

10008

10011

10024

# Antibakteriell effekt av marine peptidhydrolysat

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2024



10008

10011

10024

# **Antibakteriell effekt av marine peptidhydrolysat**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2024

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



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden



## **Forord**

Denne bacheloroppgaven er skrevet av tre bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelig universitet i Ålesund. Valget av oppgave ble lett da antibiotika resistens er et meget interessant og dagsaktuelt problem i hele verden. Bacheloren ga oss mye erfaring med både praktisk og teoretisk forskningsarbeid som vil være veldig relevant ved videre studier og i arbeidslivet.

Vi vil gjerne takke NTNU Ålesund for tilrettelegging for å kunne gjennomføre denne bacheloroppgaven, og tidligere studier som har gjort ressurser tilgjengelig for vårt forsøk. Vi vil spesielt rette en stor takk til vår kjære veileder Ann-Kristin Tveten som har hjulpet og veiledet oss med både det praktiske og teoretiske gjennom hele bachelor perioden. Hun har delt av sin kunnskap, tatt alle spørsmål på strak arm og ledet oss på rett vei med mye tålmodighet. Retter også en takk til andre personer ved Institutt for biologiske fag ved NTNU Ålesund som har vært til hjelp gjennom bacheloren.

## Sammendrag

Antibiotika er det mest sentrale hjelpemiddelet man har tilgjengelig i moderne medisin, og brukes både som forebyggende medisin i forbindelse med kirurgiske inngrep, og for å redusere infeksjoner forårsaket av patogene bakterier. I nyere tid har antibiotika resistens utviklet seg å bli et alvorlig problem, og behovet for andre medikamentelle løsninger øker. Denne oppgaven har som mål å studere om marine peptidhydrolysat, fra pelagisk fisk (makrell) og Atlantisk laks kan ha en grad av antibakteriell effekt. En rekke forsøk med ulike kombinasjoner av vekstmedium, bakteriekonsentrasjoner og tilsetning av hydrolysat ble gjennomført for å studere en potensiell inhibering av bakteriell vekst. Bakteriene *S. aureus* og *E. coli* ble benyttet som representanter for gram-negative og gram-positive bakterier, og begge artene er kjent for å ha resistensmekanismer som skaper problemer i helsevesenet. Forsøket konkluderer med at peptidhydrolysatet ikke har målbar antibakteriell effekt og det kan ikke kvantifisere en minimum inhiberende konsentrasjon.

## **Abstract**

Antibiotics is one of the most important aids available in modern medicine, because they are used as both preventatives for surgical operations, as well as for treatment of infections caused by pathogenic bacteria. Recently antimicrobial resistance has evolved, and proven to be a serious threat, increasing the need for other medicinal replacements. The goal of this thesis is to study whether there are any antibacterial effects of marine peptide hydrolysate, from pelagic fish (mackerel) and Atlantic salmon. To study potential inhibition of bacterial growth a series of tests with different combinations of growth medium, bacteria concentrations and the addition of hydrolysate are used. The representatives for gram-positive and gram-negative bacteria that are used for this experiment are *S. aureus* and *E. coli*, both bacteria are known for having mechanisms of resistance causing trouble for healthcare system. The experiment concludes with that there are no measurable antibacterial effects of marine peptide hydrolysate and that it cannot quantify a minimum inhibitory concentration.

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Innledning</b> .....	<b>6</b>
<b>Problemstilling og delmål</b> .....	<b>7</b>
<b>Terminologi og forkortelser</b> .....	<b>8</b>
<b>Teori</b> .....	<b>9</b>
Multiresistente bakterier.....	11
Alternativer til antibiotika.....	12
Antimikrobielle peptider .....	12
<b>Metode og materialer</b> .....	<b>15</b>
Grafisk fremstilling av forsøksplan.....	15
Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode. Etablere protokoll.....	16
Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat.....	17
Testing av antibakteriell effekt fra salmonide peptidhydrolysat.....	18
<b>Resultater</b> .....	<b>19</b>
Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode. Etablere protokoll.....	19
Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat.....	21
Testing av antibakteriell effekt fra salmonide peptidhydrolysat.....	24
Testing av hydrolysatets egenabsorbans.....	30
<b>Diskusjon</b> .....	<b>31</b>
Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode. Etablere protokoll.....	31
Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat.....	32
Testing av antibakteriell effekt fra salmonid peptidhydrolysat.....	33
Videre forskning.....	34
<b>Konklusjon</b> .....	<b>35</b>
<b>Litteraturliste</b> .....	<b>36</b>



<b>Vedlegg.....</b>	<b>40</b>
Vedlegg 1: Prosedyre for MULTISKAN GO.....	40
Vedlegg 2: Prosedyre for tillaging av nutrient broth og tilsetting av startkultur.....	43
Vedlegg 3: Prosedyre for testing av volum og DMEM.....	44
Vedlegg 4: Prosedyre for vekstvilkår ved tilsetting av peptidhydrolysat.....	46
Vedlegg 5: Prosedyre for testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat.....	49
Vedlegg 6: Prosedyre for testing av hydrolysatets egenabsorbans.....	52
Vedlegg 7: Tabell for standardkurver med Nutrient broth etter 24 timer.....	53
Vedlegg 8: Tabell for testing av volum og DMEM etter 24 timer.....	54
Vedlegg 9: Tabell for vekstvilkår ved tilsetting av peptidhydrolysat av makrell med ultralyd etter 24 og 48 timer.....	68
Vedlegg 10: Tabell for vekstvilkår ved tilsetting av peptidhydrolysat av makrell uten ultralyd etter 24 og 48 timer.....	71
Vedlegg 11: Tabell for vekstvilkår ved tilsetting av peptidhydrolysat av laks uten ultralyd etter 24 og 48 timer.....	74
Vedlegg 12: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 280nm.....	77
Vedlegg 13: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonide peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 420nm.....	79
Vedlegg 14: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonide peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 970nm.....	81
Vedlegg 15: Tabell for ultralydbehandling ved 600W.....	83
Vedlegg 16: Tabell for hydrolysatets egenabsorbans.....	84

## Innledning

I omtrent 100 år med ukontrollert bruk av antibiotika har det oppstått resistens som nå kan medføre alvorlig konsekvenser for både samfunnsøkonomi og folkehelse. Antibiotika resistens har utviklet seg til en alvorlig trussel for moderne medisin, helse og agrikultur på nasjonale og internasjonale nivå. Antimikrobiell resistens (AMR) er en av de største globale folkehelse og utviklingstruslene.

Siden antibiotika ble introdusert i medisin på tidlig 1900-tallet, og frem til i dag har flere faktorer i samfunnet endret seg. Gjennomsnittlig levealder har økt, i tillegg til at avanserte medisinske inngrep, som organtransplantasjon og kreftbehandlinger har blitt mulig. Parallelt som befolkningen øker, øker behovet for flere ressurser som mat, areal og medisin. Infeksjoner forårsaket av bakterier blir behandlet med antibiotika (3, 4, 5, 6, 34), ikke bare blant mennesker, men også i et stadig mer presset landbruk og akvakultur. Turisme, transport og matproduksjon er få eksempler på hvordan AMR spres over landegrenser. Konsekvensene av AMR er svært alvorlig for mennesker med immunsvekkelse, HIV, diabetes eller kreft. I tillegg belaster det helsevesenet både økonomisk og medisinsk. Verdens helse organisasjon (WHO) overvåker AMR, og har i senere år kommet med tiltak for internasjonal forebygging. Blant disse tiltakene understreker WHO forebygging, økt bevissthet og økt kunnskap. Det er derfor et behov for å utvikle nye behandlingsmetoder for å hindre bakterielle infeksjoner (3, 6, 9, 11, 20, 34).

## Problemstilling

Målet med prosjektet er å undersøke om peptidhydrolysat fra pelagisk og salmonid fisk kan ha antibakteriell peptidaktivitet, uten at peptidhydrolysatet er fraksjonert basert på peptidstørrelse.

- Delmål 1: Finne passende vekstmedium og kontrollmetode for vekst og absorbans. Utprøving av tre ulike typer medium; nutrient broth, DMEM og MEM. Vurdere absorbans spekter, avklare optimal absorbans (nm) og dyrke bakterier på vekstmedium, begge som avlesningsmetode for forsøket.
- Delmål 2: Forsøk med fokus på vekstkontroll, der man kontrollerer at bakteriene er i stand til å vokse i vekstmediet når vi tilsetter peptidhydrolysat. Målet er at kulturer skal kunne nå stasjonær fase innen 24 timer. Kontroll av metningsgrad og løselighet av hydrolysat. Avgrensning av type peptidhydrolysat for videre forsøk.
- Delmål 3: Gradient av bakterier for å se om peptidhydrolysatet har antibakteriell effekt ved å inhibere vekst. Målet er å undersøke om det finnes en målbar inhiberende effekt.

## Terminologi og forkortelser

CFU – Colony forming unit

OD – Optical density

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*E. coli* – *Escherichia coli*

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

AMP – Antimikrobiell peptider

AMR – Antimikrobiell resistens

ABR – Antibakteriell resistens

MIC – Minimum inhibitory concentration

MRSA – Meticillinresistente *Staphylococcus aureus*

ESBL – Extended Spectrum Beta-Lactamase

SK – Sterilkontroll

VK – Vekstkontroll

QS – Quorum Sensing

QQ – Quorum Quenching

QQP – Quorum quenching probiotic

MDR – Multimedikament resistens

MGE – Mobile genetiske enheter

SCC*mec* - Staphylococcal kromosom kassett

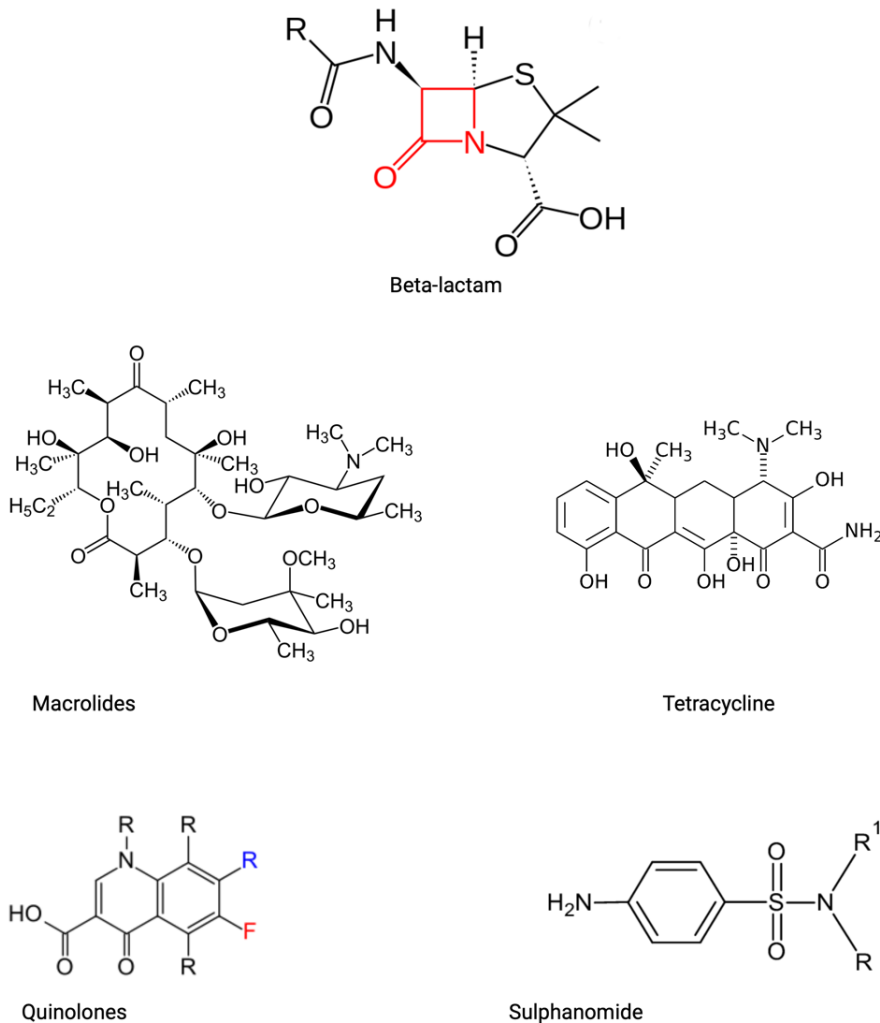
DMEM – Dulbeccos Modified Eagle Medium

MEM – Minimum Essential Medium

# Teori

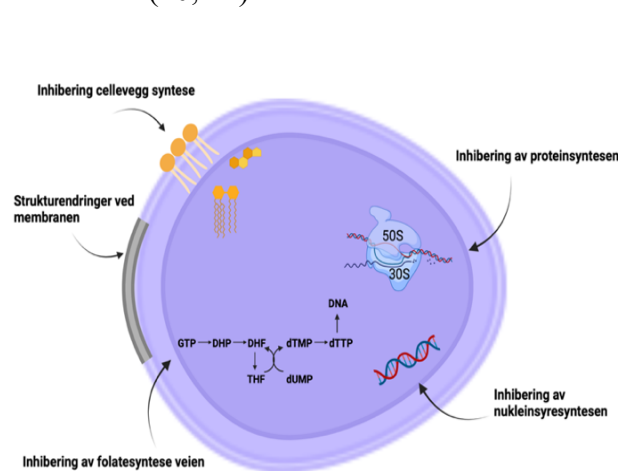
Det finnes flere ulike klassifiseringer av antibiotika, og antibiotika kan skilles inn i naturlige, semi-syntetiske og syntetiske varianter. De ulike gruppene av antibiotika benytter seg av forskjellige mekanismer for å inhibere vekst og klassifiseres igjen i mindre grupper.

En form for sortering er bredspektret eller smalspektret antibiotika, som sier noe om graden av spesifisitet for behandlingen av bakterier. Beta-lactam er en gruppe antibiotika som ofte treffer flere typer bakterier og har stor anvendelighet. Penicillin tilhører denne gruppen. Eksempler på hovedgrupper innenfor antibiotika er illustrert i figur 1 (1, 10).

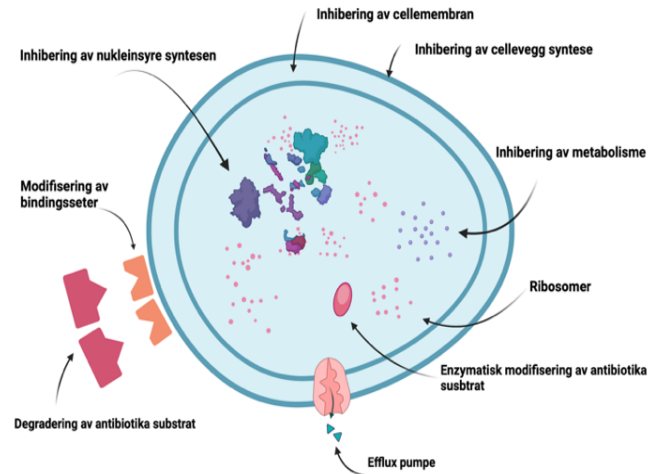


Figur 1: Oversikt over hovedklassene innenfor antibiotika. Beta-lactam har evnen til å inhibere cellevegg syntese. Macrolide er en bredspektret gruppe. Tetracycline inhiberer proteinsyntese ved å blokke 50S og 30S ribosomale subenhet – brukes mye i behandling. Quinolone inhiberer nukleinsyre syntese. Sulphanomide brukes både mot gram negative og gram positive bakterier.

Mekanismene og virkemåten til antibiotika gir dypere forståelse for AMR, og er sentrale for å finne nye løsninger i fremtiden. Figur 2 viser de ulike mekanismene antibiotika kan ta i bruk. Resistente patogener tilegner en eller flere av disse mekanismene og skaper et forsvar mot antibiotika (10, 22).



Figur 2: Oversikt over de ulike mekanismene til antibiotika 1. Inhibering av proteinsyntese. 2. Inhibering av nukleinsyresyntese. 3. Inhibering av folatesynteseveien. 4. Strukturendringer ved membranen. 5. Inhibering av celleveggsyntese.



Figur 3: Illustrerer mekanismene som forårsaker antibiotika resistens. Inhibering av cellevegg syntese, inhibering av cellemembran, inhibering av cellulære metabolske prosesser, enzymatisk modifisering av antibiotika substrat, efflux pumpe, degrading av antibiotika substrat, modifisering av bindingssteder og inhibering av nukleinsyresyntese.

AMR sorteres ofte inn i to hovedgrupper; genetisk og ervervet resistens.

Genetisk resistens forekommer ofte av naturlige årsaker, for eksempel vil manglende bindingssteder føre til ineffektiv behandling. Dermed kan ikke alle bakteriearter påvirkes av antibiotika som vil resultere i resistens. Ervervet resistens deles ytterligere inn i adaptiv og permanent resistens. Begge utvikler resistens forårsaket av ytre faktorer; stress, pH, samt endring i næring eller genetik. Permanent resistens forekommer ofte grunnet mutasjoner eller genoverføring fra resistente bakterier, mens adaptiv resistens returnerer vanligvis til normaltilstand. Figur 3 viser en oversikt over de biokjemiske mekanismene. Bakterier som benytter seg av en eller flere av disse mekanismene vil utvikle resistens. Resistens mot flere medikamenter (Eng. Multidrug resistance, MDR) er et fenomen hvor en kombinasjon av

mekanismene oppstår. MDR har i nyere tid fått oppmerksomhet, da det utgjør en reell trussel mot samfunnsøkonomi og folkehelse (2, 9, 10, 11).

## **Multiresistente bakterier**

Parallelt som utviklingen og bruken av antibiotika har økt, har resistente bakterier utviklet seg i større grad. Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) og Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) skaper et stort problem for helsevesenet da de er resistente mot flere typer antibiotika (19, 32). ESBL består av både *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) og *E. coli*. *K. pneumoniae* sto for hovedandelen av ESBL tilfeller når det først ble oppdaget på 1990-tallet. Siden 2000-tallet har *E. coli* vært ledende i tilfeller av ESBL, også med mest økning (15). MRSA ble først oppdaget på 1960-tallet blant pasienter på sykehus, men spredte seg til samfunnet i løpet av århundret (12). Både MRSA og ESBL er resistente mot betalactam som hovedgruppen i mange antibiotika (18, 23). Mobile genetiske enheter (MGE) er spredningsfaktoren hos både MRSA og ESBL, men de benytter ulike typer mobile enheter (19, 24). MRSA benytter seg av Staphylococcal kromosom kassett (SCC*mec*) som brukes til å transportere *mecA* genet som koder for resistens mot betalactam (24). Ved spredning av ESBL benyttes derimot flere MGE, som transposoner, innsettingssekvenser og integroner (19). MRSA og ESBL er resistente mot flere typer antibiotika som utgjør et stort problem. Typene antibiotika som ofte brukes mot multiresistente bakterier, er vancomycin mot MRSA og carbapenemes mot ESBL. Bruken av disse antibiotikaene øker i takt med tilfeller av sykdom forårsaket av *E. coli* og *S. aureus*. Den økte bruken vil føre til en fare for utviklingen av vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) og carbapenem-resistente bakterier (15, 24). Slik utvikling av antibiotika resistens har ført til at det forskes på alternative behandlingsmetoder for bakterielle infeksjoner.

## **Alternativer til antibiotika**

Quorum Sensing (QS) beskriver fenomenet som oppstår når celler i et mikrobiom med høy celletetthet benytter celle-celle kommunikasjon. QS har flere egenskaper og har fått oppmerksomhet i sammenheng med AMR. AMR-studier relatert til QS har vist at patogene bakterier danner komplekse biofilm og har evnen til å forsvare seg mot antibiotika. Bakterier som blir utsatt for ytre stress-faktorer vil gå i forsvarsmodus. Små mengder antibiotika vil kunne endre mottageligheten til bakteriene. Forsvaret til biofilm forsterkes ved hjelp av overflatesekresjon, endret bevegelighet, begrenset tilgangen til næring og redusert permeabilitet. Dette øker stresstoleransen og reduserer effekten av antibiotika. QS bidrar i utviklingen av AMR. Ettersom dette er et stort problem, har alternative løsninger blitt studert; Quorum Quenching

Quorum Quenching (QQ) er prosessen der QS blir hindret ved at celle-celle kommunikasjon blir forstyrret. Nåværende kunnskap tyder på at QS blir hindret ved QQ enzymer eller QS inhibitorer. Ved å forhindre deteksjon og produksjon av signalmolekyler vil ikke QS forekomme. QQ enzymer degraderer signalmolekyler som fører til at mikrobiomet ikke stresses nok til å danne resistens. Nye studier viser at QQ kan motvirke AMR uten å forstyrre mikrobiomets vekst. Quorum quenching probiotika (QQP) har lignende effekt i akvatiske miljø.

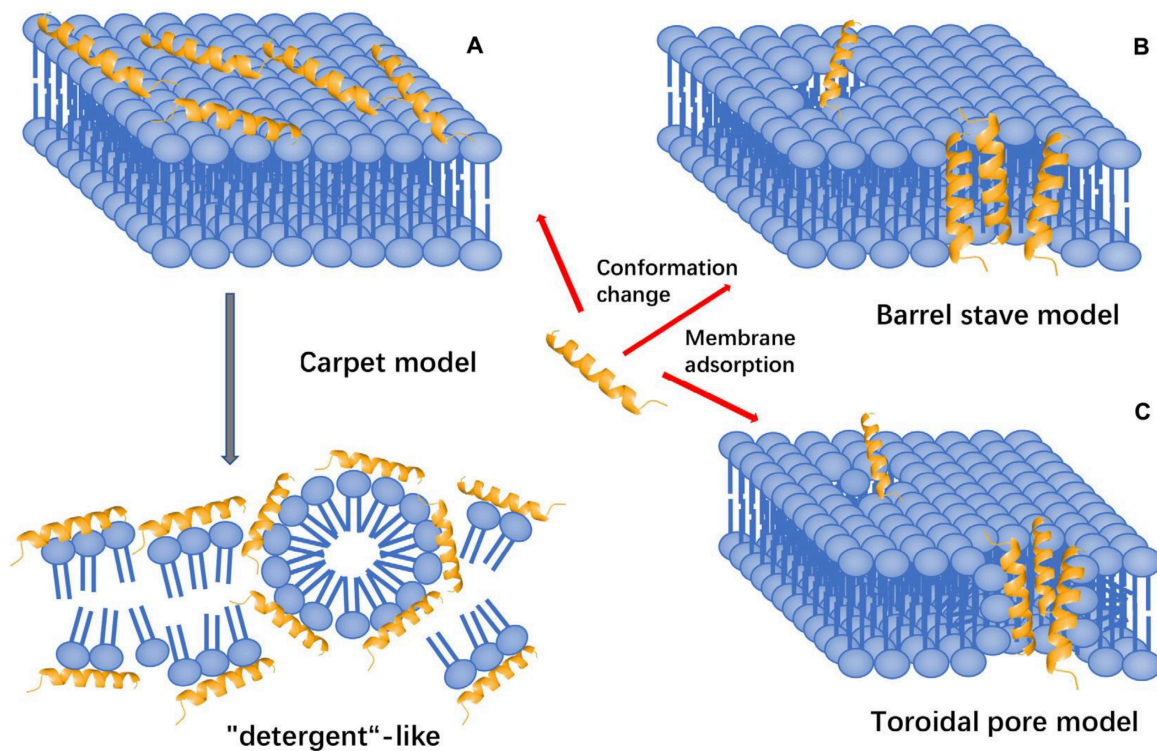
## **Antimikrobielle peptider**

Antimikrobielle peptider (AMP) beskytter vertscellene mot et stort spekter av patogene infeksjoner, noe som gjør dem til attraktive terapeutiske midler. AMP er klassifiseringen av biologisk aktive og korte peptider som finnes i de fleste levende organismer. AMP har vist hemmende effekt mot ulike mikroorganismer som bakterier, sopp, virus og parasitter. Forskere er derfor positive til AMP for motvirkning av AMR, fordi peptidene utvikler mindre resistens mot bakterier. AMP kan angripe bakteriene direkte eller stimulere medfødt immunrespons, og har både bakteriostatisk og baktericid effekt. Antimikrobiell aktivitet avhenger av peptidets ladning, hydrofobitet og sekundærstruktur (8).



AMP har ofte en rik komposisjon av positivt ladde hydrofobiske og hydrofile aminosyrer, som resulterer i kationiske og amfifile egenskaper. Slike kationiske AMP er ofte helix-formede polypeptider med korte aminosyresekvenser (under 100 aminosyrerester), inkludert et stort antall av de kationiske aminosyrene; lysin og arginin (7). Kationisk nettoioneladning har positiv korrelasjon med peptidets antibakterielle aktivitet. Peptidets hydrofobitet er konsekvent med hemolytisk aktivitet. Strukturelt karakteriseres kationiske AMP hovedsakelig i  $\alpha$ -helix peptider og  $\beta$ -plate peptider (8).

AMP har hovedsakelig to grupper av angrepsmekanismer; membranrettet og ikke-membranrettet. Membranrettet sorteres ytterligere til toroidal poremodell, barrel-stave modell og carpet-like modell (se figur 4). I toroidal poremodell danner AMP komplekse strukturer med membranen som forårsaker at membranen bukter seg med ringstruktur rundt peptidene. I barrel-stave modell aggregerer AMP-molekyl med hverandre og settes i cellemembranens bilag som multimerer og arrangeres parallelt med fosfolipidene slik at en kanal formes. Carpet-like modell foregår ved høy konsentrasjon av AMP. AMP akkumuleres på membranens overflate med sin hydrofobe del. Membranen endres strukturelt og ødelegges. Alle tre mekanismene medfører økt permeabilitet og lysing av cellen. Ikke-membranrettet mekanisme utføres ved at AMP ankommer cellen ved penetrering eller endocytose. AMP kan angripe cellen ved hemming av livsviktige prosesser som proteinbiosyntese, nukleinsyrebiosyntese, proteaseaktivitet og celledeling (7). AMP sin aktivitet måles med minimum hemmende konsentrasjon (MIC). MIC er definert som den laveste konsentrasjonen av AMP som vil hemme den synlige veksten av en mikroorganisme innen 24 timer. MIC brukes i diagnostiske laboratorier for å bestemme *in vitro* aktiviteten til nyutviklede antimikrobielle midler eller for å bekrefte resistens (16).



Figur 4: Membranrettede mekanismer for AMP: A) Carpet-like modell. B) Barrel-stave modell. C) Toroidal poremodell (7).

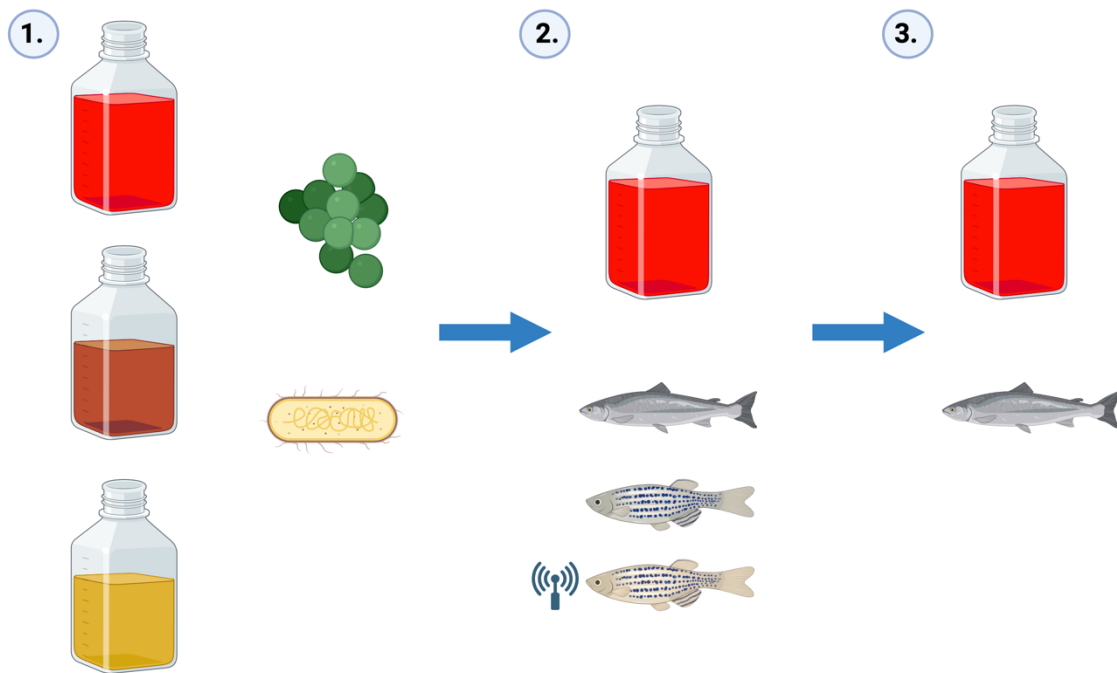
AMP finnes i alle levende organismer, men marine organismer er spesielle fordi de lever i umiddelbar nærhet med patogene mikrober i havet, i motsetning til organismer i terrestriske habitater. Marine organismer utvikler beskyttende marine peptider mot miljøpresset, som skilles strukturelt fra andre AMP. Marine AMP er strukturelt mangfoldige, viser et bredt spekter av anti-infeksjonsaktiviteter, har en lav bioavsetningsrate i kroppsvev og er bakteriespesifikke. Marine peptider har egenskaper som ikke er *in situ*; høy potensiell nutraceutisk og medisinsk verdi (14, 21).

