

William Mosnes Bjelland

Enzymatisk hydrolyse av fjørferestråstoff: Undersøkelse av enzymkinetikk og forholdet mellom vann og substrat

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft

Veileder: Turid Rustad

Mai 2024

William Mosnes Bjelland

Enzymatisk hydrolyse av fjørferestråstoff: Undersøkelse av enzymkinetikk og forholdet mellom vann og substrat

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft
Veileder: Turid Rustad
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Institutt for bioteknologi og matvitenskap.

Jeg vil takke min veileder, Turid Rustad, for hennes veiledning og for å alltid være tilgjengelig gjennom året som har gått. Laboratorieingeniør Siri Stavrum fortjener ros for å ha hjulpet til med laboratorieprosedyrer og spre god stemning på laben, og ikke minst en stor takk til avdelingsingeniør Tarjei Haugbro for å ha hjulpet til med gjennomførelse av FPLC-prøver.

Jeg vil takke mamma og pappa for at de støttet meg og hatt troa på meg gjennom disse årene, jeg vil også rette en stor takk til mine søstre for støtte og fantastisk gode akademiske innspill. Til slutt vil jeg uttrykke takknemlighet til alle mine medstudenter for to fine år, med fine lunsjpauser og det som endte opp med å bli lange fine kvelder på lesesalen.

Sammendrag

I denne studien undersøkes utnyttelsen av kyllingrestråstoff gjennom enzymatisk hydrolyse for å produsere høykvalitets proteinprodukter. Bakgrunnen for studien ligger i det økende behovet for bærekraftig matproduksjon og bedre utnyttelse av animalske biprodukter, særlig i fjørfeindustrien som stadig øker i konsum og produserer betydelige mengder restråstoff. Studien fokuserer på enzymatisk hydrolyse som en metode for å bryte ned proteiner i kyllingrestråstoff ved hjelp av proteaser, og undersøker hvordan ulike prosessbetingelser påvirker utbyttet og kvaliteten av de resulterende produktene. Proteinhydrolysater fra kyllingrestråstoff har potensialet til å anvendes i flere industrielle sammenhenger, som for eksempler er kosmetikk, legemidler, fôr, matingrediens og kosttilskudd.

Studien undersøkte enzymatisk hydrolyse (EPH) av skinn og beinfraksjon fra kyllingrestråstoff (RRS). Målet var å vurdere hvordan mengden tilsatt vann (45:55 og 60:40 vann:RRS) og hydrolysetid (15, 30, 45 og 60 minutter) påvirket enzymkinetikken og utbyttet av fett, sediment og proteinhydrolysat til to kommersielle enzymer (E0 og E1). Resultatene viste at E1 ga for alle hydrolysetider et høyere utbytte av proteinhydrolysat og fett, og lavere utbytte av sediment sammenlignet med E0. Hydrolysegraden økte over tid for begge enzymer og små forskjeller ble demonstrert, som kan indikere at redusert tilsatt vann hadde lite innflytelse på hydrolysegraden. Molekylfordelingen viste de mest fremtredene toppene hadde en molekylvekt lavere enn 2000Da og at E0 produserte peptider med lavere molekylvekt enn E1 uavhengig av vannforhold. Enzym og vannforhold viste liten innflytelse på proteininnholdet i proteinhydrolysatet som ble registrert til 87-90%. Sedimentinnholdet varierte mellom prøvene, med et proteininnhold på 46-57%, askeinnhold på 15-28%, vanninnhold på 1-13% og fettinnhold på 8-15%. Total proteingjenvinning fra restråstoff i PH og sediment varierte mellom 83% og 107%, med det høyeste utbyttet for E16060 (60 minutter, 60% vann) og det laveste for E06045 (60 minutter, 45% vann). Det uvanlig høye utbyttet for E16060 kan skyldes muligens overestimering av proteininnholdet på grunn av det høye kollageninnholdet i restråstoffet.

