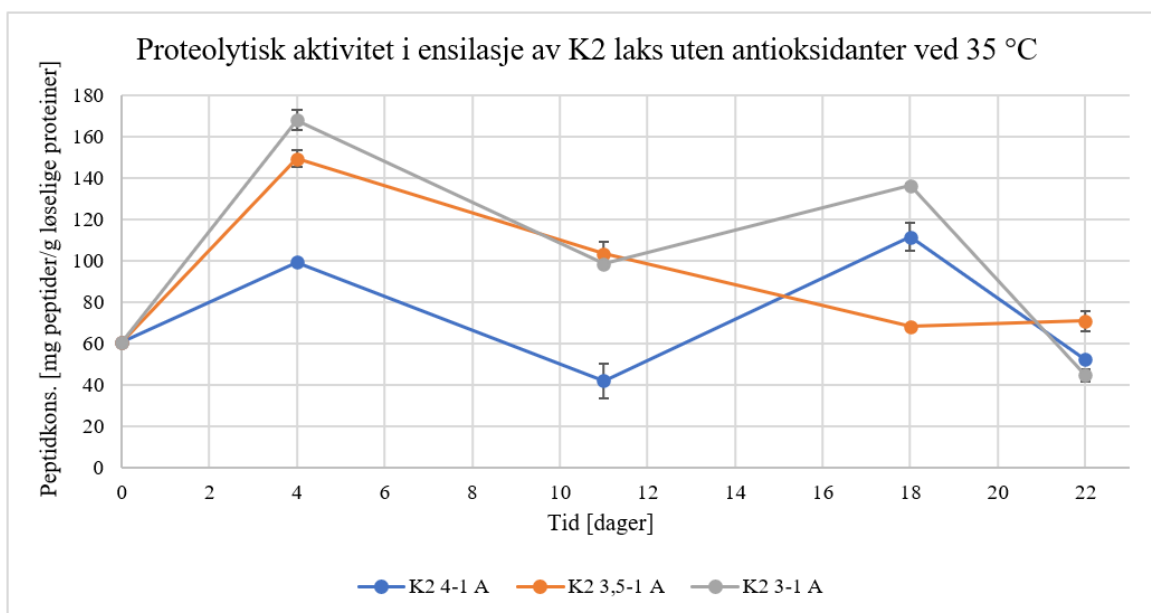
Figur 26. Utvikling av pH i ensilasje av K2 laks med antioksidanter fra lagringsdag 0 til 22. De parallelle ensilasjebatchene har omtrentlig samme utvikling i pH. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

4.2 Proteolytisk aktivitet

Proteolytisk aktivitet ble analysert over to dager, hvorav ensilasjeprøvene uten antioksidanter (parallell A fra ensilasjebatch 1) fra dag 4 og 22, samt fiskemassen fra dag 0, ble analysert først. Ensilasjeprøvene uten antioksidanter (parallell A fra ensilasjebatch 1) fra dag 11 og 18 ble analysert sist. *Figur 27* og *28* viser hvordan proteolytisk aktivitet (med standardavvik og målt i mg peptider per g løselige proteiner) i ensilasje ved ulik pH utviklet seg ved henholdsvis 10 °C og 35 °C fra dag 4 til dag 22. I tillegg vises proteolytisk aktivitet for fiskemassen ved pH 6,7 ved dag 0. Alle beregninger og rådata som ble brukt til å lage *Figur 27* og *28* vises i *Vedlegg 4*. I begge figurene representerer de blå, oransje og grå punktene verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje ved henholdsvis pH 4, 3,5 og 3. Enheten på y-aksen forteller hvor mange mg peptider av hemoglobinet som befant seg, i løsningen hvor absorbansen ble målt, per g vannløselige proteiner i ensilasjeprøven. Antall peptider og proteaser korrelerer i henhold til *Ligning 1*, dermed indikerer verdiene proteaseaktivitet i ensilasjeprøven per g løselige ensilasjeproteiner. Verdien for fiskemassen ved dag 0 indikerer proteaseaktivitet i fiskemassen per g vannløselige fiskeproteiner. Trendene viser at det er størst proteolytisk aktivitet i ensilasjen ved pH 3 og minst i ensilasjen ved pH 4. Proteolytisk trend øker ved 10 °C etter lagringsdag 11 og minker ved 35 °C etter lagringsdag 4.

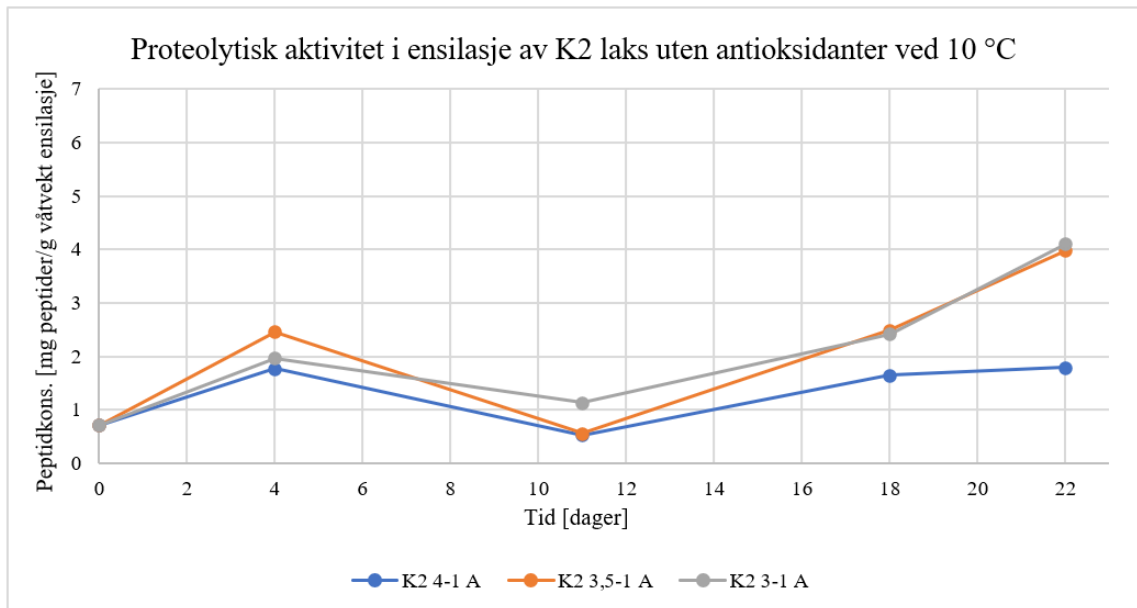


Figur 27. Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i mg peptider per g løselige proteiner. Fiskemasse uten tilsatt syre ved pH 6,7 er vist ved dag 0. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

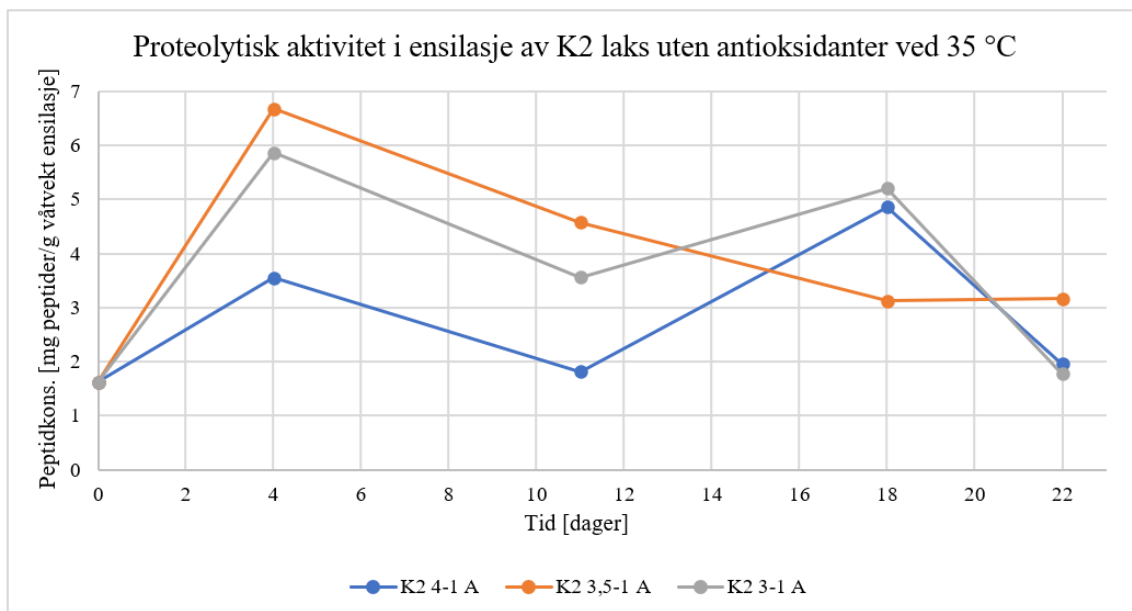


Figur 28. Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i mg peptider per g løselige proteiner. Fiskemasse uten tilsatt syre ved pH 6,7 er vist ved dag 0. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

Figur 29 og 30 viser hvordan proteolytisk aktivitet i ensilasje ved ulike pH utviklet seg, ved henholdsvis 10 °C og 35 °C fra dag 0 til dag 22, målt i mg peptider per g våtvekt ensilasje. Standardavvikverdiene er så små, så disse er ikke vist i grafene. Verdiene er beregnet ved hjelp av verdiene fra Figur 27 og 28, og opprinnelig proteinkonsentrasjon i ensilasjeprøven. Alle beregninger og rådata som ble brukt til å lage Figur 29 og 30 vises i Vedlegg 4. I begge figurene representerer de blå, oransje og grå punktene verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje ved henholdsvis pH 4, 3,5 og 3. Enheten på y-aksen forteller hvor mange mg peptider av hemoglobinet som befant seg, i løsningen hvor absorbansen ble målt, per g våtvekt av ensilasjen. Antall peptider og proteaser korrelerer i henhold til Ligning 1, dermed indikerer verdiene proteaseaktivitet i ensilasjeprøven basert på hele våtvekten av ensilasjen. Verdien for fiskemassen ved dag 0 indikerer proteaseaktivitet basert på hele våtvekten av fiskemassen. Trenden viser at det er større proteolytisk aktivitet ved lavere pH, men det er avvikende verdier for noen av ensilasjeprøvene ved pH 3,5. Helhetlig har ensilasjen ved pH 4 lavest proteolytisk aktivitet ved både 10 °C og 35 °C. Proteolytisk aktivitet får en økende trend ved 10 °C etter dag 11 og en minkende trend ved 35 °C etter dag 4.



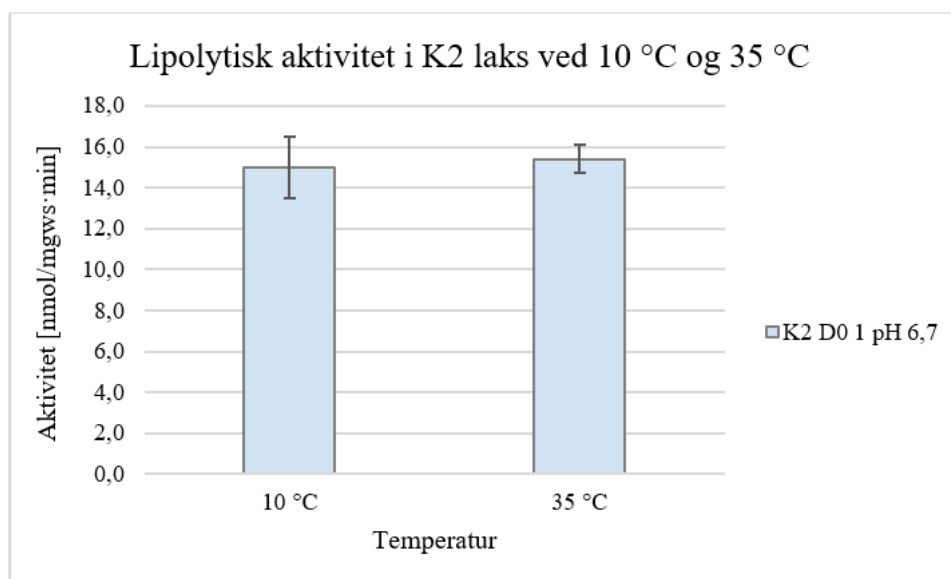
Figur 29. Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i mg peptider per g våtvekt ensilasje. Fiskemasse uten tilsatt syre med pH 6,7 er vist ved dag 0, målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.



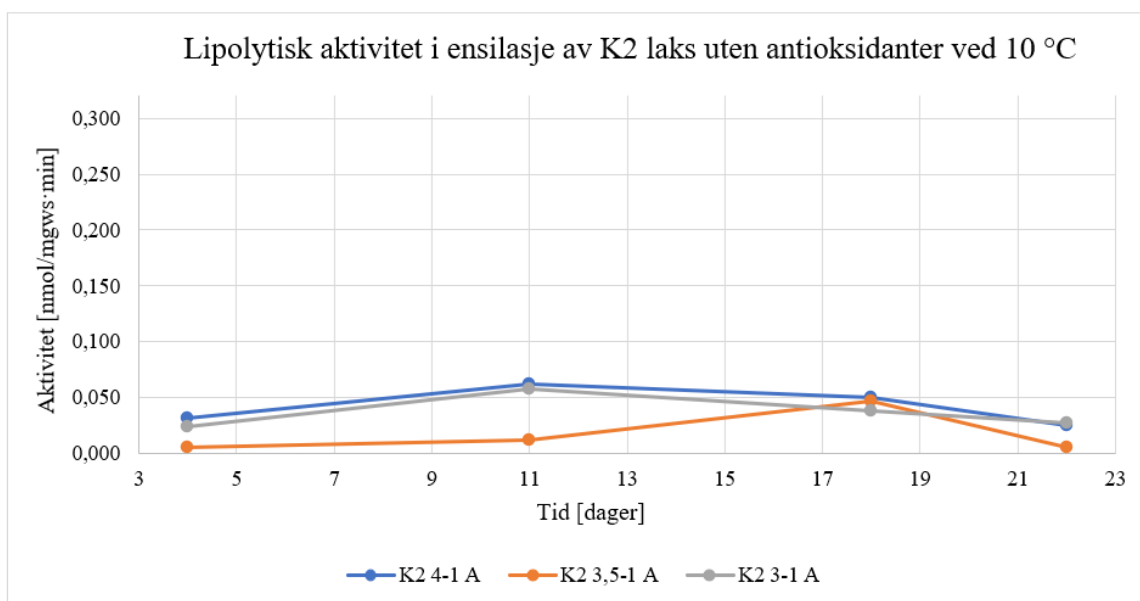
Figur 30. Proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i mg peptider per g våtvekt ensilasje. Fiskemasse uten tilsatt syre med pH 6,7 er vist ved dag 0, målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

4.3 Lipolytisk aktivitet

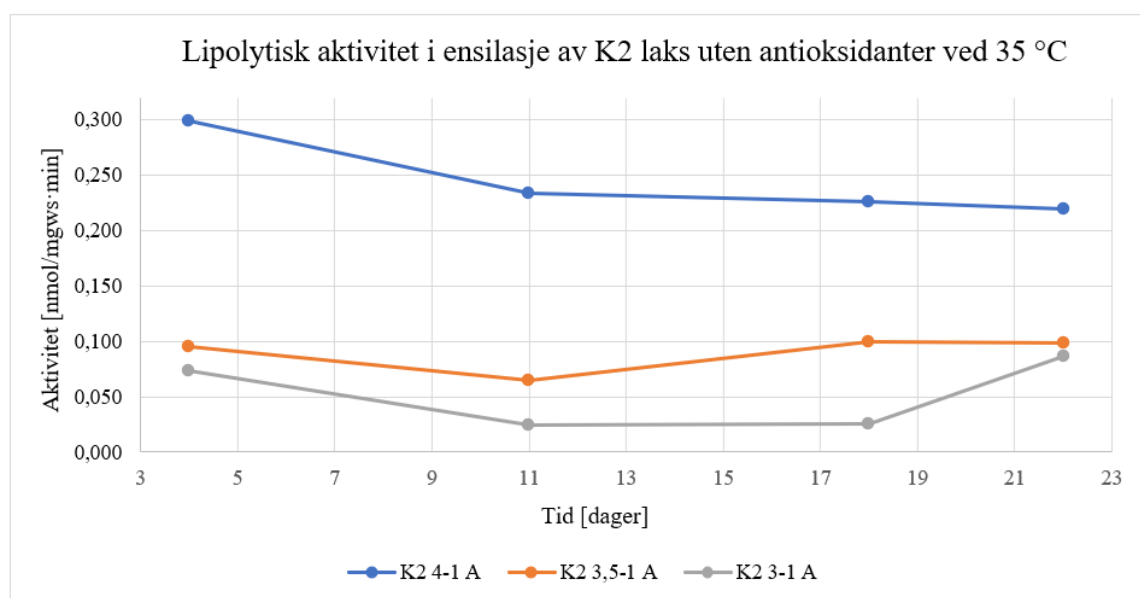
Ensilasjeprøvene uten antioksidanter (parallell A fra ensilasjebatch 1) fra hver uttaksdag, samt fiskemassen fra dag 0, ble analysert for lipolytisk aktivitet på en og samme dag. *Figur 31* viser lipolytisk aktivitet (med standardavvik), målt i nmol per mgws·min (mgws er mg vannløselige proteiner), for fiskemassen ved pH 6,7 fra dag 0. Fra figuren vises det at lipolytisk aktivitet var litt høyere ved 35 °C i forhold til 10 °C. *Figur 32* og *33* viser hvordan lipolytisk aktivitet, målt i nmol per mgws·min, for ensilasje ved ulike pH utviklet seg ved henholdsvis 10 °C og 35 °C fra dag 4 til dag 22. Alle beregninger og rådata som ble brukt til å lage *Figur 31*, *32* og *33* vises i *Vedlegg 5*, deriblant vises det at standardavvikverdien til punktene i *Figur 32* og *33* ble 0. I *Figur 32* og *33* representerer de blå, oransje og grå punktene verdier for lipolytisk aktivitet i ensilasje ved henholdsvis pH 4, 3,5 og 3. Enheten på y-aksen i *Figur 31*, *32* og *33* forteller hvor mange nmol 4-MU som befant seg, i løsningen som ble målt med fluorimeteret, per mg løselige proteiner i ensilasjen. Antall 4-MU molekyler og lipaser korrelerer i henhold til *Ligning 3*, dermed indikerer verdiene lipaseaktivitet i ensilasjeprøven per mg løselige ensilasjeproteiner. Trendene i *Figur 32* og *33* viser at ensilasjen ved pH 4 har størst lipolytisk aktivitet, samt at lipolytisk aktivitet er lav ved 10 °C i forhold til 35 °C. Ensilasjen ved pH 3,5 er litt avvikende for noen av trendene i *Figur 32* i forhold til verdiene i *Figur 33*.



Figur 31. Lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 ved 10 °C og 35 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner).

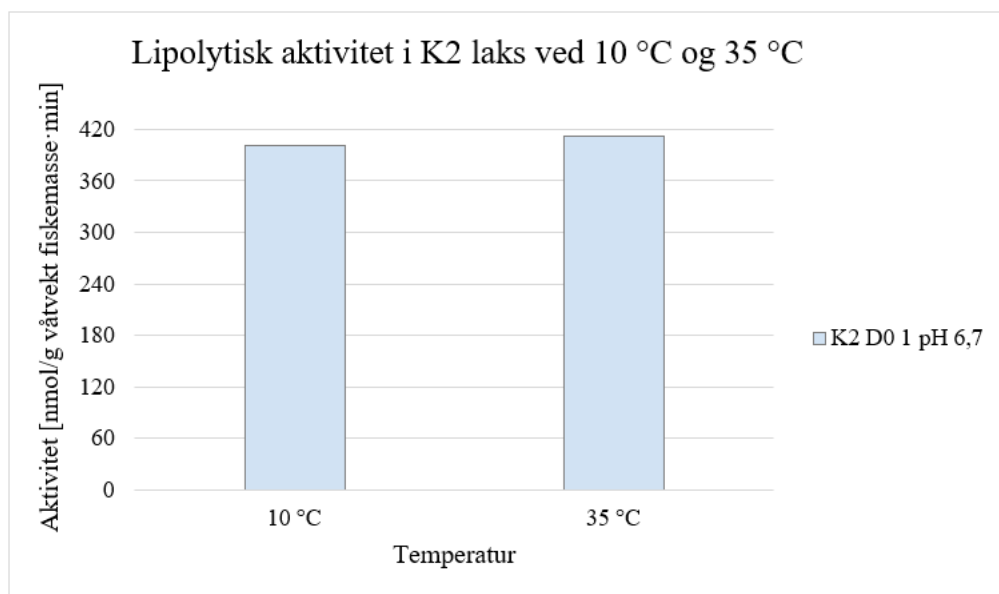


Figur 32. Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner). Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

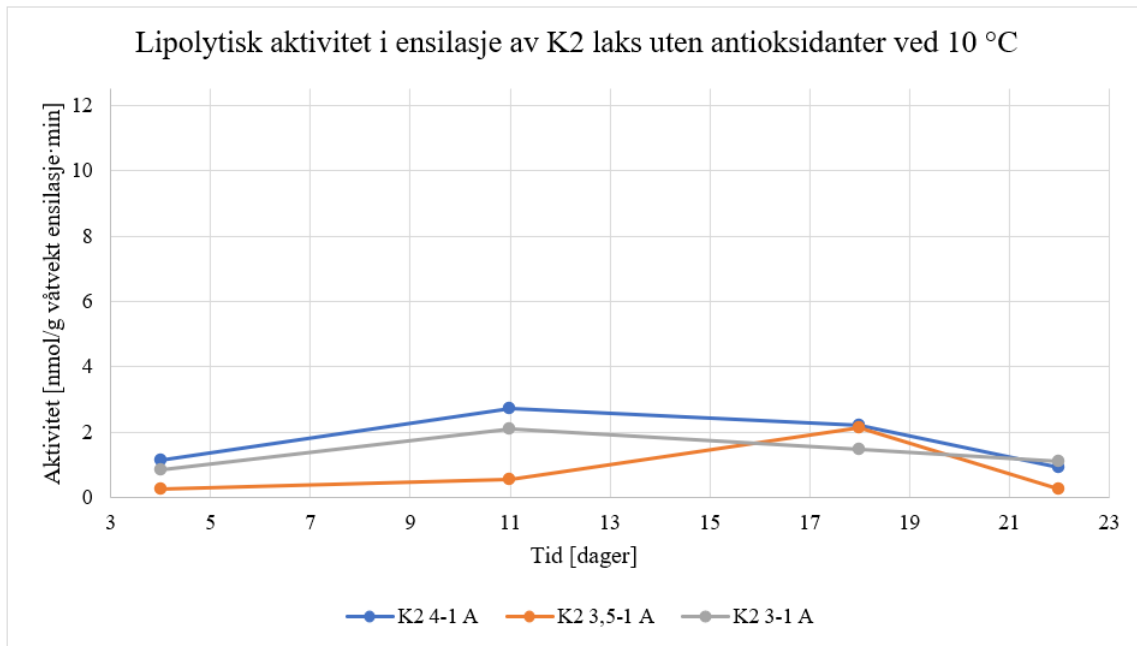


Figur 33. Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i nmol per mgws·min (mgws står for mg vannløselige proteiner). Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