Både pelagisk og salmonid fisk har høyt proteininnhold med en kompleks sammensetning av aminosyrer (13). Ved enzymatisk hydrolyse isoleres proteinfraksjonen slik at en konsentrert løsning av frie peptider og aminosyrer gjenstår. Hydrolysatet behandles ofte videre med ultralyd som endrer 3D-strukturen til proteinet. Ultralyd ansees som en effektiv metode for å forbedre peptidhydrolysatets funksjonelle egenskaper og gjøre aminosyrene mer tilgjengelig (17). Industrielt benyttes ytterligere separasjonsteknikker som elektroforese, ionebytterkromatografi, HPLC og NMR-spektroskopi for å isolere AMP fra proteinfraksjonen (28).

## Materialer og metoder

Til forsøkene ble det kultivert *Staphylococcus aureus* ATCC™ 9144™ og *Escherichia coli* ATCC™ 35218™ som stock kultur til bruk i alle delforsøk. Det ble laget stock kultur i ulike flytende vekstmedium, nutrient broth og DMEM for å unngå at det ble feil sammensetning av næringsstoffer og vekstegenskaper mellom ulike vekstmedium. DMEM og MEM er mulig å benytte om hverandre. Startkultur ble kultivert i flytende vekstmedium over natt ved 35°C og oppbevart ved +4°C mellom videre kultiveringer.

### Grafisk fremstilling av forsøksplan



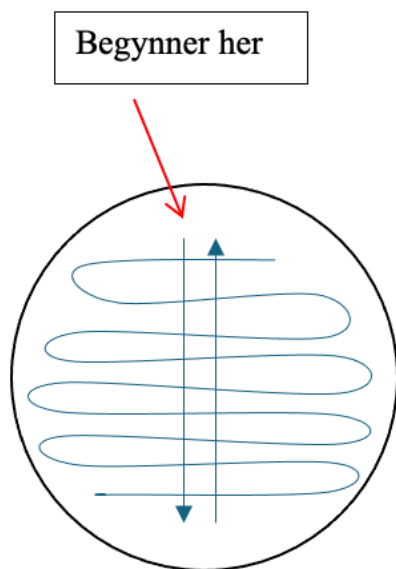
Figur 5: Visuell fremvisning om forløpet til forsøket. 1. Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode. Etablere protokoll: Fant optimalt vekstmedium for *E. coli* og *S. aureus*. 2. Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysate: Brukte optimalt vekstmedium og testet med hydrolysate av laks uten ultralyd, makrell uten ultralyd og makrell med ultralyd. 3. Testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysate: Gikk videre med optimalt vekstmedium og ett type hydrolysate.

## Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode.

### Etablere protokoll

Nutrient broth ble laget ved å blande 4g nutrient broth pulver med 500mL destillert vann og satt til autoklaving. 200mL nutrient broth ble overført til to separate 500mL autoklavflasker, hvor 50mL startkultur ble tilsatt i hver (se vedlegg 2). Startkultur ble inkubert i 5 dager. Absorbansen ble målt for både startkultur og stockkultur ved bruk av MULTISKAN GO (se vedlegg 1). Absorbans av startkulturen for *E. coli* ATCC™ 35218™ ble målt til 0,260 og *S. aureus* ATCC™ 9144™ til 0,347. Stockkultur sin absorbans ble målt til 0,097 for *E. coli* og 0,117 for *S. aureus* (se tabell 2). Bakteriekulturene ble satt til inkubasjon i to døgn ved veksttemperatur, 35°C. Fortynningsrekker ble laget for å måle absorbans og til utsåing som vist på figur 6.

Vekstmediet ble byttet til Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) og nye fortynningsrekker ble laget ved å høste CFU fra utsåingbakterieskålene. Nye absorbansmålinger og utsåinger ble utført som tidligere beskrevet for å finne optimal bølgelengde (se vedlegg 3).



Figur 6: Visuell fremstilling av utsåingsmetoden som ble brukt.

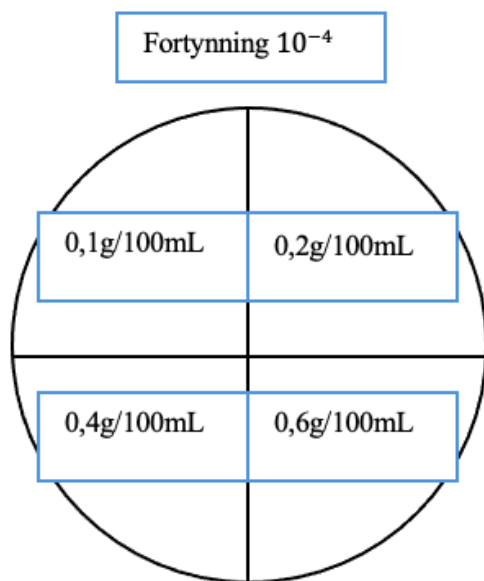
## Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat

Nye bakteriekulturer av *E. coli* og *S. aureus* ble dyrket i Minimum Essential Medium (MEM). Deretter ble nye fortynningsrekker og hydrolysatløsninger laget ifølge tabell 1.

Konsentrasjon
0,1g/100mL
0,2g/100mL
0,4g/100mL
0,6g/100mL

Tabell 1: Viser konsentrasjonene som ble brukt for tillaging av hydrolysat.

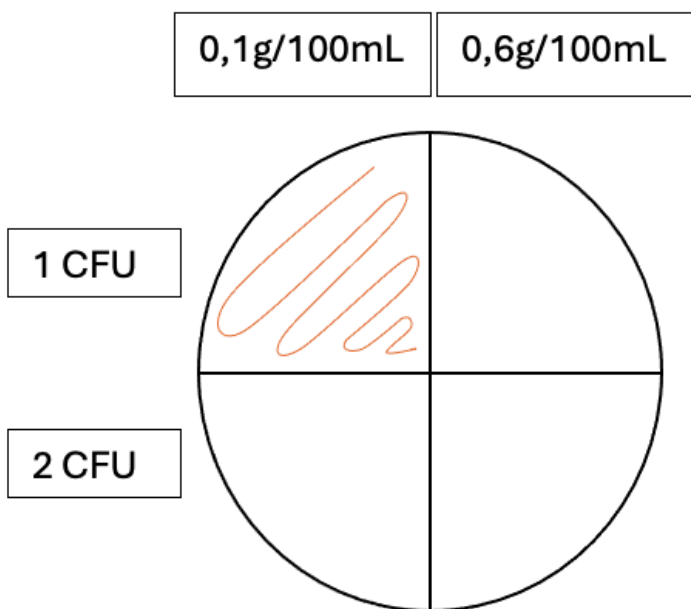
Etter 24, 48 og 72 timers inkubasjon ble det utført absorbanmålinger med MULTISKAN GO og utsåinger av alle løsningene på Colombia blod agar (se vedlegg 4). Utsåinger ble gjort som vist på figur 7.



Figur 7: Viser fordelingen av hvordan utsåing ble utført, vist med  $10^{-4}$ .

## Testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat

Hydrolysat med konsentrasjon på 0,1g/100mL og 0,6g/100mL ble laget og fordelt i rør. CFU av *E. coli* og *S. aureus* ble høstet fra skåler og tilsatt i hydrolysatet slik at det ble fortynningsrekker. Vekstkontroller ble laget. Absorbansen ble målt med MULTISKAN GO og prøvene ble strøket ut på bakteriespesifikke skåler. MacConkey agar (*E. coli*) og Mannitol salt agar (*S. aureus*) som vist på figur 8. Måling og utsåing ble gjentatt etter 48 og 72 timer (se vedlegg 5). Ny hydrolysatløsning av hver konsentrasjon ble laget og egenabsorbansen ble målt med MULTISKAN GO (se vedlegg 6).



Figur 8: Visuell fremvisning av utsåing på bakteriespesifikke petriskåler.

## Resultater

### Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode.

#### Etablere protokoll

Kontrollerte at bakteriene kunne vokse i nutrient broth. Tabell 2 viser absorbans til startkultur til venstre i tabellen og stockkultur til høyre. Resultatet tydet på at bakteriene kunne vokse i vekstmediet.

<i>E. coli</i> startkultur	<i>S. aureus</i> startkultur	<i>E. coli</i> stockkultur	<i>S. aureus</i> stockkultur
0,260	0,347	0,097	0,117

Tabell 2: Gjennomsnittverdi ved måling av absorbans til startkultur og stockkultur for *E. coli* og *S. aureus* ved 600nm.

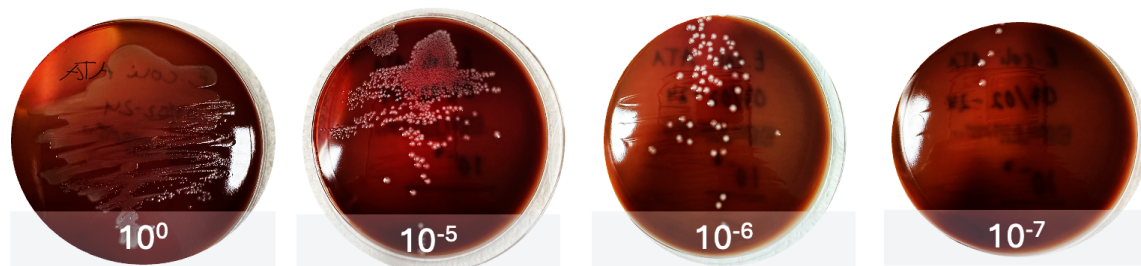
Tabell 3 er en oversikt over gjennomsnittsverdiene av absorbansmålingene for fortynningsrekkene til *E. coli* og *S. aureus*. Tallene viser differanse mellom de to første fortyntingene, mens resten har tilnærmet lik absorbans som sterilkontroll (SK).

<i>E. coli</i>										
10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	SK
0,278	0,075	0,054	0,051	0,050	0,050	0,050	0,050	0,052	0,051	0,052
<i>S. aureus</i>										
10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	SK
0,241	0,070	0,052	0,051	0,052	0,048	0,049	0,052	0,049	0,049	0,051

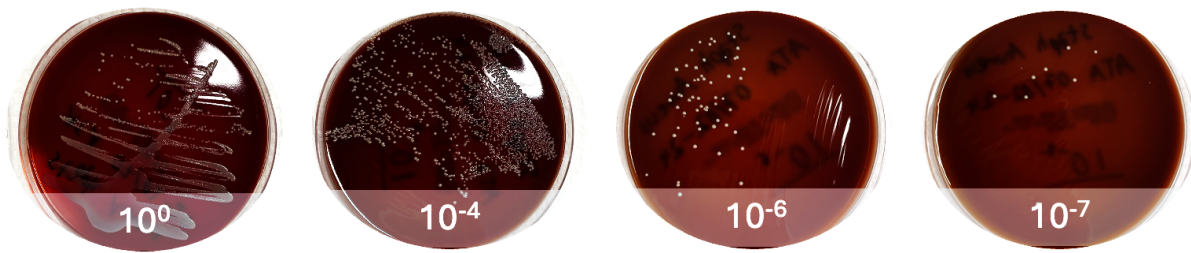
Tabell 3: Gjennomsnittverdi for måling av absorbans til fortyntinger av stockkultur av *E. coli* og *S. aureus* ved 600nm.

Inkludert sterilkontroll. Hentet fra vedlegg 7.

Utsåing av bakteriekultur av *E. coli* og *S. aureus* dyrket i nutrient broth, se figur 9 og 10. 10<sup>0</sup> tydet på tettvokste kolonier. 10<sup>-4</sup> og 10<sup>-5</sup> viser også tettvokst kolonier, men antydning til noen enkeltkolonier. 10<sup>-6</sup> viste enkeltkolonier som kunne telles med sikkerhet. Tilsvarte 72 kolonier for *E. coli* og 59 for *S. aureus*. 10<sup>-7</sup> hadde under 10 enkeltkolonier.



Figur 9: Skåler med utsåing av *E. coli* på Columbia blod agar.



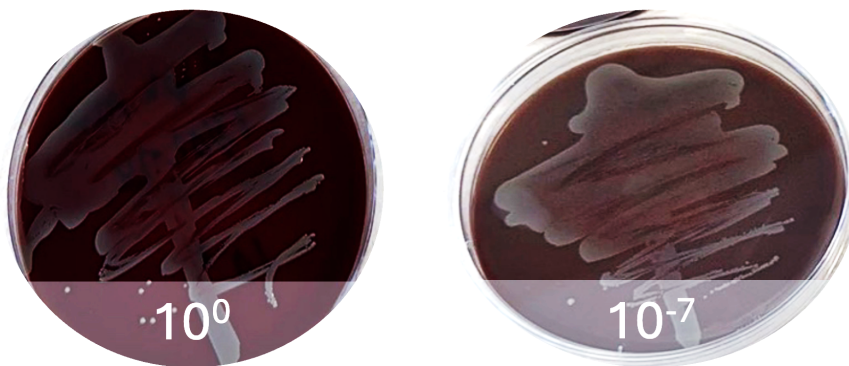
Figur 10: Skåler med utsåing av *S. aureus* på Colombia blod agar.

4mL (tabell 4) har en fin reduserende gradient med fortynningene. Gradienten på 10mL er helhetlig en reduksjon fra 1 til  $10^{-8}$ , men ujevn gradient med flere standardavvik. Figur 11 viser utsåing av bakteriekultur dyrket i DMEM. Alle skålene var overgrodde uavhengig av fortynningsgrad.

<i>E. coli</i>	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
4mL	0,7524	0,6759	0,6750	0,6742	0,6722	0,6560	0,6585	0,6479	0,6401
10mL	0,6381	0,5602	0,5318	0,5325	0,5250	0,5291	0,5395	0,5342	0,5241

Tabell 4: Resultat fra absorpsjonsmåling av *E. coli* dyrket i DMEM ved volum på 4 og 10mL målt ved 420nm.

Gjennomsnittverdier hentet fra vedlegg 8.



Figur 11: Overgrodde skåler med fortynning  $10^0$  og  $10^{-7}$  dyrket på Colombia blod agar. Ingen visuell mengde i vekst er mulig å kvantifisere.



## Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat

Gjennomsnittlig målt absorban av *E. coli* og *S. aureus* med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av makrell med ultralyd, etter 24 og 48 timer er vist i tabell 5. Resultatet tydet på en økende absorban fra 24 til 48 timer for *E. coli*. Tallene for *S. aureus* er varierende, hvor noen øker fra 24 til 48 timer for noen hydrolysatkonsentrasjoner og fra fortytning til fortytning, mens andre synker. Tallene øker i samsvar med høyere hydrolysatkonsentrasjon for både *E. coli* og *S. aureus*.

Makrell med ultralyd											
		<i>E. coli</i>						<i>S. aureus</i>			
		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>			10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>
<b>0,1</b>	24 t	0,608	0,683	0,702	0,698	24 t	0,609	0,617	0,670	0,512	
	48 t	0,620	0,681	0,708	0,692	48 t	0,568	0,593	0,582	0,673	
<b>0,2</b>	24 t	0,688	0,766	0,778	0,769	24 t	0,697	0,733	0,699	0,620	
	48 t	0,674	0,769	0,768	0,769	48 t	0,642	0,692	0,662	0,745	
<b>0,4</b>	24 t	0,832	0,889	0,900	0,903	24 t	0,766	0,821	0,851	0,769	
	48 t	0,877	0,899	0,911	0,939	48 t	0,732	0,884	0,792	0,825	
<b>0,6</b>	24 t	0,905	0,961	0,982	0,989	24 t	0,840	0,789	0,897	0,877	
	48 t	0,995	1,038	1,022	0,987	48 t	0,809	0,954	0,967	0,827	

Tabell 5: Resultat fra absorbanmålinger av *E. coli* og *S. aureus* med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av makrell med ultralyd. Gjennomsnittsverdier hentet fra vedlegg 9.

Tabell 6 er gjennomsnittlig absorban av *E. coli* og *S. aureus*, med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av makrell uten ultralyd målt etter 24 og 48 timer. Resultatet for *E. coli* har økende verdier fra 24 til 48 timer, men i liten grad. Verdiene øker også ved høyere hydrolysatkonsentrasjon. Resultatet for *S. aureus* er varierende. Noen fortytningsverdier øker fra 24 til 48 timer, mens andre synker. Noen verdier er høyere ved en lavere hydrolysatkonsentrasjon. 10<sup>-4</sup> ved 24 timer med konsentrasjon 0,1g/100mL er høyere enn samme fortytning med konsentrasjon 0,4g/100mL. Andre fortytninger er høyere ved en høyere hydrolysatkonsentrasjon. 10<sup>-8</sup> med konsentrasjon 0,6g/100mL ved 24 timer er høyere enn 10<sup>-8</sup> med konsentrasjon 0,1g/100mL ved 24 timer.

Makrell uten ultralyd											
		<i>E. coli</i>					<i>S. aureus</i>				
		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	
<b>0,1</b>	24 t	0,790	0,817	0,832	0,821	24 t	0,758	0,856	0,882	0,847	
	48 t	0,837	0,851	0,837	0,838	48 t	0,677	0,877	0,825	0,828	
<b>0,2</b>	24 t	0,815	0,857	0,854	0,855	24 t	0,926	0,942	0,818	0,969	
	48 t	0,971	0,944	0,933	0,934	48 t	0,888	0,981	0,960	0,912	
<b>0,4</b>	24 t	0,951	0,974	0,954	0,965	24 t	0,800	0,747	0,837	0,826	
	48 t	1,086	1,092	1,090	1,058	48 t	0,721	0,815	0,838	0,719	
<b>0,6</b>	24 t	1,007	1,055	1,030	1,065	24 t	0,952	1,030	1,016	1,022	
	48 t	1,162	1,207	1,227	1,186	48 t	1,076	0,908	0,960	0,921	

Tabell 6: Resultat fra absorbans målinger av *E. coli* og *S. aureus* med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av makrell uten ultralyd. Gjennomsnittsverdier hentet fra vedlegg 10.

Se tabell 7 for gjennomsnittlig målt absorbans av *E. coli* og *S. aureus*, med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av laks uten ultralyd målt etter 24 og 48 timer. Tallene for *E. coli* og *S. aureus* er noe synkende fra 24 til 48 timer, med unntak av noen verdier. Tallene øker ved høyere hydrolysatkonsentrasjon.

Laks uten ultralyd											
		<i>E. coli</i>					<i>S. aureus</i>				
		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	
<b>0,1</b>	24 t	0,613	0,698	0,710	0,708	24 t	0,547	0,699	0,678	0,662	
	48 t	0,535	0,627	0,618	0,639	48 t	0,531	0,601	0,604	0,616	
<b>0,2</b>	24 t	0,535	0,683	0,711	0,711	24 t	0,563	0,734	0,756	0,718	
	48 t	0,645	0,675	0,666	0,665	48 t	0,536	0,705	0,734	0,699	
<b>0,4</b>	24 t	0,698	0,775	0,785	0,353	24 t	0,609	0,816	0,848	0,815	
	48 t	0,722	0,809	0,732	0,337	48 t	0,658	0,780	0,831	0,793	
<b>0,6</b>	24 t	0,743	0,819	0,842	0,844	24 t	0,649	0,819	0,842	0,872	
	48 t	0,777	0,817	0,857	0,795	48 t	0,669	0,814	0,801	0,844	

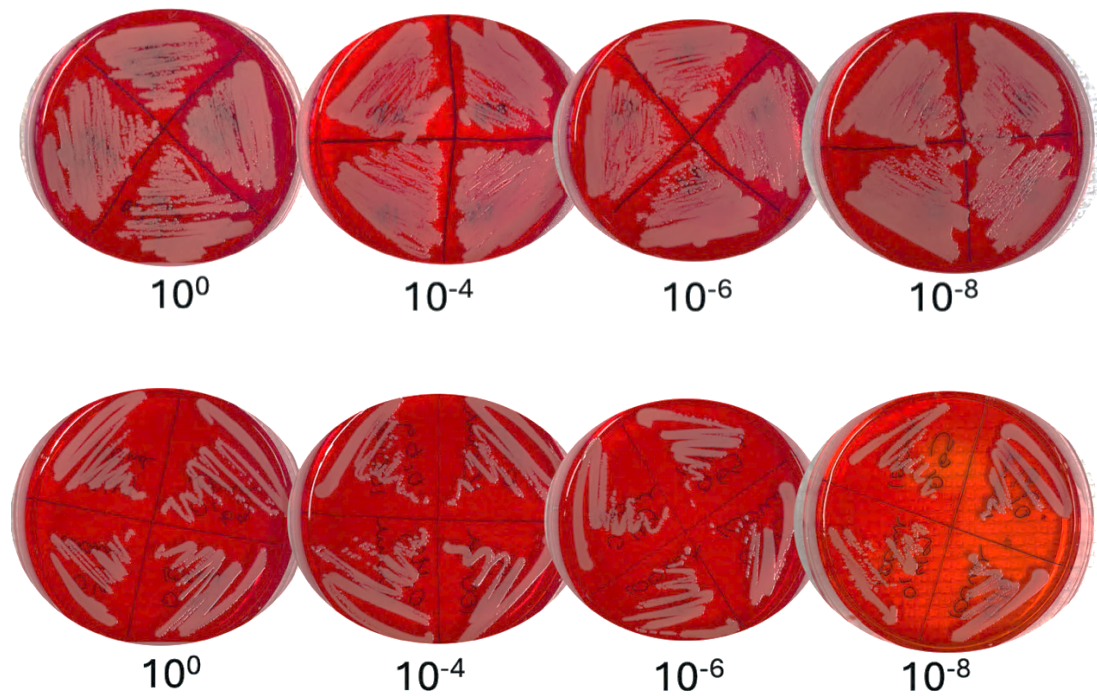
Tabell 7: Resultat fra absorbans målinger av *E. coli* og *S. aureus* med ulike hydrolysatkonsentrasjoner av laks. Gjennomsnittsverdier hentet fra vedlegg 11.

Figur 12 og 13 viser ulike konsentrasjoner av *E. coli* og *S. aureus* strøket ut på skål. Skålene er overgrodd uavhengig av hydrolysatkonsentrasjon etter 24 timer. Både *E. coli* og *S. aureus*

vekser godt. Observerer tydelig reduksjon for *S. aureus* fra 24 timer til 48 timer, mens *E. coli* nesten ikke har reduksjon.



Figur 12: Laks uten ultralyd, *E. coli*. Øverst etter 24 timer, nederst etter 48 timer.



Figur 13: Laks uten ultralyd, *S. aureus*. Øverst 24 etter timer, nederst etter 48 timer.

## Testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat

Resultatene for undersøkelse av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat for *E. coli* med hydrolysatkonsentrasjoner 0,1g/100mL og 0,6g/100mL vises på tabell 8 og 9.

Vekstkontrollene viser at *E. coli* klarer å vokse godt i vekstmediet selv ved små konsentrasjoner. I tabell 8 synker fortynningsverdiene for hvert døgn, noe de også gjør for de tre siste vekstkontrollene, mens vekstkontroll 1 øker. Tabell 9 viser at vekstkontrollene og fortynningene synker for hvert døgn.

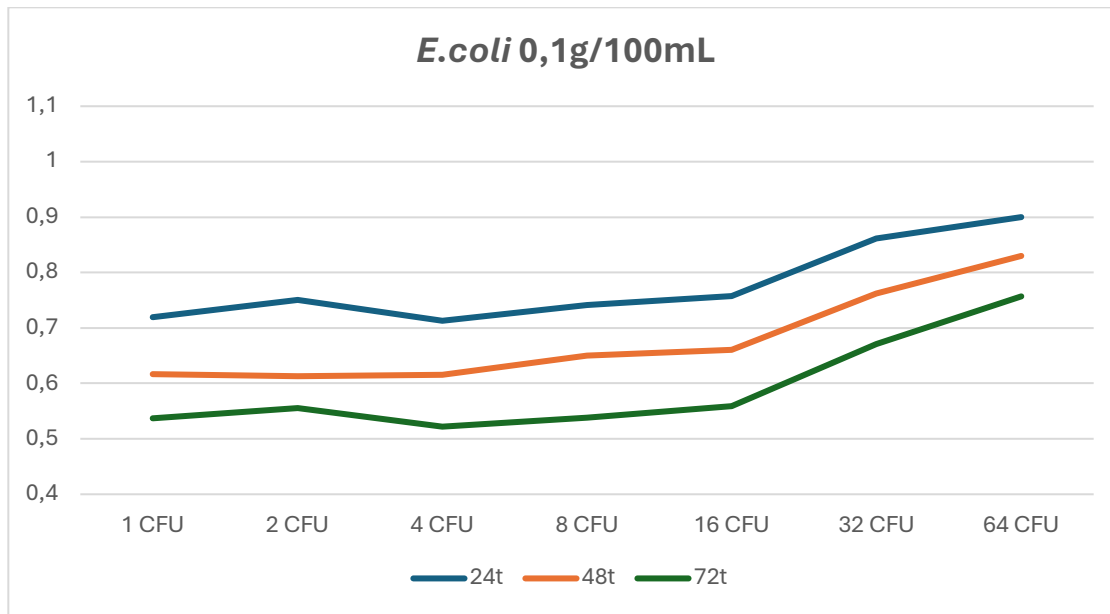
<i>E. coli</i> 0,1g/100mL								Vekstkontroll			
	1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	32
	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU
24t	0,719	0,751	0,713	0,741	0,758	0,862	0,900	0,552	0,579	0,559	0,743
48t	0,617	0,613	0,615	0,650	0,660	0,762	0,830	0,507	0,500	0,494	0,658
72t	0,537	0,556	0,522	0,538	0,559	0,671	0,757	0,651	0,314	0,565	0,366

Tabell 8: Gjennomsnittlige målinger av absorbans for *E. coli* med hydrolysatkonsentrasjon 0,1g/100mL ved 420nm. Hentet fra vedlegg 13.

<i>E. coli</i> 0,6g/100mL								Vekstkontroll			
	1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	32
	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU
24t	0,959	0,845	0,927	0,904	0,883	0,946	1,033	0,567	0,586	0,582	0,776
48t	0,826	0,746	0,841	0,835	0,854	0,927	1,006	0,501	0,478	0,479	0,632
72t	0,812	0,724	0,800	0,813	0,852	0,942	1,038	0,282	0,578	0,423	0,611

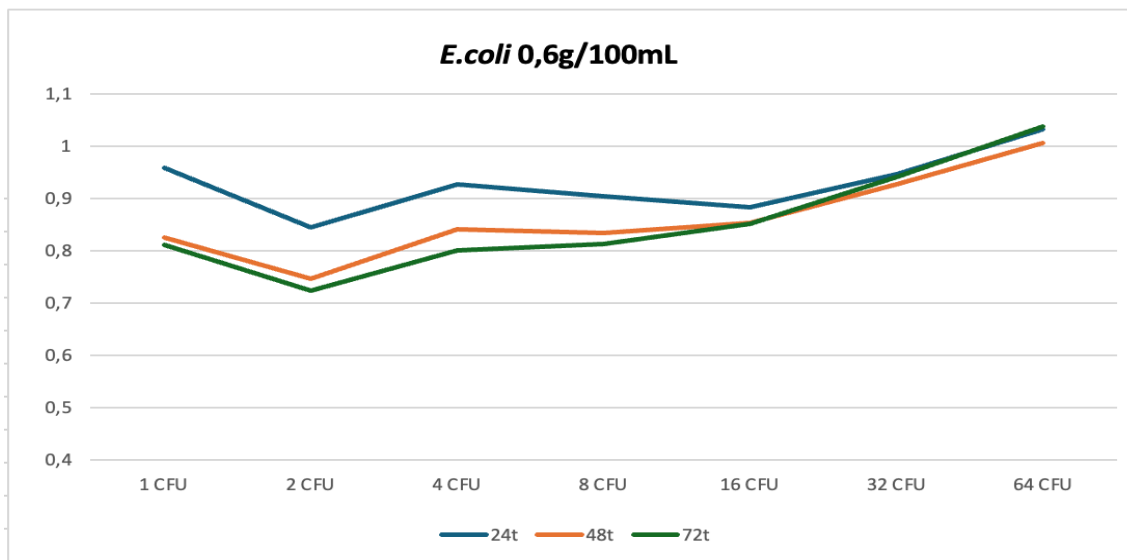
Tabell 9: Gjennomsnittlige målinger av absorbans for *E. coli* med hydrolysatkonsentrasjon 0,6g/100mL ved 420nm. Hentet fra vedlegg 13.

Trendene for 0,1g/100mL for *E. coli* etter 24, 48 og 72 timer vises på graf 1. Grafen viser relativt lik trend for alle dagene, hvor de synker og øker for samme CFU. Den viser at absorbansen synker med omtrent like mye for hvert døgn.