Fra resultatene ble de optimale betingelse for å oppnå størst mengde proteinhydrolysat, hydrolyse i 60 min, med enzym 1, 60% vann og 40% restråstoff. Imidlertid må dette vurderes opp mot de økonomiske konsekvensene, da det ikke ble observert en signifikant forskjell i proteinutbytte mellom hydrolyse med 60% og 45% vann. Økt vannmengde krever større reaktorvolum og medfører økte kostnader knyttet til nedstrøms prosessering, som inndamping eller tørking, for å fjerne overflødig vann og produsere et tørt produkt.

Abstract

This study investigates the utilization of chicken processing by-products through enzymatic hydrolysis to produce high-quality protein products. The background for the study lies in the increasing need for sustainable food production and improved utilization of animal by-products, particularly in the poultry industry, which is experiencing a growing demand and generates significant amounts of by-products. The study focuses on enzymatic hydrolysis as a method to break down proteins in chicken by-products using proteases, and investigates how different process conditions affect the yield and quality of the resulting products. Protein hydrolysates from chicken by-products have the potential to be used in various industrial applications, such as cosmetics, pharmaceuticals, animal feed, food ingredients, and nutritional supplements.

The study investigated enzymatic hydrolysis (EPH) of skin and bone fractions from chicken by-products (RRS). The aim was to assess how the amount of added water (45:55 and 60:40 water:RRS) and hydrolysis duration (15, 30, 45, and 60 minutes) affected the enzyme kinetics and the yield of fat, sediment, and protein hydrolysate of two commercial enzymes (E0 and E1).

The results showed that for all hydrolysis times, E1 resulted in a higher yield of protein hydrolysate and fat, and a lower yield of sediment compared to E0.

The degree of hydrolysis increased over time for both enzymes and small differences were demonstrated, which may indicate that reduced added water had little influence on the degree of hydrolysis. The molecular weight distribution showed that the most prominent peaks had a molecular weight lower than 2000 Da and that E0 produced peptides with a lower molecular weight than E1, regardless of the amount of water added. Enzyme and water conditions showed little influence on the protein content in the protein hydrolysate, which was recorded at 87-90%. The sediment content varied between samples, with a protein content of 46-57%, ash content of 15-28%, water content of 1-13%, and fat content of 8-15%. The total protein recovery from by-products in PH and sediment ranged between 83% and 107%, with the highest yield for E16060 (60 minutes, 60% water) and the lowest for E06045 (60 minutes, 45% water). The unusually high yield for E16060 may be because of the high collagen content in the by-product.

Based on the results, the optimal conditions to achieve the highest amount of protein hydrolysate are hydrolysis for 60 minutes, with enzyme 1, 60% water, and 40% by-products. However, this must be weighed against the economic consequences, as no significant difference in protein yield was observed between hydrolysis with 60% and 45% water. Increased water volume requires a larger reactor volume and entails increased costs associated with downstream processing, such as evaporation or drying, to remove excess water and produce a dry product.

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Industrien i Norge	1
1.2	Målet om et bærekraftig matsystem	1
1.3	Biprodukter	3
1.4	Restråstoff og animalske biprodukter	4
1.4.1	Kyllingrestråstoff	5
2	Proteinhydrolyse	7
2.1	Enzymatisk hydrolyse	7
2.2	Proteaser	9
2.3	Enzymkinetikk og regulering	10
2.3.1	Faktorer som påvirker enzymatisk hydrolyse	11
3	karakterisering av endeprodukter fra enzymatisk hydrolyse	13
3.1	Fett:	13
3.1.1	Emulsjon	14
3.2	Sediment:	14
4	Proteiner i kyllingråstoff	15
4.1	Proteiner:	15
4.1.1	Protein hydrolysat	15
4.1.2	Kollagen og gelatin:	16
5	Mål med studien	18
6	Materiale og metode	19
6.1	Kyllingrestråstoff	19
6.2	Enzymer	19
6.3	Enzymatisk hydrolyse	20
6.4	Bestemmelse av mengden vannløselig protein i hydrolysat	22
6.5	Total hydrolysegrad ved formoltitrering	23
6.6	Bestemmelse av tørrstoff og aske	23
6.7	Fettanalyse - (Bligh & Dyer)	24
6.8	C/N av frysetørket proteinhydrolysat og sediment	24
6.9	Molvektsfordeling	24
6.10	Statistiske analyser	24
7	Resultat og diskusjon	25
7.1	Massebalanse	27
7.2	Hydrolysegrad	31
7.3	Utbytte fett	33
7.4	Utbyttet sediment	35
7.4.1	Vått sediment	35
7.4.2	Tørekt sediment	37