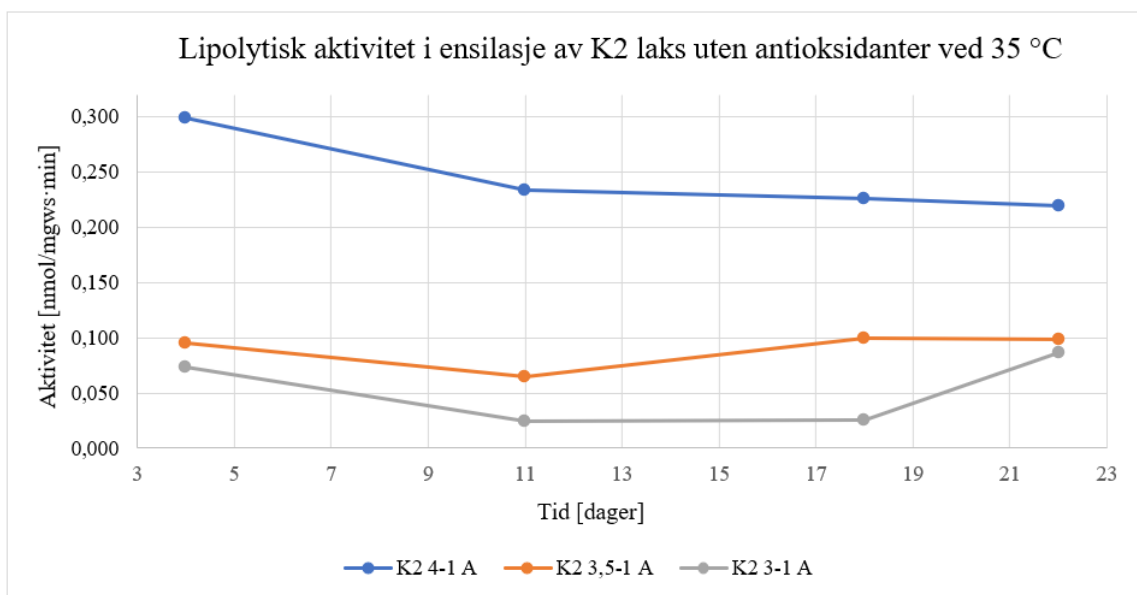
Figur 34 viser lipolytisk aktivitet, målt i nmol per g våtvekt fiskemasse·min, for fiskemassen ved pH 6,7 fra dag 0. Standardavvikverdiene er så små, så disse er ikke vist i figuren. Verdiene er beregnet ved hjelp av verdiene fra Figur 31, og opprinnelig proteinkonsentrasjon i fiskemasseprøven. Alle beregninger og rådata vises i Vedlegg 5. Fra figuren vises det at lipolytisk aktivitet var litt høyere ved 35 °C i forhold til 10 °C. Figur 35 og 36 viser hvordan lipolytisk aktivitet, målt i nmol per g våtvekt ensilasje·min, for ensilasje ved ulike pH utviklet seg ved henholdsvis 10 °C og 35 °C fra dag 4 til dag 22. Verdiene er beregnet ved hjelp av verdiene fra Figur 32 og 33, og opprinnelig proteinkonsentrasjon i ensilasjeprøven. Alle beregninger og rådata vises i Vedlegg 5. I Figur 35 og 36 representerer de blå, oransje og grå punktene verdier for lipolytisk aktivitet i ensilasje ved henholdsvis pH 4, 3,5 og 3. Enheten på y-aksen i Figur 34, 35 og 36 forteller hvor mange nmol 4-MU som befant seg, i løsningen som ble målt med fluorimeteret, per g våtvekt ensilasje. Antall 4-MU molekyler og lipaser korrelerer i henhold til Ligning 3, dermed indikerer verdiene lipaseaktivitet i ensilasjeprøven basert på hele våtvekten av ensilasjen. Trendene i Figur 35 og 36, er nokså like som trendene i Figur 32 og 33, og viser at ensilasjen ved pH 4 har høyest lipolytisk aktivitet, samt at lipolytisk aktivitet er lav ved 10 °C i forhold til 35 °C.



Figur 34. Lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 ved 10 °C og 35 °C. Målt i nmol per g våtvekt fiskemasse·min.



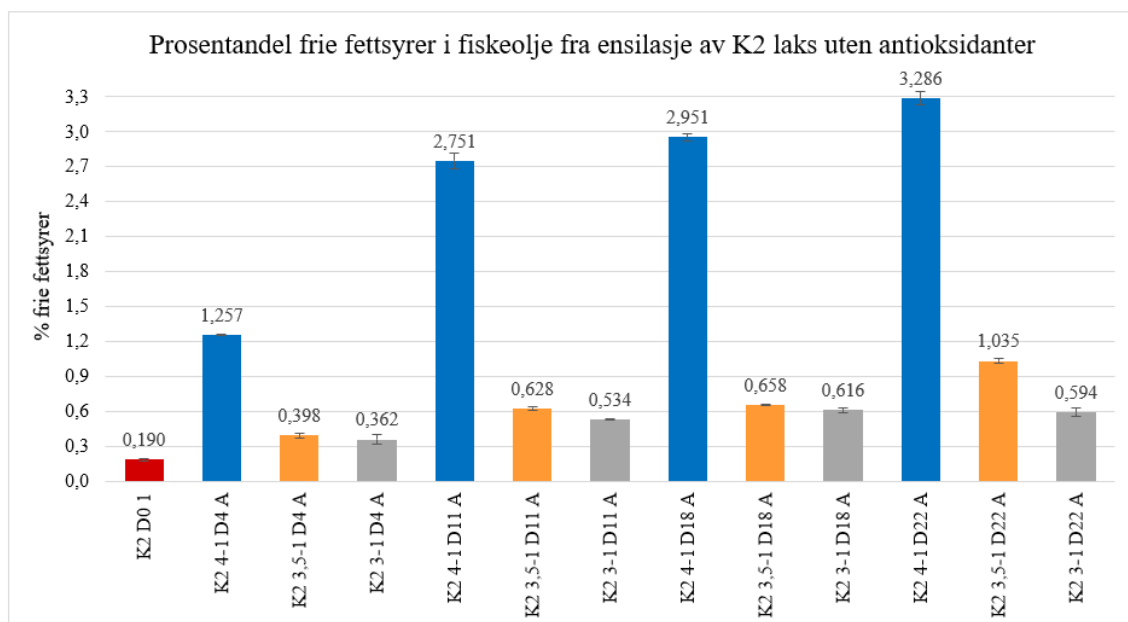
Figur 35. Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C. Målt i nmol per g våtvekt ensilasje·min. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.



Figur 36. Lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C. Målt i nmol per g våtvekt ensilasje·min. Blå linje viser ensilasjen ved pH 4, oransje linje viser ensilasjen ved pH 3,5 og grå linje viser ensilasjen ved pH 3. Linjene angir kun om den påfølgende målte verdien er høyere eller lavere enn den foregående, og gjenspeiler ikke reelle tallverdier.

4.4 Frie fettsyrer (FFA)

Frie fettsyrer ble analysert for A-parallellen av alle fettprøvene fra ensilasjebatchene uten antioksidanter. *Figur 37* viser % FFA for ensilasjebatch 1 uten antioksidanter, og de resterende prøvene er presentert i *Figur XXVII* i *Vedlegg 6*. De blå, oransje og grå søylediagrammene representerer % FFA i fiskeolje fra ensilasjen ved henholdsvis pH 4, 3,5 og 3 fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Den røde søylen representerer % FFA i fiskeolje fra fiskemassen ved pH 6,7 fra dag 0. Tallene over søylene viser beregnet verdi av % FFA. Alle beregninger og rådata for FFA er vist i *Vedlegg 6*. Figuren viser at ensilasjen ved pH 4 hadde fiskeolje som inneholdt størst % frie fettsyrer i forhold til ensilasjen ved pH 3,5 og pH 3. Ensilasjen ved pH 3 hadde fiskeolje med minst % frie fettsyrer. De fleste verdiene økte fra uttaksdag til utakksdag.



Figur 37. Prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4 (blå søyle), 3,5 (oransje søyle) og 3 (grå søyle) fra henholdsvis lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Prosentandel FFA i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 fra dag 0 er vist i rød søyle.

5. Diskusjon

En K2 laks ble ensilert med maursyre (uten og med antioksidanter) ved ulike pH og lagret over en periode på 22 dager. Tidsmessig var det kun mulig å måle parametere i ensilasjen uten antioksidanter. Proteolytisk og lipolytisk aktivitet ble målt i ensilasjebatchene ved lagringsdag 4, 11, 18 og 22, samt i fiskemassen ved dag 0. I tillegg ble FFA målt i fiskeoljen fra de samme lagringsdagene. I grafene som viser utvikling av pH, proteolytisk aktivitet og lipolytisk aktivitet (*Figur 25 – 30, 32 - 33, 35 – 36*), er det dratt linjer mellom de målte verdiene fra de ulike uttaksdagene. Linjene gjenspeiler ikke reelle verdier, men er tatt med for å se utviklingen gjennom lagringsperioden.

5.1 Ensilasjeutvikling

Det ble undersøkt hvordan ensilasje uten og med antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3 endret seg over en lagringsperiode på 22 dager. Ensilasjeprøver fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22, samt fiskemasse fra dag 0, ble inaktivert med varme for å stoppe enzymaktiviteten i ensilasjen, og sentrifugert for å separere de ulike lagene (*Figur 20 – 22*). Lagene, fiskeolje (fett), emulsjon, hydrolysat og sedimenter, ble fraksjonert og veid for å se utviklingen gjennom lagringstiden i ensilasjen. I tillegg ble pH målt i ensilasjebatchene på hver uttaksdag for å se pH - utviklingen.

Det ble observert en mer nedbrutt og homogen ensilasje på hver uttaksdag. Dette var forventet da det skjer en autolyse hvor enzymer i fisken bryter ned fisken etter døden. Samtidig bidro tilsetning av syre til fiskemassen, optimale forhold for enzymene [10]. Det var forskjell for ensilasjen ved ulik pH, hvor ensilasjen ved pH 3 var mest homogen. Dette skyldes at ensilasjen ved pH 3 hadde tilsatts av mer syre enn ensilasjen ved pH 3,5 og 4 (*Tabell I i Vedlegg 2*).

Resultatene viser at ensilasjen tilsatt maursyre uten antioksidanter var ikke like homogen som ensilasjen tilsatt blandingen av maursyre og antioksidanter (*Figur 19*). Dette kan skyldes at maursyren med antioksidantene inneholder en blanding av kjemikalier, noe som kan føre til raskere nedbrytning av fisken. Hvor homogen ensilasjen blir påvirkes av røring. Hver ensilasjebatch ble blandet med en skje hver uttaksdag, og hadde ingen røring mellom uttaksdagene. Dersom det hadde vært konstant røring i ensilasjen, ville syren blitt jevnt fordelt i ensilasjen fra start. Dette kunne ført til en jevnere nedbrytning av fiskemassen, og en mer homogen ensilasje.

Hvilket restråstoff som blir benyttet påvirker også hvor homogen ensilasjen blir. Innvollene i fisken inneholder flest enzymer, og disse fører til raskere nedbrytning av innvollene og fiskekjøttet, mens bein og skinn tar lengre tid å bryte ned av enzymene [10]. Siden det ble brukt en hel laks (K2), var det en blanding av innvoller, bein og skinn i den kvernedede fiskemassen. Den kvernedede fiskemassen ble blandet for hånd, og det er vanskelig å si om innholdet ble jevnt fordelt i ensilasjebatchene. Ulik fordeling av innvollene, bein og skinn kan ha ført til ujevn nedbrytning av fiskemassen i de ulike ensilasjebatchene. Bruk av mekanisk rører kunne ført til en mer jevn fordeling av innholdet i fisken.

Resultatene viser at masse fett i prøvene var nokså like uavhengig av pH og lagringsdag, og var rundt 4,5 – 6 gram (*Tabell 3*). Dette kan skyldes at fettmolekylene ikke brytes ned og forsvinner, men spaltes videre til FFA [63]. Masse emulsjon er større i ensilasjen ved pH 4 enn ved pH 3. Årsaken er at emulsjonsfasen inneholder en blanding av fettmolekyler og vann, slik at fettlaget blir mindre. Dermed gir ensilasje ved pH 3 større masse fett enn ensilasje ved pH 4, noe som er ønskelig for videre prosessering av fiskeoljen.

Masse hydrolysat ble mindre ved synkende pH, mens masse sedimenter økte ved synkende pH (*Tabell 3*). I tillegg ble det observert en økning i masse hydrolysat og minking i masse sedimenter, fra uttaksdag til uttaksdag. Det observeres en korrelasjon mellom masse hydrolysat og sedimenter, da sedimentene inneholder deler av fisken som ikke er nedbrutt enda. Dette fører til jo lengre hydrolyseprosessen virker, jo mer sedimenter omdannes til hydrolysat. Scanbio erfarer at dette forekommer helt til hydrolyseprosessen er mettet. Masse hydrolysat økte fra lagringsdag 4 til 18. Fra lagringsdag 18 til 22 var massen nokså lik, noe som kan tyde på en mettet hydrolyse.

Fargeendring i hydrolysatet ble observert fra uttaksdag til uttaksdag, samt forskjell i farge ved ulik pH. Hydrolysatet ved pH 4 hadde mørkest farge og var oransje, mens hydrolysatet ved pH 3 hadde lysest farge og var lys gul (*Figur 23*). Fargen ble mørkere for hver lagringsdag (*Figur 20 – 22*). Dette skyldes trolig ulik forandring i den tredimensjonale proteinstrukturen ved ulik pH, slik at de absorberer og reflekter lys ved ulik bølgelengde [33,34,75]. Fargeendring i fettene ble også observert, hvor høyere pH i ensilasjen ga mørkere farge på fettene (*Figur 24*). Antioksidanter påvirket også fargen på fettene ved at fargen ble mørkere. Scanbio observerer at jo mer harsk oljen er, jo lysere blir den. Dette stemmer overens med hvorfor fettene med antioksidanter er mørkere, da antioksidantene har hindret oksidasjon [59].

Fra lagringsdag 0 til 1 observeres en økning i pH for ensilasje uten og med antioksidanter (*Figur 25 og 26*). Dette var forventet da K2 laks inneholder mye bein, og ettersom syren trenger inn i beinene, vil syren nøytraliseres av kalsiumforbindelser [10]. For å korrigere stigningen i pH, ble mer maursyre tilsatt på lagringsdag 1. Fra lagringsdag 1 til 22 observeres en relativt stabil pH-utvikling i ensilasje uten og med antioksidanter. Ensilasje ved pH 3,5 var mest stabil for både ensilasje uten og med antioksidanter. For ensilasje uten og med antioksidanter observeres en langsom stigning ved pH 4 under lagringstiden. Årsaken til stigningen var for lite tilsatt av syre ved ensileringsstart, og dermed har syren gradvis blitt nøytralisert av fiskemassen. En annen faktor kan omhandle ujevn syrefordeling i fiskemassen. Resultatene viser at ensilasjen ved pH 4 uten antioksidanter endte ved pH 4,2-4,3 på lagringsdag 22, og ensilasjen ved pH 4 med antioksidanter endte ved pH 4,3-4,4 på lagringsdag 22 (*Tabell 1 i Vedlegg 2*). pH-verdiene er høyere enn ønsket, da pH i ensilasje bør være under 4, men ligger fortsatt innenfor grensen for bakterievekst som ligger på pH 4,5 [10]. pH er en ustabil parameter som er vanskelig å måle i ensilasje, derfor er det ikke sikkert at de målte pH-verdiene er reelle.

5.2 Proteolytisk aktivitet

Måling av proteolytisk aktivitet i fisk er et forskningsområde i stadig vekst. Forskningsarbeid knyttet til aktiviteten av ulike proteaser som finnes i fisk har blitt utført, blant annet i fordøyelseskanalen [48,76]. Derimot er det ingen tilsvarende studier for måling av proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks. Dermed er det vanskelig å kvantifisere om verdien målt for proteolytisk aktivitet i ensilasjen er høy eller lav. Fra dette eksperimentet blir det en mer kvalitativ analyse enn kvantitativ analyse, hvor trendene for ulik pH og temperatur sammenlignes.

Proteolytisk aktivitet ble målt i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved en lagringstid på 4, 11, 18 og 22 dager. Resultatene viser at pH påvirket proteolytisk aktivitet, hvor ensilasjen ved pH 3 hadde større aktivitet sammenlignet med ensilasjen ved pH 4 (*Figur 27 og 28*). Proteasen pepsin trives i magesekken og har optimums pH 3,05, noe som tilsier at proteolytisk aktivitet øker i ensilasje ved lavere pH [44,55]. Høy proteolytisk aktivitet i ensilasje er ønskelig da proteaser akselererer nedbrytningen av fiskemassen. Alle pH-dataene omtales som ensilasje ved pH 4, 3,5 og 3, men de reelle pH-verdiene til ensilasjen var ved pH 4,3, 3,6 og 3,2. For å analysere proteolytisk aktivitet i ensilasjen ved faktisk pH 3, skulle mer syre blitt tilsatt i ensilasjen på lagringsdag 1 og 4.

Temperatur påvirker også proteolytisk aktivitet i ensilasje, og resultatene viser at aktiviteten blir lavere i ensilasje ved 10 °C sammenlignet med ensilasje ved 35 °C (*Figur 27 og 28*). Dette stemmer overens med optimums temperaturen til pepsin, en av de viktigste proteasene i hydrolyseprosessen, som ligger mellom 35 - 40 °C. I tillegg har Katepsin D, en muskelprotease, optimums temperatur mellom 37 - 55 °C, og spiller også en viktig rolle i spalting av proteiner [48]. Ved lave temperaturer opprettholdes aktiviteten, men det tar lengre tid for enzymene å bryte ned proteiner til peptider. Dette forklarer hvorfor økning i proteolytisk aktivitet observeres i ensilasje ved 10 °C fra lagringsdag 11 til 22 (*Figur 27*). Fra lagringsdag 18 til 22 i ensilasje ved 10 °C observeres en brattere økning i proteolytisk aktivitet, sammenlignet med lagringsdag 11 til 18. Dette kan indikere at lengre lagringstid (> 22 dager) ved 10 °C, fører til brattere økning i proteolytisk aktivitet. Lengre lagringstid på noen få dager kan potensielt gi samme verdier av proteolytisk aktivitet som ensilasje ved 35 °C hadde ved lagringsdag 4.

I ensilasje ved 35 °C ble det observert at proteolytisk aktivitet synker etter lagringsdag 4 (*Figur 28*). Årsaken kan være at høyere temperaturer mot optimums temperaturen til pepsin fører til økt hydrolyseprosess, hvor proteasene spalter proteiner raskere til peptider. Deretter kan peptidasene begynne å nedbryte peptidene til aminosyrer raskt, så lenge de befinner seg under sine optimale miljøbetingelser. Trypsin er en peptidase med optimums temperatur mellom 35 - 63 °C [48]. Dette tilsier at i ensilasje ved 35 °C, når proteinene er spaltet til peptider, vil trypsin umiddelbart starte nedbrytningen av peptider til aminosyrer. Det antas at utviklingen av proteolytisk aktivitet i ensilasje ved 35 °C vil synke mer dersom lagringstiden blir lengre.

Det observeres ved lagringsdag 22 at ensilasjen ved pH 4 har høyere proteolytisk aktivitet enn ensilasjen ved pH 3 ved 35 °C, selv om trendene viser at aktiviteten øker ved synkende pH (*Figur 28*). Dette kan skyldes at det er flere proteiner å bryte ned i ensilasjen ved pH 4, slik at andelen peptider blir større. Det ble observert at ensilasjen ved pH 3 var mer tyntflytende ved lagringsdag 22 enn ensilasjen ved pH 4. Dette tilsier at mer proteiner har blitt brutt ned i ensilasjen ved pH 3 enn i ensilasjen ved pH 4. Samtidig er verdiene nokså like og dette kan skyldes nedbrytning av peptider til aminosyrer ved hjelp av trypsin.

I resultatene hvor proteolytisk aktivitet er vist per g våtvekt ensilasje, har ensilasjen ved pH 3,5 høyest aktivitet for lagringsdag 4 ved både 10 °C og 35 °C (*Figur 29 og 30*), sammenlignet med resultatene målt i per g løselige proteiner (*Figur 27 og 28*). Det er en avvikende trend i ensilasjen ved pH 3,5 ved 35 °C, hvor aktiviteten synker fra lagringsdag 4 til 18 (*Figur 28 og 30*). Det kan skyldes startkonsentrasjonen for ekstraktene, fortynnet 1:500 og 1:200, som ble

prøveopparbeidet i delkapittel 3.3.3. Startkonsentrasjonen av proteiner i ensilasjen ved pH 3,5 var høyere enn for ensilasjen ved pH 4 og 3 (*Figur V og VI i Vedlegg 4*). Samtidig var volum ekstrakt av ensilasjeprøvene fra de ulike utakksprøvene varierende. Hvis volumene hadde vært helt like, ville det kvantitative analysearbeidet vært mer pålitelige. I tillegg ble kun hydrolysatfasen brukt til ekstraktet, men sedimentfasen inneholder også vann. Dersom denne vannfasen hadde blitt inkludert i hydrolysatfasen, kunne proteinkonsentrasjonen vært høyere, og ført til høyere verdier for proteolytisk aktivitet. Resultatene omhandler bare vannløselige proteiner, men det bør bemerkes at det også finnes proteiner i fisk som ikke er vannløselige.