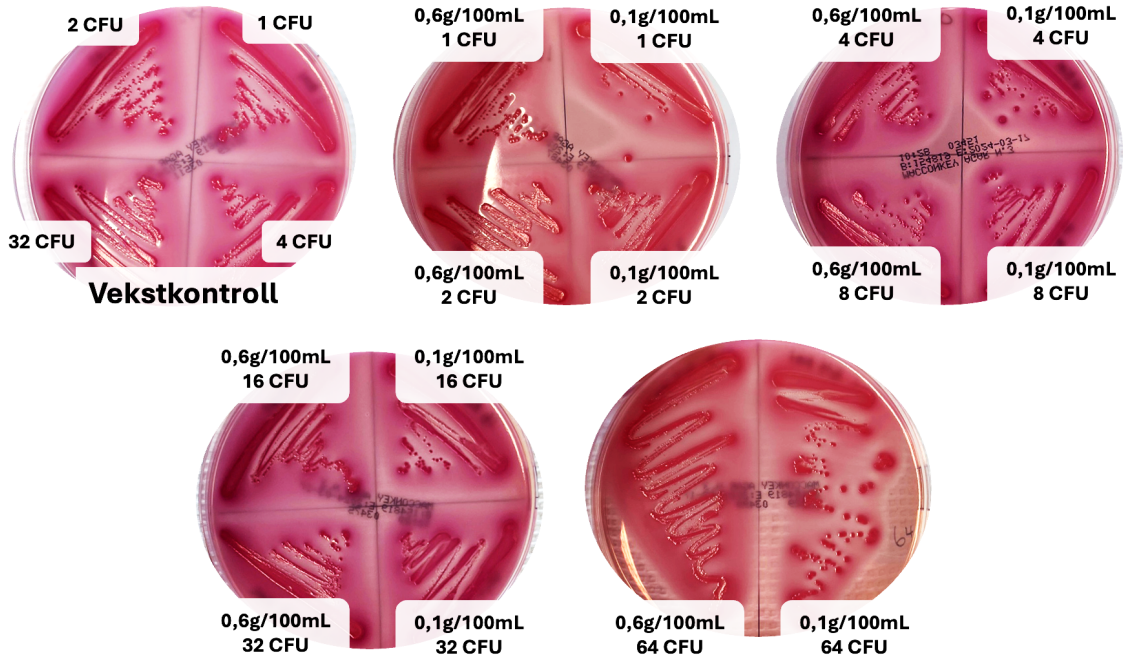
Graf 1: Trendene av verdiene fra tabell 8.

Graf 2 viser trendene for 0,6g/100mL for *E. coli* etter 24, 48 og 72 timer. Trendene er relativt like med økninger og reduksjoner på samme CFU for hver måling. Det observeres en økning i partikler for 64 CFU ved hver måling. Det er liten differanse i partikler ved 48 og 72 timer, mens den er noe større for de fleste CFU'ene ved 24 timer.

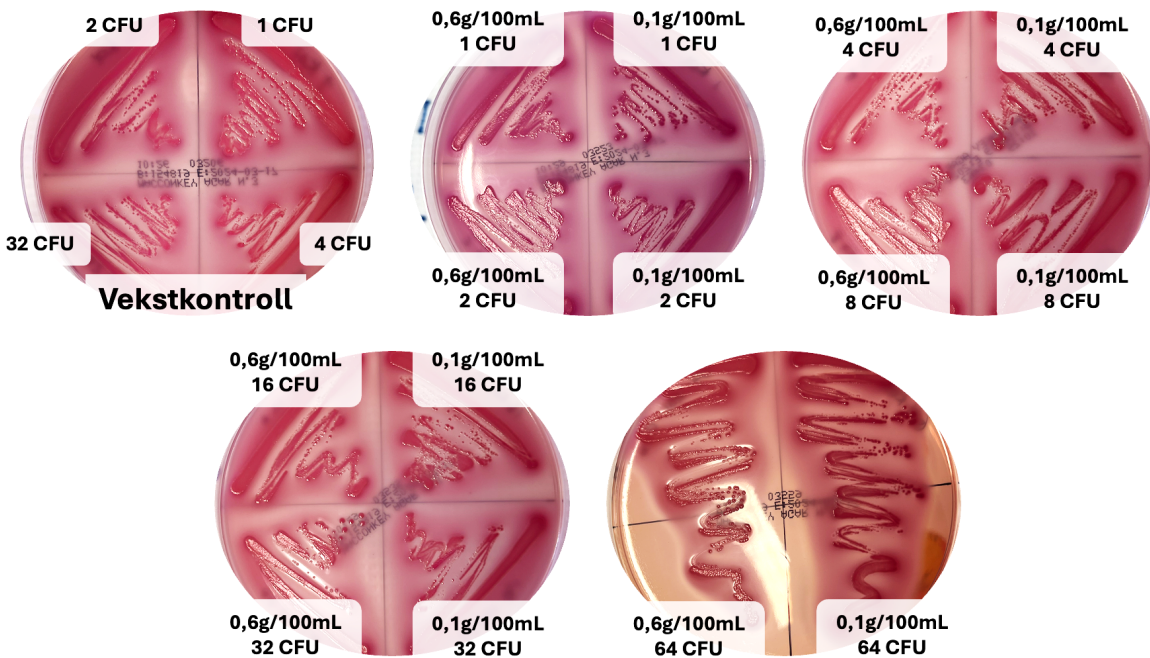


Graf 2: Trendene av verdiene fra tabell 9.

Utsåingene fra *E. coli* etter 24 timer vises på figur 14. Det er merkbar forskjell mellom 0,6g/100mL og 0,1g/100mL for 1, 16 og 64 CFU. Vekstkontrollene viser at det vokser godt. Forskjell mellom konsentrasjonen med samme antall CFU jevner seg ut etter 48 timer (figur 14 og 15). Etter 48 timer er det tilnærmet ingen observerbar differanse mellom konsentrasjonene.



Figur 14: Utsåing av *E. coli* på MacConkey agar etter 24 timer.



Figur 15: Utsåing av *E. coli* på MacConkey agar etter 48 timer.

Se tabell 10 og 11 for resultatene av undersøkelse av antibakteriell effekt, for *S. aureus* med hydrolysatkonsentrasjoner 0,1g/100mL og 0,6g/100mL. Vekstkontrollene viser at *S. aureus* klarer å vokse godt i vekstmediet selv ved lave konsentrasjoner. Resultatene synker litt for hver måling for begge hydrolysatkonsentrasjoner. Vekstkontrollene på tabell 12 øker fra 24 til 72 timer, mens de synker fra 24 til 72 timer på tabell 11.

<b><i>S. aureus</i> 0,1/100mL</b>								<b>Vekstkontroll</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>32</b>
	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>
<b>24t</b>	0,544	0,534	0,544	0,528	0,560	0,611	0,712	0,307	0,311	0,354	0,609
<b>48t</b>	0,529	0,519	0,509	0,526	0,485	0,544	0,612	0,420	0,401	0,436	0,595
<b>72t</b>	0,457	0,464	0,449	0,468	0,484	0,476	0,572	0,625	0,698	0,590	1,043

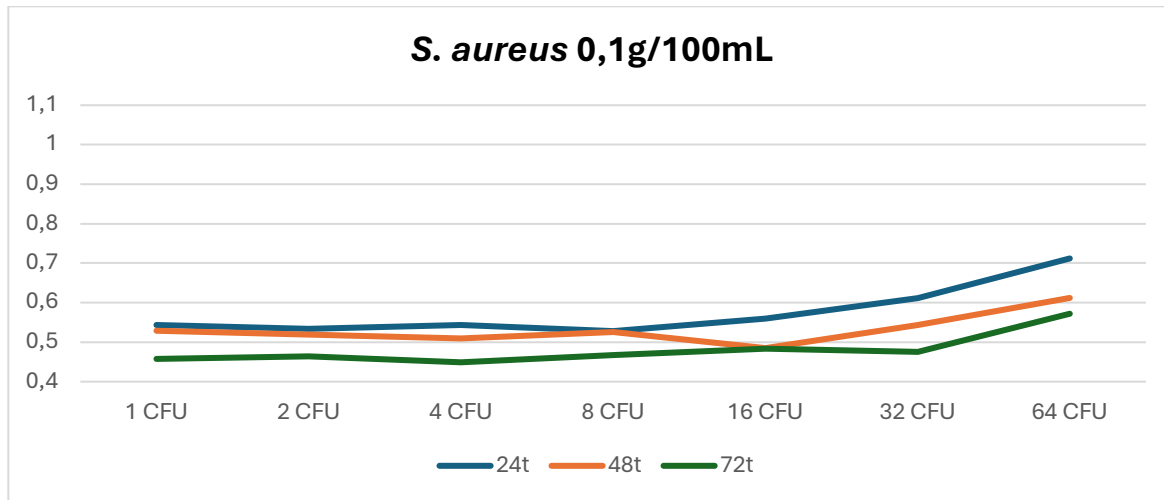
Tabell 10: Gjennomsnittlige målinger av absorbans for *S. aureus* med hydrolysatkonsentrasjon 0,1g/100mL ved 420 nm.

Hentet fra vedlegg 13.

<b><i>S. aureus</i> 0,6g/100mL</b>								<b>Vekstkontroll</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>32</b>
	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>	<b>CFU</b>
<b>24t</b>	0,799	0,803	0,803	0,823	0,851	0,848	0,871	0,357	0,354	0,396	0,625
<b>48t</b>	0,800	0,791	0,792	0,804	0,841	0,858	0,920	0,416	0,382	0,418	0,596
<b>72t</b>	0,766	0,748	0,765	0,806	0,776	0,783	0,852	0,211	0,221	0,198	0,258

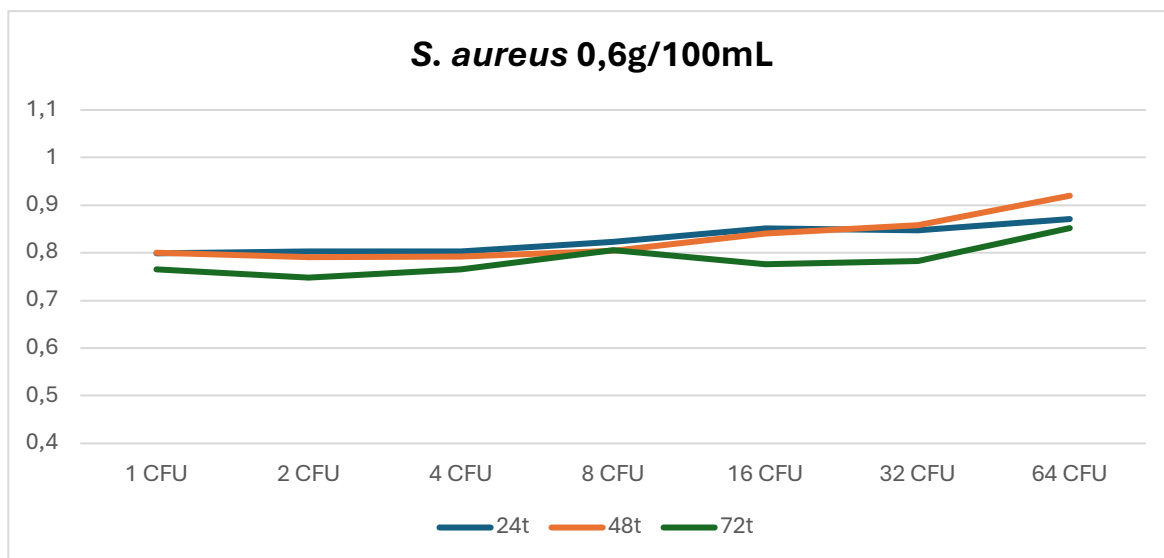
Tabell 11: Gjennomsnittlige målinger av absorbans for *S. aureus* med hydrolysatkonsentrasjon 0,6g/100mL ved 420nm. Hentet fra vedlegg 13.

Trendene for 0,1g/100mL for *S. aureus* etter 24, 48 og 72 timer vises på graf 3. Trendene fra måling etter 24 og 72 timer er relativt like, hvor begge øker mot 64 CFU. Målingene etter 48 timer er noe mer ujevne hvor verdiene varierer i større grad fra CFU til CFU, men øker i takt med de andre målingene ved de høyeste konsentrasjonene.



Graf 3: Trendene av verdiene fra tabell 10.

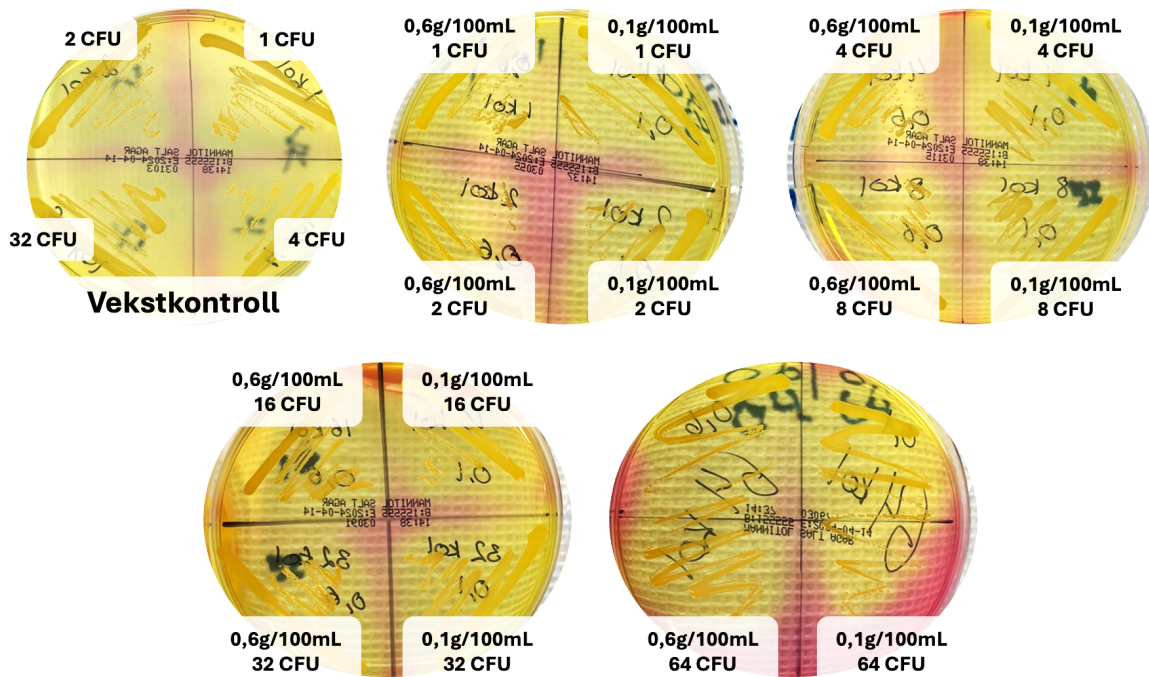
Se graf 4 for 0,6g/100mL for *S. aureus* etter 24, 48 og 72 timer. De målte absorbansverdiene etter 24 og 48 timer er relativt like for alle bakteriekonsentrasjonene. Verdiene fra 72 timer er noe lavere, men noen av verdiene er relativt lik verdier fra 24 og 48 timer.



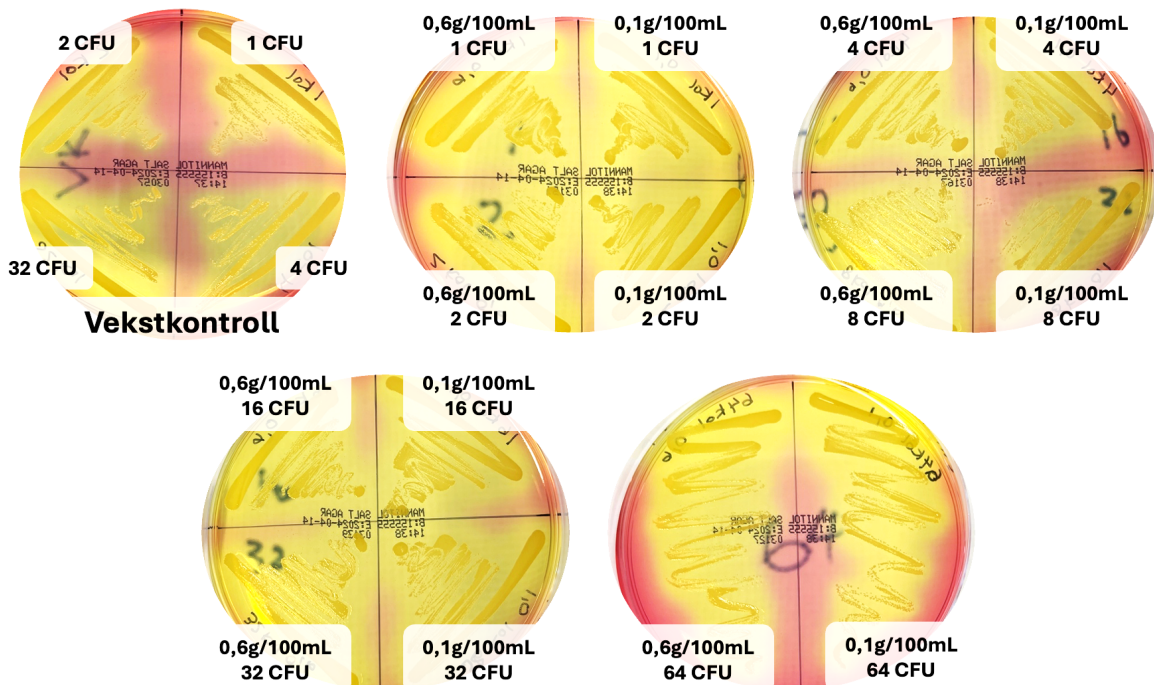
Graf 4: Trendene av verdiene til tabell 11.



Utsåinger av *S. aureus* på Mannitol salt agar etter 24 og 48 timer er vist på figur 16 og 17. Resultatene viser lite forskjell i vekst mellom hydrolysatkonsentrasjonene med samme CFU. Vekstkontrollene viser at det vokser godt. Det kan sees økt vekst på skålene fra 24 til 48 timer.



Figur 16: Utsåing av *S. aureus* på Mannitol salt agar etter 24 timer.



Figur 17: Utsåing av *S. aureus* på Mannitol salt agar etter 48 timer.

## Testing av hydrolysatets egenabsorbans

Resultatene fra absorbansmåling av de ulike hydrolysatkonsentrasjonene er gitt i tabell 12.

Resultatene viser at absorbans øker i takt med hydrolysatkonsentrasjon.

Konsentrasjon	Absorbans per 200mL	Absorbans per 100mL
Sterilkontroll	0,237	0,237
0,1g/100mL	0,491	0,245
0,2g/100mL	0,614	0,307
0,4g/100mL	0,861	0,430
0,6g/100mL	1,268	0,634

Tabell 12: Resultat av absorbansmåling av 200 $\mu$ L hydrolysatkonsentrasjoner ved 420nm. Gjennomsnittsverdier hentet fra vedlegg 16.

## Diskusjon

### Pilotforsøk: Test av vekstmedium, bakteriekultur og avlesningsmetode.

#### Etablere protokoll

Før hovedforsøket kunne starte, ble det gjennomført et pilotforsøk for å finne et optimalt vekstmedium å bruke for dyrking av *E. coli* og *S. aureus*. Nutrient broth ble valgt fordi *E. coli* og *S. aureus* kan vokse i det. Tidligere forskning viser til at 600nm er en optimal bølgelengde for måling av absorbans av bakterier, og dermed ble den brukt i starten (31). Resultatene av absorbansmålingen ble 0,260 for *E. coli* og 0,347 for *S. aureus*. Dette viste at bakteriene kunne vokse i vekstmediet, se tabell 2. Ved utplating av fortynningsrekkene med nutrient broth, viste resultatene lite differanse bortsett fra ved  $10^0$  og  $10^{-1}$ , se tabell 3. Det ble observert mye blakking, som medførte høy egenabsorbans. Utsåingene på figur 9 og 10 viste derimot at det var en tydelig gradient mellom de åtte første fortytningene. Skålene tydet også på at bakteriene ikke vokste tilstrekkelig i mediet. Blakkingen gjorde det også vanskelig å skille mellom hvor mye partikler som var i løsningen, spesielt da fortytningene hadde veldig lave konsentrasjoner av bakterier. Dette førte til at tilnærmet lik absorbans ved måling av de åtte laveste fortytningene, inkludert sterilkontroll (se tabell 3). Dette underbygget teorien om at nutrient broth hadde for høy egenabsorbans.

Vekstmediet ble byttet til DMEM som var et mer næringsrikt medium. Det ble lagd to fortynningsrekker med samme forhold, men ulikt volum. Dette ble gjort for å sjekke om volum kunne ha innvirkning på bakterievekst. Ettersom mediet ble byttet ble det også utført ny test for å se om en annen bølgelengde kunne være optimal. Det ble dermed utført absorbansmålinger med Spectrum-scan fra 250-1000nm. Vedlegg 8 viser fullstendig resultat fra spekter-måling av absorbans, hvor bølgelengde 420nm viste seg å være den optimale bølgelengden. Det ble ikke observert blakking som gjorde DMEM til et mer egnet medium enn nutrient broth. Det ble observert pH-enderinger i form av fargeforandring, løsningen ble gul.

Tabell 4 viser at det var en liten differanse mellom absorbansverdiene til de to volumene og at det ble gradient med begge, men 4mL hadde best resultat. Gradienten til målingene med 4mL var jevnere med færre standardavvik enn 10mL. Fortsatte derfor forsøket med 4mL.

Utsåingene fra fortynningsrekkene viste overgrodde skåler uavhengig av fortynningsgrad, se

figur 11. Det indikerte at DMEM var næringsrikt og fremmet mye vekst. Bruken av DMEM ville medført tidlig dødsfase og vanskeligheter med en potensiell observering av hydrolysatets antibakterielle effekt. Derfor ble det valgt et mindre næringsrikt medium med mange av de samme næringsstoffene; MEM.

### **Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat**

Målet med delforsøket var å undersøke om bakteriene kunne vokse og nå stasjonær fase i vekstmediet når det ble tilsatt peptidhydrolysat. Studerte både pelagisk og salmonid fisk; makrell med ultralyd, makrell uten ultralyd og laks uten ultralyd.

Ved utplating av bakterie og hydrolysat løsning, ble det observert økende absorbansverdier fra 24 timer til 48 timer (tabell 5, 6, 7). pH-indikatoren i fortynningsrekken antydte også god vekst da den ble gul. Fortynningene ble strøket ut på skåler for en visuell representasjon av bakterieveksten. Utsåingene viste god vekst, noe reduksjon på skålene til *E. coli* (figur 12) kunne observeres som korrelerte med absorbansverdiene i tabell 7. *S. aureus* hadde en merkbar reduksjon fra 24 timer til 48 timer (figur 13). Denne reduksjonen var ikke i samsvar med absorbansverdiene som ble målt ved 48 timer. Grunnet gode vekstvilkår og høye bakteriekonsentrasjoner, ble det antatt at dødsfasen var igangsatt innen 24 timer. De høye absorbansverdiene skyldes sannsynligvis celledabri forårsaket av dødsfasen.

Absorbansen for *E. coli* fortynningen  $10^0$  (tabell 5, 6, 7) var noe lavere sammenlignet med de tre andre fortynningene. Det kan tyde på at  $10^0$  kom lengre i vekstsyklusen og cellelysering var igangsatt. Da  $10^0$  inneholdt en høyere bakteriekonsentrasjon ville den nådd dødsfase tidligere ettersom næringsstoffene blir brukt opp raskere. Differansene mellom 24 og 48 timer er minimale. Antok at denne differansen skyldtes at løsningen ikke var helt homogen. Prøvene har antageligvis ulike mengder av levende celler, døde celler og hydrolysat. I praksis vil ikke disse variablene være identiske for alle prøvene. En viss differanse er å regne med. Verdiene til fortynningene  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  og  $10^{-8}$  indikerte at bakteriene kom tilnærmet like langt i vekstsyklusen. Dette var felles for målingene av *E. coli* på tvers av type hydrolysat. Makrell med ultralyd tydet på den beste gradienten for *E. coli*.

Testet makrell med og uten ultralyd for å undersøke om det var en målbar differanse mellom dem. Observerte høyere absorbanverdier for makrell uten. Mistenkte at forhøyede verdier kom fra ulik peptidstørrelse og sammensetning, men vedlegg 15 antydte liten differanse i peptidfraksjoner. Dette kunne kanskje blitt avklart ved å undersøke egenabsorbansen til makrell med og uten ultralyd. Dermed vil det vært mulig å se om ulik fraksjonering ville ført til forhøyet egenabsorbans.

*S. aureus* hadde lite antydning til gradient i resultatene, uavhengig av type hydrolysat (se tabell 5, 6, 7). Generelt var resultatene for absorbanmålingene lite konsekvente. Det var lite sammenheng i absorbanmålingene, da det ble observert økninger og reduksjoner ved samme fortynning. Verdiene var veldig varierende, og det ble derfor rettet større interesse for petriskålene. Skålene viste heller ingen tydelig trend. Det ble bekreftet at bakteriene kunne nå stasjonær fase innen 24 timer. Siden det generelt var varierende resultat for *S. aureus*, ble gradienten for *S. aureus* avgjørende ved valget av hydrolysat.

Forsøket viste at vekstvilkårene var bra nok. Skålene for 24 timer var tett vokste på tvers av fortynningene, både for *E. coli* og *S. aureus*. Etter 48 timer ble det observert en tydelig reduksjon, som bekreftet at stasjonær fase ble nådd innen 24 timer. Sammenlignet med de to andre hydrolysatenes, hadde laks uten ultralyd en tydeligere gradient for *S. aureus* med færre standardavvik. Dette ble avgjørende faktor for hvilket hydrolysat som skulle brukes videre for testing av antibakteriell effekt (se tabell 7).

### **Testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat**

Avsluttende forsøk ble utført med en lavere konsentrasjon av bakterier for å undersøke om hydrolysatet hadde en målbar antibakteriell effekt. Det ble tillaget vekstkontroller for å sikre at bakterier kunne vokse i de valgte konsentrasjonene. Noe tabellene 8, 9, 10, 11 og skålene på figur 14, 15, 16, 17 viste at de kunne. Skålene som ble tatt i bruk i forsøket var bakteriespesifikke, som kun tillot gram positive eller gram negative bakterier å vokse på dem. Dette ble gjort for å kunne utelukke eventuell vekst av andre bakterier.

Resultatene fra absorbanmålingene var betydelig høyere for fortynningene sammenlignet med vekstkontrollene. Verdiene i tabell 8-11 tydet på at hydrolysatet kunne ha fremmet vekst.

Skålene for *E. coli* (figur 14, 15) viste en synlig differanse mellom 0,1g/100mL og 0,6g/100mL, hvor 0,1g/100mL hadde lavere vekst etter 24 timer. Differansen på skålene jevnet seg ut etter 48 timer, hvor veksten på 0,1g/100mL hadde økt. 0,6g/100mL viste en liten reduksjon fra 24 til 48 timer, men de var tilnærmet like. *S. aureus* (figur 16, 17) viste mer vekst etter 48 timer sammenlignet med 24 timer.

Det ble observert bunnfall i prøvene som tydet på at løsningene var mettet. Dermed ble absorbansen av hydrolysatene testet. Resultatene fra absorbansmålingene i tabell 12 viste at hydrolysatet hadde en tydelig gradient som økte proporsjonalt med konsentrasjonen. Hydrolysatet hadde høy egenabsorbans og førte trolig til den observerte gradienten i prøvene. Det ble antatt at hydrolysatet skygget for måling av bakterier, som var mest synlig på 0,6g/100mL. Tabell 12 viste at hydrolysatkonsentrasjon 0,6g/100mL hadde en egenabsorbans på 0,634. Prøvene med hydrolysatkonsentrasjon på 0,6g/100mL (tabell 9, 11) hadde tilnærmet ingen differanse mellom resultatene fra 24, 48 og 72 timer, selv på tvers av gradientene. Dette underbygget teorien.

Resultatene fra tabell 8 og 10 viste at absorbansen på prøvene med hydrolysat minket noe fra dag til dag, men differansene var for liten til å klassifiseres som en målbar inhibering. Skålene viste samtidig tilnærmet lik vekst på 24 timer og 48 timer, hvor noen også hadde økt vekst (figur 14, 15, 16, 17). Noe som viste at veksten ikke ble hemmet av hydrolysatet og MIC dermed ikke observert.

## **Videre forskning**

Til videre forskning vil det vært mulig å bruke LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kits for å se forhold mellom levende og døde bakterier. Ettersom det ble brukt utsåing på skåler i forsøket ville kittet fungert som kontroll på samme måte som utsåing gjorde.

Derfor anbefales det heller å bruke fraksjonerte peptider. Ved å benytte mindre fraksjoner kan konsentrasjonen av de antimikrobielle peptidene økes, for å se på mulig inhiberende effekt.

## **Konklusjon**

Gjennom forsøket ble det ikke observert noen målbar antibakteriell effekt i form av inhibering av vekst. Dette uavhengig av type hydrolysat og konsentrasjon. Absorbansverdiene ble overskygget av hydrolysat som også ville skjult AMP sin biologiske effekt. Skålene viste ingen tegn til inhibering av vekst. Ettersom det ikke var synlig effekt av hele proteinfraksjoner konkluderes det med at marine hydrolysat ikke har antibakteriell effekt i form vekstinhibering.