7.4.3	Fett i sediment og fettgjenvinning	40
7.4.4	Mengden protein i sediment	41
7.4.5	Tørrstoff og aske i sediment	43
7.5	Utbytte proteinhydrolysat	44
7.5.1	Utbytte gel	48
7.6	Molvektsfordeling	51
7.7	Mengde vannløselig protein i proteinhydrolysat	54
7.8	Mengde protein i proteinhydrolysat	55
8	Konklusjon	57
9	Videre forskning	58
	References	i
A	Appendiks A	vi
A.1	Bestemmelse av konsentrasjon - Lowry	vi
A.2	Total hydrolysegrad	viii
A.3	Fettanalyse - Blich & Dyer	viii

1 Introduksjon

Verdens befolkning er i en stadig økning og er forventet å ha en kontinuerlig økning frem til 2050 (Aspevik mfl., 2017). Behovet for mer mat rik på verdifulle næringsstoffer blir større og øker i takt med befolkningsveksten. Kjøtt er en viktig kilde til en rekke energigivende og ikke energigivende næringsstoffer som vitamin b12 og protein. Samtidig som det anslås at kjøttkonsumet vil øke og særlig fra fjørfe. Er det en bred enighet om at produksjon av kjøtt krever store mengder ressurser og setter miljøavtrykk (Rotz, 2020, Ritchie mfl., 2022). I tillegg etterspør forbrukere en hvis kvalitet på kjøttet, som gjør at omtrent 40-60% av den totale vekten til dyret ender opp som restråstoff. (Aspevik mfl., 2017) Et viktig spørsmål blir så hva kan vi gjøre for å skape mindre miljøavtrykk i kjøttindustrien? Dette spørsmålet har mange potensielle svar, noen vil handle om å redusere inntaket, gjennom for eksempel statlige kostråd (Helsedirektoratet, 2016), andre svar finner vi muligens i genteknologien. Denne studien utforsker mulighetene rundt å optimalisere enzymatisk proteinhydrolyse, en langsiktig og bærekraftig prosess for å løse underutnyttelsen av kyllingrestråstoff mot en mer bærekraftig matproduksjon.

1.1 Industrien i Norge

Norske kjøttvaner har gjennomgått en betydelig forandring de siste tiårene. Mens svin lenge var den dominerende kjøttkilden, har fjørfe opplevd en kraftig økning i popularitet. Mellom år 2000 og 2010 steg fjørfekonsumet markant, og i 2020 ble fjørfe det nest mest konsumerte kjøttet i Norge, kun bak svin, men foran storfe. I 2022 ble det slaktet over 114 000 tonn fjørfe i Norge, en økning på 17,6% siden 2018 (dette inkluderer ikke gjess, høns og haner) (Animalia, 2023). Samtidig er behovet for norskprodusert protein til både mat og fôr stort. I 2022 utgjorde norske proteinråvarer i husdyrfôr kun 6,5%. De siste årene har Norge importert mellom 35 000 og 40 000 tonn protein til kraftfôr (Animalia, 2023). For å sikre en bærekraftig matproduksjon i fremtiden, kreves en mer effektiv utnyttelse av eksisterende proteinkilder (Aspevik mfl., 2017). Tallene viser det store proteinbehovet både nasjonalt, men også globalt, og hvordan kyllingindustrien vil spille en viktig rolle for å dekke dette behovet.