Proteolytisk aktivitet ble også målt i fiskemasse av K2 laks før tilsats av syre. Resultatene er fremstilt i grafene ved dag 0, og viser at proteolytisk aktivitet i fiskemasse er relativt lav i forhold til i ensilasje (*Figur 27, 28, 29 og 30*). Årsaken er at fiskemassen hadde en pH på 6,7, noe som ikke er i det optimale pH-forholdet for proteasene. *Figur 6* viser at aktiviteten til pepsin er lav ved pH rundt 5 [55]. Dette antyder at aktiviteten blir lavere ved pH 6,7, noe som stemmer overens med resultatene av proteolytisk aktivitet i fiskemassen. I tillegg observeres det at fiskemassen får en høyere proteolytisk aktivitet ved 35 °C i forhold til ved 10 °C.

5.3 Lipolytisk aktivitet og frie fettsyrer (FFA)

Å sammenligne lipolytisk aktivitet med andre studier, for å finne et mål på om verdiene for aktiviteten er høye eller lave, er ikke enkelt. Grunnen er at lipaser i fisk er et nytt forskningsområde, slik at det finnes lite litteratur og rapporter om dette. I rapportene som ligger ute er det store forskjeller med tanke på hvilket råstoff, metode, substrat, pH og temperatur som blir benyttet [77]. I tillegg varierer inkubasjonstiden og hvordan resultatene blir fremstilt med tanke på enheter som blir benyttet. De fleste studiene bruker en høy pH (7-9) da lipasene har høyest aktivitet i dette området, men det er lite studier å finne på lipaseaktivitet i fiskeensilasje ved lav pH. Det ble ikke funnet noen studier som ligner på forsøket gjort i denne rapporten, slik at det har ikke vært mulig å sammenligne grafer og verdier med andre studier. Det har derfor blitt lagt fokus på sammenligning av trender for de ulike temperaturene og pH-verdiene som ble benyttet i dette forsøket.

Lipolytisk aktivitet ble analysert for ensilasje uten antioksidanter, ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Aktiviteten ble analysert ved både 10 °C og 35 °C. Siden lipaser er mest aktive ved alkaliske forhold, er det forventet å se liten til ingen aktivitet i ensilasje ved lav pH [48,55]. Det ble derimot observert aktivitet, hvor ensilasjen ved pH 4 har høyest aktivitet

ved 35 °C, og aktiviteten synker med minkende pH (*Figur 33*). Lipaseaktiviteten er sensitiv for endring i pH fra optimums pH 7,95, og det observeres at aktiviteten synker drastisk ved en minking i pH fram til pH 6,2 (*Figur 6*) [55]. Ved pH under 6,2 begynner kurven å flate seg ut, noe som viser at lipaser har noe aktivitet, selv ved lave pH. I ensilasje ved 10 °C observeres det lite forskjell i lipaseaktiviteten ved pH 4, 3,5 og 3. Det antas at ved lave temperaturer er det så lite lipaseaktivitet at pH ikke utgjør en stor forskjell. I ensilasje er det ønskelig med lav lipolytisk aktivitet, da høy lipolytisk aktivitet fører til flere frie fettsyrer (*Ligning 2*). Flere frie fettsyrer kan akselerere oksidasjonsprosessen slik at fett oksiderer raskere, noe som fører til dårligere oljekvalitet [59].

Resultatene viser at lipaseaktiviteten målt i fiskemassen var høyere, ved både 10 °C og 35 °C, sammenlignet med aktiviteten målt i ensilasje ved lagringsdag 4, 11, 18 og 22 (*Figur 31 – 33*). Dette skyldes at i fiskemassen var det ikke tilsatt syre og pH ble målt til 6,7. Denne pH-verdien er nærmere optimums pH for lipaser enn ved pH 4, 3,5 og 3 som ble brukt i ensilasjen, og er grunnen til at det ble målt høyere aktivitet. Dette vises også i *Figur 6* hvor det kommer tydelig frem at det er stor forskjell i lipaseaktiviteten ved pH 6,7 og pH under 5,8.

Lipolytisk aktivitet i ensilasje ble målt ved 10 °C og 35 °C, og det observeres at temperatur har en stor påvirkning på aktiviteten av lipaser. Ved 35 °C er aktiviteten mye høyere for ensilasje ved pH 4 og 3,5 enn ved 10 °C (*Figur 32 og 33*). Dette stemmer overens med teorien som sier at lipaser er mest aktive rundt 25-37 °C [48,55]. Ensilasjen ved pH 3 avviker med teorien hvor aktiviteten er relativt lik for både 10 °C og 35 °C. Dette kan skyldes at i ensilasje ved pH 3 er aktiviteten av lipaser så liten at temperatur ikke har noen påvirkning lenger. Ved både 10 °C og 35 °C observeres det en relativt jevn aktivitet for ensilasjeprøvene over lagringstiden på 22 dager. Grunnen til dette kan være at lipaser er stabile ved både lave og høye temperaturer.

Det er flere usikkerhetsfaktorer som kan ha påvirket resultatene for lipolytisk aktivitet. En risteinkubator skulle brukes for å inkubere løsningen med blankprøve/enzymprøve og liposomal dispersjon. Dette utstyret var ikke tilgjengelig, og derfor ble det brukt vannbad med ikke-kontinuerlig manuell risting. Dermed kan det hende at løsningene ikke ble tilstrekkelig blandet, noe som kan ha påvirket resultatene. Fluorimeteret som ble benyttet kan ha vært innstilt med andre parametere enn fluorimeteret som metoden er laget etter. Dette ble oppdaget en stund etter at lipolytisk aktivitet var ferdig analysert, og det var ikke tid til å gjenta analysen. Det er ikke sjekket opp i om parameterne som er stilt inn for de to fluorimeterene er like og eventuelt hva som er forskjellene. Derfor er det vanskelig å si noe om hvordan dette har

påvirket resultatene og i hvor stor grad. Det ble først laget en standardkurve 4-MU hvor det viste seg at volum i metoden var feil, og en ny standardkurve ble laget etter analysering av prøvene. Denne standardkurven har høyere fluorescensverdier enn fluorescensverdiene for prøvene. Dermed er de beregnede verdiene fra standardkurven negative og standardavviket 0 (Vedlegg 5). For å få fluorescensverdiene innenfor standardkurven, skulle prøvene vært fortynnet mindre.

Resultatene for FFA viser at det befinner seg flere frie fettsyrer i fiskeoljen fra ensilasjen ved høyere pH enn ved lavere pH (Figur 37). Siden lipase er enzymet som spalter triglyserider til glyserol og frie fettsyrer er det forventet å se en høyere andel frie fettsyrer i fiskeolje ved pH 4. Dette er fordi som allerede nevnt har lipase en optimums pH rundt 7,95, noe som fører til at lipase jobber mer effektivt ved pH 4 enn ved pH 3,5 og 3 [55]. FFA innholdet forteller noe om aktiviteten til lipasene ved at større mengde frie fettsyrer indikerer større lipolytisk aktivitet (Ligning 2). Dette stemmer med resultatene som viser at prosentandelen FFA er høyest i fiskeolje ved pH 4 (Figur 37), og lipolytisk aktivitet er høyest i ensilasjen ved pH 4 (Figur 32 og 33). Selve verdiene kan ikke sammenlignes da frie fettsyrer også oppstår ved spaltning av fosfolipider ved hjelp av fosfolipase, mens metoden som ble benyttet bare målte lipase-aktiviteten.

5.4 Anbefaling til videre arbeid

Gjennom bacheloroppgaven har det blitt observert at pH og temperatur har stor påvirkning på den enzymatiske aktiviteten, som forekommer under hydrolyseprosessen i ensilasje av K2 laks. Ved lagringsdag 11 til 22 øker proteolytisk aktivitet i ensilasje ved 10 °C, noe som kan tyde på at aktiviteten vil fortsette å øke med lagringstiden (Figur 27 og 29). Dette kan antyde at det ikke kreves så mange ekstra lagringsdager for ensilasje ved 10 °C, før den oppnår samme verdier av proteaseaktivitet som ensilasjen ved 35 °C ved lagringsdag 4 hadde (Figur 28 og 30). I tillegg viser resultatene at lipolytisk aktivitet blir betraktelig lavere ved 10 °C i forhold til 35 °C (Figur 32, 33, 35 og 36). Dermed anbefales det som videre forskning i EnsilPro-prosjektet å lagre ensilasje av K2 laks over en lengre lagringsperiode enn 22 dager. Det er for å undersøke om en utvidet lagringstid ved 10 °C vil resultere i økt proteolytisk aktivitet, og fortsatt ha tilsvarende lav lipolytisk aktivitet. Dersom dette viser seg å være korrekt, kan en lengre lagringstid ved 10 °C muligens erstatte hydrolyseprosessen ved 35 °C. Dette vil i større grad bidra til å optimalisere energiforbruket.

Imidlertid befinner det seg også flere uttaksprøver fra ensilasjen som ble laget gjennom denne bacheloroppgaven, og Sintef Ocean har disse i besittelse. Ensilasjeprøvene uten antioksidanter, som ikke har blitt analysert, kan analyseres videre for proteolytisk og lipolytisk aktivitet. I tillegg befinner det seg ensilasjeprøver fra ensilasjen med antioksidanter, som også kan analyseres for proteolytisk og lipolytisk aktivitet. Dette for å se om antioksidanter har en påvirkning på enzymaktiviteten. Parallell B av alle fettprøvene (med og uten antioksidanter) er overlevert til Scanbio Ingredients AS, og som videre arbeid kan PV og AV kvantifiseres. Dette kan gjøres for å finne ut hvordan pH og antioksidanter påvirker oljekvaliteten i ensilasje av K2 laks, og om det er en korrelasjon mellom enzymaktivitet og lipidoksidasjon. I tillegg er det fraksjonert emulsjon, hydrolysat og sedimenter for hver prøve. Sintef Ocean har disse i besittelse og kan videre analysere tørrstoff, aske- og vanninnhold i hver prøve. Massebalansen i ensilasjene kan kvantifiseres, og det kan diskuteres påvirkninger av pH og antioksidanter.

6. Konklusjon

Ensilasje av K2 laks uten og med antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3 ble lagret gjennom en periode på 22 dager. Lav pH i ensilasje fører til mer masse fiskeolje og mindre masse emulsjon. Ved å måle proteolytisk aktivitet i ensilasje uten antioksidanter ble det bestemt at proteaseaktivitet er størst ved lav pH (pH 3), samt at aktiviteten øker ved økende temperatur. I tillegg bestemmes det at proteolytisk aktivitet øker med lagringstiden ved 10 °C og synker med lagringstiden ved 35 °C. Ved å måle lipolytisk aktivitet i ensilasje uten antioksidanter ble det bestemt at lipaseaktivitet er lav ved lav pH (pH 3-3,5). I tillegg øker lipolytisk aktivitet med temperaturen, men aktiviteten holder seg nokså stabil med lagringstiden. Prosentandelen frie fettsyrer i ensilasje uten antioksidanter er lavest ved lav pH (pH 3-3,5). Dermed konkluderes det med at det er hensiktsmessig å senke pH i ensilasje laget av K2 laks uten antioksidanter til rundt pH 3-3,5, for å oppnå best produktseparasjon, samt optimal hydrolyse og stabilitet av proteiner og lipider. I tillegg kan lagringstiden av ensilasjonen forlenges ved 10 °C, før overføring til hydrolysetanker ved 35 °C, slik at oppholdstiden av ensilasjonen ved 35 °C minimeres og ensilasjeprosessen blir mindre energikrevende.

Referanseliste

1. Norsk havbruksnæring [Internett]. Nærings- og fiskeridepartementet; 2021 [sitert 16. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiskeri-og-havbruk/1/oppdrettslaksen/Norsk-havbruksnaring/id754210/>
2. Johnsen PFF, Rognsås LL, Erraia J, Grønvik O, Fjose S, Blomgren A, mfl. Ringvirkninger av sjømatnæringen i 2021 [Internett]. Nofirma; 2022. Tilgjengelig fra: <https://nofima.no/wp-content/uploads/2022/10/2022-126-Ringvirkninger-av-sjomatnaeringen-2021.pdf>
3. Ingebrigtsen OE. Et hav av muligheter – regjeringens havbruksstrategi [Internett]. Nærings- og fiskeridepartementet; [sitert 7. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/contentassets/e430ad7a314e4039a90829fcd84c012a/no/pdfs/et-hav-av-muligheter.pdf>
4. Grefsrud ES, Andersen LB, Grøsvik BE, Karlsen Ø, Kvamme BO, Hansen PK, mfl. Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2023 [Internett]. Havforsknings Instituttet; 2023 [sitert 26. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/templates/reporteditor/report-pdf?id=66910&38229176>
5. Veikart for havbruksnæringen - sunn vekst [Internett]. Norsk Industri; [sitert 7. februar 2024] Tilgjengelig fra: https://www.norskindustri.no/siteassets/dokumenter/rapporter-og-brosjyret/veikart-havbruksnaringen_f41_web.pdf
6. Utnyttelse av restråstoff [Internett]. Barentswatch; 2021 [sitert 2. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.barentswatch.no/havbruk/utnyttelse-av-restrastoff>
7. Myhre MS, Richardsen R, Nystøyl R, Strandheim G. Analyse marint restråstoff 2021 [Internett]. Sintef Ocean AS; 2022 [sitert 7. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://sintef.brage.unit.no/sintef-xmlui/handle/11250/3013196>
8. Fiskedødelighet og tap i produksjonen [Internett]. Barentswatch; 2024 [sitert 4. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.barentswatch.no/havbruk/fiskedodelighet-og-tap-i-produksjonen>
9. Hoddevik B. Risikorapporten: Fortsatt høy dødelighet hos oppdrettslaks [Internett]. Havforskningsinstituttet; 2023 [sitert 27. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/nyheter/2023/februar/fortsatt-hoy-dodelighet-hos-oppdrettslaks>
10. Bækken Ø, Bekkevold S. Håndbok i ensilering. Skipnes Offsettrykkeri AS; 1993.
11. Opprettholdelse av veksten i norsk sjømatnæring ved å begrense miljøavtrykket [Internett]. ScanBio; [sitert 21. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://scanbio.com/baerekraftig-sjomatnaering/>
12. Regjeringa sin strategi for auka verdiskaping frå marint restråstoff [Internett]. Nærings- og fiskeridepartementet; [sitert 15. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/contentassets/0891087a014e4bab8bd2d9db5e88750d/no/sved/1.pdf>
13. Stevens JR, Newton RW, Tlusty M, Little DC. The rise of aquaculture by-products: Increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation. I: Marine Policy. ScienceDirect; 2018. s. 115–24.

14. Gjermstad RS. Hydrolysater av restråstoff fra laks (*Salmo salar*) - effekten av antioksidanter på kvaliteten under lagring [Master thesis]. NTNU; 2020.
15. Jouvenot L. Utilisation of Rest Raw Materials from the Fish Industry: Business Opportunities and Logistics Requirements [Master thesis]. NTNU; 2015.
16. Nilsen J. Veileder Animalske biprodukter [Internett]. Mattilsynet; 2014 [sitert 7. februar 2024]. Tilgjengelig fra: [https://mattilsynet-xp7prod.enonic.cloud/api/_/attachment/inline/08ea6bc4-094b-47a4-b161-59c306a641e0:af55b0f1b29b84ca6838c277aa83ca39bb79af6a/Veileder%20animalske%20biprodukter%20\(1069-2009%20og%20142-2011\).pdf](https://mattilsynet-xp7prod.enonic.cloud/api/_/attachment/inline/08ea6bc4-094b-47a4-b161-59c306a641e0:af55b0f1b29b84ca6838c277aa83ca39bb79af6a/Veileder%20animalske%20biprodukter%20(1069-2009%20og%20142-2011).pdf)
17. Forskrift om animalske biprodukter som ikke er beregnet på konsum (animaliebiproduktforskriften). FOR-2016-09-14-1064 [sitert 2. februar 2024]. Tilgjengelig fra: https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-09-14-1064/*#%23*
18. Møretrø T, Hjeltnes B, Lunestad BT, Nesse LL. Assessment of the Fish Silage Processing Method (FSPM) for treatment of category 2 and 3 material of fish origin [Internett]. Vitenskapskomiteen for mattrygghet; 2010 [sitert 7. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://vkm.no/download/18.2994e95b15cc545071682a93/1500465602428/360b21640f.pdf>
19. Lov om forbud mot hold av pelsdyr. LOV 2019-06-21-63 [sitert 26. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/LTI/lov/2019-06-21-63>
20. Våre produkter til teknisk industri har et bredt spekter av bruksområder [Internett]. ScanBio; [sitert 22. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://scanbio.com/bioenergi/>
21. Toppe J, Olsen RL, Peñarubia OR, James DG. Production and utilization of fish silage - A manual on how to turn fish waste into profit and a valuable feed ingredient or fertilizer [Internett]. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2018 [sitert 5. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.fao.org/3/i9606en/I9606EN.pdf>
22. Olsen RL, Toppe J. Fish silage hydrolysates: Not only a feed nutrient, but also a useful feed additive. I: Trends in Food Science & Technology. ScienceDirect; 2017. s. 93–7.
23. Effect of Temperature on Enzymatic Reaction - Creative Enzymes [Internett]. Creative Enzymes; [sitert 23. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://www.creative-enzymes.com/resource/effect-of-temperature-on-enzymatic-reaction_50.html
24. Strong Acids and Bases [Internett]. ChemTalk; 2021 [sitert 21. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://chemistrytalk.org/strong-acids-bases/>
25. Land M, Vanderperren E, Raes K. The effect of raw material combination on the nutritional composition and stability of four types of autolyzed fish silage. I: Animal Feed Science and Technology. ScienceDirect; 2017. s. 284–94.
26. Calmont M, Tan JYW. The way forward with organic acids [Internett]. Borregaard; [sitert 5. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://info.borregaard.com/hubfs/Feed/eBooks/SoftAcid/SoftAcid%20-%20The%20way%20forward%20with%20organic%20acids.pdf>

27. Peñarubia OR, Toppe J, James D. Fish Waste Management: Turning Waste into Healthy Feed with Antimicrobial Properties. I: Journal of the Asian Fisheries Society. Asian Fisheries Society; 2020. s. 11–5.
28. Suspensjon av ethoxyquin som førtilsetningsstoff [Internett]. Regjeringen; 2017 [sitert 21. mars 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2017/mai/suspensjon-av-ethoxyquin-som-fortilsetningsstoff/id2557353/>
29. Guldberg TS, Sandrød M, Øiaas JB, Zahlsten K, Kvitvang HF. Analysis of synthetic antioxidants in salmon silage using QuEChERS extraction method followed by determination by LC-MS/MS; a single-laboratory validation study. I: Journal of Chromatography B. ScienceDirect; 2021.
30. Ernæring [Internett]. ScanBio; [sitert 30. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://scanbio.com/fiskeolje-og-dyrefor/>
31. Lynum L, Rustad T. Anatomi og fysiologi. I: Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring. 2. utg., 2. oppl. Trondheim: Tapir; 2005. s. 19–51.
32. Kjøtt [Internett]. Universitetet i Oslo; 2023 [sitert 13. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/kjott.html>
33. Lynum L, Rustad T. Kjemisk sammensetning. I: Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring. 2. utg., 2. oppl. Trondheim: Tapir; 2005. s. 53–70.
34. Petricorena ZC. Chemical Composition of Fish and Fishery Products. I: Handbook of Food Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. s. 1–28.
35. Moran LA, Horton HR, Scrimgeour G, Perry MD, redaktører. Amino Acids and the Primary Structures of Proteins. I: Principles of biochemistry. 5. ed., Pearson new internat. ed. Harlow: Pearson; 2014. s. 81–116. (Always learning).
36. Protein [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 21. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/protein.html>
37. Enzym [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 27. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/e/enzym.html>
38. Hydrolyse [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 27. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/h/hydrolyse.html>
39. Shukla E, Bendre AD, Gaikwad SM. Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes [Internett]. Web of Science; 2022 [sitert 19. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://www.researchgate.net/publication/358279969_Hydrolases_The_most_Diverse_Class_of_Enzymes
40. Hydrolaser [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 13. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/h/hydrolaser.html>
41. Protease [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 13. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/protease.html>





42. Peptidase [Internett]. Universitetet i Oslo; [sitert 13. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/peptidase.html>
43. Hultmann L. Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture [Dr.ing.-thesis]. NTNU; 2003.
44. Aarnes H. Tynntarm - fordøyelse og absorpsjon. I: Fysiologi hos dyr og mennesker. Universitetet i Oslo; 2012. s. 74–7.
45. Lynum L. Mer om enzymer, enzymatisk utnyttelse av fiskeprotein, fiskemel, fiskeolje og tran. I: Videreforedling av fisk. Trondheim: Tapir akademisk forlag; 2005. s. 517–33.
46. Stoknes I. Proteases in fish - Purification and characterization of alkaline muscle proteases [Dr.ing.-thesis]. NTH; 1994.
47. Shen CH. Quantification and analysis of proteins. I: Diagnostic Molecular Biology. 2. utg. ScienceDirect; 2023. s. 231–57.
48. Sjøvik SL. Characterisation of enzymatic activities in by-products from cod species: effect of species, season and fishing ground [Docotral thesis]. NTNU; 2005.
49. Kurtovic I, Marshall SN, Zhao X, Simpson BK. Lipases from Mammals and Fishes. I: Reviews in Fisheries Science. Taylor & Francis Group; 2009. s. 18–40.
50. Hauge JG. lipaser [Internett]. Store medisinske leksikon; 2019 [sitert 19. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/lipaser>
51. Gjellesvik DR. Enzymatic lipid digestion in teleosts: bile salt-dependent lipase as major lipolytic enzyme in cod pancreas [Dr. scient. thesis]. University of Bergen; 1991.
52. Lynum L, Rustad T. Metabolisme før og rett etter døden. I: Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring. Tapir; 2005. s. 72–83.
53. Undeland I. Oxidative Stability of Seafood. I: Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats. Elsevier Inc.; 2016. s. 391–460.
54. Lynum L, Rustad T. Kvalitetsforringelse ved lagring (autolyse). I: Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring. 2. utg., 2. oppl. Trondheim: Tapir; 2005. s. 86–102.
55. Krogdahl Å, Sundby A, Holm H. Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. I: Aquaculture. ScienceDirect; 2015. s. 27–36.
56. Bernárdez M, Pastoriza L, Sampedro G, Herrera JJR, Cabo ML. Modified Method for the Analysis of Free Fatty Acids in Fish. I: Journal of Agricultural and Food Chemistry. American Chemical Society; 2005. s. 1903–6.
57. Moran LA, Horton HR, Scrimgeour G, Perry MD, redaktører. Lipids and Membranes. I: Principles of biochemistry. 5. utg. Pearson; 2014. s. 307–21.