## Litteraturliste

1. Mitcheltree MJ, Pisipati A, Syroegin EA, Silvestre KJ, Klepacki D, Mason JD, et al. A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance. *Nature* [Internet]. 2021 Nov 18 [cited 2024 Apr 18];599(7885):507–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04045-6>
2. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbio* [Internet]. 2011 [cited 2024 May 1];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00203/abstract>
3. C Reygaert W, Department of Biomedical Sciences, Oakland University William Beaumont School of Medicine, Rochester, MI, USA. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 15];4(3):482–501. Available from: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2018.3.482>
4. Gallagher JC, MacDougall C. *Antibiotics simplified*. Fifth edition. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2023. 282 p.
5. Walsh C, Wencewicz TA. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. Washington, DC: ASM Press; 2016. 64 p.
6. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2019 Oct [cited 2024 Apr 15];51:72–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527419300190>
7. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 16 [cited 2024 May 2];11:582779. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.582779/full>
8. Singh T, Choudhary P, Singh S. Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action. In: Enany S, Masso-Silva J, Savitskaya A, editors. *Insights on Antimicrobial Peptides* [Internet]. IntechOpen; 2022 [cited 2024 May 2]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/78410>
9. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* [Internet]. 2020 Jan [cited 2024 Apr 25];88(1):26–40. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-019-09914-3>
10. Abushaheen MA, Muzahed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*



- [Internet]. 2020 Jun [cited 2024 Apr 16];66(6):100971. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001150292030033X>
11. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2022 Mar [cited 2024 Apr 25];170:106103. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098721004048>
  12. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2024 Apr 5];111(9):1265–73. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/18535>
  13. Bianchi M, Hallström E, Parker RWR, Mifflin K, Tyedmers P, Ziegler F. Assessing seafood nutritional diversity together with climate impacts informs more comprehensive dietary advice. *Commun Earth Environ* [Internet]. 2022 Sep 8 [cited 2024 May 2];3(1):188. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43247-022-00516-4>
  14. Costa F, Teixeira C, Gomes P, Martins MCL. Clinical Application of AMPs. In: Matsuzaki K, editor. *Antimicrobial Peptides* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cited 2024 May 2]. p. 281–98. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1117). Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4\\_15](https://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4_15)
  15. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2018 Jul [cited 2024 Apr 22];61:185–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134818301783>
  16. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2024 May 2];48(suppl\_1):5–16. Available from: [https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl\\_1/5/2473513](https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513)
  17. Su J, Cavaco-Paulo A. Effect of ultrasound on protein functionality. *Ultrasonics Sonochemistry* [Internet]. 2021 Aug [cited 2024 May 2];76:105653. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417721001954>
  18. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2001 Nov [cited 2024 Apr 22];7(11):597–608. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14640490>
  19. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection*,

- Genetics and Evolution [Internet]. 2011 Oct [cited 2024 Apr 22];11(7):1499–504. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134811002103>
20. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2024 May 2]. 28 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/193736>
  21. Cheung R, Ng T, Wong J. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Marine Drugs* [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2024 May 2];13(7):4006–43. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/7/4006>
  22. Sefton AM. Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Their Clinical Relevance in the New Millennium. *Drugs* [Internet]. 2002 [cited 2024 Apr 25];62(4):557–66. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200262040-00001>
  23. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Apr [cited 2024 Apr 22];17(4):203–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0147-4>
  24. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018 Oct [cited 2024 Apr 22];31(4):e00020-18. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00020-18>
  25. Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jędrusik I, Mazurkiewicz E, Jermakow K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2020 Mar [cited 2024 Apr 23];104(5):1871–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-020-10349-w>
  26. Haque M, Islam S, Sheikh MA, Dhingra S, Uwambaye P, Labricciosa FM, et al. Quorum sensing: a new prospect for the management of antimicrobial-resistant infectious diseases. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [Internet]. 2021 May 4 [cited 2024 May 1];19(5):571–86. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14787210.2021.1843427>
  27. Zhao X, Yu Z, Ding T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2024 Apr 22];8(3):425. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/3/425>
  28. Liu S, Li Z, Yu B, Wang S, Shen Y, Cong H. Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science* [Internet]. 2020 Oct [cited 2024 May 2];284:102254. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868620303948>
  29. Kumar M, Saxena M, Saxena AK, Nandi S. Recent Breakthroughs in Various Antimicrobial Resistance Induced Quorum Sensing Biosynthetic Pathway Mediated

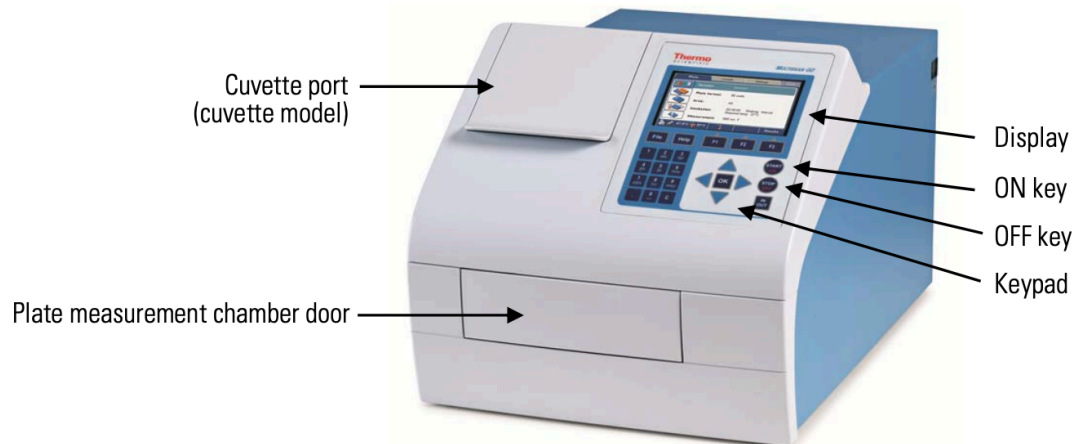
Targets and Design of their Inhibitors. CCHTS [Internet]. 2020 Oct 5 [cited 2024 May 1];23(6):458–76. Available from: <https://www.eurekaselect.com/181325/article>

30. Lubis AR, Sumon MAA, Dinh-Hung N, Dhar AK, Delamare-Deboutteville J, Kim D, et al. Review of quorum-quenching probiotics: A promising non-antibiotic-based strategy for sustainable aquaculture. *Journal of Fish Diseases* [Internet]. 2024 Mar 24 [cited 2024 May 6];e13941. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfd.13941>
31. Beal J, Farny NG, Haddock-Angelli T, Selvarajah V, Baldwin GS, Buckley-Taylor R, et al. Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Commun Biol* [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2024 Apr 23];3(1):512. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-01127-5>
32. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2008 Dec [cited 2024 Apr 5];8(6):747–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713480800141X>
33. Wang M, Lian Y, Wang Y, Zhu L. The role and mechanism of quorum sensing on environmental antimicrobial resistance. *Environmental Pollution* [Internet]. 2023 Apr [cited 2024 Apr 22];322:121238. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749123002403>
34. Gelband H, Miller-Petrie M, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, et al. The State of World's Antibiotics 2015. Copyright © 2015, Medpharm Publications: All rights reserved [Internet]. 2015 Jan 1;(2):34. Available from: <https://journals.co.za/doi/epdf/10.10520/EJC180082>
35. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* [Internet]. 2016 Jan [cited 2024 Apr 16];387(10014):176–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615004730>
36. Gao J, Wu Y, Wang Y, Zhang W, Wei F. Uplink Transmission Design for Crowded Correlated Cell-Free Massive MIMO-OFDM Systems [Internet]. arXiv; 2020 [cited 2024 May 1]. Available from: <http://arxiv.org/abs/2011.00203>
37. Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2020 Dec [cited 2024 Apr 25];208:112829. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523420308011>

# Vedlegg

## Vedlegg 1: Prosedyre for MULTISKAN GO

### Prosedyre for MULTISKAN GO



Figur 1: MULTISKAN GO sett forfra.

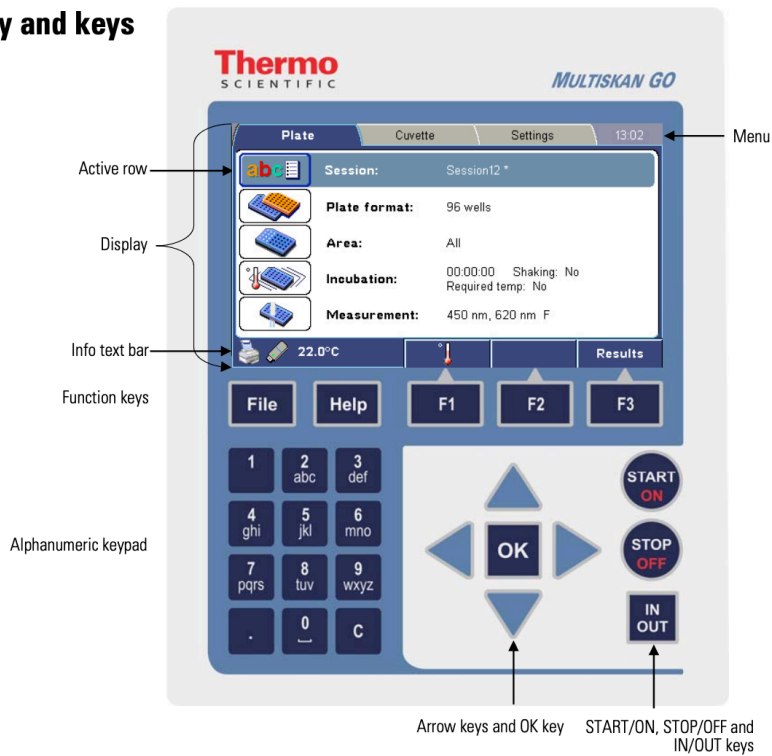
1. Trykk START/ON for å starte opp MULTISKAN GO.
2. Trykk IN/OUT for å kjøre ut platebærer.



Figur 2: MULTISKAN GO med platebærer ute.

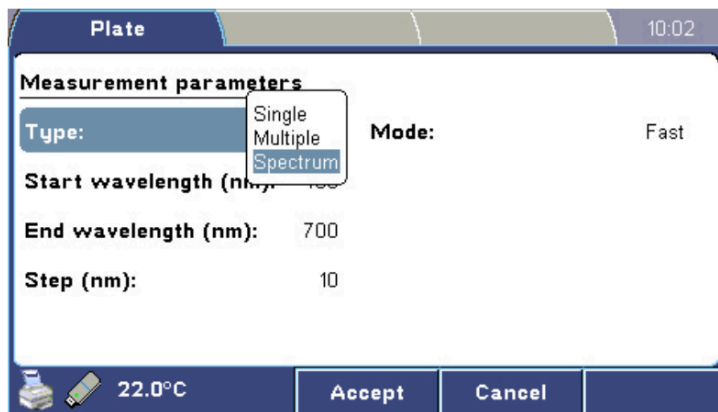
3. Sett alltid mikroplaten slik at A1-hjørnet er plassert i øverste venstre hjørne av platebæreren.
4. Trykk IN/OUT for å kjøre inn platebærer.
5. Navngi økten, velg format: 96 wells og areal: All. Ingen inkubasjon eller risting.

## Display and keys

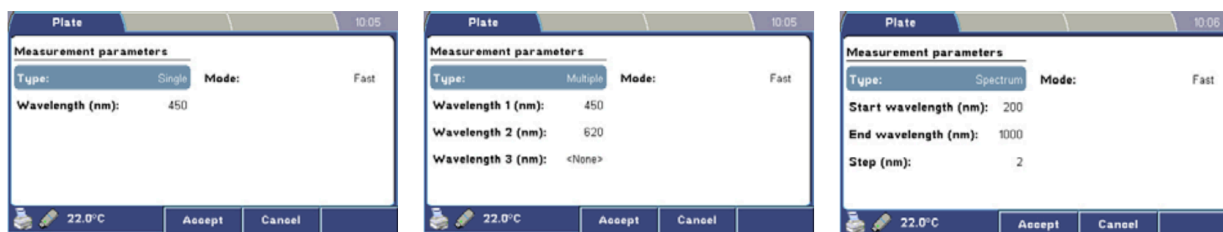


Figur 3: Tastatur og display for MULTISKAN GO.

6. Velg måleparameter: single, multiple eller spectrum. Skriv inn ønskede bølgelengder.



Figur 4: Måleparametere for MULTISKAN GO.



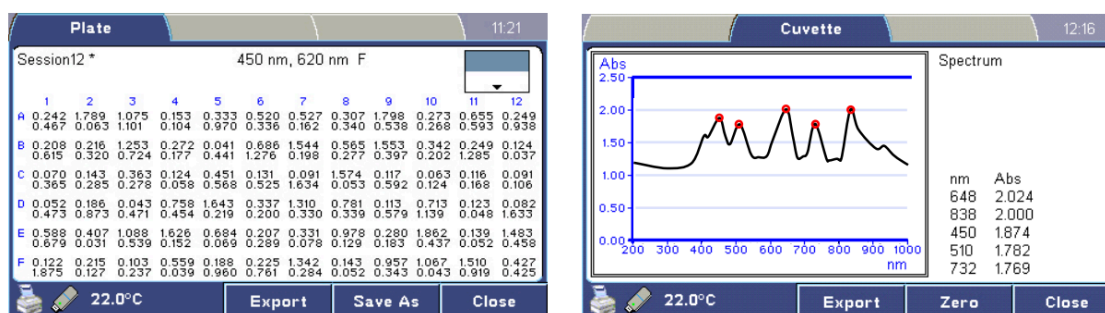
Single

Multiple

Spectrum

Figur 5: Parametere for MULTISKAN GO: single, multiple og spectrum.

7. Trykk START/ON for å starte avlesning.
8. Resultatet vises automatisk på skjermen når avlesning er gjennomført. Single og multiple presenteres som en tabell, mens spectrum presenteres som en graf.



Plate

Graph

Figur 6: Presentasjon av resultat.

9. Lagre resultatet ved å trykke SAVE AS og EXPORT til minnepenn.

### Komplett brukermanual:

Thermo Scientific, (2015), Thermo Scientific Multiskan GO User Manual Rev. 1.2, Cat. No. N10588. Hentet fra: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LCD/manuals/D01521~.pdf>

## Tillaging av nutrient broth og tilsetning av startkultur

### Materialer

- Nutrient broth
- 1L autoklavflasker
- Autoklav
- Autoklavteip
- Destillert vann
- Veieskip
- Vekt
- Startkultur

### Metode

Lages to flasker parallelt.

1. Vei opp 4 gram nutrient broth.
2. Tilsett til 1L autoklavflaske fylt med 500mL destillert vann.
3. Autoklaver i 15 min ved 121°C. Pass på at korken ligger løst og sett på autoklavteip.
4. Flytt autoklavflasken over i autoklavskap.
5. Overfør 200mL nutrient broth til en 500mL autoklavflaske.
6. Overfør 50mL startkultur til flasken.
7. Følg prosedyre for pipettering og MULTISKAN GO for å måle absorbans.

## Testing av volum og DMEM

### Materialer

- 50mL sentrifugerør
- 15mL sentrifugerør
- 4mL sentrifugerør
- Peleus ballong
- DMEM – F12
- 25mL steril pipette
- 200 $\mu$ L pipette
- Autoklaverte pipettespisser
- *S. aureus* på Colombia blodagar
- *E. coli* på Colombia blodagar
- Vortex-mikser
- 10 $\mu$ L podeøser
- 200 $\mu$ L 96-brønnsbrett med rund bunn
- MULTISKAN GO

### Metode

Prosedyren utføres parallelt for *S. aureus* og *E. coli*

1. Pipetter 30mL DMEM til et 50mL sentrifugerør.
2. Bruk en 10 $\mu$ L podeøse til å høste bakterie fra petriskål og overfør 10 $\mu$ L bakterieprøve til sentrifugerøret. Bland godt til bakteriene er fullstendig oppløst.
3. Tillag fortynningsrekke med DMEM som vekstmedium. Fortynningsrekken består av 8 fortyninger med forholdet 1:10. Tillag to fortynningsrekker med volumene: 4mL og 10mL. Bruk tilsvarende 4mL sentrifugerør og 15mL sentrifugerør.
4. For 4mL: Tilsett 4mL DMEM+bakterie til første rør og 3600 $\mu$ L DMEM til fortyningene. Overfør 400 $\mu$ L i hver fortykning. Bland godt ved å pipettere opp og ned.
5. For 10mL: Tilsett 10mL DMEM+bakterie til første rør og 9mL DMEM til fortyningene. Overfør 1mL i hver fortykning. Bland godt ved å pipettere opp og ned.



6. Inkuber fortynningsrekkene ved 35°C i 24 timer.
7. Pipetter fire paralleller av hver fortynning til et 200µL 96-brønnsbrett. Pipetter sterilkontroll (DMEM) på samme brett.
8. Følg prosedyre for MULTISKAN GO. Scan-spectrum med bølgelengde: 250-1000nm med trinn: 10.
9. Les av grafen og finn optimumsbølgelengde.
10. Ny avlesning. Velg multiple og kun optimumsbølgelengder.
11. Stryk ut *S. aureus* og *E. coli* på blodagar og setter til inkubasjon ved 35°C i 24 timer.

Vedlegg 4: Prosedyre for vekstvilkår ved tilsetning av ulike peptidhydrolysat

## Vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat

### Materialer:

- MULTISKAN GO
- Minimum Essential Medium (MEM)
- 4mL sentrifugerør
- 200µl 96-brønns Brett m/ rund bunn
- Stockkultur *E. coli*
- Stockkultur *S. aureus*
- Vortex mikser
- 25mL sterilpipette
- Sterile pipettespisser
- Peleusballong
- Hydrolysat av laks
- Hydrolysat av makrell med ultralyd
- Hydrolysat av makrell
- 1µL podeøse
- Petriskåler med blodagar
- Laboratorievekt
- Veieskip

### Metode:

Prosedyren utføres parallelt for *E. coli* og *S. aureus*. Prosedyren gjennomføres med samme fremgangsmåte for tre ulike hydrolysat:

- Laks
- Makrell
- Makrell med ultralyd

1. Tillag fortynningsrekke med MEM som vekstmedium. Fortynningsrekken består av 8 fortynninger med forholdet 1:10 av bakterieprøve til medium.

2. Tillag hydrolysat slik tabell 1.

Konsentrasjon	Praktisk
0,1g/100mL	0,04g/20mL
0,2g/100mL	0,08g/20mL
0,4g/100mL	0,16g/20mL
0,6g/100mL	0,24g/20mL

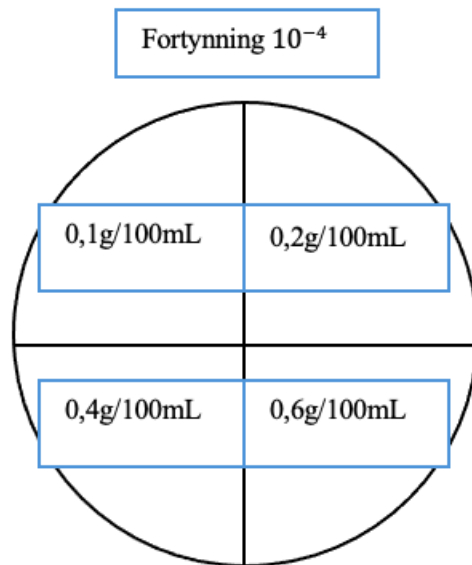
Tabell 1: Teoretisk og praktisk konsentrasjon av hydrolysat.

- Overfør 2mL fortynnet bakterie og 2mL hydrolysatløsning til et 4mL sentrifugerør og bland godt. Gjennomfør for alle fortyntninger.
- Inkuber fortyntningsrekkene ved 35°C i 24 timer.
- Bruk en 200µL pipette til å pipettere ut 200µL på et 96-brønnsbrett. Se tabell 2. Ett brett tilsvarer én hydrolysat-konsentrasjon. VK: vekstkontroll. SK: sterilkontroll.

	<i>E. coli</i>						<i>S. aureus</i>					
	VK	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	SK	VK	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	SK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabell 2: Systematisk oversikt av utplating.

- Følg prosedyre for MULTISKAN GO. Single med bølgelengde 420nm.
- Marker en petriskål i fire deler med en vannfast tusj. Bruk en 1µL pøse til å stryke ut bakterie+hydrolysat-løsningene. Se figur 1.



Figur 3: Oversikt av utsåing, her vist med bakteriekonsentrasjon  $10^{-4}$ .

8. Inkuber skålene ved  $35^{\circ}\text{C}$  i 24 timer. Undersøk skålene etter inkubasjon.
9. Sett fortynningsrekkene tilbake i inkubasjon ved  $35^{\circ}\text{C}$  i 24 timer.
10. Gjenta prosedyre for trinnene 5 til 8.

## Testing av antibakteriell effekt av salmonid peptidhydrolysat

### Materialer:

- MULTISKAN GO
- Minimum Essential Medium (MEM)
- 4mL sentrifugerør
- 96-brønns Brett m/ rund bunn
- Petriskål med *E. coli*
- Petriskål med *S. aureus*
- 25mL sterilpipette
- Sterile pipettespisser
- Peleus ballong
- Hydrolysat av laks
- 1µL podeøse
- 50mL sentrifugerør
- Mannitol salt agar petriskåler (*S. aureus*)
- MacConkey agar petriskåler (*E. coli*)

### Metode:

Prosedyren utføres parallelt for *E. coli* og *S. aureus*.

Tester kun for salmonide peptider med konsentrasjon 0,1g/100mL og 0,6g/100mL.

1. Tillag hydrolysat 80mL av 0,1 g/100ml og 0,6 g/100ml i 50mL sentrifugerør. Dobbel mengde MEM grunnet høsting av CFU fra skål. Se tabell 1.

Konsentrasjon	Praktisk
0,1 g/100mL	0,08g/80mL
0,6 g/100mL	0,48g/80mL

Tabell 1: Teoretisk og praktisk konsentrasjon av hydrolysat.

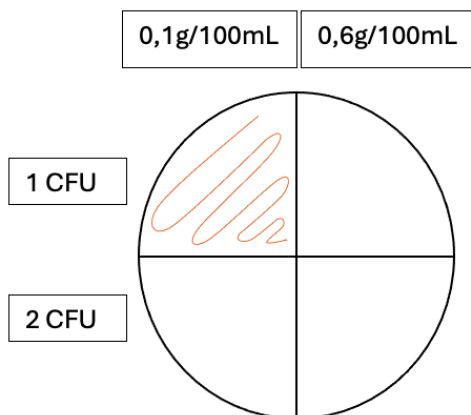
2. Tillag fortynningsrekke og vekstkontroll ved å høste CFU fra tidligere forsøk. Bruk 4mL sentrifugerør og 1µL podeøser.
3. Fortynninger: Tilsett 4mL MEM og 1, 2, 4, 8, 16, 32 og 64 CFU. Bland godt.

- Vekstkontroll: Tilsett 4mL MEM og 1, 2, 4 og 32 CFU. Bland godt.
- Inkuber ved 35°C i 24 timer.
- Bruk en 200µL pipette til å pipettere 200µL av fortynningene og vekstkontrollene på et 96-brønnsbrett. Se tabell 2.

		Bakterier + hydrolysat av laks							Vekstkontroll			
	SK	1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	32
		CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabell 2: Oversikt over utplating på 96-brønnsbrett. Lys blå: *E. coli*. Mørkere blå: *S.aureus*.

- Følg prosedyre for MULTISKAN GO. Multiple med bølgelengdene 280nm, 420nm og 970nm.
- Marker en petriskål i 4 deler med en vannfast tusj. Bruk en 1µL podeløse til å stryke ut bakterie+hydrolysat-løsningene. Bruk bakterie-spesifikke petriskåler. Se figur 1.



Figur 1: Visuell fremvisning av utsåing på bakteriespesifikke petriskåler.

- Inkuber petriskålene ved 35°C i 24 timer. Undersøk skålene etter inkubasjon.
- Sett fortynningsrekkene tilbake i inkubasjon ved 35°C i 24 timer.

11. Gjenta prosedyre for trinnene 6 til 9.

12. Gjenta prosedyre for 72 timer.

## Vedlegg 6: Prosedyre for testing av hydrolysatets egenabsorbans

### Testing av hydrolysatets egenabsorbans

#### Materialer:

- 25mL sterilpipette
- Peleus ballong
- Minimum Essential Medium (MEM)
- 50mL sentrifugerør
- 96-brønnsbrett m/ rund bunn
- MULTISKAN GO
- Sterile pipettespisser
- Steril pipette 200 $\mu$ L
- Hydrolysat av laks

#### Metode:

1. Tillag 20ml av hver konsentrasjon av hydrolysat; 0,1g/100ml, 0,2g/100ml, 0,4g/100ml og 0,6g/100ml. Se tabell 1.

Konsentrasjon	Praktisk
0,1g/100mL	0,04g/20mL
0,2g/100mL	0,08g/20mL
0,4g/100mL	0,16g/20mL
0,6g/100mL	0,24g/20mL

Tabell 1: Teoretisk og praktisk konsentrasjon av hydrolysat.

2. Inkuber ved 35°C i 24 timer.
3. Bruk en 200 $\mu$ L til å pipettere 200 $\mu$ L på et 96-brønnsbrett. Se tabell 2.

		Rad: 1 – 9. Hydrolysat	Rad: 10-12. Sterilkontroll
<b>0,1g/100ml</b>	<b>A+B</b>		
<b>0,2g/100ml</b>	<b>C+D</b>		
<b>0,4g/100ml</b>	<b>E+F</b>		
<b>0,6g/100ml</b>	<b>G+H</b>		

Tabell 2: Viser utplating av hydrolysatkonsentrasjonene.

4. Følg prosedyre for MULTISKAN GO. Single med bølgelengde 420nm.



Vedlegg 7: Tabell for standardkurver med Nutrient broth etter 24 timer.