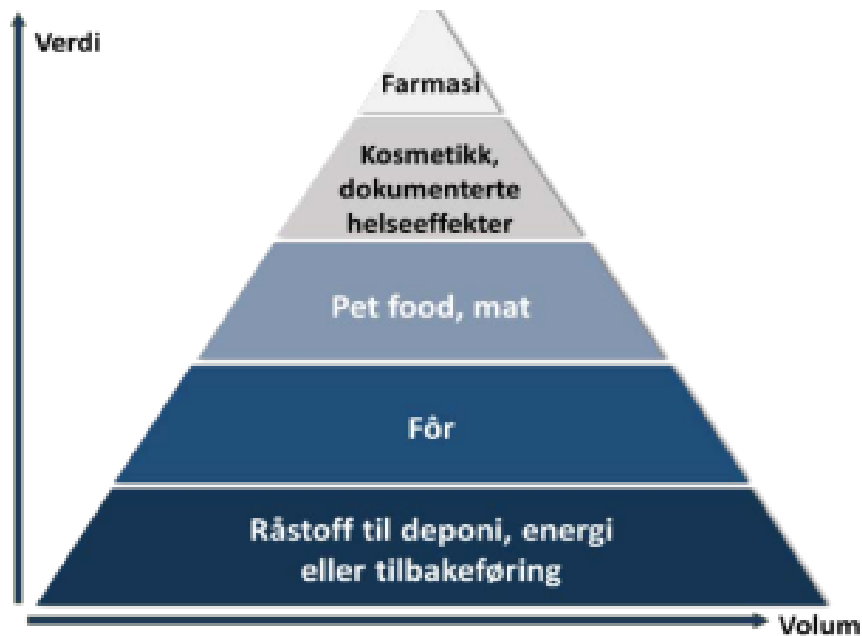
1.2 Målet om et bærekraftig matsystem

Matproduksjon legger beslag på store ressurser og har en betydelig miljøpåvirkning. Derfor er det avgjørende å minimere mengden mat som går tapt. For å oppnå et bærekraftig matsystem må vi redusere matsvinn gjennom hele verdikjeden – fra jord til bord. Dette krever en helhetlig tilnærming. Bønder og produsenter kan optimalisere produksjonen og forbedre logistikken, mens butikker kan implementere smartere innkjøpsrutiner og prisstrategier. Forbrukere spiller også en nøkkelrolle ved å planlegge måltider, oppbevare mat riktig og utnytte rester på kreative måter. Myndighetene må legge til rette for samarbeid og innovasjon gjennom målrettede reguleringer og støtteordninger. Å redusere matavfall er et felles ansvar. Sammen kan vi skape et mer bærekraftig matsystem som ivaretar både miljøet og ressursene våre (Lindberg mfl., 2016).

Regjeringens politikk for sirkulær økonomi i Norge er rettet mot bærekraftig, effektiv og

lønnsom produksjon, utvinning og bruk av fornybare, biologiske ressurser til mat, fôr, ingredienser, helseprodukter, energi, materialer, kjemikalier, papir, tekstiler og en rekke andre produkter (Regjeringen.no, 2021). Denne definisjonen understreker viktigheten av å anvende fornybar biomasse, som omfatter ethvert biologisk materiale, enten som produkt i seg selv eller som råmateriale for videre anvendelser. For å støtte en mer bærekraftig fremtid, er det nødvendig å gå fra et bruk-og-kastsamfunn til et samfunn fokusert på reduksjon, gjenbruk og gjenvinning. Dette krever en systematisk endring i hvordan vi produserer, konsumerer og resirkulerer ressurser, i tråd med prinsippene om sirkulær økonomi (Lindberg mfl., 2016).

I 2023 publiserte Animalia oppdaterte data om andelen spiselig slaktvekt for fjørfe. Disse dataene viser en betydelig økning i den spiselige andelen sammenlignet med tidligere estimater (Animalia, 2023). Muligens skyldes økningen at vi har utviklet metoder som gjør at vi kan ta det i bruk i kosmetikk, farmasi. Samtidig har Norsk Kylling rapporterer at de nå utnytter omtrent 80% av kyllingen til humant konsum (Norsk Kylling, personlig kommunikasjon, 24.11.2023), noe som resulterer i at kun 20% klassifiseres som restråstoff. I til artikkelen Mozhiarasi og Natarajan (2022) er det estimert at rundt 68-72% av hver kylling, og 78% av hver kalkun brukes til konsum og resterende betegnes som matsvinn (Matsvinn = mat som går tapt i produksjonskjeden, Matavfall = mat som kastes av konsumer). Effektiv utnyttelse av ressurser er et nøkkelprikk i en sirkulær bioøkonomi. Målet med en slik modell er å maksimere gjenvinning av restprodukter og dermed redusere matsvinn. I en ideell sirkulær bioøkonomi kan alle restprodukter transformeres til produkter med høy verdi. Lindberg mfl. (2016) sin figur 1.1 illustrere dette, hvor høy verdiprodukter brukes til farmasi, kosmetikk, fôr til dyr og til menneskelig konsum (Lindberg mfl., 2016).