58. Frøyland L, Bentsen H, Graff IE, Myhrstad M, Paulsen JE, Retterstøl K, mfl. Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods [Internett]. Vitenskapskomiteen for mattrygghet; 2011[sitert 13. februar 2024]. Tilgjengelig fra: <https://vkm.no/download/18.a665c1015c865cc85bab93e/1501509143166/c7a41adb79.pdf>
59. Mozuraityte R, Kristinova V, Standal IB, Carvajal AK, Aursand M. Oxidative Stability and Shelf Life of Fish Oil. I: Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats. Elsevier Inc.; 2016. s. 209–31.
60. Løvmo C. Fishoil; REPORT issued by an Accredited Laboratory, Sintef Industry. 2024.
61. Halvorsen KB. Karakterisering av lipider i villaks, oppdrettslaks (*Salmo salar*) og fiskefôr med GC-MS [Master thesis]. NMBU; 2019.
62. Moran LA, Horton HR, Scrimgeour G, Perry MD, redaktører. Glossary of Biochemical Terms. I: Principles of biochemistry. 5. utg. Pearson; 2014. s. 1–16.
63. Lynum L, Rustad T. Harskning. I: Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring. Tapir; 2005. s. 104–7.
64. Guneriussen T. Kvalitet av ensilasje og ensilasjeprodukter fra restråstoff etter sløyning av torsk og laks [Master thesis]. UiT; 2018.
65. Eskin NAM, Shahidi F. Lipid Oxidation. I: Biochemistry of foods. 3. utg. Academic Press, an imprint of Elsevier; 2013. s. 419–78.
66. Kamal-Eldin A, Mäkinen M, Lampi AM. The Challenging Contribution of Hydroperoxides to the Lipid Oxidation Mechanism. I: Lipid oxidation pathways. AOCS Press; 2003.
67. Kulås E, Olsen E, Ackman RG. Oxidation of Fish Lipids and its Inhibition with Tocopherols. I: Lipid oxidation pathways. AOCS Press; 2003.
68. Kuksis A, Kamido H, Ravandi A. Glycerophospholipid Core Aldehydes: Mechanism of Formation, Methods of Detection, Natural Occurrence, and Biological Significance. I: Lipid oxidation pathways. AOCS Press; 2003.
69. Semb TN. Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils [Master thesis]. NTNU; 2012.
70. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. 18B-2 Sodium Thiosulfate. I: Fundamentals of analytical chemistry. 10. utg. Cengage; 2022. s. 476–8.
71. Inneholder fôr til laks og ørret farge? [Internett]. Skretting; [sitert 28. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.skretting.com/no/aapenhet-og-tillit/ofte-stilte-spoersmaal/inneholder-for-til-laks-og-orret-farge/>
72. Irwin JW, Hedges N. Measuring lipid oxidation. I: Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food. ScienceDirect; 2004. s. 289–316.








73. Catalán V, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Skeletal Muscle of Obese Subjects. I: Obesity - Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. ScienceDirect; 2018. s. 163–89.
74. Sahu B, Jayakumar GC, Alla JP. Recent trends in oil tanning and its applications - A way forward towards cleaner approach in chamois leather making. I: Journal of Cleaner Production. ScienceDirect; 2022.
75. Guckeisen T, Hosseinpour S, Peukert W. Effect of pH and urea on the proteins secondary structure at the water/air interface and in solution. I: Journal of Colloid and Interface Science. ScienceDirect; 2021. s. 38–49.
76. Hofer R, Schiemer F. Proteolytic Activity in the Digestive Tract of Several Species of Fish with Different Feeding Habits. I: Oecologia. 1981. s. 342–5.
77. Nolasco-Soria H. Fish digestive lipase quantification methods used in aquaculture studies [Internett]. Frontiers in Aquaculture; 2023 [sitert 6. mai 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/faquc.2023.1225216/full>
78. Buffer Reference Center [Internett]. Sigmaaldrich; [sitert 4. mai 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-concentration-and-buffer-exchange/buffer-reference-center>

Vedlegg 1: Risikovurdering

RISIKOANALYSE										
Enhet/Institutt:	Institutt for materialteknologi (IMA)									
Ansvarlig linjeleder (navn):	Ida Westermann									
Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):	Ine Sunnset Trøen, Nora Ringheim Eldegard, Revilija Mozuraityte, Maria Alquiza Madina, Monika Kopczyk, Merethe Selnes og Lene Østby									
Deltakere (navn):	Ine Sunnset Trøen og Nora Ringheim Eldegard									
Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:										
Bestemmelse av enzymatisk aktivitet i fiskeensilasje basert på ulike pH forhold og temperatur. Det skal utføres en hydrolyseprosess hvor uttak av prøver skjer ca. hver uke i en måned. Proteolytisk og lipolytisk aktivitet skal måles i ensilasjen.										
Aktivitet/arbeidsoppgave	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreducerende tiltak	Vurdering av sannsynlighet (S) (1-5)	Vurdering av konsekvens (K) <i>Vurder en konsekvenskategori om gangen. Menneske skal alltid vurderes.</i>				Risikoverdi (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak <i>Prioriter tiltak som kan forhindre at hendelsen inntreffer (sannsynlighetsreducerende tiltak) foran skjerpet beredskap (konsekvensreducerende tiltak)</i>	Restrisiko etter tiltak (S x K)
				Menneske (1-5)	Øk/materiell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Omdømme (1-5)			
Tillaging av ensilasje	Ødeleggelse av instrument (pH-meter), kutt ved skjæring av fisk, eksponering for syre	God opplæring, hansker og briller	2	2				4	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr.	2 S = 1
Lagring av prøver, -80 °C	Fryseskader på hud	God opplæring	3	2	2			6	Beskyttelseshansker	3 K = 1
Bruk av sentrifuge	Ødeleggelse av instrument, kjemikalieøl og eksponering/skade som følge av ubalanse	God opplæring før bruk, likevekt i sentrifugen	2	1	2			2		
Kjemikalier i proteolytisk aktivitet	Eksponering for skadelige kjemikalier på grunn av manglende sikkerhetstiltak. F.eks. søl på hud og materialer, innånding og svelging.	Hele metoden utføres i avtrekkskap. Ha god innsikt i sikkerhetsdatablad for kjemikalier	3	3	1			9	Benytt avtrekkskap	3 S = 1
Bruk av vortexmikser	Ødeleggelse av instrument	God opplæring	2	1	2			2		
Bruk av spektrofotometer til proteolytisk aktivitet og FFA	Ødeleggelse av instrument	God opplæring før bruk	2	1	2			2		
Kjemikalier i lipolytisk aktivitet	Eksponering for skadelige kjemikalier på grunn av manglende sikkerhetstiltak. F.eks. søl på hud og materialer, innånding og svelging.	Hele metoden utføres i avtrekkskap. Ha god innsikt i sikkerhetsdatablad for kjemikalier	3	4	1			12	Ved alle sikkerhetstiltak oppfylt mtp. avtrekkskap reduseres risikoen med en gang	4 S = 1
Inndamping på rotavapor (35-40 °C)	Ødeleggelse av instrument	God opplæring	2	1	2			2		
Bruk av nitrogen-gass	Kan eksplodere under oppvarming	Gassalarm og oppbevaring på et godt ventilert sted	1	2	1			2		
Ultralyd-behandling	Ødeleggelse av instrument, hørselsskade	God opplæring	2	1	2			2		
Bruk av fluorimeter	Ødeleggelse av instrument	God opplæring	2	1	2			2		
Kjemikalier i FFA	Eksponering for skadelige kjemikalier på grunn av manglende sikkerhetstiltak. F.eks. søl på hud og materialer, innånding og svelging	Briller, labfrakk og hansker benyttes der det trengs	3	3	1			9	Benytt avtrekkskap	3 S = 1

KJEMIKALIER SOM BENYTTES GJENNOM BACHELOREN								
Kjemikalier	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikovurderende tiltak	Førstehjelpstiltak	Vurdering av sannsynlighet (S)	Vurdering av konsekvens (K)	Risikoverdi (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak	Restrisiko etter tiltak (S x K)
				(1-5)	Menneske (1-5)			
Bovine hemoglobin Sigma H-2625, CAS 9008-02-0	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Bovine Serum Albumin (BSA), C₈H₂₁NOSi₂, CAS 9048-46-8	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Dinatriumhydrogenfosfat, Na₂HPO₄, CAS 7782-85-6	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Folinreagens, C₁₀H₅NaO₅S, CAS 521-24-4 	H290 Kan være etsende for metaller. H302 Farlig ved svelging. H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne.	P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll [eller dusj] huden med vann. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P310 Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/lege.	2	3	6	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	3 S = 1
Isooktan, C₈H₁₈, CAS 540-84-1 	H225 Meget brannfarlig væske og damp. H304 Kan være dødelig ved svelging om det kommer ned i luftveiene. H315 Irriterer huden. H336 Kan forårsake døsighet eller svimmelhet. H410 Meget giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.	P210 Holdes vekk fra varme/gnister/åpen flamme/varme overflater. — Røyking forbudt. P261 Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/ aerosoler. P273 Unngå utslipp til miljøet. P280 Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsvern/hørselsvern.	P301 + P310 VED SVELGING: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege. P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann. P331 IKKE framkall brekning. P501 Innhold/beholder leveres til Godkjent avfallsmottak. P312 Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege ved ubehag.	2	5	10	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	5 S = 1
Kalium natrium tartrat, KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O, CAS 6381-59-5	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Kloroform, CHCl₃, CAS 67-66-3 	H302 Farlig ved svelging. H315 Irriterer huden. H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. H331 Giftig ved innånding. H351 Mistenkes for å kunne forårsake kreft. H361d Mistenkes for å kunne gi fosterskader. H372 Forårsaker organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering.	P202 Skal ikke håndteres før alle advarsler er lest og oppfattet. P260 Ikke innånd tåke/damp/aerosoler.	P302+P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann. P304+P340 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. P305+P351+P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P308+P313 Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.	2	5	10	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	5 S = 1
Kopperacetate-monohydrat, Cu(CH₃COO)₂ · H₂O, CAS 6046-93-1 	H302 Farlig ved svelging. H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. H218 Gir alvorlig øyeskade. H410 Meget giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.	P260 Ikke innånd støv/ tåke. P273 Unngå utslipp til miljøet. P280 Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktskjermer.	P301 + P330 + P331 VED SVELGING: Skyll munnen. IKKE framkall brekning. P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll huden med vann. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.	2	2	4	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	2 S = 1

Kobbersulfatpentahydrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CAS 7758-99-8 	H302 Farlig ved svelging. H318 Gir alvorlig øyeskade. H410 Meget giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.	P273 Unngå utslipp til miljøet. P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P301 + P312 VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege ved ubehag. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.	2	3	6	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	3 S = 1
Maursyre, HCOOH, CAS 64-18-6 	H226 Brannfarlig væske og damp. H290 Kan være etsende for metaller. H302 Farlig ved svelging. H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. H331 Giftig ved innånding.	P210 Holdes vekk fra varme, gnister, åpen flamme, varme overflater. Røyking forbudt. P280 Benytt vernehansker/vernebriller/ansiktsskjerm.	P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll [eller dusj] huden med vann. P304 + P340 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P310 Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/lege.	2	5	10	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	5 S = 1
Metanol, CH_3OH, CAS 67-56-1 	H225 Meget brannfarlig væske og damp. H301 + H311 + H331 Giftig ved svelging, hudkontakt eller innånding. H370 Forårsaker organskader (øye).	P210 Holdes vekk fra varme, gnister, åpen flamme, varme overflater. Røyking forbudt. P270 Ikke spis, drikk eller røyk ved bruk av produktet. P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll [eller dusj] huden med vann. P304 + P340 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. P308 + P311 Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege.	2	4	8	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	4 S = 1
Natriumhydroksid pastiller, NaOH, CAS 1310-73-2 	H290 Kan være etsende for metaller. H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne.	P233 Hold beholderen tett lukket. P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll [eller dusj] huden med vann. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P310 Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/lege.	2	3	6	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	3 S = 1
Natriumkarbonat, Na_2CO_3, CAS 497-19-8 	H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.		P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P337 + P313 Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp.	2	1	3		
Natriumklorid, NaCl, CAS 7647-14-5	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Nitrogengass, N_2, CAS 7727-37-9 	H280 Inneholder gass under trykk; kan eksplodere ved oppvarming.	P403 Oppbevares på et godt ventilerst sted.		2	2	4	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	2 S = 1

Oljesyre, C ₁₈ H ₃₄ O ₂ , CAS 112-80-1	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Pyridin, C ₅ H ₅ N, CAS 110-86-1  	H225 Meget brannfarlig væske og damp. H302 + H312 + H332 Farlig ved svelging, hudkontakt eller innånding. H315 Irriterer huden. H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.	P210 Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningskilder. Røyking forbudt. P280 Bruk vernehansker/ verneklær/ øyebeskyttelse/ ansiktsbeskyttelse.	P301 + P312 VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/ en lege ved ubehag. P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll huden med vann. P304 + P340 + P312 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/ en lege ved ubehag. P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.	2	2	4	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	2 S = 1
Sitronsyremonohydrat, C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O CAS 5949-29-1 	H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. H335 Kan forårsake irritasjon av luftveiene.	P261 Unngå innånding av tåke/damp/aerosoler. P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P337 + P313 Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp.	2	1	2		
Soyalecitin (L- α -fosfatidylkolin), CAS 8002-43-5	Ikke merkepliktig			1	1	1		
Triklorediksyre (TCA), C ₂ HCl ₃ O ₂ , CAS 76-03-9   	H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. H335 Kan forårsake irritasjon av luftveiene. H410 Meget giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.	P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P301 + P330 + P331 VED SVELGING: Skyll munnen. IKKE framkall brekning. P303+P361+P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll [eller dusj] huden med vann. P305+P351+P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen P310 Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/lege.	2	3	6	Jobbe i avtrekk med relevant verneutstyr som briller og relevenate hansker, dobbelt dersom stoffet er ekstra farlig. I tillegg få god opplæring i håndtering av avfallstømming. Vær varsom ved håndtering av kjemikalier.	3 S = 1
Tris(hydoksymetyl)amino metanhydroklorid (Tris-HCl), NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl, CAS 1185-53-1	Ikke merkepliktig			1	1	1		
4-Methylumbelliferone (4-MU), C ₁₀ H ₈ O ₃ , CAS 90-33-5 	H315 Irriterer huden. H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. H335 Kan forårsake irritasjon av luftveiene.	P280 Benytt vernehansker/vernebriller.	P302+P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann. P304+P340 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. P305+P351+P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.	2	1	2		
4-Methylumbelliferylheptanoat (4-MUH), C ₁₇ H ₂₀ O ₄ , CAS 18319-92-1	Ikke merkepliktig			1	1	1		

Vedlegg 2: pH-verdier i ensilasjen og rådata for masse

Tabell I viser hvor mye fiskemasse som ble overført til hver plastbøtte, samt volum tilsatt syre og pH-verdier i ensilasjen på hver uttaksdag. Det ble overført rundt 1400 g fiskemasse til hver bøtte. $Syre_T tot_F$ viser hvor mye syre som var tilsatt til fiskemassen i hver bøtte før første uttak på lagringsdag 4. Etter tilsatt av syre på dag 4 viser $Syre_T tot_E$ hvor mye syre som ble tilsatt til sammen i hver ensilasje. Tabell II viser pH-verdiene som ble brukt til å lage Figur 25 og 26.

Tabell I. Masse fiskemasse overført til hver bøtte, volum tilsatt syre og pH-verdier i ensilasjen. $Syre_T$: Syre tilsatt, pH_0 : pH før tilsatt syre, $Syre_T tot_F$: Syre tilsatt totalt før uttak, $Syre_T tot_E$: Syre tilsatt totalt etter uttak (300 g).

Bøtte	Masse [g]	$Syre_T D0$ [mL]	pH D0	$pH_0 D1$	$Syre_T D1$ [mL]	pH D1	$Syre_T tot_F$ [mL]	$pH_0 D4$	$Syre_T D4$ [mL]	pH D4	$Syre_T tot_E$ [mL]	pH D11	pH D18	pH D22
K2 4-1	1400	22	3,9	4,3	5	4,1-4,2	27	4,3	3	4,1-4,2	30	4,2	4,2-4,3	4,3
K2 4-2	1400	22	3,8	4,1-4,2	0	4,1-4,2	22	4,3-4,4	5	4,00	27	4,2-4,3	4,2-4,3	4,2-4,3
K2 3,5-1	1400	75	3,4-3,5	3,6	5	3,5	80	3,6	0	3,6	80	3,5-3,6	3,6	3,6
K2 3,5-2	1403	75	3,4-3,5	3,6	5	2,5	80	3,6	0	3,6	80	3,5	3,6	3,6
K2 3-1	1399	150	3,1-3,2	3,3-3,4	35	3,1-3,2	185	3,2	40	3,1	225	3	3,2	3,2
K2 3-2	1406	150	3,2	3,3-3,4	35	3,1-3,2	185	3,2	40	3,1	225	3,0-3,1	3,1-3,2	3,1-3,2
K2 A 4-1	1400	15	3,8	4,3	5	4,1-4,2	20	4,1-4,2	0	4,1-4,2	20	4,3-4,4	4,3	4,4
K2 A 4-2	1402	17	3,8	4,1-4,2	0	4,1-4,2	17	4,4	3	4,1-4,2	20	4,2-4,3	4,3-4,4	4,3-4,4
K2 A 3,5-1	1405	50	3,3	3,5	0	3,5	50	3,5-3,6	0	3,5-3,6	50	3,5-3,6	3,6	3,6
K2 A 3,5-2	1405	50	3,2	3,5	0	3,5	50	3,5-3,6	0	3,5-3,6	50	3,5-3,6	3,5-3,6	3,6-3,7
K2 A 3-1	1400	110	2,8-2,9	3,0-3,1	0	3,0-3,1	110	3,1	0	3,1	110	3,1-3,2	3,1	3,1
K2 A 3-2	1400	120	2,9-3,0	3,1-3,2	0	3,1-3,2	120	3,0-3,1	0	3,0-3,1	120	3,00	3,0-3,1	3,1

Tabell II. pH-verdier som ble brukt til tillaging av Figur 25 og 26. Det ble brukt gjennomsnittsverdier av pH for ensilasjeprovene som hadde varierende pH på målingene.

Dag	K2 4-1	K2 4-2	K2 3,5-1	K2 3,5-2	K2 3-1	K2 3-2	K2 A 4-1	K2 A 4-2	K2 A 3,5-1	K2 A 3,5-2	K2 A 3-1	K2 A 3-2
0	3,9	3,8	3,45	3,45	3,15	3,2	3,8	3,8	3,3	3,2	2,85	2,95
1	4,15	4,15	3,5	3,5	3,15	3,15	4,15	4,15	3,5	3,5	3,05	3,15
4	4,15	4,00	3,6	3,6	3,1	3,1	4,15	4,15	3,55	3,55	3,1	3,1
11	4,2	4,25	3,55	3,5	3	3,05	4,35	4,25	3,55	3,55	3,15	3,00
18	4,25	4,25	3,6	3,6	3,2	3,15	4,3	4,35	3,6	3,55	3,1	3,15
22	4,3	4,25	3,6	3,6	3,2	3,15	4,4	4,35	3,6	3,65	3,1	3,1

Tabell III viser hvordan hver uttaksprøve ble merket, masse inaktivert ensilasje og rådata for hvor mye sentrifugerørene på 15 mL, veieskipene og de små og store plastposene veide, samt hvor mye fett, hydrolysat, sedimenter og emulsjon som ble veid og beregnet. I tillegg vises også prosentvis-avvik fra hvor mye ensilasje som ble inaktivert til summen av den totale massen av fraksjonene fett, emulsjon, hydrolysat og sedimenter. Ved overføring av 100 g

inaktivert prøve til de 2 x 50 mL sentrifugerørene ble litt ensilasje sølt ut for prøve K2 A 4-1 D4 B. Prøve K2 3-1 D11 A, K2 3-1 D11 B, K2 3-2 D11 A og K2 3-2 D11 B ble sentrifugert to ganger. Prøve K2 A 3-1 D11 A, K2 A 3-1 D11 B, K2 A 3-2 D11 A og K2 A 3-2 D11 B lå i sentrifugen over natten før de ble fryst. Rutene som er tomme mangles å analysere på % frie fettstoffer og bunnfallet med emulsjon i disse prøvene har derfor ikke blitt veid.

Tabell III. Merking av alle prøvene, mengde inaktivert ensilasje, masse fett, hydrolysat, sedimenter og emulsjon og %-avvik fra innveid masse ensilasje. Masse_I: Masse ensilasje inaktivert, Fett_B: Fett + bunnfall, B: Bunnfall emulsjon, Skip: Veieskip, Hyd: Hydrolysat, Sed: Sediment, Em_{uB}: Emulsjon ÷ B, Em: Emulsjon + B, Sum veid: sum av Fett, Hyd, Sed og Em, % avvik: %-avvik fra Masse_I.