<i>S. Aureus</i>											
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	SK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.239	0.069	0.05	0.050	0.05	0.049	0.05	0.049	0.048	0.050	0.049
B	0.243	0.071	0.06	0.05	0.05	0.050	0.05	0.061	0.050	0.050	0.051
C	0.250	0.071	0.05	0.05	0.05	0.047	0.05	0.049	0.049	0.049	0.052
D	0.234	0.068	0.05	0.050	0.05	0.050	0.05	0.049	0.048	0.048	0.053
E	0.239	0.071	0.05	0.05	0.05	0.048	0.050	0.050	0.049	0.048	0.052
F	0.245	0.069	0.05	0.05	0.05	0.049	0.050	0.078	0.049	0.050	0.051
G	0.233	0.070	0.05	0.05	0.05	0.048	0.05	0.050	0.049	0.051	0.052
H	0.240	0.068	0.05	0.05	0.05	0.043	0.05	0.049	0.051	0.048	0.048
	0.241	0.070	0.052	0.051	0.052	0.048	0.049	0.055	0.049	0.049	0.051

<i>E. coli</i>											
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	Blank
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.28	0.074	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.051	0.053	0.052
B	0.28	0.077	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.051	0.052	0.055
C	0.28	0.074	0.05	0.05	0.05	0.049	0.05	0.05	0.052	0.049	0.051
D	0.27	0.074	0.05	0.05	0.05	0.052	0.05	0.052	0.052	0.052	0.052
E	0.28	0.073	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.05	0.05
F	0.28	0.074	0.06	0.05	0.05	0.051	0.05	0.052	0.053	0.052	0.052
G	0.28	0.077	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.052	0.052	0.052
H	0.28	0.074	0.05	0.05	0.05	0.049	0.05	0.047	0.05	0.049	0.051
	0.278	0.075	0.054	0.051	0.050	0.050	0.050	0.050	0.052	0.051	0.052

Vedlegg 8: Tabell for testing av volum og DMEM etter 24 timer.

nm	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
250	3.867	3.823	3.824	3.823	3.813	3.806	3.806	3.798	3.792	3.587	3.482	3.474
260	3.837	3.793	3.797	3.798	3.803	3.801	3.792	3.784	3.769	3.573	3.469	3.453
270	3.707	3.664	3.669	3.672	3.664	3.649	3.651	3.648	3.629	3.417	3.294	3.280
280	3.311	3.249	3.271	3.293	3.282	3.262	3.274	3.287	3.240	2.871	2.479	2.327
290	2.051	1.882	1.950	1.993	1.967	1.936	1.954	1.979	1.928	1.292	0.924	0.858
300	1.243	1.099	1.129	1.139	1.128	1.103	1.103	1.103	1.075	0.587	0.343	0.327
310	1.053	0.924	0.944	0.949	0.942	0.919	0.919	0.914	0.890	0.449	0.244	0.233
320	0.953	0.834	0.848	0.852	0.847	0.826	0.826	0.820	0.798	0.380	0.204	0.196
330	0.892	0.780	0.792	0.796	0.791	0.771	0.770	0.764	0.744	0.341	0.182	0.174
340	0.826	0.720	0.730	0.733	0.728	0.709	0.708	0.701	0.683	0.305	0.161	0.154
350	0.772	0.671	0.680	0.682	0.678	0.660	0.658	0.651	0.634	0.285	0.144	0.138
360	0.736	0.639	0.646	0.647	0.644	0.627	0.625	0.617	0.601	0.269	0.118	0.114
370	0.699	0.606	0.610	0.609	0.607	0.590	0.588	0.578	0.565	0.231	0.076	0.076
380	0.694	0.605	0.607	0.606	0.604	0.587	0.586	0.575	0.563	0.216	0.062	0.062
390	0.703	0.617	0.619	0.618	0.616	0.599	0.599	0.588	0.577	0.220	0.056	0.056
400	0.721	0.639	0.640	0.639	0.637	0.620	0.621	0.610	0.600	0.239	0.053	0.053
410	0.740	0.660	0.660	0.659	0.657	0.641	0.642	0.632	0.623	0.260	0.052	0.052
420	0.752	0.676	0.675	0.674	0.672	0.656	0.659	0.648	0.640	0.280	0.051	0.051
430	0.750	0.677	0.675	0.675	0.673	0.657	0.660	0.649	0.643	0.290	0.050	0.050
440	0.728	0.659	0.657	0.657	0.655	0.639	0.642	0.632	0.626	0.288	0.050	0.049
450	0.691	0.625	0.622	0.622	0.620	0.605	0.608	0.598	0.591	0.274	0.049	0.049
460	0.641	0.576	0.573	0.573	0.571	0.557	0.559	0.550	0.543	0.251	0.049	0.048
470	0.580	0.517	0.513	0.514	0.512	0.499	0.500	0.491	0.484	0.222	0.049	0.048
480	0.529	0.468	0.463	0.464	0.463	0.450	0.450	0.443	0.435	0.201	0.048	0.048
490	0.472	0.414	0.409	0.409	0.409	0.397	0.396	0.389	0.380	0.182	0.048	0.048
500	0.432	0.375	0.370	0.371	0.370	0.359	0.357	0.350	0.342	0.175	0.048	0.048
510	0.398	0.342	0.337	0.337	0.337	0.327	0.324	0.318	0.309	0.179	0.048	0.047
520	0.374	0.320	0.314	0.315	0.315	0.305	0.302	0.296	0.287	0.194	0.048	0.047
530	0.359	0.306	0.301	0.302	0.302	0.292	0.289	0.283	0.274	0.215	0.048	0.047
540	0.348	0.296	0.290	0.291	0.291	0.282	0.279	0.273	0.264	0.255	0.048	0.047
550	0.341	0.290	0.284	0.285	0.285	0.276	0.273	0.268	0.259	0.303	0.048	0.047
560	0.334	0.284	0.278	0.279	0.280	0.270	0.268	0.262	0.254	0.325	0.048	0.047
570	0.327	0.279	0.273	0.274	0.274	0.266	0.263	0.258	0.249	0.247	0.048	0.047
580	0.320	0.274	0.268	0.269	0.269	0.261	0.258	0.253	0.245	0.140	0.048	0.047
590	0.314	0.270	0.263	0.265	0.265	0.257	0.254	0.249	0.241	0.080	0.048	0.047
600	0.309	0.266	0.260	0.261	0.261	0.253	0.251	0.246	0.238	0.061	0.048	0.047
610	0.304	0.262	0.256	0.257	0.257	0.249	0.247	0.242	0.235	0.054	0.047	0.047
620	0.299	0.259	0.252	0.254	0.254	0.246	0.244	0.239	0.232	0.052	0.047	0.046
630	0.294	0.255	0.248	0.250	0.250	0.243	0.240	0.236	0.229	0.050	0.047	0.046
640	0.290	0.251	0.245	0.246	0.247	0.239	0.237	0.233	0.226	0.050	0.046	0.046
650	0.285	0.248	0.242	0.243	0.243	0.236	0.234	0.229	0.223	0.049	0.046	0.045
660	0.281	0.245	0.239	0.240	0.240	0.233	0.231	0.227	0.220	0.049	0.045	0.045
670	0.277	0.242	0.236	0.237	0.237	0.231	0.229	0.224	0.218	0.049	0.045	0.045
680	0.273	0.238	0.232	0.234	0.234	0.227	0.225	0.221	0.215	0.048	0.045	0.045
690	0.270	0.235	0.230	0.231	0.231	0.225	0.223	0.219	0.213	0.048	0.045	0.044

700	0.266	0.233	0.228	0.229	0.229	0.223	0.221	0.217	0.211	0.048	0.045	0.045
710	0.263	0.230	0.225	0.226	0.227	0.220	0.219	0.215	0.209	0.048	0.045	0.044
720	0.261	0.229	0.224	0.225	0.225	0.219	0.218	0.213	0.208	0.049	0.045	0.045
730	0.259	0.228	0.223	0.224	0.225	0.219	0.217	0.213	0.207	0.050	0.044	0.044
740	0.258	0.227	0.222	0.224	0.224	0.218	0.217	0.213	0.207	0.052	0.044	0.044
750	0.254	0.225	0.220	0.222	0.222	0.216	0.215	0.211	0.205	0.052	0.044	0.044
760	0.252	0.223	0.218	0.219	0.220	0.214	0.213	0.209	0.204	0.052	0.044	0.044
770	0.248	0.220	0.216	0.217	0.217	0.212	0.210	0.207	0.201	0.052	0.044	0.044
780	0.245	0.218	0.213	0.214	0.215	0.209	0.208	0.204	0.199	0.052	0.044	0.044
790	0.241	0.215	0.210	0.211	0.212	0.206	0.205	0.201	0.197	0.051	0.044	0.044
800	0.238	0.212	0.207	0.209	0.209	0.204	0.203	0.199	0.194	0.050	0.044	0.044
810	0.235	0.210	0.205	0.206	0.207	0.201	0.200	0.197	0.192	0.050	0.044	0.044
820	0.233	0.208	0.203	0.205	0.205	0.200	0.199	0.195	0.191	0.050	0.044	0.044
830	0.232	0.208	0.204	0.205	0.206	0.201	0.200	0.196	0.192	0.053	0.044	0.044
840	0.232	0.208	0.204	0.205	0.206	0.200	0.200	0.196	0.192	0.055	0.044	0.044
850	0.230	0.207	0.203	0.204	0.205	0.199	0.199	0.195	0.191	0.055	0.044	0.044
860	0.229	0.207	0.202	0.204	0.204	0.199	0.199	0.195	0.192	0.057	0.044	0.044
870	0.230	0.208	0.204	0.205	0.206	0.201	0.201	0.197	0.193	0.060	0.047	0.047
880	0.227	0.206	0.202	0.204	0.204	0.199	0.199	0.196	0.192	0.061	0.046	0.046
890	0.225	0.204	0.201	0.202	0.202	0.197	0.197	0.194	0.191	0.061	0.044	0.044
900	0.224	0.203	0.200	0.201	0.202	0.197	0.197	0.193	0.190	0.062	0.044	0.044
910	0.224	0.204	0.201	0.201	0.202	0.197	0.197	0.194	0.191	0.064	0.044	0.044
920	0.227	0.208	0.204	0.205	0.206	0.202	0.202	0.197	0.195	0.069	0.045	0.045
930	0.235	0.216	0.213	0.214	0.215	0.209	0.210	0.206	0.203	0.080	0.045	0.045
940	0.250	0.232	0.230	0.231	0.231	0.226	0.227	0.223	0.221	0.099	0.044	0.044
950	0.276	0.259	0.258	0.259	0.259	0.254	0.255	0.251	0.249	0.129	0.044	0.044
960	0.313	0.297	0.296	0.297	0.298	0.291	0.294	0.289	0.288	0.169	0.043	0.043
970	0.319	0.305	0.304	0.304	0.305	0.299	0.302	0.297	0.295	0.177	0.044	0.043
980	0.318	0.303	0.303	0.303	0.304	0.298	0.301	0.295	0.295	0.179	0.043	0.043
990	0.308	0.293	0.293	0.293	0.294	0.288	0.291	0.286	0.284	0.172	0.044	0.045
1000	0.293	0.279	0.279	0.279	0.279	0.274	0.277	0.272	0.270	0.159	0.044	0.044

nm	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
250	3.857	3.831	3.832	3.819	3.823	3.810	3.817	3.820	3.823	3.590	3.485	3.469
260	3.858	3.810	3.815	3.798	3.815	3.786	3.805	3.795	3.789	3.569	3.467	3.469
270	3.724	3.665	3.680	3.666	3.671	3.667	3.668	3.659	3.663	3.414	3.291	3.286
280	3.366	3.246	3.280	3.266	3.279	3.260	3.294	3.278	3.280	2.874	2.540	2.486
290	2.137	1.912	1.976	1.956	1.963	1.932	1.995	1.938	1.948	1.286	0.956	0.940
300	1.282	1.117	1.158	1.134	1.134	1.107	1.130	1.101	1.105	0.581	0.349	0.351
310	1.084	0.940	0.971	0.948	0.949	0.926	0.940	0.918	0.921	0.444	0.249	0.250
320	0.980	0.847	0.873	0.853	0.854	0.833	0.845	0.825	0.829	0.375	0.208	0.209
330	0.918	0.793	0.816	0.797	0.797	0.778	0.788	0.770	0.774	0.337	0.185	0.185
340	0.849	0.731	0.752	0.734	0.734	0.716	0.723	0.707	0.711	0.301	0.163	0.163
350	0.793	0.682	0.701	0.683	0.683	0.667	0.673	0.658	0.662	0.281	0.145	0.145
360	0.756	0.650	0.667	0.650	0.650	0.634	0.639	0.626	0.629	0.266	0.118	0.119
370	0.717	0.616	0.633	0.615	0.616	0.598	0.602	0.592	0.595	0.228	0.076	0.077

380	0.712	0.615	0.631	0.613	0.614	0.596	0.600	0.591	0.595	0.214	0.062	0.063
390	0.722	0.628	0.643	0.626	0.628	0.609	0.614	0.606	0.610	0.218	0.055	0.056
400	0.741	0.650	0.665	0.648	0.651	0.631	0.637	0.631	0.635	0.236	0.053	0.053
410	0.762	0.673	0.687	0.670	0.674	0.652	0.660	0.655	0.660	0.258	0.051	0.052
420	0.776	0.689	0.703	0.686	0.691	0.668	0.677	0.673	0.678	0.279	0.051	0.050
430	0.774	0.691	0.703	0.687	0.692	0.670	0.678	0.675	0.681	0.288	0.050	0.050
440	0.752	0.673	0.685	0.669	0.674	0.652	0.661	0.657	0.663	0.287	0.049	0.049
450	0.714	0.638	0.649	0.634	0.638	0.618	0.625	0.622	0.627	0.273	0.049	0.049
460	0.661	0.588	0.597	0.583	0.586	0.568	0.575	0.571	0.576	0.250	0.048	0.048
470	0.598	0.527	0.536	0.522	0.525	0.509	0.513	0.509	0.513	0.222	0.048	0.048
480	0.545	0.477	0.484	0.471	0.473	0.459	0.463	0.457	0.461	0.201	0.048	0.048
490	0.486	0.421	0.426	0.415	0.416	0.404	0.406	0.400	0.403	0.182	0.048	0.047
500	0.444	0.381	0.386	0.375	0.375	0.365	0.366	0.359	0.362	0.175	0.047	0.047
510	0.408	0.346	0.351	0.341	0.340	0.332	0.332	0.324	0.328	0.180	0.047	0.047
520	0.383	0.323	0.327	0.318	0.317	0.310	0.309	0.301	0.304	0.195	0.047	0.047
530	0.368	0.310	0.313	0.304	0.303	0.296	0.296	0.288	0.291	0.216	0.047	0.047
540	0.356	0.299	0.302	0.293	0.292	0.286	0.285	0.278	0.280	0.257	0.047	0.047
550	0.349	0.293	0.296	0.287	0.286	0.280	0.280	0.272	0.275	0.305	0.047	0.047
560	0.342	0.287	0.290	0.281	0.281	0.275	0.274	0.267	0.269	0.327	0.048	0.047
570	0.335	0.282	0.284	0.276	0.275	0.269	0.269	0.262	0.264	0.249	0.047	0.047
580	0.328	0.277	0.279	0.271	0.270	0.265	0.264	0.257	0.260	0.140	0.047	0.047
590	0.322	0.272	0.274	0.267	0.266	0.260	0.260	0.253	0.255	0.080	0.047	0.047
600	0.317	0.269	0.270	0.263	0.262	0.257	0.257	0.250	0.252	0.061	0.047	0.047
610	0.311	0.264	0.266	0.259	0.258	0.253	0.253	0.246	0.248	0.053	0.047	0.047
620	0.307	0.261	0.262	0.256	0.255	0.250	0.250	0.243	0.245	0.051	0.046	0.046
630	0.302	0.257	0.258	0.252	0.251	0.246	0.246	0.240	0.242	0.050	0.046	0.046
640	0.297	0.253	0.254	0.248	0.248	0.243	0.243	0.237	0.239	0.049	0.046	0.045
650	0.293	0.249	0.251	0.245	0.245	0.240	0.240	0.234	0.236	0.048	0.045	0.045
660	0.288	0.246	0.248	0.242	0.242	0.237	0.237	0.231	0.233	0.048	0.045	0.045
670	0.284	0.243	0.245	0.239	0.239	0.234	0.234	0.229	0.230	0.048	0.045	0.045
680	0.280	0.239	0.241	0.236	0.236	0.231	0.231	0.226	0.227	0.048	0.045	0.045
690	0.276	0.237	0.239	0.233	0.233	0.228	0.229	0.223	0.225	0.047	0.044	0.044
700	0.273	0.234	0.236	0.231	0.231	0.226	0.226	0.221	0.223	0.048	0.044	0.045
710	0.269	0.231	0.233	0.228	0.228	0.223	0.224	0.219	0.221	0.048	0.044	0.044
720	0.267	0.230	0.232	0.227	0.227	0.222	0.223	0.218	0.220	0.049	0.044	0.045
730	0.265	0.229	0.231	0.226	0.226	0.222	0.223	0.218	0.219	0.050	0.044	0.044
740	0.264	0.228	0.230	0.226	0.226	0.221	0.222	0.218	0.219	0.052	0.044	0.044
750	0.261	0.226	0.228	0.224	0.224	0.219	0.220	0.216	0.217	0.052	0.044	0.044
760	0.258	0.223	0.226	0.221	0.222	0.217	0.218	0.214	0.215	0.052	0.044	0.044
770	0.254	0.221	0.223	0.219	0.219	0.214	0.216	0.212	0.213	0.052	0.043	0.044
780	0.251	0.218	0.221	0.216	0.217	0.212	0.213	0.209	0.210	0.051	0.044	0.044
790	0.247	0.215	0.218	0.213	0.214	0.209	0.210	0.207	0.208	0.051	0.044	0.044
800	0.244	0.212	0.215	0.211	0.212	0.207	0.208	0.204	0.205	0.050	0.044	0.044
810	0.241	0.210	0.212	0.208	0.209	0.204	0.205	0.202	0.203	0.050	0.044	0.044
820	0.239	0.208	0.211	0.207	0.207	0.203	0.204	0.201	0.202	0.050	0.043	0.044
830	0.238	0.208	0.211	0.207	0.208	0.204	0.205	0.202	0.203	0.052	0.043	0.044
840	0.238	0.207	0.211	0.207	0.208	0.203	0.205	0.202	0.203	0.054	0.044	0.044

850	0.236	0.206	0.210	0.206	0.207	0.202	0.204	0.201	0.202	0.055	0.044	0.043
860	0.235	0.206	0.209	0.206	0.207	0.202	0.204	0.200	0.202	0.057	0.045	0.044
870	0.235	0.207	0.211	0.207	0.208	0.203	0.205	0.202	0.203	0.060	0.047	0.047
880	0.233	0.205	0.210	0.206	0.207	0.202	0.204	0.201	0.202	0.061	0.046	0.046
890	0.230	0.203	0.208	0.204	0.205	0.200	0.202	0.199	0.200	0.061	0.044	0.044
900	0.229	0.203	0.207	0.204	0.205	0.199	0.201	0.199	0.200	0.062	0.044	0.044
910	0.230	0.203	0.208	0.204	0.205	0.200	0.202	0.200	0.201	0.064	0.044	0.044
920	0.232	0.206	0.211	0.208	0.209	0.204	0.206	0.203	0.204	0.069	0.045	0.045
930	0.239	0.213	0.219	0.216	0.218	0.211	0.214	0.212	0.214	0.079	0.045	0.045
940	0.254	0.230	0.236	0.233	0.235	0.229	0.231	0.231	0.232	0.098	0.044	0.044
950	0.281	0.257	0.265	0.261	0.264	0.256	0.261	0.260	0.261	0.127	0.044	0.044
960	0.318	0.294	0.305	0.300	0.304	0.294	0.300	0.300	0.302	0.167	0.044	0.043
970	0.324	0.301	0.311	0.307	0.311	0.302	0.307	0.307	0.310	0.175	0.043	0.043
980	0.323	0.299	0.310	0.306	0.310	0.300	0.306	0.306	0.308	0.176	0.043	0.043
990	0.312	0.291	0.300	0.296	0.300	0.291	0.296	0.296	0.298	0.169	0.044	0.044
1000	0.297	0.276	0.286	0.282	0.285	0.276	0.283	0.282	0.283	0.157	0.045	0.043

nm	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
250	3.879	3.838	3.828	3.838	3.817	3.839	3.828	3.842	3.809	3.585	3.471	3.475
260	3.857	3.804	3.812	3.811	3.804	3.814	3.804	3.823	3.789	3.583	3.470	3.474
270	3.728	3.679	3.686	3.668	3.672	3.691	3.678	3.677	3.662	3.417	3.286	3.300
280	3.366	3.234	3.293	3.296	3.238	3.290	3.299	3.269	3.259	2.847	2.439	2.583
290	2.154	1.903	1.990	2.002	1.942	2.015	1.995	1.992	1.947	1.261	0.898	1.011
300	1.298	1.122	1.163	1.156	1.136	1.165	1.146	1.175	1.105	0.573	0.336	0.370
310	1.099	0.945	0.973	0.966	0.952	0.973	0.961	0.989	0.920	0.437	0.241	0.262
320	0.994	0.853	0.875	0.867	0.856	0.876	0.866	0.895	0.828	0.369	0.202	0.217
330	0.930	0.798	0.818	0.810	0.801	0.819	0.809	0.838	0.773	0.332	0.181	0.192
340	0.862	0.736	0.754	0.746	0.738	0.753	0.744	0.774	0.709	0.296	0.160	0.169
350	0.805	0.687	0.702	0.694	0.687	0.701	0.693	0.723	0.660	0.278	0.143	0.150
360	0.768	0.655	0.668	0.660	0.655	0.668	0.660	0.690	0.628	0.263	0.118	0.122
370	0.731	0.624	0.634	0.625	0.622	0.634	0.625	0.657	0.592	0.225	0.078	0.079
380	0.726	0.623	0.632	0.623	0.621	0.633	0.624	0.655	0.592	0.211	0.064	0.063
390	0.736	0.637	0.645	0.637	0.635	0.649	0.639	0.669	0.607	0.214	0.058	0.056
400	0.756	0.659	0.667	0.661	0.657	0.674	0.663	0.692	0.632	0.232	0.056	0.053
410	0.778	0.682	0.689	0.684	0.680	0.698	0.687	0.715	0.656	0.253	0.054	0.052
420	0.792	0.699	0.705	0.701	0.697	0.716	0.705	0.732	0.674	0.273	0.054	0.051
430	0.790	0.701	0.705	0.702	0.698	0.718	0.707	0.733	0.676	0.282	0.053	0.050
440	0.768	0.682	0.687	0.684	0.679	0.699	0.688	0.714	0.659	0.280	0.052	0.049
450	0.729	0.647	0.651	0.647	0.643	0.662	0.651	0.677	0.623	0.267	0.052	0.049
460	0.675	0.596	0.599	0.595	0.591	0.609	0.599	0.624	0.572	0.245	0.052	0.048
470	0.611	0.535	0.536	0.532	0.530	0.544	0.536	0.561	0.510	0.219	0.051	0.048
480	0.556	0.483	0.484	0.479	0.477	0.489	0.483	0.508	0.458	0.198	0.051	0.048
490	0.495	0.426	0.426	0.421	0.420	0.429	0.424	0.449	0.401	0.181	0.051	0.048
500	0.453	0.385	0.385	0.380	0.379	0.387	0.382	0.407	0.361	0.176	0.051	0.048
510	0.416	0.351	0.350	0.345	0.345	0.351	0.347	0.371	0.326	0.183	0.051	0.047

520	0.391	0.327	0.327	0.321	0.321	0.326	0.323	0.347	0.303	0.200	0.051	0.047
530	0.375	0.313	0.312	0.307	0.307	0.312	0.309	0.332	0.289	0.222	0.051	0.048
540	0.363	0.302	0.301	0.296	0.296	0.301	0.298	0.321	0.279	0.266	0.051	0.048
550	0.356	0.296	0.295	0.290	0.290	0.295	0.292	0.315	0.274	0.317	0.051	0.048
560	0.348	0.290	0.289	0.284	0.284	0.289	0.286	0.309	0.268	0.340	0.051	0.048
570	0.341	0.285	0.283	0.278	0.279	0.283	0.281	0.303	0.263	0.257	0.051	0.047
580	0.334	0.280	0.278	0.273	0.274	0.278	0.276	0.297	0.259	0.143	0.051	0.048
590	0.328	0.275	0.273	0.269	0.269	0.274	0.271	0.292	0.254	0.080	0.051	0.047
600	0.323	0.271	0.270	0.265	0.266	0.270	0.268	0.289	0.251	0.059	0.051	0.047
610	0.317	0.267	0.265	0.261	0.261	0.266	0.264	0.284	0.247	0.051	0.051	0.047
620	0.312	0.263	0.262	0.258	0.258	0.263	0.260	0.281	0.245	0.049	0.050	0.047
630	0.307	0.259	0.258	0.254	0.254	0.259	0.257	0.277	0.241	0.047	0.050	0.046
640	0.302	0.256	0.254	0.250	0.251	0.256	0.253	0.273	0.238	0.046	0.050	0.046
650	0.298	0.252	0.251	0.247	0.248	0.252	0.250	0.269	0.235	0.046	0.049	0.046
660	0.293	0.249	0.247	0.244	0.244	0.249	0.247	0.266	0.232	0.046	0.049	0.045
670	0.290	0.246	0.244	0.241	0.242	0.247	0.244	0.263	0.230	0.046	0.049	0.045
680	0.285	0.242	0.241	0.238	0.238	0.243	0.241	0.259	0.226	0.045	0.048	0.045
690	0.281	0.239	0.238	0.235	0.236	0.241	0.238	0.256	0.224	0.045	0.048	0.045
700	0.278	0.237	0.235	0.233	0.233	0.238	0.236	0.254	0.222	0.045	0.049	0.045
710	0.274	0.234	0.232	0.230	0.231	0.236	0.233	0.251	0.220	0.045	0.049	0.045
720	0.272	0.233	0.231	0.229	0.230	0.234	0.232	0.249	0.219	0.046	0.049	0.045
730	0.270	0.231	0.230	0.228	0.229	0.234	0.231	0.249	0.218	0.048	0.049	0.044
740	0.269	0.231	0.230	0.228	0.228	0.233	0.231	0.247	0.218	0.049	0.048	0.044
750	0.266	0.228	0.227	0.226	0.226	0.231	0.229	0.245	0.216	0.049	0.048	0.044
760	0.263	0.226	0.225	0.224	0.224	0.230	0.227	0.243	0.214	0.049	0.048	0.044
770	0.259	0.223	0.222	0.221	0.222	0.227	0.224	0.240	0.212	0.049	0.048	0.044
780	0.256	0.220	0.220	0.219	0.219	0.224	0.221	0.237	0.209	0.048	0.048	0.044
790	0.252	0.217	0.217	0.216	0.216	0.221	0.219	0.234	0.207	0.048	0.048	0.044
800	0.249	0.215	0.214	0.213	0.213	0.219	0.216	0.231	0.204	0.047	0.048	0.044
810	0.245	0.212	0.212	0.211	0.211	0.216	0.213	0.229	0.202	0.047	0.048	0.044
820	0.243	0.210	0.210	0.209	0.210	0.215	0.212	0.227	0.201	0.047	0.048	0.044
830	0.243	0.211	0.211	0.210	0.210	0.215	0.212	0.227	0.201	0.050	0.048	0.044
840	0.242	0.210	0.210	0.209	0.210	0.215	0.212	0.227	0.202	0.052	0.048	0.044
850	0.240	0.209	0.209	0.209	0.209	0.214	0.211	0.226	0.201	0.053	0.048	0.044
860	0.239	0.209	0.209	0.209	0.209	0.214	0.211	0.225	0.201	0.055	0.049	0.044
870	0.239	0.209	0.210	0.210	0.210	0.215	0.213	0.226	0.202	0.058	0.051	0.047
880	0.237	0.208	0.209	0.208	0.209	0.214	0.211	0.225	0.201	0.058	0.050	0.046
890	0.235	0.206	0.207	0.207	0.207	0.212	0.209	0.223	0.199	0.058	0.049	0.044
900	0.234	0.205	0.207	0.207	0.206	0.212	0.208	0.222	0.199	0.060	0.048	0.044
910	0.234	0.206	0.208	0.207	0.207	0.213	0.209	0.223	0.200	0.062	0.049	0.044
920	0.236	0.208	0.210	0.210	0.210	0.216	0.213	0.226	0.203	0.067	0.049	0.045
930	0.243	0.217	0.219	0.219	0.219	0.225	0.222	0.234	0.212	0.077	0.049	0.045
940	0.260	0.233	0.236	0.237	0.237	0.244	0.240	0.252	0.229	0.095	0.048	0.044
950	0.287	0.261	0.265	0.267	0.266	0.274	0.269	0.281	0.258	0.125	0.048	0.044
960	0.325	0.300	0.305	0.308	0.306	0.317	0.310	0.321	0.298	0.165	0.048	0.044
970	0.331	0.306	0.312	0.315	0.313	0.324	0.317	0.328	0.305	0.173	0.048	0.043
980	0.329	0.305	0.310	0.313	0.312	0.323	0.316	0.326	0.304	0.173	0.047	0.043

990	0.319	0.295	0.301	0.303	0.302	0.312	0.306	0.317	0.294	0.166	0.048	0.043
1000	0.305	0.281	0.286	0.289	0.287	0.297	0.291	0.301	0.280	0.153	0.048	0.044

nm	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
250	3.881	3.834	3.825	3.820	3.831	3.811	3.825	3.801	3.814	3.582	3.463	3.486
260	3.860	3.814	3.807	3.804	3.814	3.791	3.789	3.795	3.795	3.565	3.465	3.471
270	3.726	3.682	3.681	3.658	3.678	3.660	3.658	3.650	3.660	3.405	3.281	3.296
280	3.348	3.281	3.273	3.271	3.319	3.277	3.269	3.237	3.276	2.805	2.418	2.563
290	2.129	1.947	1.967	1.960	2.052	1.955	1.942	1.921	1.938	1.252	0.882	1.009
300	1.293	1.152	1.158	1.131	1.169	1.114	1.108	1.092	1.105	0.572	0.328	0.368
310	1.095	0.972	0.970	0.944	0.973	0.928	0.927	0.909	0.920	0.436	0.234	0.261
320	0.993	0.878	0.872	0.848	0.873	0.834	0.833	0.816	0.829	0.368	0.196	0.216
330	0.930	0.821	0.815	0.792	0.814	0.778	0.778	0.762	0.774	0.331	0.175	0.190
340	0.861	0.758	0.752	0.728	0.749	0.714	0.715	0.699	0.711	0.296	0.154	0.166
350	0.805	0.707	0.701	0.678	0.696	0.664	0.666	0.650	0.661	0.278	0.138	0.147
360	0.768	0.675	0.667	0.644	0.661	0.631	0.632	0.618	0.628	0.264	0.113	0.120
370	0.732	0.643	0.632	0.609	0.623	0.595	0.595	0.583	0.594	0.225	0.074	0.078
380	0.728	0.643	0.630	0.606	0.621	0.593	0.593	0.582	0.594	0.210	0.061	0.063
390	0.737	0.658	0.642	0.619	0.634	0.606	0.606	0.597	0.609	0.213	0.055	0.056
400	0.757	0.683	0.663	0.641	0.657	0.629	0.628	0.620	0.634	0.230	0.052	0.053
410	0.778	0.707	0.685	0.663	0.681	0.651	0.650	0.644	0.658	0.250	0.051	0.052
420	0.792	0.725	0.700	0.680	0.698	0.668	0.666	0.662	0.677	0.270	0.050	0.050
430	0.790	0.727	0.701	0.681	0.699	0.669	0.667	0.664	0.679	0.279	0.049	0.050
440	0.768	0.708	0.682	0.663	0.681	0.652	0.650	0.647	0.662	0.278	0.049	0.049
450	0.729	0.671	0.646	0.628	0.645	0.617	0.616	0.612	0.626	0.265	0.048	0.049
460	0.676	0.618	0.595	0.578	0.593	0.567	0.567	0.562	0.574	0.244	0.048	0.048
470	0.611	0.553	0.534	0.517	0.530	0.507	0.507	0.501	0.512	0.218	0.048	0.048
480	0.557	0.499	0.483	0.466	0.478	0.457	0.458	0.449	0.460	0.199	0.048	0.048
490	0.497	0.439	0.426	0.410	0.420	0.401	0.403	0.393	0.402	0.182	0.047	0.048
500	0.454	0.397	0.385	0.370	0.378	0.362	0.364	0.353	0.361	0.178	0.047	0.048
510	0.417	0.360	0.350	0.336	0.343	0.328	0.331	0.319	0.327	0.186	0.047	0.048
520	0.392	0.336	0.327	0.313	0.320	0.306	0.309	0.296	0.304	0.204	0.047	0.048
530	0.377	0.321	0.313	0.299	0.305	0.292	0.295	0.283	0.290	0.228	0.047	0.048
540	0.365	0.310	0.302	0.289	0.295	0.282	0.285	0.273	0.279	0.274	0.047	0.048
550	0.358	0.304	0.296	0.283	0.289	0.276	0.280	0.268	0.274	0.327	0.047	0.048
560	0.350	0.298	0.289	0.277	0.283	0.270	0.274	0.262	0.268	0.352	0.047	0.048
570	0.343	0.292	0.284	0.272	0.278	0.266	0.269	0.257	0.264	0.265	0.047	0.048
580	0.336	0.287	0.278	0.267	0.272	0.261	0.264	0.253	0.259	0.146	0.047	0.048
590	0.329	0.282	0.274	0.262	0.268	0.257	0.260	0.249	0.255	0.080	0.047	0.048
600	0.324	0.278	0.270	0.259	0.265	0.253	0.256	0.246	0.251	0.058	0.047	0.048
610	0.319	0.274	0.265	0.255	0.260	0.249	0.252	0.242	0.248	0.050	0.047	0.047
620	0.314	0.270	0.262	0.251	0.257	0.246	0.249	0.239	0.245	0.047	0.046	0.047
630	0.309	0.266	0.258	0.248	0.253	0.243	0.246	0.236	0.241	0.046	0.046	0.047
640	0.304	0.262	0.254	0.244	0.250	0.239	0.242	0.233	0.238	0.045	0.045	0.046
650	0.299	0.258	0.251	0.241	0.246	0.236	0.239	0.230	0.235	0.045	0.045	0.046