Figur 1.1: Verdi- og volumpyramiden for restråstoff-produkter illustrerer hvordan ulike bruksområder for restråstoff kan optimeres for å maksimere verdi eller volum, avhengig av industriens behov og markedsforhold. På toppen av pyramiden finner vi høyverdige produkter med lavt volum. Disse produktene krever ofte avanserte prosesser og spesialiserte markeder, men gir betydelig økonomisk gevinst per enhet. Midtnivået av pyramiden representerer produkter med moderat verdi og volum. Disse produktene er mer allsidige og kan brukes i et bredere spekter av applikasjoner. Bunnen av pyramiden representerer produkter med høyt volum og lav verdi. Disse produktene krever ofte mindre bearbeiding, men har lavere verdien per enhet. Figuren er hentet fra Lindberg mfl., 2016

1.3 Biprodukter

Klassifisering av animalske biprodukter er avgjørende for å sikre sikker og bærekraftig håndtering av disse produktene. Ved å kategorisere animalske biprodukter basert på potensiell risiko kan vi minimere farene for husdyr, mennesker og miljøet. Regelverket stiller strenge krav til håndtering av animalske biprodukter, inkludert behandling, hygieniske håndteringsrutiner og registrering og sporing. Ved å følge disse kravene kan vi sikre at animalske biprodukter utnyttes på en bærekraftig måte og at risikoen for negative effekter minimeres (Lindberg mfl., 2016, Adler og Løes, 2018).

Kategori 1

Råmaterialer og biprodukter fra dyr, klassifisert som kategori 1. Kategorien representerer den høyeste risiko. Dette gjelder for materialer som kan bære alvorlige sykdommer. Materiale i kategori 1 kan ikke brukes og må destrueres enten ved forbrenning eller ved deponi (Adler og Løes, 2018, Lindberg mfl., 2016).

Kategori 2

Kategori 2-materiale omfatter animalske biprodukter som anses for å ha en høy risiko, men som ikke krever like strenge destruksjonsmetoder som kategori 1. Disse materialene

representerer en viss smitterisiko, men regnes ikke som direkte farlige som de i kategori 1. Disse materialene kan anvendes i produksjon av biogass, kompost, eller som gjødsel (Adler og Løes, 2018, Lindberg mfl., 2016).

Kategori 3

Kategori 3-materiale omfatter rester fra næringsmiddelindustrien, som er egnet for humant konsum gitt at hygienekravene er oppfylt. Disse restråstoffene kommer typisk fra slakterier, meierier, restauranter og matbutikker. Siden disse restene anses som trygge for mennesker, har de et lavere risikonivå sammenlignet med kategori en og to, og kan derfor anvendes mer fleksibelt. For eksempel kan slikt matsvinn brukes til dyrefôr, bortsett fra avfall fra restauranter og storkjøkken, som grunnet høyere risiko for kontaminasjon ikke kan brukes til fôring av husdyr (Adler og Løes, 2018, Lindberg mfl., 2016).

1.4 Restråstoff og animalske biprodukter

Detaljert karakterisering av råvarer er en nøkkelfaktor for å optimalisere enzymatiske hydrolyseprosesser og oppnå høy kvalitet på sluttproduktet. Ved å forstå de kjemiske, fysiske og ernæringsmessige egenskapene til råvaren, hvordan den har blitt behandlet og hvilke egenskaper det endelige produktet skal ha, kan man designe en forutsigbar og skreddersydd prosessinfrastruktur. Dette muliggjør et forbedret produktutbytte, økt økonomisk effektivitet og en mer bærekraftig produksjon (Lindberg mfl., 2021a, Sajib mfl., 2020, Bui mfl., 2021).