Prøve	Masse _I [g]	Rør [g]	Rør + Fett _B [g]	Fett _B [g]	B [g]	Fett [g]	Skip [g]	Skip + Hyd [g]	Hyd [g]	Pose [g]	Pose + Sed [g]	Sed [g]	Pose [g]	Pose + Em _{uB} [g]	Em _{uB} [g]	Em [g]	Sum veid	% avvik
K2 D0 1	102	6,66	11,42	4,76	0,28	4,48	2,23	20,42	18,19	2,80	71,25	68,45	-	-	-	0,28	91,12	10,67 %
K2 D0 2	104	6,68	12,18	5,50		5,50	2,29	22,85	20,56	2,72	69,54	66,82	-	-	-	0,00	92,88	10,69 %
K2 4-1 D4 A	100	6,66	12,60	5,94	0,29	5,65	2,30	43,41	41,11	2,93	42,31	39,38	2,05	8,28	6,23	6,52	92,66	7,34 %
K2 4-1 D4 B	101	6,67	12,94	6,27		6,27	2,33	41,48	39,15	2,75	43,98	41,23	2,07	9,29	7,22	7,22	93,87	7,06 %
K2 4-2 D4 A	100	6,66	12,68	6,02	0,06	5,96	2,28	43,16	40,88	2,73	43,10	40,37	2,03	9,70	7,67	7,73	94,94	5,06 %
K2 4-2 D4 B	101	6,67	13,37	6,70		6,70	2,44	43,94	41,50	2,64	42,35	39,71	2,02	7,73	5,71	5,71	93,62	7,31 %
K2 3,5-1 D4 A	101	6,72	12,67	5,95	0,12	5,83	2,30	41,25	38,95	2,78	43,35	40,57	2,10	6,48	4,38	4,50	89,85	11,04 %
K2 3,5-1 D4 B	102	6,74	12,48	5,74		5,74	2,33	42,44	40,11	2,76	43,49	40,73	2,05	7,11	5,06	5,06	91,64	10,16 %
K2 3,5-2 D4 A	104	6,73	13,19	6,46	0,14	6,32	2,19	46,60	44,41	2,79	46,86	44,07	2,01	6,04	4,03	4,17	98,97	4,84 %
K2 3,5-2 D4 B	100	6,68	12,79	6,11		6,11	2,28	43,08	40,80	2,63	45,84	43,21	2,09	7,64	5,55	5,55	95,67	4,33 %
K2 3-1 D4 A	100	6,67	12,81	6,14	0,28	5,86	2,46	38,31	35,85	2,85	51,26	48,41	2,04	6,32	4,28	4,56	94,68	5,32 %
K2 3-1 D4 B	100	6,69	12,45	5,76		5,76	2,24	35,92	33,68	2,67	52,22	49,55	2,10	6,71	4,61	4,61	93,60	6,40 %
K2 3-2 D4 A	102	6,66	12,79	6,13	0,48	5,65	2,32	39,63	37,31	2,90	53,43	50,53	2,07	6,45	4,38	4,86	98,35	3,58 %
K2 3-2 D4 B	100	6,67	12,49	5,82		5,82	2,26	37,53	35,27	2,86	53,48	50,62	2,14	6,30	4,16	4,16	95,87	4,13 %
K2 A 4-1 D4 A	102	6,67	12,73	6,06		6,06	2,35	44,77	42,42	2,79	45,73	42,94	2,07	8,87	6,80	6,80	98,22	3,71 %
K2 A 4-1 D4 B	103	6,66	12,92	6,26		6,26	2,25	38,00	35,75	2,74	44,44	41,70	2,08	8,59	6,51	6,51	90,22	12,41 %
K2 A 4-2 D4 A	101	6,68	12,83	6,15		6,15	2,28	43,14	40,86	2,76	43,94	41,18	2,07	7,75	5,68	5,68	93,87	7,06 %
K2 A 4-2 D4 B	102	6,66	12,91	6,25		6,25	2,27	49,29	47,02	2,77	42,87	40,10	2,07	7,57	5,50	5,50	98,87	3,07 %
K2 A 3,5-1 D4 A	101	6,69	13,47	6,78		6,78	2,31	41,55	39,24	2,77	50,76	47,99	2,10	3,46	1,36	1,36	95,37	5,57 %
K2 A 3,5-1 D4 B	103	6,73	13,61	6,88		6,88	2,27	42,41	40,14	2,73	48,67	45,94	2,13	3,74	1,61	1,61	94,57	8,18 %
K2 A 3,5-2 D4 A	101	6,69	13,25	6,56		6,56	2,46	42,48	40,02	2,75	49,30	46,55	2,10	3,74	1,64	1,64	94,77	6,17 %
K2 A 3,5-2 D4 B	102	6,69	13,40	6,71		6,71	2,21	40,77	38,56	2,76	51,10	48,34	2,10	3,84	1,74	1,74	95,35	6,52 %
K2 A 3-1 D4 A	102	6,71	13,35	6,64		6,64	2,27	34,84	32,57	2,76	55,77	53,01	2,07	4,75	2,68	2,68	94,90	6,96 %
K2 A 3-1 D4 B	101	6,67	13,07	6,40		6,40	2,19	25,82	23,63	2,76	62,14	59,38	2,13	8,04	5,91	5,91	95,32	5,62 %
K2 A 3-2 D4 A	101	6,69	12,85	6,16		6,16	2,32	25,67	23,35	2,79	60,00	57,21	2,09	7,88	5,79	5,79	92,51	8,41 %
K2 A 3-2 D4 B	100	6,70	12,64	5,94		5,94	2,27	26,88	24,61	2,78	59,74	56,96	2,10	8,26	6,16	6,16	93,67	6,33 %
K2 4-1 D11 A	103	6,67	12,19	5,52	0,07	5,45	2,37	50,91	48,54	2,76	34,97	32,21	2,09	10,43	8,34	8,41	94,61	8,15 %
K2 4-1 D11 B	103	6,66	12,16	5,50		5,50	2,44	50,92	48,48	2,77	34,31	31,54	2,06	11,58	9,52	9,52	95,04	7,73 %
K2 4-2 D11 A	102	6,66	12,29	5,63	0,09	5,54	2,36	49,90	47,54	2,75	36,03	33,28	2,11	9,79	7,68	7,77	94,13	7,72 %
K2 4-2 D11 B	102	6,67	13,11	6,44		6,44	2,41	50,03	47,62	2,76	34,66	31,90	2,08	10,55	8,47	8,47	94,43	7,42 %
K2 3,5-1 D11 A	101	6,73	13,13	6,40	0,33	6,07	2,30	44,80	42,50	2,76	37,38	34,62	2,07	7,62	5,55	5,88	89,07	11,81 %
K2 3,5-1 D11 B	101	6,66	12,91	6,25		6,25	2,47	45,88	43,41	2,79	38,41	35,62	2,05	7,67	5,62	5,62	90,90	10,00 %
K2 3,5-2 D11 A	103	6,68	12,56	5,88	0,25	5,63	2,44	46,99	44,55	2,82	39,37	36,55	2,08	6,40	4,32	4,57	91,30	11,36 %
K2 3,5-2 D11 B	100	6,66	12,55	5,89		5,89	2,40	44,79	42,39	2,78	39,41	36,63	2,07	6,60	4,53	4,53	89,44	10,56 %
K2 3-1 D11 A	104	6,68	12,69	6,01	0,43	5,58	2,26	45,68	43,42	2,80	48,12	45,32	2,04	4,80	2,76	3,19	97,51	6,24 %
K2 3-1 D11 B	100	6,68	12,69	6,01		6,01	2,44	42,43	39,99	2,79	45,71	42,92	2,04	5,66	3,62	3,62	92,54	7,46 %
K2 3-2 D11 A	101	6,73	12,66	5,93	0,37	5,56	2,32	43,73	41,41	2,76	46,86	44,10	2,09	4,62	2,53	2,90	93,97	6,96 %
K2 3-2 D11 B	100	6,69	12,47	5,78		5,78	2,37	40,82	38,45	2,75	47,14	44,39	2,11	6,56	4,45	4,45	93,07	6,93 %
K2 A 4-1 D11 A	100	6,67	13,18	6,51		6,51	2,18	46,63	44,45	2,77	39,29	36,52	2,08	9,11	7,03	7,03	94,51	5,49 %
K2 A 4-1 D11 B	100	6,65	13,11	6,46		6,46	2,38	47,30	44,92	2,76	38,31	35,55	2,07	9,63	7,56	7,56	94,49	5,51 %
K2 A 4-2 D11 A	102	6,69	12,33	5,64		5,64	2,40	49,60	47,20	2,77	36,26	33,49	2,08	10,34	8,26	8,26	94,59	7,26 %
K2 A 4-2 D11 B	102	6,67	12,34	5,67		5,67	2,25	46,28	44,03	2,77	36,52	33,75	2,08	12,24	10,16	10,16	93,61	8,23 %
K2 A 3,5-1 D11 A	101	6,67	13,00	6,33		6,33	2,40	40,96	38,56	2,75	44,10	41,35	2,06	6,20	4,14	4,14	90,38	10,51 %
K2 A 3,5-1 D11 B	100	6,71	12,69	5,98		5,98	2,29	40,89	38,60	2,76	44,82	42,06	2,06	6,49	4,43	4,43	91,07	8,93 %
K2 A 3,5-2 D11 A	103	6,66	13,20	6,54		6,54	2,36	42,14	39,78	2,78	45,99	43,21	2,09	6,42	4,33	4,33	93,86	8,87 %
K2 A 3,5-2 D11 B	100	6,66	13,01	6,35		6,35	2,23	38,63	36,40	2,74	43,97	41,23	2,08	6,15	4,07	4,07	88,05	11,95 %
K2 A 3-1 D11 A	102	6,67	13,05	6,38		6,38	2,36	23,99	21,63	2,75	59,33	56,58	2,08	8,02	5,94	5,94	90,53	11,25 %
K2 A 3-1 D11 B	101	6,66	12,80	6,14		6,14	2,29	21,43	19,14	2,76	61,69	58,93	2,08	8,22	6,14	6,14	90,35	10,54 %

K2 A 3-2 D11 A	101	6,68	12,79	6,11		6,11	2,37	21,40	19,03	2,71	60,88	58,17	2,11	6,81	4,70	4,70	88,01	12,86 %
K2 A 3-2 D11 B	101	6,67	12,72	6,05		6,05	2,40	21,89	19,49	2,73	61,42	58,69	2,05	7,28	5,23	5,23	89,46	11,43 %
K2 4-1 D18 A	102	6,70	11,62	4,92	0,17	4,75	2,24	52,98	50,74	2,85	31,98	29,13	2,09	13,67	11,58	11,75	96,37	5,52 %
K2 4-1 D18 B	103	6,66	11,72	5,06		5,06	2,23	52,01	49,78	2,85	33,02	30,17	2,11	13,80	11,69	11,69	96,70	6,12 %
K2 4-2 D18 A	102	6,64	11,39	4,75	0,09	4,66	2,26	51,07	48,81	2,81	32,32	29,51	2,09	13,31	11,22	11,31	94,29	7,56 %
K2 4-2 D18 B	102	6,63	11,48	4,85		4,85	2,27	49,67	47,40	2,83	32,38	29,55	2,06	13,04	10,98	10,98	92,78	9,04 %
K2 3,5-1 D18 A	100	6,67	12,70	6,03	0,17	5,86	2,13	46,30	44,17	2,77	38,30	35,53	2,07	6,99	4,92	5,09	90,65	9,35 %
K2 3,5-1 D18 B	101	6,70	12,22	5,52		5,52	2,25	46,11	43,86	2,79	37,88	35,09	2,07	7,13	5,06	5,06	89,53	11,36 %
K2 3,5-2 D18 A	102	6,65	12,48	5,83	0,20	5,63	2,25	47,04	44,79	2,82	40,54	37,72	2,10	6,97	4,87	5,07	93,21	8,62 %
K2 3,5-2 D18 B	103	6,67	12,68	6,01		6,01	2,28	48,10	45,82	2,76	40,89	38,13	2,09	7,33	5,24	5,24	95,20	7,57 %
K2 3-1 D18 A	103	6,66	12,35	5,69	1,14	4,55	2,26	41,72	39,46	2,73	45,91	43,18	2,10	6,23	4,13	5,27	92,46	10,23 %
K2 3-1 D18 B	100	6,69	12,21	5,52		5,52	2,24	38,10	35,86	2,76	45,46	42,70	2,08	7,02	4,94	4,94	89,02	10,98 %
K2 3-2 D18 A	101	6,67	12,75	6,08	0,55	5,53	2,29	38,13	35,84	2,79	45,84	43,05	2,05	7,41	5,36	5,91	90,33	10,56 %
K2 3-2 D18 B	101	6,63	12,76	6,13		6,13	2,27	39,85	37,58	2,78	47,52	44,74	2,02	6,16	4,14	4,14	92,59	8,33 %
K2 A 4-1 D18 A	103	6,64	12,16	5,52		5,52	2,36	51,09	48,73	2,82	35,95	33,13	2,02	9,64	7,62	7,62	95,00	7,77 %
K2 A 4-1 D18 B	102	6,69	12,81	6,12		6,12	2,24	48,85	46,61	2,81	36,79	33,98	2,09	10,00	7,91	7,91	94,62	7,24 %
K2 A 4-2 D18 A	101	6,68	11,73	5,05		5,05	2,24	50,87	48,63	2,79	33,14	30,35	2,05	11,51	9,46	9,46	93,49	7,44 %
K2 A 4-2 D18 B	102	6,70	12,09	5,39		5,39	2,32	51,65	49,33	2,83	34,46	31,63	2,04	10,89	8,85	8,85	95,20	6,67 %
K2 A 3,5-1 D18 A	101	6,67	12,41	5,74		5,74	2,36	40,88	38,52	2,86	40,98	38,12	2,07	7,44	5,37	5,37	87,75	13,12 %
K2 A 3,5-1 D18 B	103	6,68	12,53	5,85		5,85	2,35	41,71	39,36	2,80	42,07	39,27	2,07	7,20	5,13	5,13	89,61	13,00 %
K2 A 3,5-2 D18 A	102	6,65	12,53	5,88		5,88	2,32	41,97	39,65	2,80	41,17	38,37	2,09	7,20	5,11	5,11	89,01	12,74 %
K2 A 3,5-2 D18 B	103	6,68	12,81	6,13		6,13	2,28	40,74	38,46	2,82	42,91	40,09	2,05	7,17	5,12	5,12	89,80	12,82 %
K2 A 3-1 D18 A	101	6,72	12,42	5,70		5,70	2,31	35,52	33,21	2,81	47,22	44,41	2,08	6,90	4,82	4,82	88,14	12,73 %
K2 A 3-1 D18 B	105	6,63	12,88	6,25		6,25	2,39	35,71	33,32	2,83	47,77	44,94	2,08	6,92	4,84	4,84	89,35	14,90 %
K2 A 3-2 D18 A	105	6,65	12,90	6,25		6,25	2,41	38,74	36,33	2,76	49,86	47,10	2,08	6,44	4,36	4,36	94,04	10,44 %
K2 A 3-2 D18 B	104	6,66	12,94	6,28		6,28	2,28	36,69	34,41	2,81	48,21	45,40	2,04	6,78	4,74	4,74	90,83	12,66 %
K2 4-1 D22 A	104	6,65	11,59	4,94	0,17	4,77	2,35	53,15	50,80	2,81	32,31	29,50	2,08	12,38	10,30	10,47	95,54	8,13 %
K2 4-1 D22 B	103	6,67	11,33	4,66		4,66	3,32	53,47	50,15	2,81	31,82	29,01	2,07	12,53	10,46	10,46	94,28	8,47 %
K2 4-2 D22 A	102	6,70	11,85	5,15	0,30	4,85	2,39	51,15	48,76	2,78	31,52	28,74	2,05	12,50	10,45	10,75	93,10	8,73 %
K2 4-2 D22 B	103	6,66	11,63	4,97		4,97	2,38	51,21	48,83	2,82	34,00	31,18	2,04	13,25	11,21	11,21	96,19	6,61 %
K2 3,5-1 D22 A	102	6,67	12,43	5,76	0,14	5,62	2,29	46,74	44,45	2,80	36,51	33,71	2,05	7,78	5,73	5,87	89,65	12,11 %
K2 3,5-1 D22 B	105	6,68	12,59	5,91		5,91	2,21	47,40	45,19	2,80	38,30	35,50	2,05	7,76	5,71	5,71	92,31	12,09 %
K2 3,5-2 D22 A	100	6,72	12,48	5,76	0,48	5,28	2,36	44,02	41,66	2,79	38,36	35,57	2,06	7,25	5,19	5,67	88,18	11,82 %
K2 3,5-2 D22 B	100	6,66	12,61	5,95		5,95	2,31	43,98	41,67	2,79	38,03	35,24	2,05	7,30	5,25	5,25	88,11	11,89 %
K2 3-1 D22 A	102	6,71	12,32	5,61	0,34	5,27	2,39	44,71	42,32	2,78	46,86	44,08	2,07	5,63	3,56	3,90	95,57	6,30 %
K2 3-1 D22 B	103	6,69	12,50	5,81		5,81	2,31	43,51	41,20	2,80	46,62	43,82	2,08	6,24	4,16	4,16	94,99	7,78 %
K2 3-2 D22 A	100	6,65	12,60	5,95	0,65	5,30	2,28	39,63	37,35	2,79	46,38	43,59	2,06	6,33	4,27	4,92	91,16	8,84 %
K2 3-2 D22 B	101	6,67	12,35	5,68		5,68	2,30	41,60	39,30	2,81	48,66	45,85	2,02	5,82	3,80	3,80	94,63	6,31 %
K2 A 4-1 D22 A	100	6,74	11,99	5,25		5,25	2,34	48,10	45,76	2,86	35,12	32,26	2,05	10,97	8,92	8,92	92,19	7,81 %
K2 A 4-1 D22 B	100	6,64	11,58	4,94		4,94	2,29	48,77	46,48	2,86	34,56	31,70	2,05	11,05	9,00	9,00	92,12	7,88 %
K2 A 4-2 D22 A	101	6,70	11,52	4,82		4,82	2,33	49,95	47,62	2,81	33,72	30,91	2,05	11,57	9,52	9,52	92,87	8,05 %
K2 A 4-2 D22 B	105	6,66	11,55	4,89		4,89	2,40	52,94	50,54	2,87	33,85	30,98	2,06	12,82	10,76	10,76	97,17	7,46 %
K2 A 3,5-1 D22 A	104	6,66	12,51	5,85		5,85	2,46	44,29	41,83	2,83	41,47	38,64	2,08	8,30	6,22	6,22	92,54	11,02 %
K2 A 3,5-1 D22 B	105	6,63	12,96	6,33		6,33	2,34	43,68	41,34	2,83	43,34	40,51	2,07	8,82	6,75	6,75	94,93	9,59 %
K2 A 3,5-2 D22 A	102	6,72	12,86	6,14		6,14	2,36	42,02	39,66	2,83	40,31	37,48	2,04	8,57	6,53	6,53	89,81	11,95 %
K2 A 3,5-2 D22 B	105	6,65	12,93	6,28		6,28	2,33	43,50	41,17	2,83	42,97	40,14	2,05	9,03	6,98	6,98	94,57	9,93 %
K2 A 3-1 D22 A	102	6,65	12,78	6,13		6,13	2,38	30,64	28,26	2,83	54,55	51,72	2,07	6,47	4,40	4,40	90,51	11,26 %
K2 A 3-1 D22 B	103	6,64	12,77	6,13		6,13	2,36	36,18	33,82	2,83	48,94	46,11	2,07	6,86	4,79	4,79	90,85	11,80 %
K2 A 3-2 D22 A	102	6,70	12,48	5,78		5,78	2,24	33,98	31,74	2,82	49,53	46,71	2,07	7,42	5,35	5,35	89,58	12,18 %
K2 A 3-2 D22 B	100	6,67	12,46	5,79		5,79	2,24	33,16	30,92	2,81	48,55	45,74	2,06	7,27	5,21	5,21	87,66	12,34 %

Vedlegg 3: Metoder for tillaging av løsninger

Tabell IV. Metoder for tillaging av løsninger til proteolytisk aktivitet.