660	0.295	0.255	0.247	0.238	0.243	0.233	0.236	0.227	0.232	0.045	0.045	0.046
670	0.291	0.252	0.244	0.235	0.241	0.231	0.233	0.225	0.230	0.045	0.045	0.046
680	0.286	0.248	0.241	0.232	0.237	0.227	0.230	0.222	0.226	0.044	0.044	0.045
690	0.282	0.245	0.238	0.229	0.235	0.225	0.228	0.220	0.224	0.044	0.044	0.045
700	0.279	0.242	0.235	0.227	0.233	0.223	0.225	0.217	0.222	0.044	0.044	0.045
710	0.275	0.240	0.233	0.225	0.230	0.220	0.223	0.215	0.220	0.044	0.044	0.045
720	0.273	0.238	0.231	0.223	0.229	0.219	0.221	0.215	0.219	0.045	0.044	0.045
730	0.271	0.237	0.230	0.223	0.228	0.219	0.221	0.214	0.218	0.047	0.044	0.045
740	0.269	0.236	0.229	0.222	0.228	0.218	0.220	0.214	0.218	0.048	0.043	0.044
750	0.266	0.234	0.227	0.220	0.226	0.216	0.218	0.212	0.216	0.049	0.044	0.044
760	0.263	0.232	0.225	0.218	0.224	0.215	0.216	0.210	0.214	0.049	0.044	0.045
770	0.260	0.229	0.222	0.216	0.221	0.212	0.213	0.208	0.212	0.049	0.043	0.044
780	0.256	0.226	0.220	0.213	0.218	0.210	0.211	0.205	0.209	0.048	0.043	0.044
790	0.252	0.223	0.217	0.210	0.216	0.207	0.208	0.203	0.207	0.048	0.044	0.045
800	0.249	0.220	0.214	0.208	0.213	0.205	0.206	0.201	0.205	0.047	0.044	0.044
810	0.246	0.218	0.212	0.205	0.211	0.202	0.203	0.199	0.202	0.047	0.043	0.044
820	0.243	0.216	0.210	0.204	0.209	0.201	0.202	0.197	0.201	0.047	0.043	0.044
830	0.243	0.216	0.210	0.205	0.210	0.201	0.202	0.198	0.201	0.050	0.043	0.044
840	0.242	0.216	0.210	0.205	0.210	0.201	0.203	0.198	0.202	0.052	0.044	0.044
850	0.240	0.215	0.209	0.204	0.209	0.201	0.202	0.197	0.201	0.052	0.043	0.044
860	0.239	0.214	0.209	0.204	0.209	0.201	0.202	0.197	0.201	0.054	0.044	0.045
870	0.239	0.215	0.209	0.204	0.210	0.201	0.202	0.198	0.202	0.057	0.046	0.047
880	0.237	0.213	0.208	0.203	0.209	0.201	0.201	0.198	0.201	0.058	0.046	0.046
890	0.234	0.211	0.206	0.202	0.207	0.199	0.199	0.196	0.199	0.058	0.044	0.044
900	0.233	0.211	0.206	0.202	0.207	0.199	0.199	0.196	0.199	0.060	0.043	0.044
910	0.233	0.212	0.207	0.202	0.208	0.199	0.200	0.197	0.200	0.061	0.044	0.044
920	0.235	0.214	0.209	0.204	0.211	0.202	0.203	0.200	0.203	0.066	0.044	0.044
930	0.243	0.222	0.217	0.213	0.220	0.210	0.211	0.208	0.212	0.077	0.045	0.045
940	0.258	0.240	0.234	0.230	0.237	0.227	0.227	0.226	0.230	0.095	0.043	0.044
950	0.285	0.269	0.263	0.258	0.266	0.255	0.255	0.254	0.259	0.125	0.043	0.044
960	0.322	0.308	0.301	0.297	0.307	0.294	0.293	0.294	0.299	0.166	0.044	0.044
970	0.329	0.315	0.309	0.304	0.314	0.301	0.299	0.301	0.305	0.173	0.043	0.044
980	0.326	0.313	0.306	0.302	0.312	0.299	0.297	0.299	0.304	0.174	0.042	0.043
990	0.316	0.303	0.296	0.292	0.303	0.290	0.288	0.289	0.295	0.166	0.043	0.043
1000	0.302	0.289	0.283	0.279	0.288	0.276	0.274	0.276	0.280	0.155	0.043	0.044

nm	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
250	3.788	3.742	3.724	3.715	3.703	3.710	3.726	3.704	3.700	3.593	3.471	3.464
260	3.784	3.724	3.700	3.696	3.691	3.701	3.700	3.689	3.681	3.573	3.458	3.466
270	3.642	3.579	3.563	3.541	3.540	3.552	3.557	3.540	3.532	3.413	3.280	3.284
280	3.220	3.088	3.131	3.054	3.047	3.148	3.133	3.097	3.084	2.856	2.402	2.465
290	1.821	1.612	1.651	1.603	1.590	1.672	1.667	1.605	1.601	1.260	0.875	0.934
300	1.058	0.895	0.876	0.854	0.841	0.873	0.881	0.847	0.842	0.575	0.326	0.346
310	0.885	0.740	0.711	0.694	0.682	0.705	0.716	0.689	0.683	0.437	0.233	0.246
320	0.791	0.659	0.627	0.613	0.601	0.621	0.633	0.609	0.604	0.368	0.195	0.204



330	0.735	0.610	0.578	0.566	0.555	0.572	0.584	0.562	0.558	0.330	0.174	0.181
340	0.673	0.555	0.523	0.512	0.501	0.516	0.528	0.508	0.504	0.296	0.154	0.158
350	0.624	0.513	0.481	0.471	0.460	0.474	0.486	0.467	0.462	0.279	0.137	0.141
360	0.590	0.486	0.453	0.445	0.435	0.446	0.458	0.441	0.436	0.264	0.113	0.115
370	0.556	0.459	0.423	0.417	0.407	0.415	0.428	0.412	0.408	0.225	0.074	0.077
380	0.553	0.461	0.425	0.420	0.410	0.418	0.430	0.415	0.411	0.209	0.061	0.063
390	0.564	0.479	0.443	0.438	0.429	0.436	0.449	0.434	0.431	0.210	0.055	0.056
400	0.584	0.505	0.470	0.465	0.457	0.464	0.476	0.461	0.459	0.227	0.053	0.053
410	0.604	0.530	0.496	0.491	0.483	0.491	0.502	0.487	0.486	0.246	0.051	0.052
420	0.620	0.551	0.517	0.512	0.505	0.513	0.524	0.508	0.509	0.266	0.050	0.051
430	0.621	0.555	0.522	0.517	0.510	0.518	0.530	0.513	0.515	0.275	0.050	0.050
440	0.604	0.542	0.509	0.505	0.498	0.506	0.517	0.501	0.502	0.274	0.049	0.050
450	0.571	0.510	0.478	0.474	0.468	0.475	0.486	0.471	0.472	0.261	0.049	0.049
460	0.525	0.464	0.433	0.429	0.422	0.429	0.440	0.426	0.426	0.240	0.048	0.049
470	0.468	0.408	0.376	0.374	0.367	0.373	0.383	0.371	0.370	0.216	0.048	0.049
480	0.421	0.360	0.330	0.327	0.320	0.326	0.336	0.325	0.322	0.198	0.048	0.048
490	0.369	0.308	0.278	0.275	0.269	0.274	0.283	0.273	0.270	0.183	0.048	0.048
500	0.331	0.271	0.241	0.239	0.233	0.237	0.247	0.238	0.234	0.180	0.047	0.048
510	0.300	0.239	0.211	0.209	0.202	0.206	0.216	0.208	0.203	0.189	0.047	0.048
520	0.279	0.219	0.191	0.189	0.183	0.186	0.195	0.188	0.183	0.208	0.047	0.048
530	0.266	0.207	0.179	0.177	0.171	0.175	0.184	0.177	0.172	0.233	0.047	0.048
540	0.257	0.199	0.171	0.170	0.164	0.167	0.176	0.169	0.164	0.280	0.047	0.049
550	0.251	0.195	0.168	0.166	0.161	0.163	0.172	0.166	0.161	0.334	0.047	0.049
560	0.246	0.191	0.165	0.163	0.157	0.160	0.169	0.163	0.158	0.359	0.048	0.049
570	0.241	0.187	0.161	0.160	0.155	0.158	0.166	0.160	0.155	0.271	0.047	0.049
580	0.236	0.184	0.159	0.157	0.152	0.155	0.163	0.157	0.153	0.150	0.047	0.049
590	0.232	0.181	0.156	0.155	0.150	0.153	0.161	0.155	0.151	0.082	0.047	0.049
600	0.228	0.179	0.154	0.153	0.148	0.151	0.159	0.154	0.149	0.060	0.047	0.048
610	0.224	0.176	0.152	0.151	0.146	0.149	0.157	0.152	0.147	0.051	0.047	0.048
620	0.221	0.174	0.151	0.149	0.145	0.148	0.156	0.150	0.146	0.048	0.046	0.048
630	0.218	0.172	0.149	0.148	0.143	0.146	0.154	0.148	0.144	0.047	0.046	0.048
640	0.214	0.170	0.147	0.145	0.141	0.144	0.152	0.147	0.143	0.046	0.045	0.047
650	0.211	0.168	0.145	0.144	0.140	0.143	0.151	0.145	0.141	0.046	0.045	0.047
660	0.208	0.165	0.144	0.143	0.139	0.141	0.149	0.144	0.140	0.046	0.045	0.046
670	0.206	0.164	0.143	0.142	0.138	0.140	0.148	0.143	0.139	0.046	0.045	0.047
680	0.202	0.162	0.141	0.140	0.136	0.138	0.146	0.141	0.137	0.045	0.044	0.046
690	0.200	0.160	0.140	0.138	0.135	0.137	0.145	0.140	0.136	0.045	0.044	0.046
700	0.197	0.159	0.138	0.138	0.134	0.136	0.144	0.139	0.136	0.045	0.044	0.046
710	0.195	0.157	0.137	0.136	0.133	0.135	0.143	0.138	0.134	0.044	0.044	0.046
720	0.194	0.157	0.137	0.137	0.133	0.135	0.143	0.138	0.135	0.046	0.044	0.046
730	0.193	0.157	0.138	0.137	0.134	0.136	0.143	0.139	0.135	0.047	0.044	0.046
740	0.192	0.157	0.138	0.137	0.134	0.136	0.144	0.139	0.136	0.048	0.043	0.045
750	0.191	0.156	0.138	0.137	0.134	0.136	0.143	0.139	0.135	0.049	0.044	0.045
760	0.189	0.155	0.137	0.136	0.133	0.135	0.142	0.138	0.135	0.049	0.044	0.045
770	0.186	0.153	0.135	0.134	0.131	0.133	0.141	0.136	0.134	0.048	0.043	0.045
780	0.184	0.151	0.134	0.133	0.130	0.132	0.139	0.135	0.132	0.048	0.043	0.045
790	0.181	0.150	0.132	0.131	0.129	0.131	0.138	0.134	0.131	0.048	0.044	0.045

800	0.178	0.148	0.131	0.130	0.127	0.129	0.136	0.132	0.129	0.047	0.044	0.045
810	0.176	0.146	0.129	0.129	0.126	0.128	0.135	0.131	0.128	0.047	0.043	0.045
820	0.174	0.145	0.128	0.128	0.125	0.127	0.134	0.130	0.128	0.047	0.043	0.044
830	0.175	0.146	0.130	0.130	0.127	0.129	0.136	0.132	0.130	0.050	0.043	0.045
840	0.175	0.147	0.131	0.131	0.128	0.130	0.137	0.133	0.131	0.051	0.044	0.045
850	0.174	0.147	0.131	0.131	0.128	0.131	0.137	0.133	0.131	0.053	0.044	0.045
860	0.174	0.147	0.132	0.132	0.130	0.131	0.138	0.134	0.132	0.054	0.044	0.045
870	0.175	0.149	0.134	0.133	0.131	0.133	0.139	0.135	0.134	0.057	0.046	0.047
880	0.173	0.148	0.134	0.133	0.131	0.134	0.140	0.136	0.134	0.058	0.046	0.047
890	0.172	0.147	0.133	0.132	0.130	0.132	0.138	0.135	0.133	0.058	0.044	0.045
900	0.172	0.148	0.134	0.133	0.131	0.133	0.139	0.136	0.134	0.059	0.044	0.045
910	0.172	0.149	0.135	0.135	0.133	0.135	0.140	0.137	0.136	0.061	0.044	0.045
920	0.174	0.152	0.139	0.139	0.136	0.138	0.144	0.140	0.139	0.066	0.044	0.045
930	0.182	0.160	0.148	0.147	0.146	0.148	0.153	0.149	0.149	0.076	0.045	0.045
940	0.198	0.178	0.165	0.165	0.163	0.166	0.171	0.167	0.166	0.095	0.043	0.045
950	0.224	0.205	0.194	0.193	0.191	0.194	0.200	0.195	0.195	0.124	0.044	0.044
960	0.260	0.244	0.233	0.233	0.231	0.234	0.240	0.234	0.235	0.165	0.044	0.045
970	0.267	0.251	0.240	0.240	0.238	0.241	0.247	0.241	0.243	0.172	0.043	0.044
980	0.264	0.249	0.240	0.239	0.237	0.241	0.246	0.240	0.242	0.172	0.042	0.043
990	0.256	0.241	0.231	0.231	0.229	0.232	0.237	0.232	0.233	0.165	0.043	0.044
1000	0.243	0.228	0.218	0.218	0.216	0.219	0.224	0.219	0.220	0.152	0.043	0.044

nm	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
250	3.792	3.749	3.717	3.718	3.719	3.719	3.733	3.724	3.715	3.591	3.475	3.471
260	3.776	3.730	3.705	3.700	3.688	3.709	3.709	3.700	3.692	3.566	3.458	3.455
270	3.646	3.584	3.558	3.549	3.545	3.551	3.558	3.555	3.550	3.414	3.279	3.284
280	3.237	3.114	3.096	3.097	3.009	3.113	3.124	3.060	3.067	2.841	2.372	2.470
290	1.835	1.631	1.609	1.611	1.545	1.662	1.657	1.591	1.615	1.247	0.859	0.915
300	1.067	0.913	0.870	0.867	0.846	0.880	0.888	0.862	0.859	0.573	0.324	0.341
310	0.893	0.755	0.709	0.705	0.692	0.714	0.723	0.704	0.698	0.435	0.232	0.243
320	0.799	0.673	0.626	0.622	0.612	0.629	0.639	0.624	0.618	0.366	0.194	0.203
330	0.741	0.623	0.578	0.575	0.566	0.580	0.590	0.577	0.571	0.329	0.173	0.180
340	0.679	0.568	0.524	0.521	0.513	0.524	0.534	0.523	0.516	0.295	0.154	0.160
350	0.629	0.525	0.482	0.479	0.472	0.482	0.491	0.481	0.474	0.278	0.137	0.142
360	0.596	0.497	0.455	0.453	0.448	0.455	0.465	0.456	0.449	0.264	0.113	0.116
370	0.561	0.471	0.428	0.426	0.425	0.426	0.436	0.431	0.421	0.225	0.074	0.076
380	0.558	0.473	0.431	0.429	0.430	0.429	0.440	0.435	0.425	0.209	0.061	0.062
390	0.569	0.491	0.450	0.448	0.451	0.450	0.460	0.455	0.445	0.210	0.055	0.055
400	0.590	0.517	0.477	0.476	0.479	0.479	0.488	0.483	0.474	0.226	0.053	0.053
410	0.611	0.543	0.504	0.503	0.507	0.507	0.516	0.511	0.502	0.246	0.052	0.051
420	0.627	0.564	0.525	0.524	0.530	0.530	0.539	0.533	0.525	0.266	0.051	0.050
430	0.628	0.568	0.531	0.530	0.536	0.537	0.545	0.539	0.531	0.275	0.051	0.050
440	0.611	0.554	0.518	0.517	0.523	0.523	0.531	0.526	0.518	0.274	0.050	0.049
450	0.577	0.522	0.487	0.486	0.491	0.491	0.499	0.494	0.486	0.262	0.049	0.049
460	0.530	0.475	0.440	0.439	0.444	0.443	0.452	0.447	0.439	0.241	0.049	0.049

470	0.473	0.417	0.383	0.382	0.385	0.385	0.393	0.389	0.381	0.216	0.049	0.048
480	0.425	0.369	0.335	0.334	0.336	0.335	0.344	0.340	0.333	0.198	0.049	0.048
490	0.371	0.315	0.282	0.281	0.282	0.281	0.289	0.286	0.279	0.183	0.048	0.048
500	0.333	0.278	0.245	0.244	0.244	0.242	0.251	0.248	0.241	0.181	0.048	0.048
510	0.301	0.246	0.214	0.213	0.212	0.210	0.219	0.217	0.210	0.190	0.048	0.048
520	0.280	0.224	0.193	0.192	0.191	0.189	0.198	0.196	0.190	0.209	0.048	0.048
530	0.267	0.212	0.182	0.180	0.179	0.177	0.186	0.184	0.178	0.234	0.048	0.048
540	0.257	0.204	0.174	0.172	0.171	0.169	0.178	0.176	0.170	0.282	0.048	0.048
550	0.252	0.200	0.170	0.169	0.167	0.166	0.174	0.173	0.167	0.337	0.048	0.048
560	0.247	0.196	0.166	0.165	0.164	0.162	0.171	0.169	0.164	0.363	0.048	0.048
570	0.242	0.192	0.163	0.162	0.161	0.159	0.168	0.166	0.161	0.273	0.048	0.048
580	0.237	0.188	0.160	0.160	0.158	0.157	0.165	0.163	0.158	0.149	0.048	0.048
590	0.233	0.185	0.158	0.157	0.156	0.154	0.162	0.161	0.156	0.082	0.048	0.047
600	0.229	0.183	0.156	0.155	0.154	0.153	0.161	0.159	0.154	0.059	0.047	0.047
610	0.225	0.180	0.154	0.153	0.152	0.151	0.159	0.157	0.152	0.050	0.047	0.047
620	0.222	0.178	0.152	0.152	0.151	0.149	0.157	0.156	0.151	0.048	0.047	0.046
630	0.218	0.176	0.150	0.150	0.149	0.148	0.155	0.154	0.149	0.047	0.046	0.046
640	0.215	0.174	0.148	0.148	0.147	0.146	0.153	0.152	0.148	0.046	0.046	0.046
650	0.212	0.171	0.147	0.146	0.146	0.144	0.152	0.151	0.146	0.045	0.046	0.046
660	0.209	0.169	0.145	0.145	0.144	0.143	0.151	0.149	0.145	0.045	0.045	0.045
670	0.206	0.168	0.144	0.144	0.143	0.142	0.149	0.148	0.144	0.045	0.045	0.045
680	0.203	0.165	0.142	0.142	0.141	0.140	0.147	0.146	0.142	0.044	0.045	0.045
690	0.200	0.164	0.141	0.141	0.140	0.139	0.146	0.145	0.141	0.044	0.045	0.045
700	0.198	0.162	0.140	0.140	0.139	0.138	0.145	0.144	0.140	0.045	0.045	0.045
710	0.196	0.160	0.139	0.138	0.138	0.137	0.144	0.143	0.139	0.044	0.045	0.044
720	0.195	0.160	0.139	0.139	0.138	0.137	0.144	0.143	0.140	0.045	0.045	0.045
730	0.194	0.160	0.139	0.139	0.139	0.138	0.145	0.144	0.140	0.047	0.045	0.044
740	0.193	0.160	0.139	0.140	0.139	0.138	0.145	0.144	0.141	0.048	0.044	0.044
750	0.191	0.159	0.139	0.139	0.139	0.138	0.145	0.144	0.140	0.049	0.044	0.044
760	0.189	0.158	0.138	0.138	0.138	0.137	0.144	0.143	0.139	0.049	0.044	0.044
770	0.186	0.156	0.136	0.137	0.136	0.136	0.142	0.141	0.138	0.048	0.044	0.044
780	0.184	0.154	0.135	0.135	0.134	0.134	0.141	0.140	0.137	0.048	0.044	0.044
790	0.181	0.152	0.134	0.133	0.133	0.133	0.139	0.139	0.135	0.047	0.045	0.044
800	0.179	0.150	0.132	0.132	0.132	0.131	0.138	0.136	0.134	0.047	0.044	0.044
810	0.176	0.149	0.130	0.131	0.130	0.130	0.136	0.135	0.132	0.047	0.044	0.044
820	0.175	0.148	0.130	0.130	0.130	0.129	0.136	0.135	0.132	0.047	0.044	0.044
830	0.175	0.149	0.131	0.132	0.131	0.131	0.137	0.136	0.134	0.049	0.044	0.044
840	0.175	0.149	0.133	0.133	0.133	0.132	0.139	0.137	0.135	0.051	0.044	0.044
850	0.174	0.149	0.133	0.133	0.133	0.133	0.139	0.138	0.135	0.053	0.045	0.044
860	0.174	0.150	0.133	0.134	0.134	0.134	0.140	0.138	0.136	0.054	0.045	0.045
870	0.174	0.151	0.135	0.135	0.135	0.135	0.141	0.140	0.137	0.057	0.047	0.047
880	0.174	0.150	0.135	0.135	0.135	0.135	0.141	0.140	0.137	0.058	0.047	0.046
890	0.172	0.149	0.134	0.135	0.135	0.135	0.140	0.139	0.136	0.057	0.045	0.045
900	0.172	0.150	0.135	0.136	0.136	0.136	0.141	0.140	0.138	0.060	0.045	0.044
910	0.172	0.151	0.136	0.137	0.137	0.137	0.143	0.141	0.139	0.061	0.046	0.045
920	0.174	0.153	0.139	0.140	0.140	0.140	0.146	0.145	0.143	0.065	0.045	0.045
930	0.182	0.162	0.148	0.149	0.150	0.151	0.155	0.154	0.151	0.076	0.046	0.045

940	0.198	0.180	0.166	0.168	0.168	0.169	0.174	0.173	0.170	0.094	0.045	0.044
950	0.224	0.207	0.195	0.196	0.198	0.199	0.204	0.203	0.200	0.125	0.045	0.044
960	0.260	0.245	0.235	0.236	0.239	0.240	0.245	0.244	0.241	0.165	0.046	0.044
970	0.266	0.252	0.241	0.243	0.247	0.247	0.252	0.250	0.248	0.173	0.045	0.044
980	0.264	0.252	0.240	0.242	0.246	0.246	0.251	0.249	0.247	0.172	0.043	0.044
990	0.255	0.242	0.231	0.234	0.236	0.237	0.242	0.241	0.238	0.165	0.045	0.043
1000	0.242	0.229	0.218	0.220	0.222	0.224	0.229	0.227	0.223	0.152	0.044	0.044

nm	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
250	3.815	3.750	3.728	3.738	3.728	3.733	3.731	3.733	3.724	3.597	3.485	3.487
260	3.793	3.726	3.708	3.712	3.710	3.713	3.701	3.715	3.710	3.578	3.465	3.471
270	3.671	3.595	3.570	3.576	3.569	3.564	3.569	3.572	3.563	3.419	3.291	3.296
280	3.265	3.149	3.120	3.141	3.119	3.139	3.138	3.124	3.167	2.878	2.434	2.435
290	1.869	1.661	1.633	1.672	1.643	1.664	1.670	1.668	1.690	1.277	0.888	0.920
300	1.099	0.924	0.886	0.903	0.880	0.889	0.895	0.892	0.887	0.586	0.334	0.349
310	0.921	0.763	0.721	0.735	0.714	0.722	0.728	0.724	0.717	0.443	0.239	0.249
320	0.823	0.679	0.636	0.648	0.629	0.636	0.643	0.641	0.633	0.372	0.200	0.208
330	0.764	0.629	0.587	0.598	0.580	0.587	0.593	0.591	0.584	0.333	0.178	0.186
340	0.700	0.572	0.532	0.542	0.525	0.531	0.537	0.535	0.528	0.300	0.158	0.164
350	0.649	0.528	0.489	0.498	0.482	0.488	0.494	0.492	0.484	0.282	0.141	0.146
360	0.616	0.500	0.462	0.472	0.456	0.461	0.466	0.464	0.456	0.267	0.115	0.119
370	0.583	0.472	0.435	0.443	0.428	0.432	0.437	0.435	0.425	0.226	0.075	0.078
380	0.581	0.475	0.438	0.447	0.431	0.435	0.440	0.438	0.428	0.208	0.062	0.063
390	0.594	0.493	0.457	0.467	0.451	0.455	0.459	0.457	0.448	0.208	0.055	0.056
400	0.617	0.519	0.485	0.496	0.480	0.483	0.488	0.486	0.477	0.223	0.053	0.054
410	0.640	0.545	0.512	0.524	0.508	0.511	0.515	0.513	0.505	0.242	0.052	0.052
420	0.657	0.566	0.534	0.547	0.531	0.533	0.538	0.536	0.527	0.261	0.051	0.051
430	0.659	0.571	0.539	0.553	0.537	0.539	0.543	0.541	0.533	0.270	0.050	0.050
440	0.640	0.557	0.526	0.539	0.524	0.526	0.530	0.528	0.520	0.269	0.050	0.050
450	0.605	0.524	0.494	0.506	0.492	0.494	0.498	0.496	0.488	0.258	0.049	0.049
460	0.555	0.477	0.446	0.457	0.444	0.446	0.450	0.449	0.441	0.238	0.049	0.049
470	0.494	0.418	0.388	0.397	0.385	0.388	0.392	0.391	0.383	0.215	0.049	0.048
480	0.443	0.370	0.339	0.347	0.336	0.339	0.343	0.342	0.334	0.199	0.049	0.048
490	0.386	0.315	0.285	0.291	0.281	0.284	0.289	0.287	0.280	0.186	0.049	0.048
500	0.346	0.277	0.247	0.252	0.243	0.247	0.251	0.250	0.242	0.184	0.049	0.048
510	0.312	0.245	0.215	0.219	0.211	0.215	0.219	0.218	0.210	0.195	0.049	0.048
520	0.289	0.224	0.194	0.197	0.190	0.194	0.198	0.197	0.190	0.217	0.049	0.048
530	0.275	0.212	0.182	0.185	0.178	0.182	0.186	0.185	0.178	0.244	0.049	0.048
540	0.265	0.203	0.174	0.177	0.170	0.174	0.178	0.177	0.170	0.293	0.049	0.048
550	0.260	0.199	0.170	0.173	0.166	0.170	0.174	0.174	0.167	0.351	0.049	0.048
560	0.254	0.195	0.167	0.169	0.163	0.167	0.171	0.170	0.164	0.379	0.049	0.049
570	0.249	0.191	0.164	0.166	0.160	0.164	0.167	0.167	0.161	0.285	0.049	0.048
580	0.244	0.188	0.161	0.163	0.157	0.161	0.165	0.164	0.158	0.155	0.049	0.048
590	0.239	0.185	0.158	0.161	0.155	0.159	0.162	0.162	0.156	0.084	0.049	0.048
600	0.236	0.183	0.156	0.159	0.153	0.157	0.160	0.160	0.154	0.061	0.048	0.048