Restprodukter er materialer som ikke er det primære målet med en produksjonsprosess, men som oppstår som et biprodukt. De kan klassifiseres som enten avfall eller ikke-avfall, avhengig av lokale forskrifter og bruksområder. Eksempler på restprodukter inkluderer skall fra reker, sagflis fra treindustri og overskuddsjord fra byggeplasser. Bærekraftig håndtering av restprodukter er viktig for å minimere miljøpåvirkningen og skape verdier gjennom gjenvinning, foredling eller andre bruksområder.

Animalske biprodukter er produkter som stammer fra dyr i matproduksjon, men som ikke er beregnet til konsum. En bærekraftig håndtering av animalske biprodukter er avgjørende for å minimere avfall og fremme en sirkulær økonomi (Lindberg mfl., 2016).

Restråstoff fra landbruk, som oppstår etter slakting og bearbeiding av husdyr, representerer en betydelig ubenyttet ressurs med stort potensial for verdiskapning. Disse restråstoffene, også kalt biprodukter, inkluderer bein, skinn, fjær, hover, horn, vingspisser, skrotter, hoder, hår, innvoller, organer, blod, føtter, mage- og tarminnhold. De er rike på næringsstoffer og kan omdannes til verdifulle produkter med et bredt spekter av bruksområder (Alao mfl., 2017, Aspevik mfl., 2017, Seong mfl., 2015, Adhikari mfl., 2018, Mozhiarasi og Natarajan, 2022).

Restråstoff fra husdyr, som oppstår etter slakting og bearbeiding, utgjør en betydelig ressurs med stort potensiale for verdiskapning. Til tross for at disse restråstoffene ofte brukes i produkter som har lav verdi, er det et stort marked for produkter med høy verdi laget av disse materialene. Litteraturen viser at det stadig dukker opp nye og mer bærekraftige bruksområder for disse ressursene. En av de største utfordringene med å

utnytte restråstoff fra husdyr er den store variabiliteten og kompleksiteten. Dette stammer fra en blanding av slaktedeler, prosesseringsbetingelser og variasjoner i næringsinnhold mellom ulike restprodukter (Mozhiarasi og Natarajan, 2022). Denne kompleksiteten understreker behovet for kontinuerlig forskning og dypere forståelse av råvareinteraksjoner og hvordan prosesseringsbetingelser påvirker sluttproduktets funksjonalitet. For å realisere det fulle potensialet til restråstoff fra husdyr, er kontinuerlig forskning på dette feltet essensielt. Forskning kan bidra til å utvide vår kunnskapsbase om råvareinteraksjoner og prosesseringsbetingelser, utvikle effektive og bærekraftige metoder for å omdanne restråstoff til høyverdi produkter, og identifisere nye bruksområder for restråstoffene (Chiodza og Goosen, 2023, Seong mfl., 2015).

1.4.1 Kyllingrestråstoff

Fjørfeindustrien genererer betydelige mengder biprodukter og restråstoff, hvorav det kan betraktes som matsvinn,. Disse restene inkluderer fjær, skinn, nebb, bein, skrotter, føtter, vinge tipper, hode, blod og innvoller. De er rike på næringsstoffer og kan bearbeides til en rekke produkter med et bredt spekter av bruksområder (Lasekan mfl., 2013). Tidligere studier har vist at slakteavfall fra fjørfe inneholder ca. 34,2% tørrstoff, som igjen inneholder 51,8% råprotein, 41,0% fett og 6,3% aske (Abedinia mfl., 2020). Helgeland-Rossavik (2021) utførte en detaljert analyse av næringsinnholdet i ulike fraksjoner av kyllingrester etter prosessering. Studien undersøkte protein-, aske-, tørrstoff- og lipidandelene i hode, lårben, fot, innvoller, øvre del av rygg, nedre del av rygg, nakke, bryst-kadaver, vingspiss, ønskeben og skinn. Funnene er presentert i tabell 1.1.