Løsninger til proteolytisk aktivitet																																												
Løsning	Kjemikalier		Prøveopparbeidelse																																									
<p>Sitronsyre-fosfatbuffer</p> <p>Under forsøket ble det tillaget sitronsyre-fosfatbuffer med pH 3,2, 3,6, 4,3 og 6,7. Det ble brukt gjennomsnittsverdier fra <i>Tabell II</i>.</p>	<p><u>Stock A</u> Sitronsyre, C₆H₈O₇, 0,1 M - 192,124 g/mol - 19.21 g C₆H₈O₇ · H₂O /L destillert vann</p> <p><u>Stock B</u> Dinatriumhydrogenfosfat, Na₂HPO₄, 0,2 M - 141,96 g/mol - 28.38 g Na₂HPO₄/L destillert vann</p>		<p>Stock A: x mL. Stock B: 100 mL – Stock A. mL i henhold til <i>Tabell II</i> i dette vedlegget. Juster pH ved å tilsette mer stock A eller B dersom pH ikke blir optimal ved volum fra <i>Tabell II</i>.</p>																																									
1 % Hemoglobin (substrat)	Bovine hemoglobin Sigma H-2625		Løs 1 g hemoglobin i 100 mL destillert vann, lagres fryst.																																									
5 % TCA (Ble laget av Maria A. M.)	Triklorediksyre (TCA), C ₂ HCl ₃ O ₂		Løs 50 g TCA i 1000 mL destillert vann.																																									
2 % Natriumkarbonat i 0,1 M Natriumhydroksid (A)	Natriumkarbonat, Na ₂ CO ₃ Natriumhydroksid, NaOH, 0,1 M - 3,9997 g NaOH pastiller + 1000 mL destillert vann		Løs 20 g natriumkarbonat i 0,1 M natriumhydroksid.																																									
1 % Kobbersulfat (B) (Ble laget av Maria A. M.)	Kobbersulfatpentahydrat, CuSO ₄ · 5 H ₂ O		Løs 1 g kobbersulfatpentahydrat i 100 mL destillert vann.																																									
2 % Kaliumnatriumtartrat (C) (Ble laget av Maria A. M.)	Kaliumnatriumtartrat, KNaC ₄ H ₄ O ₆ · 4H ₂ O		Løs 2 g kaliumnatriumtartrat i 100 mL destillert vann.																																									
Alkalisk kobberreagens (D)	2 % Natriumkarbonat i 0,1 M Natriumhydroksid (A) 1 % Kobbersulfat (B) 2 % Kaliumnatriumtartrat (C)		For å danne D bland 100 mL A + 1 mL B + 1 mL C i en erlenmeyerkolbe.																																									
Fortynnet folinreagens	Folinreagens, C ₁₀ H ₅ NaO ₅ S		Bland 1 del folinreagens (50 mL) + 2 deler destillert vann (100 mL). Beskytt løsningen med aluminiumsfolie.																																									
Proteinstandarder, Bovine Serum Albumin (BSA), fortynnes fra 1000 µg/mL standardløsning med destillert vann i henhold til tabellen. (Ble laget av Maria A. M.)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Standard</th> <th style="width: 20%;">Konsentrasjon [µg/mL]</th> <th style="width: 20%;">Total mengde [mL]</th> <th style="width: 20%;">µL BSA [µL]</th> <th style="width: 20%;">Destillert vann [mL]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>12,5</td><td>10</td><td>125</td><td>9,875</td></tr> <tr><td>2</td><td>25</td><td>10</td><td>250</td><td>9,750</td></tr> <tr><td>3</td><td>50</td><td>10</td><td>500</td><td>9,5</td></tr> <tr><td>4</td><td>100</td><td>10</td><td>1000</td><td>9</td></tr> <tr><td>5</td><td>150</td><td>10</td><td>1500</td><td>8,5</td></tr> <tr><td>6</td><td>200</td><td>10</td><td>2000</td><td>8</td></tr> <tr><td>7</td><td>300</td><td>10</td><td>3000</td><td>7</td></tr> </tbody> </table>				Standard	Konsentrasjon [µg/mL]	Total mengde [mL]	µL BSA [µL]	Destillert vann [mL]	1	12,5	10	125	9,875	2	25	10	250	9,750	3	50	10	500	9,5	4	100	10	1000	9	5	150	10	1500	8,5	6	200	10	2000	8	7	300	10	3000	7
Standard	Konsentrasjon [µg/mL]	Total mengde [mL]	µL BSA [µL]	Destillert vann [mL]																																								
1	12,5	10	125	9,875																																								
2	25	10	250	9,750																																								
3	50	10	500	9,5																																								
4	100	10	1000	9																																								
5	150	10	1500	8,5																																								
6	200	10	2000	8																																								
7	300	10	3000	7																																								

Tabell V. Volum som må pipetteres av sitronsyre, $C_6H_8O_7$, 0,1 M, og dinatriumhydrogenfosfat, Na_2HPO_4 , 0,2 M, for å lage sitronsyre-fosfatbuffer med ulik pH [78].

pH at 25 °C	Citric acid		$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	
	Volume of 0.1M solution (cm ³)	Mass in 100cm ³ (g)	Volume of 0.2M solution (cm ³)	Mass in 100cm ³ (g)
2.6	89.1	1.87	10.9	0.78
2.8	84.15	1.77	15.85	1.14
3.0	79.45	1.67	20.55	1.47
3.2	75.3	1.58	24.7	1.77
3.4	71.5	1.50	28.5	2.04
3.6	67.8	1.42	32.2	2.31
3.8	64.5	1.36	35.5	2.54
4.0	61.45	1.29	38.55	2.76
4.2	58.6	1.23	41.4	2.97
4.4	55.9	1.17	44.1	3.16
4.6	53.25	1.12	46.75	3.35
4.8	50.7	1.07	49.3	3.53
5.0	48.5	1.02	51.5	3.69
5.2	46.4	0.97	53.6	3.84
5.4	44.25	0.93	55.75	3.99
5.6	42.0	0.88	58.0	4.16
5.8	39.55	0.83	60.45	4.33
6.0	36.85	0.77	63.15	4.52
6.2	33.9	0.71	66.1	4.74
6.4	30.75	0.65	69.25	4.96
6.6	27.25	0.57	72.75	5.21
6.8	22.75	0.48	77.25	5.53
7.0	17.65	0.37	82.35	5.90
7.2	13.05	0.27	86.95	6.23
7.4	9.15	0.19	90.85	6.51
7.6	6.35	0.13	93.65	6.71

Tabell VI. Metoder for tillaging av løsninger til lipolytisk aktivitet.

Løsninger til lipolytisk aktivitet			
Løsning	Kjemikalier	Prøveopparbeidelse	
1 M Tris-HCl buffer (pH 7,5)	Tris(hydroksymetyl)aminometanhydroklorid (Tris-HCl), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$	Vei 121,14 g Tris-HCl i en 1 L målekolbe. Tilsett omtrent 800 mL destillert vann og bland løsningen på en magnetrører til alt stoff er oppløst. Juster pH til litt under 7,5 med 2 M NaOH, da pH kan øke. Tilsett destillert vann til 1 L. Overfør løsningen til en pyrexflaske. Oppbevares kaldt og pH justeres til 7,5 før bruk dersom pH ikke er optimal.	
Standardserie, 4-Methylumbelliferone (4-MU), fortynnes fra 1000 μM standardløsning (0,17616 g + 1 L destillert vann) med destillert vann i henhold til tabellen. 4-MU er vanskelig å løse, og løsningen må derfor stå på røring i mange timer. (Ble laget Maria A. M.)	Standard	μL 4-MU [μL]	Destillert vann [mL]
	1 μM	10	9,99
	2,5 μM	25	9,975
	5 μM	50	9,95
	10 μM	100	9,9
	15 μM	150	9,85
Standardserien er holdbar i opptil 6 måneder.			
2:1 kloroform og metanol blanding (v/v) (Ble laget av masterstudenter)	Kloroform, CHCl_3 Metanol, CH_3OH	Bland 2:1 (v/v) av kloroform og metanol i en pyrexflaske til ønsket mengde.	
0,15 M Natriumklorid (Ble laget av masterstudenter)	Natriumklorid, NaCl	Fortynn med destillert vann NaCl til ønsket molaritet og volum.	

Tabell VII. Metoder for tillaging av løsninger til frie fettsyrer.

Løsninger til frie fettsyrer (FFA)							
Løsning	Kjemikalier			Prøveopparbeidelse			
Standardløsninger til standardkurve. 4,8 mL isooktan tilsettes til 14 kimaxrør (2 serier, 7 konsentrasjoner). Tilsett x μL isooktan til rørene i henhold til tabellen, og tilsett x μL standardløsning til rørene i henhold til tabellen.	Rør nr.	1	2	3	4	5	6
	n oljesyre (μmol)	0,0 (blank)	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0
	mL isooktan	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
	μL isooktan	200	175	150	125	100	50
	μL standardløsning	0	25	50	75	100	150

Vedlegg 4: Rådata og beregninger for proteolytisk aktivitet

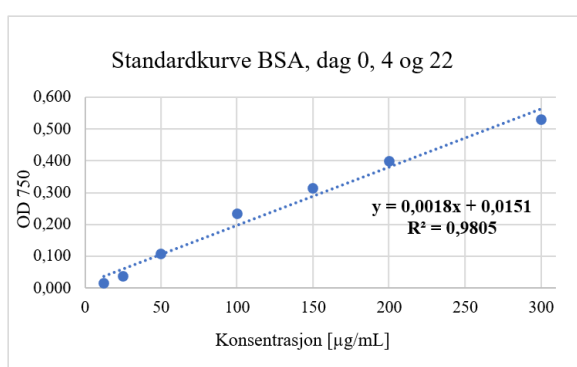
Excel dokumentet som ble brukt til beregning for proteolytisk aktivitet er utarbeidet fra dokumenter som ble tilsendt fra Forsker/dr.grads-stipendiat Maria Alquiza Madina. *Figur I* og *II* (linje 9-11) viser absorbansverdien som ble målt for hver standardløsning BSA, og gjennomsnittsverdien (linje 12) ble benyttet for å lage standardkurvene i henholdsvis *Figur III* og *IV*. Linje 4 og 5 i *Figur I* og *II* viser henholdsvis stigningstallet og konstantleddet fra regresjonslinjen i *Figur III* og *IV*. Ensilasjen fra lagringsdag 0 refererer til fiskemassen.

05.04.2024		Absorbansverdier for standardkurve BSA for dag 0, 4 og 22						
a:	0,0018							
b:	0,0151							
		Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7
750 nm		12,5	25	50	100	150	200	300
[µg/mL]								
Parallel 1		0,015	0,038	0,109	0,223	0,309	0,405	0,527
Parallel 2		0,016	0,038	0,106	0,253	0,322	0,4	0,533
Parallel 3		0,017	0,036	0,106	0,227	0,309	0,392	0,531
Gjennomsnitt		0,016	0,037	0,107	0,234	0,313	0,399	0,530

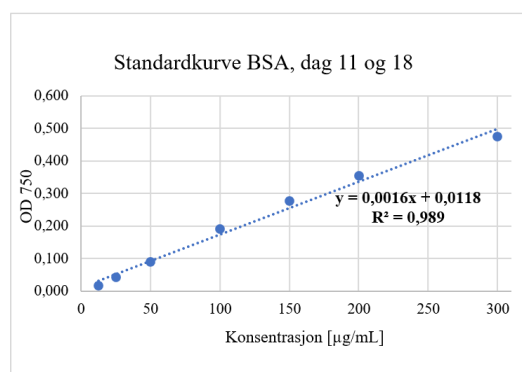
Figur I. Absorbansverdier som ble brukt til å lage standardkurven BSA for ensilasjeprøvene fra lagringsdag 0, 4 og 22.

09.04.2024		Absorbansverdier for standardkurve BSA for dag 11 og 18						
a:	0,0016							
b:	0,0118							
		Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7
750 nm		12,5	25	50	100	150	200	300
[µg/mL]								
Parallel 1		0,016	0,044	0,095	0,196	0,28	0,37	0,477
Parallel 2		0,016	0,044	0,091	0,188	0,274	0,343	0,48
Parallel 3		0,016	0,039	0,087	0,187	0,275	0,348	0,468
Gjennomsnitt		0,016	0,042	0,091	0,190	0,276	0,354	0,475

Figur II. Absorbansverdier som ble brukt til å lage standardkurven BSA for ensilasjeprøvene fra lagringsdag 11 og 18.



Figur III. Standardkurve BSA som ble brukt til å beregne Lowry proteininnhold i hver ensilasjeprøve, samt proteolytisk aktivitet for hver ensilasjeprøve, for prøver fra lagringsdag 0, 4 og 22.



Figur IV. Standardkurve BSA som ble brukt til å beregne Lowry proteininnhold i hver ensilasjeprøve, samt proteolytisk aktivitet for hver ensilasjeprøve, for prøver fra lagringsdag 11 og 18.

Figur V og VI viser mengde proteiner i hver ensilasjeprøve [mg/mL] (linje 28) beregnet fra Lowry standardkurven, og denne verdien ble brukt videre for å bestemme proteolytisk aktivitet. Linje 15 viser hvilken prøve som er analysert. Linje 16 viser hvor mye ensilasje som ble innveid. Linje 17 viser hvor mye proteinekstrakt ensilasjeprøven inneholdt etter tilsats av 20 mL vann, og det er dette ekstraktet som har blitt behandlet videre. Prøvens (ekstraktet) fortykning er vist i linje 18. Linje 19-21 viser målt absorbans. Proteinkonsentrasjon, beregnet fra regresjonslinjen i Figur III og IV for hver absorbansmåling, er vist i linje 22-24. Linje 25 viser gjennomsnittsverdien av proteinkonsentrasjonen, og denne verdien er multiplisert med fortykningen i linje 18 for å finne ufortynnet prøve i linje 27. Standardavviket for beregnet proteinkonsentrasjon vises i linje 26. Verdien i den ufortynnede prøven er dividert med 1000 for å få riktig enhet [mg/mL]. Linje 29 viser mg løselige proteiner per g våtvekt ensilasje beregnet fra proteinkonsentrasjonen multiplisert med volum ekstrakt, og dividert med masse innveid ensilasje. Figur VII viser beregningsformler for kolonne C i Figur V. Kolonne D-I i Figur V og C-H i Figur VI er beregnet på samme måte.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
15	Prove		K2 D0 1	K2 4-1 D4 A	K2 3,5-1 D4 A	K2 3-1 D4 A	K2 4-1 D22 A	K2 3,5-1 D22 A	K2 3-1 D22 A
16	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,07	20,05	20,01	20,02	20,06	20,10	20,07
17	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		20,68	22,90	25,39	24,76	21,67	24,88	26,04
18	Fortynning		500	200	200	200	200	200	200
19	750 nm	Parallel 1	0,109	0,288	0,330	0,264	0,324	0,337	0,295
20		Parallel 2	0,109	0,300	0,333	0,270	0,333	0,348	0,287
21		Parallel 3	0,108	0,304	0,333	0,273	0,328	0,335	0,292
22	Proteiner [µg/mL]	1	52,2	151,6	174,9	138,3	171,6	178,8	155,5
23		2	52,2	158,3	176,6	141,6	176,6	184,9	151,1
24		3	51,6	160,5	176,6	143,3	173,8	177,7	153,8
25	Gjennomsnitt		52,0	156,8	176,1	141,1	174,0	180,5	153,5
26	SD		0,3	4,6	1,0	2,5	2,5	3,9	2,2
27	Ufortynnet prøve [µg/mL]		25990,7	31359,3	35211,1	28211,1	34803,7	36100,0	30692,6
28	Prot. [mg/mL] (Lowry)		25,99	31,36	35,21	28,21	34,80	36,10	30,69
29	Proteiner [mg løselige proteiner/g våtvekt ensilasje]		26,78	35,82	44,68	34,89	37,60	44,68	39,82

Figur V. Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon ved hjelp av Lowry metoden i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 0, 4 og 22.

	A	B	C	D	E	F	G	H
15	Prove		K2 4-1 D11 A	K2 3,5-1 D11 A	K2 3-1 D11 A	K2 4-1 D18 A	K2 3,5-1 D18 A	K2 3-1 D18 A
16	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,04	20,00	20,01	20,01	20,07	20,02
17	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		24,32	24,70	25,91	24,08	25,07	24,78
18	Fortynning		200	200	200	200	200	200
19	750 nm	Parallel 1	0,285	0,298	0,230	0,307	0,305	0,257
20		Parallel 2	0,292	0,307	0,236	0,305	0,300	0,261
21		Parallel 3	0,320	0,291	0,239	0,294	0,310	0,258
22	Proteiner [µg/mL]	1	170,8	178,9	136,4	184,5	183,3	153,3
23		2	175,1	184,5	140,1	183,3	180,1	155,8
24		3	192,6	174,5	142,0	176,4	186,4	153,9
25	Gjennomsnitt		179,5	179,3	139,5	181,4	183,3	154,3
26	SD		11,6	5,0	2,9	4,4	3,1	1,3
27	Ufortynnet prøve [µg/mL]		35900,0	35858,3	27900,0	36275,0	36650,0	30858,3
28	Prot. [mg/mL] (Lowry)		35,90	35,86	27,90	36,28	36,65	30,86
29	Proteiner [mg løselige proteiner/g våtvekt ensilasje]		43,6	44,3	36,1	43,7	45,8	38,2

Figur VI. Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon ved hjelp av Lowry metoden i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter fra lagringsdag 11 og 18.

Beregningsformler for kolonne C Lowry**Linje: Formel:**

$$22 = (1/\$B\$4)*(C19-\$B\$5)$$

$$23 = (1/\$B\$4)*(C20-\$B\$5)$$

$$24 = (1/\$B\$4)*(C21-\$B\$5)$$

$$25 = \text{GJENNOMSNIITT}(C22:C24)$$

$$26 = \text{STDAV.S}(C22:C24)$$

$$27 = C25 * C18$$

$$28 = C27 / 1000$$

$$28 = ((C27 * C17) / C16) / 1000$$

Figur VII. Beregningsformler for kolonne C i Figur V. Kolonne D-I er beregnet på samme måte.

Figur VIII og IX viser peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje ved 10 °C som ble brukt for å lage grafene til Figur 27 og 29. Figur X og XI viser peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje ved 35 °C som ble brukt for å lage grafene til Figur 28 og 30. Linje 15 viser hvilken temperatur prøvene er inkubert ved, og linje 16 viser hvilken prøve som er analysert. Inkubasjonstiden vises i linje 17, masse innveid ensilasje vises i linje 18 og volum ekstrakt vises i linje 19. Linje 20 viser hvilken fortykning prøven hadde. Absorbansen som ble målt av prøvene (ekstraktet) fortynnet 1:50 og 1:20 vises i linje 21-23. De røde tallene er avvikene og derfor ikke tatt med i beregningene. Linje 24-26 viser peptidkonsentrasjon beregnet fra standardkurvene fra Figur III og IV. Gjennomsnittskonsentrasjonen vises i linje 27, og standardavviket i linje 28. Linje 29 viser konsentrasjonen i «ufortynnet prøve» beregnet ved å multiplisere gjennomsnittskonsentrasjonen med 4 for så å dividere med 0,4. Det er fordi prøvene 1:50 og 1:20 fortynges med 2 mL TCA + 1,2 mL buffer + 0,4 mL prøve + 0,4 mL substrat (= 4 mL), og prøven er bare på 0,4 mL. Linje 30 viser konsentrasjonen av peptider i helt ufortynnede prøver dannet ved å subtrahere nullprøven fra de enzymaktive prøvene, samt multiplisere begge med fortykningen i linje 20. Linje 31 viser proteinkonsentrasjonen fra Figur V og VI, og [mg peptider/g løselige proteiner] i linje 32 beregnes ved å dividere linje 30 med linje 31 (samt multiplisere med 1000 over og under brøkstreken for å få riktig enhet). Linje 33 viser konsentrasjonen per time. Linje 34 viser mg peptider per g våtvekt ensilasje beregnet ved å multiplisere linje 32 med den opprinnelige proteinkonsentrasjonen fra Figur V og VI (linje 29), samt dividere med 1000 for å få riktig enhet. Figur XII viser beregningsformler for kolonne C i Figur VII, og kolonne D-P er beregnet på samme måte. Kolonnene C-N i Figur IX og XI, og kolonnene C-P i Figur X er beregnet på samme måte.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
15	Temperatur		10 °C													
16	Prove		K2 6.7 D0 1 0-tid prove		K2 4-1 D4 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D4 A 0-tid prove		K2 3-1 D4 A 0-tid prove		K2 4-1 D22 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D22 A 0-tid prove		K2 3-1 D22 A 0-tid prove	
17	Inkubasjonstid [h]		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,07	20,07	20,05	20,05	20,01	20,01	20,02	20,02	20,06	20,06	20,10	20,10	20,07	20,07
19	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		20,68	20,68	22,90	22,90	25,39	25,39	24,76	24,76	21,67	21,67	24,88	24,88	26,04	26,04
20	Fortynning		50	50	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	750 nm	Parallel 1	0,035	0,037	0,253	0,238	0,299	0,286	0,242	0,214	0,278	0,279	0,310	0,281	0,261	0,260
22		Parallel 2	0,034	0,031	0,258	0,247	0,306	0,284	0,240	0,237	0,286	0,272	0,293	0,306	0,277	0,268
23		Parallel 3	0,032	0,030	0,267	0,251	0,280	0,277	0,245	0,233	0,279	0,263	0,296	0,311	0,312	0,264
24	Peptider [µg/mL] TCA	1	11,1	12,2	132,2	123,8	157,7	150,5	126,1	110,5	146,1	146,6	163,8	147,7	136,6	136,1
25		2	10,5	8,8	134,9	128,8	161,6	149,4	124,9	123,3	150,5	142,7	154,4	161,6	145,5	140,5
26		3	9,4	8,3	139,9	131,1	147,2	145,5	127,7	121,1	146,6	137,7	156,1	164,4	164,9	138,3
27	Gjennomsnitt		9,9	8,6	135,7	127,9	157,9	149,9	126,2	118,3	148,6	140,2	163,8	147,7	155,2	139,4
28	SD		0,79	0,39	3,94	3,70	2,75	0,79	1,40	6,83	2,75	3,54	#DIV/0!	#DIV/0!	13,75	1,57
29	*Ufortynnet prøve [µg/mL]		99,4	85,6	1356,9	1279,1	1596,7	1499,4	1262,4	1182,8	1485,6	1402,2	1638,3	1477,2	1552,2	1393,9
30	Minus 0-tid [µg/mL]		694,4		1555,6		1944,4		1592,6		1666,7		3222,2		3166,7	
31	Prot. [mg/mL] (Lowry)		25,99		31,36		35,21		28,21		34,80		36,10		30,69	
32	[mg peptider/g løselige proteiner]		26,7		49,6		55,2		56,5		47,9		89,3		103,2	
33	[mg peptider/g løselige proteiner 1 h]		26,72		49,60		55,22		56,45		47,89		89,26		103,17	
34	[mg peptider/g våtvekt ensilasje]		0,72		1,78		2,47		1,97		1,80		3,99		4,11	

Figur VIII. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C fra lagringsdag 0, 4 og 22. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje. Målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse for fiskemassen fra dag 0.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
15	Temperatur		10 °C												
16	Prove		K2 4-1 D11 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D11 A 0-tid prove		K2 3-1 D11 A 0-tid prove		K2 4-1 D18 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D18 A 0-tid prove		K2 3-1 D18 A 0-tid prove		
17	Inkubasjonstid [h]		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
18	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,04	20,04	20,00	20,00	20,01	20,01	20,01	20,01	20,01	20,07	20,07	20,02	20,02
19	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		24,32	24,32	24,70	24,70	25,91	25,91	24,08	24,08	25,07	25,07	24,78	24,78	
20	Fortynning		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
21	750 nm	Parallel 1	0,269	0,265	0,280	0,276	0,226	0,232	0,282	0,277	0,288	0,273	0,244	0,216	
22		Parallel 2	0,273	0,275	0,284	0,281	0,230	0,230	0,314	0,283	0,302	0,285	0,241	0,237	
23		Parallel 3	0,251	0,248	0,270	0,266	0,235	0,228	0,284	0,267	0,288	0,288	0,250	0,235	
24	Peptider [µg/mL] TCA	1	160,8	158,3	167,6	165,1	133,9	137,6	168,9	165,8	172,6	163,3	145,1	127,6	
25		2	163,3	164,5	170,1	168,3	136,4	136,4	188,9	169,5	181,4	170,8	143,3	140,8	
26		3	149,5	147,6	161,4	158,9	139,5	135,1	170,1	159,5	172,6	172,6	148,9	139,5	
27	Gjennomsnitt		155,1	152,9	166,4	164,1	139,5	135,1	169,5	162,6	177,0	167,0	145,8	136,0	
28	SD		7,95	7,51	4,51	4,77	#DIV/0!	#DIV/0!	0,88	4,42	6,19	5,30	2,86	7,24	
29	*Ufortynnet prøve [µg/mL]		1551,3	1529,4	1663,8	1640,8	1395,0	1351,3	1695,0	1626,3	1770,0	1670,0	1457,5	1359,6	
30	Minus 0-tid [µg/mL]		437,5		458,3		875,0		1375,0		2000,0		1958,3		
31	Prot. [mg/mL] (Lowry)		35,90		35,86		27,90		36,28		36,65		30,86		
32	[mg peptider/g løselige proteiner]		12,19		12,78		31,36		37,90		54,57		63,46		
33	[mg peptider/g løselige proteiner 1 h]		12,19		12,78		31,36		37,90		54,57		63,46		
34	[mg peptider/g våtvekt ensilasje]		0,53		0,57		1,13		1,65		2,50		2,42		