610	0.232	0.180	0.154	0.157	0.151	0.155	0.158	0.158	0.152	0.052	0.048	0.048
620	0.229	0.178	0.153	0.155	0.150	0.153	0.157	0.156	0.151	0.049	0.048	0.047
630	0.225	0.175	0.151	0.153	0.148	0.151	0.155	0.155	0.149	0.048	0.047	0.047
640	0.221	0.173	0.149	0.151	0.146	0.149	0.153	0.153	0.148	0.047	0.047	0.046
650	0.218	0.171	0.147	0.150	0.144	0.148	0.151	0.151	0.146	0.046	0.047	0.046
660	0.215	0.169	0.146	0.148	0.143	0.146	0.150	0.150	0.145	0.046	0.046	0.046
670	0.212	0.168	0.145	0.147	0.142	0.145	0.149	0.149	0.144	0.046	0.046	0.046
680	0.209	0.165	0.143	0.145	0.140	0.143	0.147	0.147	0.142	0.046	0.046	0.045
690	0.207	0.163	0.141	0.144	0.139	0.142	0.146	0.145	0.141	0.045	0.045	0.045
700	0.204	0.162	0.141	0.143	0.138	0.141	0.145	0.145	0.140	0.046	0.045	0.045
710	0.202	0.161	0.139	0.141	0.137	0.140	0.144	0.143	0.139	0.046	0.045	0.045
720	0.200	0.160	0.140	0.142	0.137	0.140	0.144	0.144	0.139	0.048	0.046	0.045
730	0.200	0.161	0.140	0.143	0.138	0.141	0.144	0.144	0.140	0.049	0.045	0.044
740	0.199	0.160	0.140	0.143	0.138	0.141	0.145	0.144	0.140	0.050	0.044	0.044
750	0.197	0.159	0.140	0.142	0.138	0.141	0.144	0.144	0.140	0.051	0.045	0.044
760	0.195	0.158	0.139	0.141	0.137	0.140	0.143	0.143	0.139	0.050	0.045	0.044
770	0.193	0.156	0.137	0.140	0.135	0.138	0.142	0.141	0.137	0.050	0.044	0.044
780	0.190	0.154	0.136	0.138	0.134	0.137	0.140	0.140	0.136	0.049	0.044	0.044
790	0.187	0.152	0.134	0.137	0.133	0.135	0.139	0.138	0.135	0.049	0.044	0.044
800	0.185	0.151	0.133	0.135	0.131	0.133	0.137	0.137	0.133	0.048	0.044	0.044
810	0.182	0.149	0.131	0.134	0.130	0.132	0.136	0.135	0.132	0.048	0.044	0.044
820	0.181	0.148	0.131	0.133	0.129	0.132	0.135	0.135	0.131	0.048	0.044	0.043
830	0.181	0.149	0.132	0.135	0.131	0.134	0.137	0.137	0.133	0.051	0.044	0.044
840	0.181	0.149	0.133	0.136	0.132	0.134	0.138	0.138	0.134	0.053	0.044	0.044
850	0.181	0.150	0.134	0.136	0.132	0.135	0.138	0.138	0.134	0.054	0.044	0.044
860	0.180	0.150	0.134	0.137	0.133	0.135	0.139	0.138	0.135	0.055	0.045	0.045
870	0.181	0.151	0.136	0.138	0.134	0.137	0.140	0.140	0.137	0.058	0.046	0.046
880	0.180	0.151	0.136	0.138	0.135	0.137	0.140	0.141	0.137	0.059	0.046	0.046
890	0.178	0.149	0.135	0.138	0.134	0.136	0.139	0.139	0.136	0.058	0.044	0.045
900	0.178	0.150	0.136	0.139	0.135	0.137	0.140	0.140	0.137	0.060	0.044	0.045
910	0.179	0.152	0.138	0.140	0.137	0.139	0.142	0.142	0.138	0.062	0.045	0.045
920	0.180	0.154	0.140	0.143	0.139	0.141	0.145	0.145	0.143	0.067	0.044	0.045
930	0.189	0.163	0.150	0.153	0.149	0.151	0.155	0.154	0.152	0.077	0.044	0.045
940	0.207	0.180	0.168	0.173	0.168	0.169	0.173	0.173	0.170	0.096	0.044	0.045
950	0.234	0.209	0.198	0.203	0.198	0.200	0.203	0.202	0.200	0.125	0.044	0.044
960	0.274	0.248	0.238	0.245	0.239	0.240	0.243	0.242	0.241	0.166	0.044	0.045
970	0.280	0.255	0.246	0.252	0.246	0.247	0.251	0.249	0.248	0.173	0.043	0.044
980	0.277	0.254	0.244	0.251	0.245	0.246	0.249	0.248	0.247	0.173	0.042	0.044
990	0.268	0.245	0.235	0.242	0.236	0.238	0.240	0.240	0.238	0.166	0.044	0.045
1000	0.254	0.231	0.223	0.228	0.223	0.223	0.227	0.227	0.225	0.154	0.044	0.044

nm	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
250	3.813	3.746	3.740	3.734	3.730	3.736	3.730	3.742	3.731	3.596	3.486	3.479
260	3.787	3.728	3.726	3.709	3.710	3.723	3.720	3.736	3.711	3.590	3.467	3.448
270	3.652	3.588	3.580	3.573	3.569	3.569	3.569	3.601	3.571	3.428	3.297	3.288

280	3.195	3.116	3.124	3.139	3.116	3.125	3.161	3.220	3.126	2.876	2.493	2.326
290	1.839	1.648	1.657	1.680	1.640	1.653	1.700	1.771	1.680	1.281	0.920	0.845
300	1.092	0.929	0.910	0.915	0.887	0.890	0.922	0.951	0.895	0.591	0.347	0.332
310	0.917	0.770	0.742	0.745	0.720	0.724	0.752	0.772	0.725	0.447	0.247	0.240
320	0.821	0.687	0.654	0.658	0.636	0.640	0.666	0.683	0.641	0.375	0.207	0.203
330	0.763	0.637	0.605	0.608	0.587	0.591	0.615	0.631	0.592	0.336	0.184	0.182
340	0.700	0.582	0.549	0.552	0.532	0.536	0.559	0.572	0.536	0.304	0.163	0.162
350	0.649	0.538	0.504	0.508	0.489	0.492	0.513	0.525	0.492	0.286	0.145	0.145
360	0.616	0.509	0.477	0.480	0.462	0.466	0.486	0.496	0.465	0.272	0.118	0.121
370	0.582	0.479	0.449	0.450	0.434	0.438	0.457	0.465	0.434	0.229	0.077	0.083
380	0.579	0.479	0.452	0.452	0.437	0.441	0.460	0.467	0.437	0.210	0.062	0.069
390	0.590	0.494	0.472	0.471	0.456	0.461	0.479	0.486	0.456	0.209	0.055	0.063
400	0.611	0.518	0.501	0.498	0.484	0.490	0.508	0.515	0.485	0.224	0.053	0.060
410	0.633	0.542	0.529	0.525	0.512	0.518	0.535	0.544	0.513	0.242	0.051	0.058
420	0.649	0.561	0.551	0.547	0.534	0.540	0.558	0.567	0.536	0.261	0.050	0.057
430	0.650	0.564	0.557	0.552	0.540	0.546	0.563	0.572	0.542	0.270	0.050	0.057
440	0.633	0.551	0.543	0.539	0.526	0.533	0.550	0.558	0.528	0.269	0.049	0.056
450	0.599	0.520	0.510	0.506	0.495	0.500	0.517	0.525	0.496	0.258	0.049	0.055
460	0.550	0.475	0.461	0.458	0.447	0.452	0.468	0.475	0.448	0.239	0.048	0.055
470	0.491	0.419	0.401	0.399	0.389	0.393	0.408	0.414	0.389	0.216	0.048	0.054
480	0.442	0.373	0.351	0.350	0.340	0.344	0.358	0.363	0.340	0.200	0.048	0.054
490	0.387	0.321	0.295	0.295	0.285	0.289	0.302	0.306	0.285	0.188	0.048	0.054
500	0.348	0.285	0.256	0.257	0.247	0.250	0.263	0.266	0.247	0.188	0.048	0.053
510	0.315	0.254	0.223	0.225	0.215	0.218	0.230	0.233	0.215	0.200	0.048	0.053
520	0.292	0.234	0.201	0.203	0.194	0.197	0.208	0.211	0.194	0.222	0.048	0.053
530	0.279	0.222	0.189	0.191	0.182	0.185	0.196	0.199	0.182	0.250	0.048	0.053
540	0.269	0.213	0.180	0.183	0.174	0.177	0.187	0.190	0.174	0.301	0.048	0.053
550	0.263	0.209	0.176	0.179	0.171	0.173	0.184	0.186	0.171	0.361	0.048	0.053
560	0.258	0.205	0.173	0.175	0.167	0.169	0.180	0.183	0.168	0.389	0.048	0.053
570	0.252	0.201	0.169	0.172	0.164	0.166	0.176	0.179	0.164	0.293	0.048	0.053
580	0.247	0.198	0.166	0.169	0.161	0.163	0.173	0.176	0.162	0.160	0.048	0.052
590	0.243	0.194	0.164	0.166	0.159	0.161	0.171	0.174	0.159	0.086	0.047	0.052
600	0.239	0.192	0.162	0.164	0.157	0.159	0.169	0.172	0.158	0.062	0.047	0.052
610	0.235	0.189	0.160	0.162	0.155	0.157	0.167	0.170	0.155	0.052	0.047	0.052
620	0.232	0.186	0.158	0.159	0.153	0.156	0.165	0.168	0.154	0.049	0.047	0.051
630	0.228	0.184	0.156	0.157	0.151	0.154	0.163	0.166	0.152	0.048	0.046	0.051
640	0.224	0.181	0.154	0.156	0.150	0.152	0.161	0.164	0.151	0.047	0.046	0.050
650	0.221	0.179	0.152	0.154	0.148	0.150	0.159	0.162	0.149	0.047	0.045	0.050
660	0.217	0.176	0.151	0.152	0.146	0.149	0.157	0.161	0.148	0.047	0.045	0.050
670	0.215	0.175	0.149	0.151	0.145	0.148	0.156	0.159	0.147	0.047	0.045	0.050
680	0.211	0.172	0.147	0.149	0.143	0.146	0.154	0.158	0.145	0.046	0.045	0.049
690	0.209	0.170	0.146	0.147	0.142	0.145	0.153	0.156	0.144	0.046	0.044	0.049
700	0.206	0.169	0.145	0.146	0.141	0.144	0.152	0.155	0.143	0.046	0.045	0.049
710	0.204	0.167	0.144	0.145	0.140	0.142	0.150	0.154	0.142	0.046	0.045	0.049
720	0.203	0.166	0.144	0.144	0.140	0.142	0.150	0.154	0.142	0.047	0.045	0.049
730	0.202	0.166	0.144	0.145	0.141	0.143	0.151	0.155	0.143	0.049	0.044	0.048
740	0.201	0.166	0.145	0.145	0.141	0.144	0.151	0.155	0.143	0.050	0.044	0.048

750	0.198	0.164	0.144	0.144	0.140	0.143	0.150	0.154	0.143	0.051	0.044	0.048
760	0.196	0.163	0.143	0.143	0.140	0.142	0.149	0.153	0.142	0.051	0.044	0.048
770	0.194	0.161	0.141	0.142	0.138	0.140	0.147	0.151	0.140	0.050	0.044	0.048
780	0.191	0.159	0.140	0.140	0.136	0.139	0.146	0.150	0.139	0.049	0.044	0.048
790	0.188	0.157	0.138	0.138	0.135	0.137	0.144	0.148	0.138	0.049	0.044	0.048
800	0.186	0.154	0.137	0.137	0.133	0.135	0.143	0.146	0.136	0.048	0.044	0.048
810	0.183	0.153	0.135	0.135	0.132	0.134	0.141	0.145	0.134	0.048	0.044	0.048
820	0.182	0.152	0.134	0.135	0.131	0.133	0.140	0.144	0.134	0.049	0.044	0.047
830	0.182	0.152	0.136	0.136	0.133	0.135	0.142	0.146	0.136	0.051	0.044	0.048
840	0.182	0.152	0.137	0.137	0.134	0.136	0.143	0.147	0.137	0.053	0.044	0.048
850	0.181	0.152	0.137	0.137	0.134	0.136	0.143	0.147	0.137	0.054	0.044	0.048
860	0.180	0.152	0.138	0.137	0.135	0.137	0.144	0.148	0.138	0.055	0.045	0.049
870	0.181	0.154	0.140	0.139	0.136	0.138	0.145	0.150	0.140	0.058	0.046	0.050
880	0.180	0.153	0.140	0.139	0.137	0.139	0.145	0.149	0.140	0.059	0.046	0.050
890	0.178	0.152	0.139	0.138	0.136	0.138	0.144	0.148	0.139	0.059	0.044	0.048
900	0.178	0.151	0.139	0.138	0.136	0.138	0.145	0.149	0.140	0.061	0.044	0.048
910	0.178	0.152	0.141	0.140	0.138	0.140	0.146	0.150	0.141	0.062	0.044	0.049
920	0.180	0.155	0.144	0.144	0.142	0.144	0.150	0.154	0.145	0.067	0.045	0.048
930	0.188	0.163	0.154	0.152	0.151	0.154	0.159	0.164	0.155	0.077	0.045	0.049
940	0.204	0.178	0.173	0.170	0.169	0.172	0.178	0.183	0.173	0.096	0.044	0.048
950	0.230	0.204	0.202	0.199	0.198	0.201	0.208	0.213	0.203	0.125	0.044	0.047
960	0.266	0.239	0.242	0.238	0.238	0.242	0.249	0.255	0.243	0.166	0.044	0.048
970	0.272	0.246	0.251	0.246	0.246	0.249	0.256	0.263	0.251	0.174	0.044	0.047
980	0.271	0.245	0.250	0.245	0.245	0.249	0.255	0.262	0.250	0.174	0.043	0.047
990	0.262	0.237	0.241	0.237	0.236	0.240	0.246	0.253	0.241	0.165	0.043	0.048
1000	0.250	0.225	0.227	0.223	0.223	0.227	0.233	0.238	0.226	0.152	0.044	0.049

Vedlegg 9: Tabell for vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat av makrell med ultralyd etter 24 og 48 timer.

24 timer, 420 nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.411	0.594	0.656	0.685	0.676	0.251	0.265	0.595	0.591	0.653	0.502	0.248
B	0.415	0.604	0.682	0.698	0.697	0.249	0.268	0.612	0.620	0.677	0.512	0.254
C	0.414	0.606	0.703	0.705	0.705	0.244	0.265	0.599	0.626	0.666	0.519	0.255
D	0.415	0.610	0.685	0.706	0.706	0.245	0.266	0.607	0.624	0.673	0.516	0.254
E		0.607	0.686	0.705	0.699	0.228		0.609	0.616	0.683	0.512	0.254
F		0.620	0.684	0.697	0.707	0.233		0.613	0.622	0.671	0.516	0.255
G		0.613	0.685	0.708	0.700	0.222		0.612	0.616	0.670	0.510	0.256
H		0.606	0.684	0.712	0.696	0.243		0.624	0.625	0.671	0.506	0.252
	0.414	0.608	0.683	0.702	0.698	0.239	0.266	0.609	0.617	0.670	0.512	0.253

0,2g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.420	0.661	0.750	0.752	0.748	0.249	0.254	0.679	0.667	0.680	0.619	0.259
B	0.418	0.695	0.773	0.775	0.765	0.250	0.259	0.704	0.744	0.700	0.621	0.247
C	0.427	0.696	0.756	0.774	0.780	0.250	0.270	0.707	0.749	0.705	0.616	0.254
D	0.419	0.693	0.757	0.794	0.766	0.241	0.267	0.697	0.739	0.710	0.619	0.256
E		0.683	0.768	0.782	0.771	0.252	0.265	0.692	0.741	0.708	0.625	0.251
F		0.675	0.778	0.782	0.780	0.244	0.266	0.700	0.736	0.700	0.617	0.255
G		0.694	0.774	0.802	0.773	0.236	0.262	0.699	0.736	0.696	0.620	0.254
H		0.707	0.772	0.761	0.769	0.244	0.258	0.697	0.749	0.694	0.621	0.257
	0.421	0.688	0.766	0.778	0.769	0.246	0.263	0.697	0.733	0.699	0.620	0.254

0,4g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.409	0.816	0.865	0.861	0.889	0.254	0.265	0.729	0.769	0.835	0.689	0.253
B	0.411	0.834	0.888	0.922	0.866	0.236	0.263	0.782	0.826	0.854	0.794	0.248
C	0.422	0.829	0.923	0.931	0.920	0.247	0.269	0.758	0.838	0.858	0.786	0.253
D	0.421	0.838	0.882	0.894	0.912	0.260	0.270	0.742	0.840	0.850	0.780	0.259
E	0.422	0.829	0.901	0.909	0.903	0.250	0.265	0.748	0.823	0.861	0.776	0.251
F	0.423	0.825	0.886	0.910	0.911	0.243	0.265	0.765	0.828	0.854	0.763	0.252
G	0.417	0.824	0.889	0.879	0.917	0.255	0.268	0.844	0.814	0.848	0.778	0.250
H	0.417	0.860	0.880	0.892	0.903	0.252	0.271	0.765	0.828	0.848	0.784	0.252
	0.416	0.832	0.889	0.900	0.903	0.250	0.267	0.766	0.821	0.851	0.769	0.252

0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.411	0.876	0.853	0.948	0.939	0.249	0.263	0.819	0.743	0.866	0.878	0.249
B	0.417	0.944	0.977	0.965	1.005	0.253	0.260	0.835	0.774	0.904	0.879	0.250
C	0.421	0.894	0.983	0.983	1.006	0.246	0.269	0.857	0.787	0.907	0.865	0.246
D	0.426	0.891	0.978	1.008	0.975	0.254	0.268	0.850	0.784	0.907	0.881	0.251
E		0.920	1.001	1.029	1.007	0.250		0.867	0.789	0.912	0.882	0.252
F		0.913	0.995	0.984	1.003	0.249		0.838	0.813	0.913	0.875	0.251
G		0.887	0.954	0.961	0.998	0.242		0.821	0.817	0.870	0.881	0.246



H		0.917	0.949	0.982	0.980	0.248		0.834	0.807	0.901	0.877	0.246
	0.418	0.905	0.961	0.982	0.989	0.249	0.265	0.840	0.789	0.897	0.877	0.249

48 timer, 420 nm  
0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.341	0.587	0.640	0.674	0.679	0.224	0.252	0.521	0.557	0.552	0.648	0.227
B	0.343	0.613	0.678	0.711	0.697	0.217	0.241	0.567	0.599	0.578	0.679	0.237
C	0.357	0.638	0.684	0.715	0.700	0.214	0.254	0.568	0.598	0.585	0.693	0.234
D	0.358	0.610	0.694	0.706	0.697	0.212	0.254	0.568	0.602	0.589	0.692	0.229
E		0.628	0.688	0.711	0.694	0.234		0.574	0.601	0.587	0.676	0.230
F		0.632	0.691	0.712	0.701	0.232		0.585	0.597	0.590	0.674	0.233
G		0.626	0.687	0.722	0.678	0.221		0.582	0.602	0.579	0.650	0.226
H		0.629	0.683	0.716	0.690	0.223		0.577	0.590	0.599	0.670	0.232
	0.350	0.620	0.681	0.708	0.692	0.222	0.250	0.568	0.593	0.582	0.673	0.231

0,2g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.339	0.657	0.738	0.778	0.776	0.214	0.239	0.613	0.684	0.640	0.717	0.228
B	0.342	0.658	0.775	0.779	0.774	0.226	0.240	0.638	0.701	0.667	0.740	0.234
C	0.344	0.688	0.779	0.766	0.753	0.227	0.241	0.643	0.678	0.656	0.752	0.233
D	0.346	0.670	0.773	0.766	0.754	0.226	0.244	0.655	0.683	0.655	0.746	0.230
E		0.692	0.771	0.761	0.782	0.224		0.645	0.678	0.651	0.760	0.235
F		0.684	0.783	0.769	0.761	0.227		0.647	0.704	0.662	0.743	0.234
G		0.680	0.762	0.776	0.766	0.224		0.642	0.700	0.661	0.747	0.229
H		0.666	0.772	0.753	0.784	0.232		0.653	0.708	0.706	0.755	0.232
	0.343	0.674	0.769	0.768	0.769	0.225	0.241	0.642	0.692	0.662	0.745	0.232

0,4g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.349	0.819	0.818	0.871	0.940	0.244	0.242	0.691	0.826	0.745	0.765	0.243
B	0.348	0.871	0.915	0.916	0.921	0.237	0.245	0.695	0.868	0.817	0.808	0.237
C	0.347	0.894	0.903	0.924	0.958	0.241	0.256	0.690	0.876	0.818	0.851	0.241
D	0.349	0.881	0.895	0.918	0.925	0.237	0.250	0.670	0.851	0.807	0.806	0.241
E		0.884	0.924	0.919	0.944	0.240		0.685	0.869	0.702	0.807	0.249
F		0.885	0.910	0.885	0.960	0.236		0.676	0.927	0.812	0.802	0.239
G		0.882	0.918	0.931	0.940	0.239		0.890	0.927	0.817	0.907	0.238
H		0.902	0.913	0.926	0.923	0.243		0.860	0.929	0.814	0.854	0.232
	0.348	0.877	0.899	0.911	0.939	0.240	0.248	0.732	0.884	0.792	0.825	0.240

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.343	0.997	0.996	0.997	0.971	0.236	0.242	0.750	0.873	0.914	0.775	0.240
B	0.343	0.996	1.043	1.032	0.977	0.240	0.242	0.825	0.936	0.972	0.817	0.233
C	0.345	0.990	1.049	1.011	0.983	0.233	0.245	0.820	0.919	0.975	0.805	0.235

D	0.345	1.016	1.031	1.026	0.967	0.227	0.245	0.809	0.940	0.963	0.807	0.232
E	0.347	1.015	1.040	1.015	0.963	0.226	0.248	0.805	0.945	0.972	0.818	0.232
F	0.350	0.980	1.043	1.029	1.018	0.236	0.247	0.814	0.991	0.978	0.833	0.229
G	0.355	0.968	1.034	1.022	1.004	0.236	0.245	0.816	1.024	0.980	0.811	0.238
H	0.348	1.001	1.065	1.040	1.012	0.237	0.247	0.834	1.004	0.979	0.949	0.052
	0.344	0.995	1.038	1.022	0.987	0.234	0.245	0.809	0.954	0.967	0.827	0.211

Vedlegg 10: Tabell for vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat av makrell uten ultralyd etter 24 og 48 timer.

24 timer, 420 nm

0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.419	0.755	0.739	0.784	0.784	0.277	0.383	0.711	0.791	0.829	0.820	0.277
B	0.426	0.787	0.827	0.837	0.823	0.285	0.404	0.772	0.869	0.895	0.851	0.262
C	0.433	0.784	0.829	0.837	0.814	0.272	0.405	0.772	0.852	0.895	0.844	0.267
D	0.437	0.789	0.828	0.827	0.824	0.288	0.409	0.751	0.868	0.889	0.852	0.262
E		0.810	0.829	0.840	0.827	0.275	0.051	0.768	0.836	0.871	0.852	0.268
F		0.802	0.817	0.845	0.824	0.272	0.054	0.768	0.879	0.883	0.847	0.284
G		0.792	0.826	0.847	0.828	0.280	0.051	0.764	0.880	0.899	0.846	0.279
H		0.801	0.840	0.836	0.845	0.286	0.051	0.759	0.875	0.893	0.861	0.267
	0.428	0.790	0.817	0.832	0.821	0.279	0.226	0.758	0.856	0.882	0.847	0.271

0,2g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.439	0.804	0.809	0.824	0.845	0.279	0.413	0.915	0.885	0.717	0.938	0.306
B	0.449	0.821	0.859	0.863	0.856	0.291	0.412	0.950	0.954	0.829	0.987	0.301
C	0.449	0.819	0.866	0.857	0.862	0.300	0.410	0.941	0.953	0.833	0.980	0.300
D	0.448	0.815	0.861	0.852	0.859	0.288	0.410	0.934	0.952	0.828	0.964	0.301
E		0.816	0.895	0.852	0.851	0.304		0.924	0.948	0.841	0.968	0.313
F		0.821	0.852	0.849	0.858	0.293		0.931	0.941	0.867	0.977	0.313
G		0.809	0.855	0.867	0.862	0.297		0.876	0.959	0.816	0.972	0.308
H		0.814	0.861	0.867	0.849	0.291		0.936	0.941	0.816	0.968	0.307
	0.446	0.815	0.857	0.854	0.855	0.293	0.411	0.926	0.942	0.818	0.969	0.306

0,4g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.439	0.918	0.945	0.927	0.938	0.282	0.405	0.775	0.675	0.799	0.776	0.301
B	0.446	0.949	0.994	0.976	0.988	0.304	0.411	0.831	0.700	0.850	0.839	0.293
C	0.444	0.940	0.988	0.960	0.966	0.303	0.413	0.825	0.702	0.834	0.822	0.293
D	0.446	0.952	0.962	0.954	0.926	0.302	0.418	0.815	0.766	0.845	0.844	0.304
E		0.951	0.972	0.930	0.970	0.299		0.821	0.730	0.858	0.833	0.298
F		1.005	0.981	0.944	0.981	0.304		0.826	0.782	0.843	0.835	0.299
G		0.946	0.972	0.971	0.986	0.293		0.685	0.849	0.841	0.827	0.301
H		0.948	0.979	0.970	0.964	0.307		0.825	0.770	0.825	0.833	0.298
	0.443	0.951	0.974	0.954	0.965	0.299	0.412	0.800	0.747	0.837	0.826	0.298

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.436	0.984	1.000	0.960	0.989	0.303	0.396	0.972	0.979	0.994	0.971	0.294
B	0.445	1.002	1.066	1.010	1.073	0.289	0.405	0.907	1.024	1.031	1.037	0.297
C	0.447	1.019	1.081	1.035	1.045	0.300	0.417	0.941	1.042	1.019	1.041	0.304
D	0.444	1.008	1.059	1.017	1.099	0.297	0.416	0.904	1.037	1.010	1.024	0.294
E		1.027	1.053	1.075	1.096	0.295		0.941	1.031	1.009	1.015	0.303
F		1.016	1.064	1.069	1.089	0.298		0.868	1.040	1.013	1.031	0.302
G		0.990	1.066	1.050	1.063	0.295		1.046	1.051	1.042	1.028	0.299

H		1.013	1.056	1.024	1.068	0.300		1.037	1.038	1.008	1.029	0.296
	0.443	1.007	1.055	1.030	1.065	0.297	0.408	0.952	1.030	1.016	1.022	0.299

48 timer, 420 nm

0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.425	0.762	0.800	0.795	0.798	0.241	0.385	0.587	0.848	0.762	0.739	0.244
B	0.438	0.826	0.856	0.831	0.841	0.238	0.395	0.682	0.883	0.820	0.791	0.243
C	0.445	0.850	0.859	0.820	0.839	0.246	0.395	0.683	0.878	0.927	0.803	0.253
D	0.429	0.848	0.847	0.838	0.837	0.240	0.403	0.696	0.878	0.835	0.799	0.241
E		0.847	0.862	0.832	0.826	0.243		0.691	0.894	0.830	0.797	0.246
F		0.861	0.862	0.841	0.850	0.244		0.685	0.894	0.816	0.805	0.247
G		0.853	0.847	0.863	0.856	0.230		0.697	0.856	0.803	0.910	0.261
H		0.847	0.876	0.876	0.858	0.245		0.691	0.882	0.809	0.978	0.247
	0.434	0.837	0.851	0.837	0.838	0.241	0.394	0.677	0.877	0.825	0.828	0.248

0,2g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.409	0.939	0.908	0.908	0.890	0.243	0.377	0.830	0.920	0.915	0.826	0.260
B	0.434	1.010	0.942	0.954	0.930	0.256	0.400	0.899	0.987	0.967	0.887	0.248
C	0.435	1.105	0.951	0.931	0.947	0.257	0.399	0.925	0.987	0.968	1.043	0.263
D	0.436	0.962	0.953	0.921	0.935	0.258	0.399	0.895	0.989	0.966	0.906	0.264
E		0.939	0.955	0.936	0.938	0.254		0.886	0.998	0.968	0.915	0.263
F		0.942	0.953	0.939	0.945	0.263		0.893	0.985	0.982	0.923	0.266
G		0.937	0.947	0.937	0.951	0.260		0.897	0.997	0.954	0.905	0.260
H		0.933	0.943	0.941	0.940	0.252		0.875	0.987	0.962	0.895	0.260
	0.428	0.971	0.944	0.933	0.934	0.255	0.394	0.888	0.981	0.960	0.912	0.260

0,4g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.433	1.093	1.048	1.054	1.016	0.254	0.352	0.685	0.839	0.775	0.580	0.253
B	0.422	0.969	1.100	1.098	1.063	0.258	0.399	0.716	0.804	0.843	0.678	0.259
C	0.437	1.097	1.116	1.090	1.077	0.259	0.395	0.715	0.823	0.868	0.762	0.262
D	0.433	1.111	1.104	1.085	1.068	0.244	0.396	0.719	0.799	0.851	0.671	0.259
E		1.116	1.093	1.102	1.081	0.258		0.723	0.823	0.852	0.802	0.258
F		1.119	1.093	1.102	1.034	0.249		0.715	0.817	0.844	0.675	0.260
G		1.095	1.094	1.095	1.066	0.257		0.702	0.810	0.828	0.680	0.259
H		1.088	1.091	1.095	1.058	0.257		0.790	0.801	0.842	0.906	0.258
	0.431	1.086	1.092	1.090	1.058	0.255	0.385	0.721	0.815	0.838	0.719	0.258

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.431	1.137	1.148	1.194	1.159	0.259	0.381	0.970	0.860	0.857	0.809	0.254
B	0.423	1.168	1.233	1.233	1.209	0.252	0.384	1.074	0.824	0.967	0.960	0.254
C	0.430	1.180	1.248	1.241	1.190	0.254	0.396	1.090	0.809	0.979	0.977	0.256

D	0.435	1.167	1.186	1.213	1.185	0.247	0.394	1.107	0.854	0.963	0.934	0.251
E		1.173	1.212	1.260	1.184	0.253		1.092	0.838	0.976	0.939	0.249
F		1.162	1.220	1.229	1.196	0.250		1.108	0.816	0.989	0.939	0.244
G		1.150	1.198	1.223	1.187	0.250		1.075	0.808	0.971	0.899	0.252
H		1.155	1.215	1.224	1.177	0.248		1.092		0.974	0.908	0.249
	0.429	1.162	1.207	1.227	1.186	0.252	0.389	1.076	0.830	0.960	0.921	0.251

Vedlegg 11: Tabell for vekstvilkår ved tilsetning av peptidhydrolysat av laks uten ultralyd etter 24 og 48 timer.