En studie av Seong mfl. (2015) undersøkte næringsinnholdet i ulike kyllingbiprodukter, inkludert hjerte, lever, lunge og deler av fordøyelseskanalen. Resultatene viste et bredt spekter av næringsinnhold, med lever og krås som hadde det høyeste proteininnholdet. Leveren inneholdt også betydelig høyere nivåer av vitamin A og B-vitaminer (B1, B2, B3, B5 og B6) sammenlignet med andre biprodukter. Fettsyresammensetningen varierte også betydelig mellom biproduktene, med forskjellige nivåer av SFA, UFA og PUFA. I tillegg inneholdt kyllingbiprodukter, spesielt leveren, høyere nivåer av sporstoffer som jern (Fe), mangan (Mn) og sink (Zn) sammenlignet med muskelvev.

Tabell 1.1: Prosentandelen av protein, aske, tørrstoff og lipid i hver fraksjon i 11 ulike fraksjoner av kyllingråstoff: hode, lårben, fot, innvoller, øvre del av rygg, nedre del av rygg, nakke, brystkadaver, vingespiss, ønskeben og skinn. Tabellen er hentet fra Helgeland-Rossavik (2021)

Fraksjon	% Protein	% Aske	% Tørrstoff	% Fett
Hode	16,2	4,1	30,6	7,6
Lårben	16,7	9,4	39,0	11,7
Føtter	21,0	6,1	38,8	26,8
Innvoller	11,7	0,9	36,0	21,3
Øvre rygg	17,44	4,8	38,2	17,1
Nedrerygg	13,7	5,1	44,9	26,7
Nakke	12,5	3,1	39,4	22,8
Bryst-kadaver	19,1	6,1	35,3	4,8
Vingespiss	15,2	5,6	41,4	27,2
Ønskeben	20,5	2,7	36,3	14,2
skinn	9,7	0,4	49,7	62,8

Ulike kroppsdeler av fjørfe har forskjellige egenskaper, både når det gjelder næringsinnhold og struktur. For eksempel inneholder bein mer mineraler, mens skinn og fett inneholder mer lipider. Mengden av gjenværende kjøtt, skinn og fett i slaktdelene varierer avhengig av slaktemetode og trimmingsnivå (Schmidt mfl., 2020; Hou mfl., 2017; . Zhang mfl., 2023a). Alder, type kylling, rase og fôring er faktorer hos fjørfe som kan påvirke sammensetningen av restråstoffet. For eksempel kan eldre dyr ha lavere proteininnhold og mer fett i slaktkroppen (Abedinia mfl., 2020, Adler og Løes, 2018).

Å finne kombinasjoner av proteaser som effektivt hydrolyser restråstoff og samtidig produsere gjentakende produkter av samme kvalitet er utfordrende (Lindberg mfl., 2021a). For å hindre tap av sensoriske kvaliteter som smak, aroma og tekstur er det ønskelig å kunne karakterisere råstoffsammensetningen, slik at det blir enklere å produsere produkter gjentakende og forutsigbar kvalitet (Aspevik mfl., 2017).