Figur IX. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 10 °C fra lagringsdag 11 og 18. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
15	Temperatur		35 °C													
16	Prove		K2 6,7 D0 1 0-tid prove		K2 4-1 D4 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D4 A 0-tid prove		K2 3-1 D4 A 0-tid prove		K2 4-1 D22 A 0-tid prove		K2 3,5-1 D22 A 0-tid prove		K2 3-1 D22 A 0-tid prove	
17	Inkubasjonstid [h]		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,07	20,07	20,05	20,05	20,01	20,01	20,02	20,02	20,06	20,06	20,10	20,10	20,07	20,07
19	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		20,68	20,68	22,90	22,90	25,39	25,39	24,76	24,76	21,67	21,67	24,88	24,88	26,04	26,04
20	Fortynning		50	50	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	750 nm	Parallel 1	0,035	0,027	0,273	0,245	0,324	0,275	0,274	0,235	0,305	0,290	0,328	0,316	0,291	0,268
22		Parallel 2	0,034	0,029	0,229	0,254	0,337	0,297	0,282	0,233	0,307	0,293	0,340	0,306	0,283	0,277
23		Parallel 3	0,034	0,030	0,272	0,244	0,336	0,283	0,291	0,251	0,312	0,292	0,278	0,293	0,293	0,285
24	Peptider [µg/mL] TCA	1	11,1	6,6	143,3	127,7	171,6	144,4	143,8	122,2	161,1	152,7	173,8	167,2	153,3	140,5
25		2	10,5	7,7	118,8	132,7	178,8	156,6	148,3	121,1	162,2	154,4	180,5	161,6	148,8	145,5
26		3	10,5	8,3	142,7	127,2	178,3	148,8	153,3	131,1	164,9	153,8	146,1	154,4	154,4	149,9
27	Gjennomsnitt		10,7	7,5	143,0	127,4	176,2	149,9	148,5	124,8	162,7	153,6	177,2	164,4	152,2	145,3
28	SD		0,32	0,85	0,39	0,39	4,02	6,19	4,72	5,48	2,00	0,85	4,71	3,93	2,94	4,72
29	*Ufortynnet prøve [µg/mL]		106,9	75,4	1430,0	1274,4	1762,4	1499,4	1484,6	1247,6	1627,2	1536,5	1771,7	1643,9	1521,7	1453,1
30	Minus 0-tid [µg/mL]		1574,1		3111,1		5259,3		4740,7		1814,8		2555,6		1370,4	
31	Prot. [mg/mL] (Lowry)		25,99		31,36		35,21		28,21		34,80		36,10		30,69	
32	[mg peptider/g løselige proteiner]		60,6		99,2		149,4		168,0		52,1		70,8		44,6	
33	[mg peptider/g løselige proteiner 1 h]		60,6		99,2		149,4		168,0		52,1		70,8		44,6	
34	[mg peptider/g våtvekt ensilasje]		1,62		3,55		6,67		5,86		1,96		3,16		1,78	

Figur X. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C fra lagringsdag 0, 4 og 22. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje. Målt i mg peptider per g våtvekt fiskemasse for fiskemassen fra dag 0.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
15	Temperatur		35 °C											
16	Prøve		K2 4-1 D11 A	0-tid prøve	K2 3.5-1 D11 A	0-tid prøve	K2 3-1 D11 A	0-tid prøve	K2 4-1 D18 A	0-tid prøve	K2 3.5-1 D18 A	0-tid prøve	K2 3-1 D18 A	0-tid prøve
17	Inkubasjonstid [h]		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	Masse ensilasje for ekstrahering [g]		20,04	20,04	20,00	20,00	20,01	20,01	20,01	20,01	20,07	20,07	20,02	20,02
19	Volum ekstrakt (filtrat) [mL]		24,32	24,32	24,70	24,70	25,91	25,91	24,08	24,08	25,07	25,07	24,78	24,78
20	Fortynning		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	750 nm	Parallel 1	0,243	0,228	0,279	0,266	0,240	0,211	0,300	0,250	0,270	0,279	0,256	0,235
22		Parallel 2	0,258	0,248	0,292	0,256	0,228	0,231	0,283	0,255	0,281	0,261	0,256	0,225
23		Parallel 3	0,270	0,259	0,297	0,257	0,243	0,228	0,280	0,261	0,253	0,267	0,259	0,210
24	Peptider [µg/mL] TCA	1	144,5	135,1	167,0	158,9	142,6	124,5	180,1	148,9	161,4	167,0	152,6	139,5
25		2	153,9	147,6	175,1	152,6	135,1	137,0	169,5	152,0	168,3	155,8	152,6	133,3
26		3	161,4	154,5	178,3	153,3	144,5	135,1	167,6	155,8	150,8	159,5	154,5	123,9
27	Gjennomsnitt		153,3	145,8	173,5	154,9	143,6	129,8	172,4	152,2	168,3	155,8	153,3	132,2
28	SD		8,45	9,82	5,81	3,44	1,33	7,51	6,74	3,44	#DIV/0!	#DIV/0!	1,08	7,86
29	*Ufortynnet prøve [µg/mL]		1532,5	1457,5	1734,6	1549,2	1435,6	1298,1	1724,2	1522,1	1682,5	1557,5	1532,5	1322,1
30	Målt 0-tid [µg/mL]		1500,0		3708,3		2750,0		4041,7		2500,0		4208,3	
31	Prot. [mg/mL] (Lowry)		35,90		35,86		27,90		36,28		36,65		30,86	
32	[mg peptider/g løselige proteiner]		41,78		103,42		98,57		111,42		68,21		136,38	
33	[mg peptider/g løselige proteiner 1 h]		41,78		103,42		98,57		111,42		68,21		136,38	
34	[mg peptider/g våtvekt ensilasje]		1,82		4,58		3,56		4,86		3,12		5,21	

Figur XI. Rådata og beregnede verdier for proteolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved 35 °C fra lagringsdag 11 og 18. Proteolytisk aktivitet målt i peptidkonsentrasjonen i mg peptider per g løselige proteiner og mg peptider per g våtvekt ensilasje.

Beregningsformler for kolonne C proteolytisk aktivitet	
Linje:	Formel:
24	$= (1/ \$B\$4) * (C21 - \$B\$5)$
25	$= (1/ \$B\$4) * (C22 - \$B\$5)$
26	$= (1/ \$B\$4) * (C23 - \$B\$5)$
27	$= GJENNOMSNIITT(C25:C26)$
28	$= STDAV.S(C25:C26)$
29	$= (C27 * 4) / 0,4$
30	$= (C29 * C20) - (D29 * D20)$
31	$= \text{Lowry raw material (0,4,22)} * C28$
32	$= (C30 * 1000) / (1000 * C31)$
33	$= C32 / C17$
34	$= C32 * (\text{Lowry raw material (0,4,22)} * C29) / 1000$

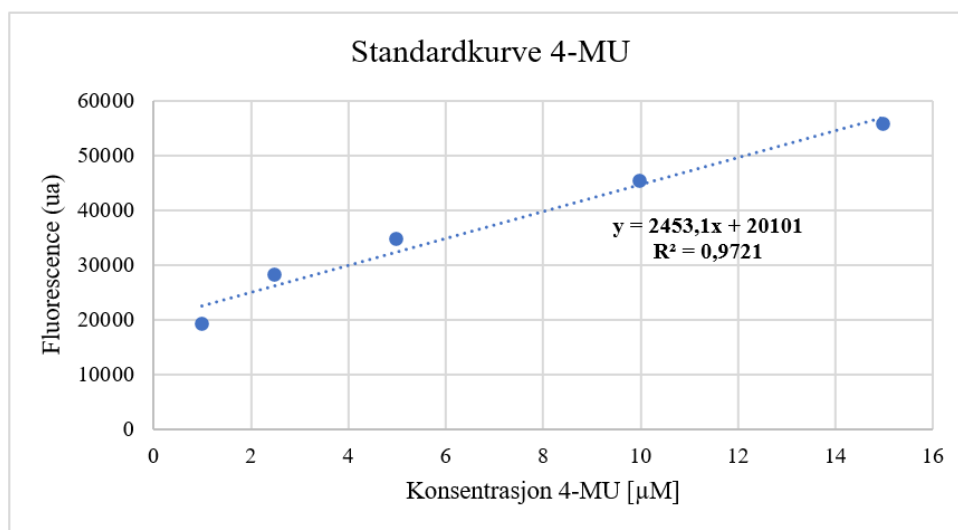
Figur XII. Beregningsformler for kolonne C i Figur VIII. Kolonne D-P er beregnet på samme måte. 'Lowry raw material (0,4,22)' er verdien hentet fra excelarket hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.

Vedlegg 5: Rådata og beregninger for lipolytisk aktivitet

Excel dokumentet som ble brukt til beregning for lipolytisk aktivitet er utarbeidet fra dokumenter som ble tilsendt fra Forsker/dr.grads-stipendiat Maria Alquiza Madina. *Figur XIII* (kolonne D-E, linje 6-10) viser fluorescensverdiene som ble målt for hver standardløsning 4-MU, og gjennomsnittsverdien (Kolonne C) ble benyttet for å lage standardkurven i *Figur XIV*. Linje 14 og 15 i *Figur XIII* viser henholdsvis stigningstallet og konstantleddet fra regresjonslinjen i *Figur XIV*.

	B	C	D	E	F
3	16.04.2024				
4					
5	Standard (µM)	Fluorescence (mean)	Fluorescence (ua)		
6	1	19040	19859	18523	18738
7	2,5	28102	27670	29125	27510
8	5	34621	34366	34297	35201
9	10	45291	45808	50169	39896
10	15	55629	55232	59893	51762
11					
12					
13				Y = AX + B	
14				A =	2453,09
15				B =	20100,93

Figur XIII. Fluorescensverdiene som ble målt og brukt til å lage standardkurven 4-MU.



Figur XIV. Standardkurve 4-MU som ble brukt til å beregne lipolytisk aktivitet.

Figur XV, XVI, XVII, XVIII og XIX viser fluorescensverdiene som ble målt for enzymprøvene og blankprøvene fra henholdsvis dag 0, 4, 11, 18 og 22 ved 10 °C og 35 °C. Alle figurene viser også standardavvik og beregnet konsentrasjon 4-MU fra regresjonslinjen fra *Figur XIV*. Linje 25 i kolonne C i *Figur XV* viser beregningsformel for konsentrasjonen. De fleste prøvene hadde fluorescensverdier utenfor standardkurven, men tidsmessig var det ikke mulighet til å gjenta prosedyren. De røde tallene er avvikende og ikke tatt med i beregningene.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
21	DAG 0												
22	Dilution =	1/50	[4-MU] (µM)	Fluorescence (ua)			MEAN	SD	Blank			MEAN BLANK	SD
23	Sample =	pH 6.7 (10 C)	12,3422	53186	46205	51741	50377	3685	13154	14106	12904	13388	634
24		pH 6.7 (35 C)	12,0089	50027	47715	50937	49560	1661	11919	10135	12527	11527	1243
25			=(G23-\$F\$15)/\$F\$14										

Figur XV. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra fiskemassen ved dag 0.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
21	DAG 4												
22	Dilution =	1/20	[4-MU] (µM)	Fluorescence (ua)			MEAN	SD	Blank			MEAN BLANK	SD
23	Sample =	pH 3 (10 C)	-3,1240	12134	11799	12741	12438	429	12333	12116	12388	12279	144
24		pH 3.5 (10 C)	-2,9924	12809	12844	12628	12760	116	12428	10590	13005	12717	408
25		pH 4 (10 C)	-3,2409	12884	10102	13466	12151	1798	12019	11701	12034	11918	188
26		pH 3 (35 C)	-3,4499	9815	9812	11638	11638	#DIV/0!	10038	11629	11779	11149	965
27		pH 3.5 (35 C)	-3,4992	12229	11434	10888	11517	674	11181	11855	9133	10723	1418
28		pH 4 (35 C)	-3,3250	12285	12794	10754	11944	1062	9355	9676	10124	9718	386

Figur XVI. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 4.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
21	DAG 11												
22	Dilution =	1/20	[4-MU] (µM)	Fluorescence (ua)			MEAN	SD	Blank			MEAN BLANK	SD
23	Sample =	pH 3 (10 C)	-3,4366	11561	11785	11666	11671	112	11570	12463	9822	11285	1343
24		pH 3.5 (10 C)	-3,1516	12399	12293	12417	12370	67	12318	12380	12096	12265	149
25		pH 4 (10 C)	-3,1029	11976	12921	12571	12489	478	11921	11875	12085	11960	110
26		pH 3 (35 C)	-3,1651	12452	11555	13003	12337	731	12068	12227	12226	12174	92
27		pH 3.5 (35 C)	-3,0385	12455	12779	12708	12647	170	12200	12595	11493	12096	558
28		pH 4 (35 C)	-3,1719	12543	12097	13588	12320	315	9738	11174	10078	10330	750

Figur XVII. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 11.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
21	DAG 18												
22	Dilution =	1/20	[4-MU] (µM)	Fluorescence (ua)			MEAN	SD	Blank			MEAN BLANK	SD
23	Sample =	pH 3 (10 C)	-3,6222	11112	11153	11381	11215	145	11333	11550	9919	10934	886
24		pH 3.5 (10 C)	-3,3681	11673	11663	12180	11839	296	11780	11095	11421	11432	343
25		pH 4 (10 C)	-3,3922	11695	11864	11780	11780	120	11404	10994	11630	11343	322
26		pH 3 (35 C)	-3,4977	10703	12109	11750	11521	731	11816	10857	9773	11337	678
27		pH 3.5 (35 C)	-2,8242	13613	10619	12733	13173	622	11819	12358	12748	12308	466
28		pH 4 (35 C)	-3,2695	10414	12817	13011	12081	1447	10039	8500	10239	10139	141

Figur XVIII. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 18.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
21	DAG 22												
22	Dilution =	1/20	[4-MU] (µM)	Fluorescence (ua)			MEAN	SD	Blank			MEAN BLANK	SD
23	Sample =	pH 3 (10 C)	-3,2999	13301	11796	12216	12006	297	11922	11685	11348	11804	168
24		pH 3.5 (10 C)	-3,3763	11585	11860	12011	11819	216	12633	11998	11546	11772	320
25		pH 4 (10 C)	-3,4962	11070	11581	11922	11524	429	11248	13277	11392	11320	102
26		pH 3 (35 C)	-3,4962	11544	12542	11505	11525	28	11285	10590	10801	10892	356
27		pH 3.5 (35 C)	-3,3030	11982	14634	9379	11998	2628	10330	11981	8307	11156	1167
28		pH 4 (35 C)	-3,1102	12399	12487	12528	12471	66	10759	8662	12544	10655	1943

Figur XIX. Fluorescensverdier for enzymprøvene og blankprøvene fra ensilasjen ved lagringsdag 22.

Figur XX (linje 57 og 59) viser beregnet lipase aktivitet per mg vannløselige proteiner ([nmol/mg ws·min]), og lipase aktivitet per g våtvekt fiskemasse ([nmol/g våtvekt fiskemasse·min]) for fiskemassen fra dag 0 ved 10 °C og 35 °C. Disse verdiene ble henholdsvis brukt til å lage Figur 31 og 34. De tre øverste kolonnene viser verdier for enzymprøvene og de nederste viser verdier for blankprøvene. Linje 30 og 45 er hentet fra proteinkonsentrasjonen som ble beregnet for prøven fortynnet 1:500 med Lowry metoden, fra Figur V. Standardavviket for proteinkonsentrasjonen er hentet fra samme figur og vises i linje 31 og 46. Linje 32 og 47

viser volum prøve analysert i fluorimeteret, linje 33 og 48 viser fortynningen prøvene hadde, linje 34 og 49 viser volum enzymprøve og blankprøve inkubert, og linje 35 og 50 viser antall minutter prøvene ble inkubert. Beregningsformler for lipaseaktivitet for kolonne B for dag 0 vises i *Figur XXI*. Kolonne C ble beregnet på tilsvarende måte.

	A	B	C
27	DAG 0	pH 6,7 (10 C)	pH 6,7 (35 C)
28	Fluorescence (mean)	50377	49560
29	SD fluorescence	3685	1661
30	[Protein extract] (mg/ml)	25,99	25,99
31	SD protein	0,32	0,32
32	Volume sample (l)	0,00031	0,00031
33	Dilution factor enzyme	50	50
34	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04
35	Incubation time (min)	15	15
36	Total volume enzyme extract (ml)	-	-
37	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	12,26743	11,93612
38	(Fl-b)	30276,4	29458,7
39	SD	1,49309	0,67313
40			
41			
42		Blank pH 6,7 (10 C)	Blank pH 6,7 (35 C)
43	Fluorescence (mean)	13388	11527
44	SD fluorescens	634	1243
45	[Protein extract] (mg/ml)	25,99	25,99
46	SD protein	0,32	0,32
47	Volume sample (l)	0,00031	0,00031
48	Dilution factor enzyme	50	50
49	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04
50	Incubation time (min)	15	15
51	Total volume enzyme extract (ml)	-	-
52	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-2,71995	-3,47399
53	(Fl-b)	-6712,9	-8573,9
54	SD	0,00000	0,00000
55			
56		pH 6,7 (10 C)	pH 6,7 (35 C)
57	Final lipolytic activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	14,98738	15,41012
58	SD	1,49309	0,67313
59	[nmol/g våtvekt fiskemasse·min]	401,3723548	412,6935958

Figur XX. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7, ved 10 °C og 35 °C, fra dag 0. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt fiskemasse·min.

Beregningsformler for kolonne B lipolytisk aktivitet dag 0	
Linje:	Formel:
30	='Lowry raw material (0,4,22)!'SC\$28
31	='Lowry raw material (0,4,22)!'SC\$26
37	=\$((B28-\$F\$15)/\$F\$14)*((B32*B33*1000)/(B34*B35*B30)))
38	=B28-\$F\$15
39	=STØRST(0;(B38/B30)*ROT((B29/B38)^2 + (B32/B31)^2)*((B32*B33*1000)/(\$F\$14*B34*B35)))
52	=\$((B43-\$F\$15)/\$F\$14)*((B47*B48*1000)/(B49*B50*B45)))
53	=B43-\$F\$15
54	=STØRST(0;(B53/B45)*ROT((B44/B53)^2 + (B46/B45)^2)*((B47*B48*1000)/(\$F\$14*B49*B50)))
57	=B37-B52
58	=B39+B54
59	=B57 *('Lowry raw material (0,4,22)!'C29)

Figur XXI. Beregningsformler for kolonne B i Figur XX, og kolonne C er beregnet på samme måte. 'Lowry raw material (0,4,22)' er verdien hentet fra exceldokumentet hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.

Figur XXII, XXIII, XXIV, og XXV (linje 64 og 66) viser beregnet lipase aktivitet per mg vannløselige proteiner ([nmol/mg ws·min]) og lipase aktivitet per g våtvekt ensilasje ([nmol/g våtvekt ensilasje·min]) for henholdsvis dag 4, 11, 18 og 22 ved 10 °C og 35 °C. Disse verdiene ble brukt til å lage Figur 32, 33, 35 og 36. De øverste kolonnene i hver figur viser verdier for enzymprøvene og den nederste viser verdier for blankprøvene. Linje 37 og 52 er hentet fra proteinkonsentrasjonen som ble beregnet for prøvene fortynnet 1:200 med Lowry metoden, fra Figur V og VI. Standardavviket for proteinkonsentrasjonen er hentet fra de samme figurene og vises i linje 38 og 53. Linje 39 og 54 viser volum prøve analysert i fluorimeteret, linje 40 og 55 viser fortynningen prøvene hadde, linje 41 og 56 viser volum enzymprøve og blankprøve inkubert, og linje 42 og 57 viser antall minutter prøvene ble inkubert. Beregningsformler for lipaseaktivitet for kolonne B for dag 4 i Figur XXII vises i Figur XXVI. Kolonne C-G i Figur XXII og kolonne B-G for de resterende dagene ble beregnet på samme måte.

	A	B	C	D	E	F	G
34	DAG 4	pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
35	Fluorescence (mean)	12438	12760	12151	11638	11517	11944
36	SD fluorescence	429	116	1798	#DIV/0!	674	1062
37	[Protein extract] (mg/ml)	28,21	35,21	31,36	28,21	35,21	31,36
38	SD protein	2,55	0,96	4,63	2,55	0,96	4,63
39	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
40	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
41	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
42	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
43	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
44	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,14428	-0,87817	-1,06793	-1,26365	-1,02691	-1,09565
45	(F1-b)	-7663,4	-7340,6	-7950,3	-8462,9	-8583,9	-8156,6
46	SD	0,00000	0,00000	0,00000	#DIV/0!	0,00000	0,00000
47							
48							
49		Blank pH 3 (10 C)	Blank pH 3,5 (10 C)	Blank pH 4 (10 C)	Blank pH 3 (35 C)	Blank pH 3,5 (35 C)	Blank pH 4 (35 C)
50	Fluorescence (mean)	12279	12717	11918	11149	10723	9718
51	SD fluorescens	144	408	188	965	1418	386
52	[Protein extract] (mg/ml)	28,21	35,21	31,36	28,21	35,21	31,36
53	SD protein	2,55	0,96	4,63	2,55	0,96	4,63
54	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
55	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
56	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
57	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
58	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
59	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,16794	-0,88342	-1,09918	-1,33672	-1,12190	-1,39466
60	(F1-b)	-7821,9	-7384,4	-8182,9	-8952,3	-9377,9	-10382,6
61	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
62							
63		pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
64	Final lipolytic activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	0,02367	0,00524	0,03125	0,07307	0,09499	0,29901
65	SD	0,00000	0,00000	0,00000	#DIV/0!	0,00000	0,00000
66	[nmol/g våtvekt ensilasje·min]	0,825740556	0,234286839	1,119394207	2,549289457	4,243887829	10,70961965

Figur XXII. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 4. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.