24 timer, 420 nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.497	0.619	0.697	0.715	0.717	0.322	0.425	0.539	0.690	0.684	0.665	0.350
B	0.484	0.619	0.711	0.719	0.715	0.314	0.413	0.543	0.711	0.680	0.656	0.357
C	0.491	0.615	0.692	0.706	0.719	0.339	0.417	0.558	0.702	0.674	0.675	0.348
D	0.491	0.607	0.696	0.698	0.706	0.333	0.420	0.552	0.698	0.681	0.673	0.348
E	0.491	0.604	0.690	0.700	0.705	0.341		0.539	0.700	0.680	0.670	0.341
F	0.482	0.613	0.696	0.712	0.702	0.348		0.557	0.700	0.670	0.659	0.350
G	0.482	0.610	0.702	0.700	0.702	0.351		0.549	0.697	0.679	0.652	0.350
H	0.485	0.616	0.698	0.729	0.704	0.339		0.540	0.692	0.678	0.647	0.328
	0.488	0.613	0.698	0.710	0.708	0.336	0.419	0.547	0.699	0.678	0.662	0.346

0,2g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.451	0.520	0.482	0.717	0.717	0.347	0.393	0.564	0.734	0.765	0.726	0.339
B	0.454	0.540	0.714	0.716	0.715	0.345	0.409	0.570	0.735	0.759	0.717	0.343
C	0.459	0.543	0.632	0.707	0.719	0.344	0.405	0.577	0.744	0.759	0.722	0.338
D		0.533	0.733	0.713	0.712	0.349		0.563	0.731	0.773	0.713	0.344
E		0.536	0.731	0.710	0.708	0.348		0.554	0.731	0.752	0.718	0.332
F		0.525	0.726	0.708	0.709	0.345		0.571	0.733	0.730	0.718	0.343
G		0.533	0.723	0.709	0.702	0.341		0.556	0.730	0.756	0.708	0.333
H		0.549	0.727	0.712	0.706	0.337		0.553	0.731	0.759	0.721	0.336
	0.455	0.535	0.683	0.711	0.711	0.344	0.402	0.563	0.734	0.756	0.718	0.339

0,4g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.447	0.695	0.759	0.788	0.311	0.323	0.376	0.610	0.813	0.862	0.813	0.281
B	0.451	0.702	0.765	0.785	0.309	0.305	0.377	0.619	0.809	0.858	0.815	0.284
C		0.701	0.778	0.789	0.310	0.316	0.386	0.605	0.823	0.852	0.811	0.285
D		0.695	0.784	0.768	0.374	0.308	0.383	0.618	0.828	0.844	0.811	0.285
E		0.699	0.778	0.781	0.377	0.317		0.604	0.816	0.838	0.810	0.282
F		0.699	0.762	0.771	0.388	0.288		0.609	0.815	0.845	0.830	0.280
G		0.698	0.787	0.794	0.378	0.282		0.604	0.814	0.840	0.820	0.286
H		0.699	0.787	0.801	0.378	0.276		0.602	0.809	0.847	0.812	0.276
	0.449	0.698	0.775	0.785	0.353	0.302	0.381	0.609	0.816	0.848	0.815	0.282

0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.438	0.746	0.825	0.817	0.851	0.285	0.385	0.648	0.797	0.829	0.855	0.283
B	0.451	0.746	0.818	0.847	0.838	0.284	0.392	0.667	0.838	0.820	0.859	0.284
C	0.444	0.750	0.822	0.857	0.838	0.278	0.394	0.643	0.827	0.824	0.881	0.285
D	0.444	0.743	0.825	0.854	0.841	0.291	0.390	0.644	0.820	0.822	0.881	0.281
E	0.447	0.746	0.820	0.849	0.839	0.281	0.387	0.636	0.811	0.850	0.874	0.285
F		0.745	0.803	0.843	0.845	0.285	0.391	0.640	0.818	0.855	0.870	0.281
G		0.740	0.820	0.838	0.848	0.280	0.387	0.659	0.827	0.861	0.869	0.284

H		0.731	0.822	0.832	0.855	0.280		0.657	0.816	0.876	0.888	0.280
	0.445	0.743	0.819	0.842	0.844	0.283	0.389	0.649	0.819	0.842	0.872	0.283

48 timer, 420 nm

0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385	0.533	0.634	0.620	0.646	0.285	0.405	0.530	0.598	0.607	0.597	0.302
B		0.535	0.629	0.624	0.638	0.292		0.536	0.602	0.610	0.616	0.300
C		0.544	0.633	0.618	0.646	0.296		0.532	0.604	0.611	0.617	0.295
D		0.533	0.630	0.622	0.619	0.296		0.528	0.609	0.606	0.613	0.292
E		0.535	0.629	0.609	0.638	0.300		0.531	0.603	0.606	0.617	0.299
F		0.531	0.623	0.620	0.645	0.297		0.535	0.596	0.595	0.624	0.292
G		0.531	0.620	0.617	0.639	0.308		0.527	0.599	0.599	0.619	0.300
H		0.537	0.621	0.617	0.638	0.287		0.526	0.601	0.599	0.624	0.298
	0.385	0.535	0.627	0.618	0.639	0.295	0.405	0.531	0.601	0.604	0.616	0.297

0,2g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385	0.649	0.655	0.639	0.644	0.267	0.385	0.513	0.685	0.673	0.710	0.309
B		0.645	0.664	0.677	0.672	0.302		0.549	0.710	0.737	0.700	0.303
C		0.654	0.680	0.672	0.671	0.308		0.540	0.707	0.742	0.705	0.301
D		0.643	0.687	0.669	0.669	0.310		0.547	0.702	0.746	0.698	0.311
E		0.641	0.672	0.663	0.658	0.309		0.536	0.704	0.747	0.699	0.308
F		0.635	0.678	0.666	0.674	0.308		0.539	0.712	0.743	0.701	0.311
G		0.646	0.673	0.668	0.669	0.309		0.533	0.713	0.740	0.690	0.317
H		0.651	0.688	0.676	0.663	0.299		0.530	0.708	0.744	0.692	0.313
	0.385	0.645	0.675	0.666	0.665	0.302	0.385	0.536	0.705	0.734	0.699	0.309

0,4g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385	0.699	0.778	0.574	0.328	0.313	0.385	0.650	0.754	0.782	0.740	0.310
B		0.727	0.822	0.587	0.343	0.319		0.666	0.787	0.832	0.799	0.314
C		0.726	0.817	0.586	0.334	0.318		0.670	0.780	0.839	0.806	0.314
D		0.722	0.813	0.586	0.337	0.316		0.644	0.791	0.825	0.799	0.311
E		0.726	0.805	0.579	0.339	0.312		0.661	0.791	0.824	0.794	0.313
F		0.716	0.817	1.118	0.332	0.314		0.655	0.792	0.855	0.785	0.310
G		0.724	0.811	0.916	0.342	0.313		0.662	0.762	0.866	0.805	0.316
H		0.732	0.813	0.912	0.338	0.316		0.654	0.785	0.829	0.817	0.313
	0.385	0.722	0.809	0.732	0.337	0.315	0.385	0.658	0.780	0.831	0.793	0.313

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385	0.868	0.834	0.834	0.627	0.308	0.385	0.625	0.786	0.778	0.825	0.280
B		0.752	0.828	0.87	0.644	0.301		0.685	0.809	0.822	0.852	0.287
C		0.744	0.817	0.861	0.633	0.293		0.673	0.808	0.803	0.850	0.306

D		0.732	0.822	0.862	0.636	0.300		0.678	0.834	0.811	0.858	0.313
E		0.759	0.814	0.856	0.634	0.304		0.674	0.799	0.813	0.848	0.307
F		0.780	0.819	0.858		0.301		0.664	0.783	0.814	0.854	0.297
G		0.772	0.800	0.852	0.757	0.296		0.669	0.799	0.792	0.829	0.294
H		0.813	0.804	0.862		0.299		0.682	0.895	0.779	0.835	0.306
	0.385	0.777	0.817	0.857	0.655	0.300	0.385	0.669	0.814	0.801	0.844	0.299



Vedlegg 12: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonide peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 280nm.

24 timer, 280nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.905	3.143	3.204	3.169	3.184	3.156	3.219	3.205	3.059	3.093	3.074	3.161
B	2.905	3.171	3.214	3.169	3.181	3.235	3.251	3.225	3.054	3.100	3.098	3.189
C	2.909	3.171	3.202	3.170	3.193	3.189	3.252	3.268	3.064	3.094	3.065	3.190
D	2.938	3.182	3.188	3.154	3.197	3.223	3.228	3.272	3.076	3.100	3.097	3.198
E	2.934	3.152	3.154	3.186	3.177	3.222	3.279	3.320	3.031	3.027	3.053	3.220
F	2.915	3.191	3.178	3.207	3.218	3.239	3.298	3.345	3.039	3.048	3.058	3.276
G	2.919	3.188	3.173	3.173	3.224	3.259	3.283	3.356	3.023	3.023	3.072	3.269
H	2.901	3.186	3.212	3.184	3.209	3.229	3.307	3.370	3.028	3.057	3.037	3.228

24 timer, 280nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.878	3.401	3.377	3.391	3.391	3.364	3.296	3.332	3.035	3.078	3.064	3.178
B	2.888	3.413	3.350	3.392	3.400	3.385	3.372	3.370	3.040	3.068	3.070	3.204
C	2.886	3.454	3.393	3.408	3.404	3.366	3.378	3.391	3.026	3.044	3.013	3.188
D	2.911	3.406	3.346	3.402	3.400	3.398	3.368	3.363	3.022	3.065	3.040	3.154
E	2.890	3.395	3.441	3.409	3.405	3.448	3.465	3.495	3.015	3.021	3.063	3.220
F	2.897	3.424	3.449	3.462	3.442	3.477	3.456	3.495	3.006	3.020	2.989	3.260
G	2.907	3.460	3.416	3.424	3.446	3.457	3.473	3.508	3.015	3.011	3.061	3.229
H	2.897	3.447	3.440	3.452	3.425	3.462	3.477	3.513	3.015	3.027	3.071	3.236

48 timer, 280nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.899	3.499	3.486	3.466	3.512	3.626	3.856	4.000	3.191	3.218	3.302	3.781
B	2.976	3.499	3.511	3.528	3.689	3.684	4.000	4.000	3.183	3.225	3.283	3.778
C	2.985	3.593	3.585	3.595	3.682	3.735	3.920	4.000	3.217	3.211	3.266	3.744
D	2.982	3.670	3.617	3.477	3.710	3.791	4.000	4.000	3.171	3.239	3.285	3.801
E	2.972	3.432	3.397	3.425	3.413	3.486	3.613	3.654	3.291	3.318	3.274	3.514
F	2.995	3.435	3.427	3.453	3.495	3.491	3.606	3.617	3.321	3.342	3.363	3.554
G	3.015	3.460	3.464	3.454	3.478	3.558	3.596	3.622	3.259	3.384	3.360	3.505
H	2.918	3.444	3.461	3.444	3.506	3.565	3.621	3.656	3.285	3.388	3.331	3.533

48 timer, 280nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.823	3.296	3.275	3.327	3.327	3.281	3.273	3.279	3.026	3.049	3.031	3.088
B	2.845	3.323	3.303	3.333	3.361	3.313	3.311	3.334	3.039	3.051	3.026	3.142
C	2.868	3.321	3.293	3.346	3.346	3.326	3.309	3.318	3.022	3.027	3.000	3.133
D	2.865	3.324	3.268	3.341	3.326	3.318	3.295	3.348	3.007	3.037	3.042	3.135
E	2.865	3.417	3.378	3.384	3.418	3.430	3.440	3.518	3.007	2.996	3.058	3.263
F	2.861	3.400	3.391	3.408	3.432	3.485	3.458	3.549	3.013	3.020	2.996	3.283

G	2.874	3.395	3.406	3.378	3.422	3.438	3.441	3.481	3.027	3.022	3.060	3.267
H	2.872	3.394	3.439	3.446	3.476	3.469	3.453	3.477	2.996	3.027	3.077	3.235

72 timer, 280nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.896	3.566	3.564	3.517	3.546	3.599	3.683	3.698	3.638	3.313	3.649	3.424
B	3.038	3.682	3.637	3.614	3.541	3.640	3.763	3.961				
C	3.009	3.426	3.637	3.492	3.598	3.667	3.856	3.862				
D	2.990	3.625	3.645	3.660	3.627	3.668	3.735	4.000				
E	3.045	3.745	3.825	3.704	3.962	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
F	3.018	3.694	4.000	3.915	4.000	4.000	4.000	4.000				
G	3.047	3.906	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000				
H	2.957	3.916	4.000	3.950	4.000	4.000	4.000	4.000				

72 timer, 280nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.775	3.403	3.495	3.339	3.394	3.372	3.331	3.380	3.025	3.165	3.109	3.178
B	2.863	3.374	3.275	3.367	3.363	3.385	3.379	3.402			3.052	3.223
C	2.848	3.403	3.335	3.394	3.372	3.379	3.370	3.408				
D	2.813	3.388	3.365	3.432	3.411	3.345	3.383	3.395				
E	2.826	3.503	3.529	3.527	3.525	3.542	3.536	3.613	2.963	2.971	3.020	3.204
F	2.848	3.497	3.493	3.487	3.566	3.528	3.564	3.562				
G	2.837	3.531	3.490	3.544	3.538	3.496	3.559	3.569				
H	2.829	3.478	3.523	3.453	3.512	3.554	3.559	3.594				

Vedlegg 13: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonide peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 420nm.

24 timer, 420nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.145	0.678	0.731	0.688	0.716	0.714	0.837	0.816	0.558	0.578	0.526	0.708
B	0.148	0.730	0.762	0.720	0.747	0.773	0.867	0.932	0.541	0.577	0.573	0.755
C	0.145	0.733	0.748	0.723	0.740	0.757	0.875	0.929	0.544	0.593	0.574	0.750
D	0.142	0.735	0.764	0.722	0.761	0.786	0.870	0.923	0.564	0.570	0.564	0.759
E	0.153	0.523	0.511	0.525	0.483	0.531	0.573	0.679	0.308	0.317	0.361	0.539
F	0.147	0.564	0.529	0.571	0.537	0.582	0.632	0.724	0.315	0.325	0.360	0.635
G	0.147	0.542	0.562	0.542	0.557	0.567	0.621	0.726	0.318	0.305	0.345	0.638
H	0.158	0.549	0.534	0.537	0.534	0.563	0.616	0.718	0.288	0.295	0.351	0.624

24 timer, 420nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.189	0.954	0.828	0.932	0.882	0.866	0.869	0.996	0.560	0.590	0.593	0.766
B	0.189	0.960	0.848	0.931	0.908	0.891	0.971	1.044	0.582	0.596	0.603	0.792
C	0.189	0.952	0.859	0.923	0.906	0.895	0.974	1.060	0.568	0.575	0.580	0.789
D	0.202	0.970	0.845	0.922	0.919	0.880	0.969	1.034	0.558	0.583	0.553	0.755
E	0.197	0.748	0.775	0.776	0.811	0.816	0.835	0.846	0.366	0.351	0.403	0.612
F	0.202	0.819	0.808	0.803	0.824	0.879	0.864	0.877	0.362	0.356	0.398	0.625
G	0.200	0.811	0.824	0.815	0.855	0.847	0.837	0.885	0.357	0.356	0.400	0.622
H	0.198	0.820	0.804	0.818	0.803	0.863	0.855	0.877	0.345	0.351	0.382	0.640

48 timer, 420nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.183	0.536	0.489	0.483	0.490	0.468	0.513	0.594	0.410	0.373	0.437	0.583
B	0.200	0.518	0.533	0.527	0.533	0.482	0.562	0.618	0.415	0.410	0.436	0.607
C	0.214	0.534	0.533	0.508	0.546	0.494	0.544	0.620	0.427	0.411	0.441	0.594
D	0.221	0.528	0.522	0.517	0.536	0.495	0.555	0.616	0.427	0.409	0.431	0.599
E	0.214	0.601	0.590	0.596	0.639	0.624	0.746	0.813	0.502	0.486	0.470	0.665
F	0.205	0.627	0.608	0.631	0.653	0.664	0.764	0.836	0.527	0.506	0.523	0.650
G	0.207	0.618	0.623	0.609	0.662	0.676	0.766	0.839	0.491	0.517	0.492	0.662
H	0.195	0.621	0.630	0.625	0.645	0.676	0.770	0.832	0.506	0.490	0.490	0.655

48 timer, 420nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.196	0.815	0.742	0.817	0.812	0.814	0.899	0.958	0.506	0.473	0.465	0.616
B	0.186	0.823	0.751	0.846	0.843	0.869	0.928	1.033	0.502	0.482	0.468	0.653
C	0.205	0.842	0.748	0.843	0.839	0.874	0.943	1.021	0.501	0.473	0.498	0.611
D	0.196	0.823	0.745	0.859	0.848	0.859	0.938	1.010	0.496	0.486	0.485	0.651
E	0.206	0.781	0.784	0.791	0.791	0.776	0.867	0.893	0.415	0.350	0.423	0.589
F	0.201	0.807	0.775	0.813	0.772	0.858	0.873	0.957	0.419	0.404	0.411	0.605
G	0.210	0.806	0.790	0.757	0.836	0.869	0.836	0.909	0.423	0.389	0.416	0.590
H	0.196	0.806	0.814	0.806	0.820	0.862	0.857	0.919	0.406	0.385	0.424	0.602

72 timer, 420nm

0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.179	0.562	0.554	0.504	0.525	0.568	0.681	0.687	0.651	0.314	0.565	0.366
B	0.178	0.546	0.564	0.541	0.535	0.554	0.666	0.785				
C	0.189	0.503	0.553	0.518	0.551	0.555	0.672	0.775				
D	0.187	0.537	0.551	0.527	0.542	0.559	0.664	0.779				
E	0.196	0.446	0.443	0.423	0.462	0.466	0.445	0.528	0.625	0.698	0.590	1.043
F	0.187	0.461	0.468	0.459	0.470	0.472	0.476	0.581				
G	0.195	0.458	0.489	0.464	0.471	0.503	0.471	0.580				
H	0.193	0.461	0.457	0.450	0.468	0.497	0.511	0.598				

72 timer, 420nm

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.187	0.862	1.246	0.749	0.804	0.856	0.930	1.043	0.282	0.578	0.423	0.611
B	0.199	0.787	0.544	0.800	0.829	0.855	0.952	1.012				
C	0.201	0.798	0.650	0.812	0.803	0.865	0.952	1.048				
D	0.199	0.799	0.798	0.840	0.818	0.833	0.935	1.051				
E	0.203	0.761	0.715	0.789	0.799	0.737	0.733	0.880	0.211	0.221	0.198	0.258
F	0.199	0.767	0.753	0.739	0.827	0.778	0.808	0.815				
G	0.203	0.769	0.755	0.792	0.827	0.785	0.813	0.858				
H	0.199	0.768	0.768	0.739	0.772	0.805	0.776	0.857				

Vedlegg 14: Tabell for testing av antibakteriell effekt av salmonide peptidhydrolysat etter 24, 48 og 72 timer ved 970nm.

24 timer, 970nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.169	0.340	0.362	0.345	0.361	0.374	0.428	0.433	0.263	0.272	0.254	0.357
B	0.169	0.355	0.372	0.354	0.370	0.392	0.438	0.481	0.255	0.268	0.268	0.375
C	0.165	0.356	0.365	0.359	0.370	0.387	0.443	0.479	0.257	0.278	0.265	0.370
D	0.169	0.359	0.372	0.359	0.381	0.400	0.443	0.475	0.263	0.265	0.264	0.373
E	0.173	0.254	0.250	0.251	0.235	0.251	0.268	0.311	0.195	0.200	0.208	0.273
F	0.168	0.266	0.253	0.267	0.257	0.269	0.291	0.327	0.198	0.201	0.207	0.307
G	0.167	0.261	0.267	0.258	0.263	0.264	0.295	0.327	0.199	0.195	0.203	0.309
H	0.179	0.267	0.261	0.257	0.261	0.276	0.287	0.326	0.194	0.200	0.216	0.306

24 timer, 970nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.170	0.452	0.391	0.451	0.420	0.419	0.426	0.485	0.255	0.261	0.267	0.360
B	0.170	0.460	0.400	0.442	0.432	0.432	0.467	0.509	0.260	0.269	0.272	0.373
C	0.168	0.449	0.405	0.435	0.435	0.429	0.467	0.514	0.257	0.260	0.257	0.368
D	0.173	0.462	0.401	0.437	0.432	0.418	0.465	0.501	0.253	0.259	0.250	0.355
E	0.171	0.316	0.328	0.329	0.343	0.344	0.348	0.350	0.202	0.195	0.210	0.286
F	0.171	0.348	0.343	0.341	0.347	0.374	0.361	0.359	0.204	0.197	0.209	0.292
G	0.170	0.343	0.348	0.346	0.359	0.359	0.352	0.364	0.198	0.198	0.208	0.290
H	0.176	0.345	0.338	0.350	0.339	0.364	0.360	0.359	0.197	0.199	0.204	0.300

48 timer, 970nm												
0,1g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.167	0.245	0.228	0.224	0.224	0.218	0.233	0.265	0.214	0.199	0.227	0.284
B	0.175	0.238	0.245	0.238	0.242	0.221	0.249	0.268	0.217	0.216	0.225	0.293
C	0.161	0.245	0.242	0.232	0.247	0.226	0.243	0.273	0.223	0.218	0.228	0.288
D	0.164	0.244	0.243	0.237	0.248	0.229	0.249	0.269	0.223	0.219	0.228	0.289
E	0.161	0.300	0.298	0.298	0.314	0.312	0.357	0.390	0.251	0.249	0.238	0.334
F	0.160	0.313	0.305	0.315	0.320	0.328	0.368	0.398	0.258	0.255	0.256	0.327
G	0.161	0.307	0.309	0.307	0.324	0.335	0.369	0.400	0.243	0.262	0.248	0.332
H	0.159	0.310	0.314	0.315	0.318	0.338	0.370	0.398	0.255	0.250	0.250	0.327

48 timer, 970nm												
0,6g/100mL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.167	0.402	0.359	0.399	0.395	0.401	0.436	0.472	0.253	0.243	0.237	0.310
B	0.164	0.410	0.364	0.412	0.412	0.426	0.453	0.499	0.249	0.245	0.234	0.326
C	0.166	0.420	0.363	0.409	0.411	0.431	0.458	0.498	0.249	0.244	0.248	0.306
D	0.168	0.410	0.361	0.424	0.424	0.423	0.461	0.490	0.247	0.248	0.245	0.326
E	0.166	0.323	0.330	0.333	0.326	0.324	0.354	0.357	0.221	0.192	0.227	0.289
F	0.167	0.333	0.323	0.332	0.320	0.360	0.360	0.382	0.223	0.215	0.221	0.292
G	0.167	0.336	0.326	0.315	0.355	0.372	0.341	0.368	0.225	0.208	0.223	0.287
H	0.171	0.334	0.335	0.335	0.345	0.355	0.356	0.373	0.220	0.208	0.228	0.291

72 timer, 970nm

0,1g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.165	0.313	0.302	0.277	0.288	0.310	0.356	0.356	0.353	0.213	0.317	0.232
B	0.168	0.306	0.312	0.298	0.295	0.305	0.347	0.399				
C	0.165	0.285	0.306	0.293	0.298	0.305	0.350	0.399				
D	0.168	0.301	0.308	0.295	0.301	0.306	0.348	0.401				
E	0.168	0.241	0.222	0.214	0.231	0.232	0.220	0.249	0.352	0.383	0.329	0.535
F	0.167	0.234	0.240	0.230	0.235	0.236	0.232	0.270				
G	0.173	0.235	0.244	0.235	0.233	0.246	0.230	0.272				
H	0.167	0.236	0.230	0.227	0.237	0.244	0.246	0.277				

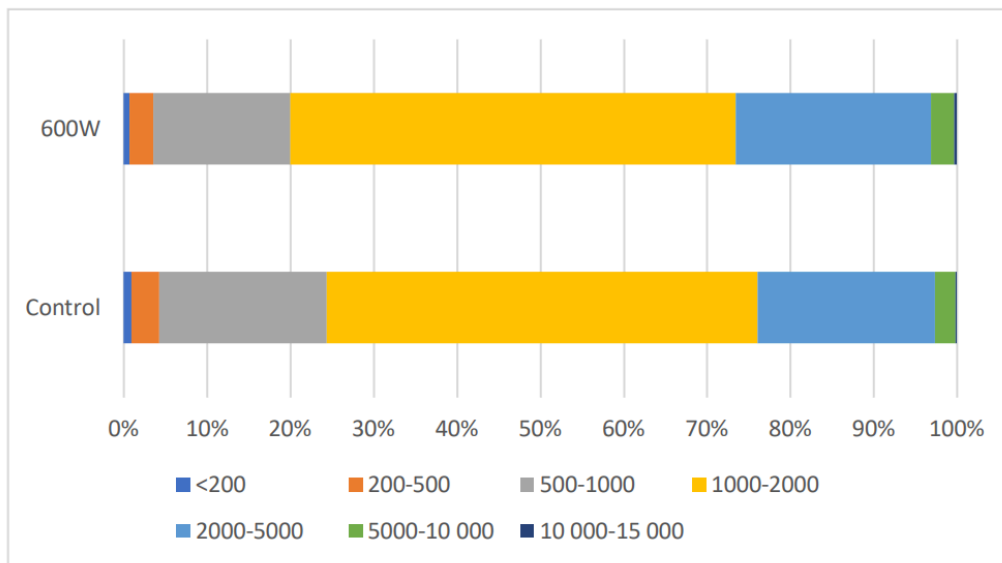
72 timer, 970nm

0,6g/100mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.165	0.444	0.673	0.379	0.412	0.442	0.476	0.535	0.201	0.327	0.262	0.337
B	0.170	0.402	0.288	0.406	0.422	0.437	0.484	0.517				
C	0.168	0.410	0.334	0.414	0.416	0.437	0.487	0.534				
D	0.171	0.409	0.405	0.425	0.416	0.428	0.477	0.538				
E	0.160	0.313	0.296	0.329	0.333	0.322	0.301	0.360	0.160	0.167	0.162	0.175
F	0.170	0.317	0.314	0.313	0.344	0.326	0.330	0.330				
G	0.170	0.321	0.313	0.330	0.353	0.357	0.350	0.354				
H	0.170	0.320	0.317	0.314	0.330	0.374	0.328	0.351				

Vedlegg 15: Tabell for ultralydbehandling ved 600W

	Control		600W	
	Mean	Std dev	Mean	Std dev
<200	0.923	0.038	0.720	0.017
200-500	3.380	0.812	2.897	0.235
500-1000	20.043	0.631	16.487	1.031
1000-2000	51.733	0.197	53.620	0.504
2000-5000	21.250	0.469	23.470	0.183
5000-10 000	2.483	0.396	2.790	0.668
10 000-15 000	0.187	0.081	0.343	0.159



	Control	600W
<200	0.9233	0.72
200-500	3.38	2.897
500-1000	20.043	16.49
1000-2000	51.733	53.62
2000-5000	21.25	23.47
5000-10 000	2.4833	2.79
10 000-15 000	0.1867	0.343
15 000-20 000		
20 000-50 000		
50 000-100 000		

Vedlegg 16: Tabell for hydrolysatets egenabsorbans

										SK			
Konsentrasjon		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,1g/100mL	A	0,487	0,509	0,514	0,460	0,481	0,497	0,477	0,488	0,498	0,232	0,232	0,249
	B	0,499	0,502	0,501	0,493	0,485	0,487	0,471	0,501	0,494	0,233	0,233	0,245
0,2g/100mL	C	0,613	0,620	0,627	0,619	0,630	0,634	0,596	0,593	0,606	0,231	0,234	0,231
	D	0,618	0,621	0,625	0,609	0,613	0,594	0,617	0,623	0,598	0,234	0,236	0,235
0,4g/100mL	E	0,845	0,875	0,913	0,819	0,843	0,864	0,855	0,856	0,873	0,234	0,235	0,237
	F	0,869	0,854	0,818	0,832	0,891	0,881	0,833	0,865	0,911	0,234	0,237	0,237
0,6g/100mL	G	1,243	1,266	1,286	1,250	1,254	1,256	1,276	1,266	1,270	0,237	0,236	0,238
	H	1,284	1,257	1,257	1,287	1,269	1,270	1,290	1,280	1,271	0,237	0,236	0,258