	A	B	C	D	E	F	G
34	DAG 11	pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
35	Fluorescence (mean)	11671	12370	12489	12337	12647	12320
36	SD fluorescence	112	67	478	731	170	315
37	[Protein extract] (mg/ml)	27,90	35,86	35,90	27,90	35,86	35,90
38	SD protein	2,86	5,01	11,58	2,86	5,01	11,58
39	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
40	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
41	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
42	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
43	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
44	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,27281	-0,90821	-0,89312	-1,17226	-0,87560	-0,91299
45	(Fl-b)	-8430,3	-7731,3	-7611,6	-7764,3	-7453,6	-7780,9
46	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
47							
48							
49		Blank pH 3 (10 C)	Blank pH 3,5 (10 C)	Blank pH 4 (10 C)	Blank pH 3 (35 C)	Blank pH 3,5 (35 C)	Blank pH 4 (35 C)
50	Fluorescence (mean)	11285	12265	11960	12174	12096	10330
51	SD fluorescens	1343	149	110	92	558	750
52	[Protein extract] (mg/ml)	27,90	35,86	35,90	27,90	35,86	35,90
53	SD protein	2,86	5,01	11,58	2,86	5,01	11,58
54	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
55	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
56	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
57	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
58	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
59	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,33104	-0,92055	-0,95519	-1,19687	-0,94036	-1,14649
60	(Fl-b)	-8815,9	-7836,3	-8140,6	-7927,3	-8004,9	-9770,9
61	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
62							
63		pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
64	Final lipolytic activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	0,05823	0,01233	0,06207	0,02461	0,06477	0,23350
65	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
66	[nmol/g våtvekt ensilasje·min]	2,103585703	0,546240678	2,704265373	0,889069497	2,868197084	10,17294535

Figur XXIII. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 11. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.

	A	B	C	D	E	F	G
34	DAG 18	pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
35	Fluorescence (mean)	11215	11839	11780	11521	13173	12081
36	SD fluorescence	145	296	120	731	622	1447
37	[Protein extract] (mg/ml)	30,86	36,65	36,28	30,86	36,65	36,28
38	SD protein	1,30	3,13	4,38	1,30	3,13	4,38
39	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
40	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
41	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
42	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
43	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
44	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,21295	-0,94963	-0,96631	-1,17127	-0,79626	-0,93134
45	(Fl-b)	-8885,6	-8262,3	-8321,4	-8580,3	-6927,9	-8020,3
46	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
47							
48							
49		Blank pH 3 (10 C)	Blank pH 3,5 (10 C)	Blank pH 4 (10 C)	Blank pH 3 (35 C)	Blank pH 3,5 (35 C)	Blank pH 4 (35 C)
50	Fluorescence (mean)	10934	11432	11343	11337	12308	10139
51	SD fluorescens	886	343	322	678	466	141
52	[Protein extract] (mg/ml)	30,86	36,65	36,28	30,86	36,65	36,28
53	SD protein	1,30	3,13	4,38	1,30	3,13	4,38
54	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
55	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
56	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
57	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
58	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
59	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,25135	-0,99637	-1,01704	-1,19641	-0,89564	-1,15681
60	(Fl-b)	-9166,9	-8668,9	-8758,3	-8764,4	-7792,6	-9961,9
61	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
62							
63		pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
64	Final lipolytic activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	0,03840	0,04674	0,05073	0,02514	0,09938	0,22547
65	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
66	[nmol/g våtvekt ensilasje·min]	1,46685168	2,13980067	2,214384059	0,960231698	4,549707327	9,842645663

Figur XXIV. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 18. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.

	A	B	C	D	E	F	G
34	DAG 22	pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
35	Fluorescence (mean)	12006	11819	11524	11525	11998	12471
36	SD fluorescence	297	216	429	28	2628	66
37	[Protein_extract] (mg/ml)	30,69	36,10	34,80	30,69	36,10	34,80
38	SD protein	2,25	3,89	2,51	2,25	3,89	2,51
39	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
40	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
41	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
42	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
43	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
44	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,11098	-0,96643	-1,03805	-1,17707	-0,94546	-0,92343
45	(Fl-b)	-8094,9	-8282,3	-8576,6	-8576,4	-8102,6	-7629,6
46	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
47							
48							
49		Blank pH 3 (10 C)	Blank pH 3,5 (10 C)	Blank pH 4 (10 C)	Blank pH 3 (35 C)	Blank pH 3,5 (35 C)	Blank pH 4 (35 C)
50	Fluorescence (mean)	11804	11772	11320	10892	11156	10655
51	SD fluorescens	168	320	102	356	1167	1943
52	[Protein_extract] (mg/ml)	30,69	36,10	34,80	30,69	36,10	34,80
53	SD protein	2,25	3,89	2,51	2,25	3,89	2,51
54	Volume sample (l)	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031	0,00031
55	Dilution factor enzyme	20	20	20	20	20	20
56	Volume incubated enzyme extract (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
57	Incubation time (min)	15	15	15	15	15	15
58	Total volume enzyme extract (ml)	-	-	-	-	-	-
59	Lipase activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	-1,13877	-0,97187	-1,06278	-1,26387	-1,04381	-1,14327
60	(Fl-b)	-8297,4	-8328,9	-8780,9	-9208,9	-8945,4	-9445,9
61	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
62							
63		pH 3 (10 C)	pH 3,5 (10 C)	pH 4 (10 C)	pH 3 (35 C)	pH 3,5 (35 C)	pH 4 (35 C)
64	Final lipolytic activity pr. mg water soluble protein (nmol/mg ws·min)	0,02779	0,00545	0,02473	0,08681	0,09835	0,21984
65	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
66	[nmol/g våtvekt ensilasje·min]	1,106742065	0,243326204	0,929811652	3,456861017	4,394645052	8,265160997

Figur XXV. Rådata og beregning av lipolytisk aktivitet i ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, ved 10 °C og 35 °C, fra lagringsdag 22. Verdiene er presentert i nmol per mg ws·min og nmol per g våtvekt ensilasje·min.

Beregningsformler for kolonne B lipolytisk aktivitet dag 4

Linje: Formel:

37 =Lowry raw material (0,4,22)!\$F\$28

38 =Lowry raw material (0,4,22)!\$F\$26

44 =(((B35-\$F\$15)/\$F\$14)*((B39*B40*1000)/(B41*B42*B37)))

45 =B35-\$F\$15

46 =STØRST(0;(B45/B37)*ROT((B36/B45)^2 + (B39/B38)^2)*((B39*B40*1000)/(\$F\$14*B41*B42)))

59 =(((B50-\$F\$15)/\$F\$14)*((B54*B55*1000)/(B56*B57*B52)))

60 =B50-\$F\$15

61 =STØRST(0;(B60/B52)*ROT((B51/B60)^2 + (B53/B52)^2)*((B54*B55*1000)/(\$F\$14*B56*B57)))

64 =B44-B59

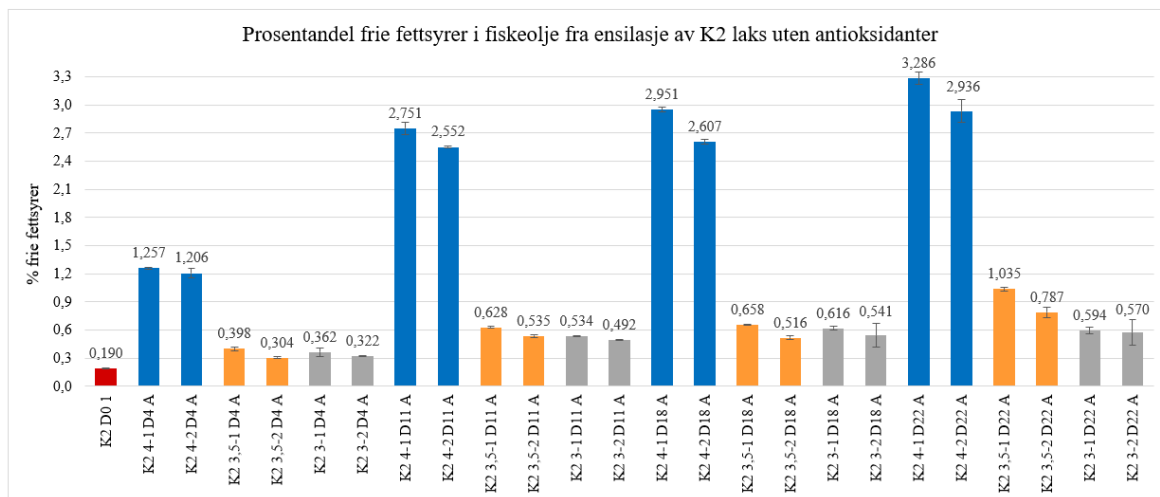
65 =B46+B61

66 =B64 *(Lowry raw material (0,4,22)!F29)

Figur XXVI. Beregningsformler for kolonne B i Figur XXII, og kolonne C-G er beregnet på samme måte. 'Lowry raw material (0,4,22)' er verdien hentet fra exceldokumentet hvor proteinkonsentrasjon med Lowry metoden ble beregnet.

Vedlegg 6: Rådata og beregninger for frie fettsyrer (FFA)

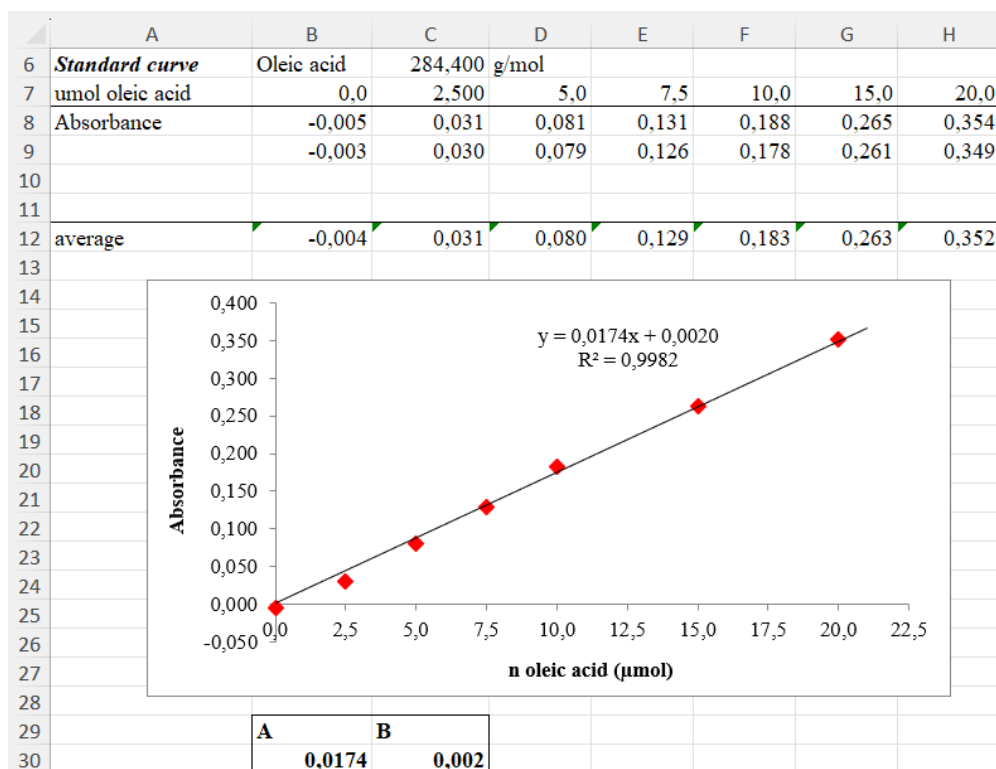
Figur XXVII viser prosentandelen av FFA for parallell A fra begge ensilasjebatchene uten antioksidanter fra alle uttaksdagene. Tabell VIII viser hvilke verdier som ble benyttet for å lage Figur 37 og XXVII. Absorbansverdier for standardserien og standardkurven som ble brukt til å beregne prosentandel FFA vises i Figur XXVIII.



Figur XXVII. Prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter, fra to ensilasjebatcher, ved pH 4 (de blå søylene), 3,5 (de oransje søylene) og 3 (de grå søylene) fra henholdsvis lagringsdag 4, 11, 18 og 22. Prosentandel FFA i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7 fra dag 0 er vist i rød søyle.

Tabell VIII. Verdier og standardavvik for prosentandel FFA i fiskeolje fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter, ved pH 4, 3,5 og 3 fra lagringsdag 4, 11, 18 og 22. I tillegg vises verdien og standardavviket for prosentandel FFA i fiskemasse av K2 laks ved pH 6,7.

Prove	% FFA	SD
K2 D0 1	0,190	0,010
K2 4-1 D4 A	1,257	0,009
K2 4-2 D4 A	1,206	0,052
K2 3,5-1 D4 A	0,398	0,021
K2 3,5-2 D4 A	0,304	0,010
K2 3-1 D4 A	0,362	0,044
K2 3-2 D4 A	0,322	0,002
K2 4-1 D11 A	2,751	0,065
K2 4-2 D11 A	2,552	0,008
K2 3,5-1 D11 A	0,628	0,013
K2 3,5-2 D11 A	0,535	0,011
K2 3-1 D11 A	0,534	0,005
K2 3-2 D11 A	0,492	0,003
K2 4-1 D18 A	2,951	0,028
K2 4-2 D18 A	2,607	0,028
K2 3,5-1 D18 A	0,658	0,003
K2 3,5-2 D18 A	0,516	0,022
K2 3-1 D18 A	0,616	0,020
K2 3-2 D18 A	0,541	0,126
K2 4-1 D22 A	3,286	0,061
K2 4-2 D22 A	2,936	0,124
K2 3,5-1 D22 A	1,035	0,020
K2 3,5-2 D22 A	0,787	0,053
K2 3-1 D22 A	0,594	0,036
K2 3-2 D22 A	0,570	0,135



Figur XXVIII. Absorbansverdier for tillaging av standardkurve med oljesyre, og standardkurven benyttet til å beregne prosentandel FFA, i fiskeolje fra fiskemasse av K2 laks og ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved en lagringstid på 22 dager.

Figur XXIX, XXX, XXXI, XXXII og XXXIII viser beregnet gjennomsnittlig prosentandel FFA med standardavvik i kolonne I, i fiskeolje fra henholdsvis lagringsdag 0, 4, 11, 18 og 22. Kolonne A viser hvilken prøve som er analysert. Kolonne B viser hvor mye masse fett som ble innveid og kolonne C viser absorbansverdien som ble målt. Kolonne D viser mol fett beregnet fra regresjonslinjen i Figur XXVIII. Kolonne E viser mg fett beregnet fra antall mol og den molare massen til oljesyre. Kolonne F viser mg/g og kolonne G viser prosentandelen frie fettsyrer. De grønne rutene er multiplisert med 0,8 på grunn av feil volum av prøven. Figur XXXIV viser beregningsformlene for en parallell av fiskeoljeprøven fra fiskemassen ved dag 0, og de resterende resultatene er beregnet på samme måte.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
31						k/kg			
32	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
33		0,2286	0,034	1,839	0,52	2,29	0,183	average	0,190
34	K2 D0	0,3794	0,061	3,391	0,96	2,54	0,203	stdev.p	0,010
35		0,2955	0,035	1,897	0,54	1,83	0,183		

Figur XXIX. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra fiskemasse av K2 laks uten antioksidanter ved pH 6,7, fra dag 0.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
36	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
37		0,0950	0,093	5,230	1,49	15,66	1,253	average	1,257
38	D4 4 - 1	0,1081	0,107	6,034	1,72	15,88	1,270	stdev.p	0,009
39		0,2899	0,279	15,920	4,53	15,62	1,249		
40	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
41		0,1181	0,109	6,149	1,75	14,81	1,185	average	1,206
42	D4 4 - 2	0,1105	0,110	6,207	1,77	15,98	1,278	stdev.p	0,052
43		0,1936	0,173	9,828	2,79	14,44	1,155		
44	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
45		0,1790	0,043	2,356	0,67	3,74	0,374	average	0,398
46	D4 3,5 - 1	0,2534	0,068	3,793	1,08	4,26	0,426	stdev.p	0,021
47		0,2036	0,051	2,816	0,80	3,93	0,393		
48	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
49		0,1109	0,029	1,552	0,44	3,98	0,318	average	0,304
50	D4 3,5 - 2	0,0935	0,023	1,207	0,34	3,67	0,294	stdev.p	0,010
51		0,2393	0,046	2,529	0,72	3,01	0,301		
52	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
53		0,0844	0,024	1,264	0,36	4,26	0,341	average	0,362
54	D4 3 - 1	0,2347	0,078	4,368	1,24	5,29	0,423	stdev.p	0,044
55		0,1942	0,050	2,759	0,78	4,04	0,323		
56	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
57		0,1063	0,028	1,494	0,42	4,00	0,320	average	0,322
58	D4 3 - 2	0,0846	0,023	1,207	0,34	4,06	0,325	stdev.p	0,002
59		0,2277	0,062	3,226	0,92	4,03	0,322		

Figur XXX. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 4.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
60	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
61		0,1031	0,224	12,759	3,63	35,19	2,816	average	2,751
62	D11 4 - 1	0,0998	0,207	11,782	3,35	33,57	2,686	stdev.p	0,065
63	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
64		0,1037	0,205	11,667	3,32	32,00	2,560	average	2,552
65	D11 4 - 2	0,1439	0,282	16,092	4,58	31,80	2,544	stdev.p	0,008
66	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
67		0,2084	0,100	5,632	1,60	7,69	0,615	average	0,628
68	D11 3,5 - 1	0,2294	0,092	5,172	1,47	6,41	0,641	stdev.p	0,013
69	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
70		0,1604	0,069	3,851	1,10	6,83	0,546	average	0,535
71	D11 3,5 - 2	0,1949	0,080	4,483	1,27	6,54	0,523	stdev.p	0,011
72	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
73		0,2378	0,079	4,425	1,26	5,29	0,529	average	0,534
74	D11 3 - 1	0,1881	0,064	3,563	1,01	5,39	0,539	stdev.p	0,005
75	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
76		0,1713	0,066	3,678	1,05	6,11	0,489	average	0,492
77	D11 3 - 2	0,2007	0,078	4,368	1,24	6,19	0,495	stdev.p	0,003

Figur XXXI. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 11.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
78	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
79		0,1027	0,236	13,448	3,82	37,24	2,979	average	2,951
80	D18 4 - 1	0,1096	0,247	14,080	4,00	36,54	2,923	stdev.p	0,028
81	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
82		0,1186	0,241	13,736	3,91	32,94	2,635	average	2,607
83	D18 4 - 2	0,1642	0,261	14,885	4,23	25,78	2,578	stdev.p	0,028
84	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
85		0,2096	0,108	6,092	1,73	8,27	0,661	average	0,658
86	D18 3,5 - 1	0,1577	0,081	4,540	1,29	8,19	0,655	stdev.p	0,003
87	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
88		0,1821	0,077	4,310	1,23	6,73	0,539	average	0,516
89	D18 3,5 - 2	0,2050	0,064	3,563	1,01	4,94	0,494	stdev.p	0,022
90	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
91		0,2136	0,106	5,977	1,70	7,96	0,637	average	0,616
92	D18 3 - 1	0,2018	0,094	5,287	1,50	7,45	0,596	stdev.p	0,020
93	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
94		0,1640	0,085	4,770	1,36	8,27	0,662	average	0,541
95	D18 3 - 2	0,2090	0,049	2,701	0,77	3,68	0,368	stdev.p	0,126
96		0,2362	0,109	6,149	1,75	7,40	0,592		

Figur XXXII. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 18.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
97	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
98		0,1289	0,332	18,966	5,39	41,84	3,348	average	3,286
99	D22 4 - 1	0,1034	0,257	14,655	4,17	40,31	3,225	stdev.p	0,061
100	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
101		0,0782	0,185	10,517	2,99	38,25	3,060	average	2,936
102	D22 4 - 2	0,1116	0,242	13,793	3,92	35,15	2,812	stdev.p	0,124
103	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
104		0,0876	0,070	3,908	1,11	12,69	1,015	average	1,035
105	D22 3,5 - 1	0,1115	0,074	4,138	1,18	10,55	1,055	stdev.p	0,020
106	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
107		0,0962	0,056	3,103	0,88	9,17	0,734	average	0,787
108	D22 3,5 - 2	0,0840	0,056	3,103	0,88	10,51	0,841	stdev.p	0,053
109	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
110		0,2609	0,091	5,115	1,45	5,58	0,558	average	0,594
111	D22 3 - 1	0,2103	0,083	4,655	1,32	6,30	0,630	stdev.p	0,036
112	Sample ID	mass (g)	Abs	umol	mg	mg/g	%		
113		0,1048	0,061	3,391	0,96	9,20	0,736	average	0,570
114	D22 3 - 2	0,2748	0,087	4,885	1,39	5,06	0,404	stdev.p	0,135
115		0,2377	0,085	4,770	1,36	5,71	0,571		

Figur XXXIII. Rådata som ble brukt til å beregne prosentandel FFA i fiskeolje, fra ensilasje av K2 laks uten antioksidanter ved pH 4, 3,5 og 3, fra lagringsdag 22.

Beregningsformler for % frie fettsyrer dag 0**Kolonne og linje: Formel:**

$$D33 = (C33 - \$C\$30) / \$B\$30$$

$$E33 = D33 * \$C\$6 / 1000$$

$$F33 = E33 / B33$$

$$G33 = F33 / 10 * 0,8$$

$$I33 = \text{GJENNOMSNIITT}(G33:G35)$$

$$I34 = \text{STDAV.P}(G33:G35)$$

Figur XXXIV. Beregningsformler som ble brukt for å beregne prosentandel FFA i fiskeolje for en av parallellene i Figur XXIX, samt gjennomsnittsverdien av prosentandel FFA og standardavvik.