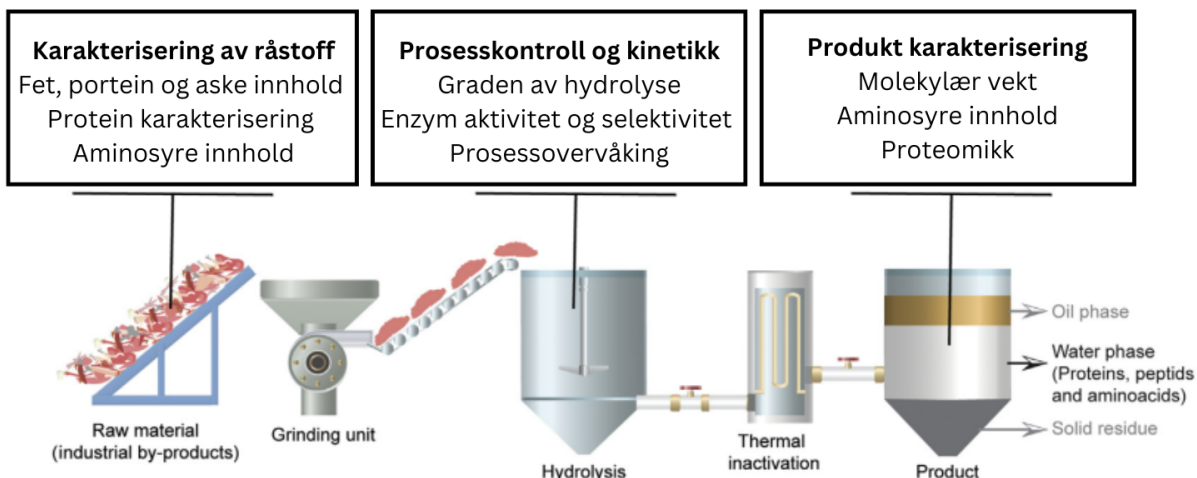
På grunn av det store volumet av restråstoff som blir produsert av den globale fjørfeindustrien og utnyttelsespotensialet som beskrevet, er det en stadig økende interesse for å forbedre utnyttelsen og forbedre effektiviteten av bærekraftige metoder for å gi råstoffet en høyere verdi. (Tavano, 2013). I denne studien utforskes enzymatisk hydrolyse som anses som en lovende metode for å utnytte restråstoff fra fjørfe til produkter med høyverdige produkter med funksjonelle og næringsrike egenskaper. Enzymatisk hydrolyse kan i mange tilfeller danne optimaliserte endeprodukter som kan brukes som tilleggskilde i mat. Videre har disse endeproduktene potensiale anvendelser innen farmasøytisk industri og helsevesen, noe som ytterligere kan øke verdien (Tavano, 2013).

2 Proteinhydrolyse

Flere industrielle teknologier blir anvendt for å utnytte biprodukter, inkludert kverning, rendering (koking under høyt trykk), fermentering, kjemisk hydrolyse og ensilasjeprosessen. Proteinutvinning fra vev fraksjoner kan ikke gå til humant konsum og er en nøkkelkomponent i gjenvinningen av slakteriavfall, men utfordringen ligger i at proteinet i vevet løses dårlig opp i vann. Vanligvis løses dette ved å løse opp proteinet i et vandig medium ved hjelp av varme, kjemikalier, og enzymer, eller en kombinasjon av disse. (Adler og Løes, 2018, Adhikari mfl., 2018). Kjemisk hydrolyse er en metode som er vanlig å bruke i industrielle sammenhenger. Høy temperatur eller et høyt trykk sammen med syre eller alkaliske reaktanter brukes for å hydrolyser proteiner til peptider og aminosyrer (Kristinsson og Rasco, 2000). Hovedmålet med proteinhydrolyse er å oppnå høyest mulig utbytte av verdifulle komponenter fra restrå materialet samtidig som kvaliteten på komponentene opprettholdes (Šližytė mfl., 2005). I de senere årene har enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) blitt stadig mer anerkjent som en fleksibel og effektiv teknologi sammenlignet med tidligere metoder. Sammenlignet med kjemisk hydrolyse som er en mer ekstrem prosess med høyt trykk og temperatur, er EPH, en mild bioteknologisk prosess, som gir høye utbytter av produkter uten å forringe den ernæringsmessige kvaliteten. Prosessen benytter seg av proteaser sine katalytiske egenskaper til å frigjøre peptider ved å spalte peptidbindinger i proteinet. Bruken av protaser tillater mer skånsomme driftsforhold og tillater en mer kontrollert tilnærming for å tilpasse prosessene slik at sluttproduktet ender med de rette funksjonelle egenskapene, samtidig som unngår bruk av giftige kjemikalier og dannelse av giftige biprodukter. (Aspevik mfl., 2017). .

2.1 Enzymatisk hydrolyse

Den generelle utformingen av et EPH-prosessanlegg består av flere trinn som illustrert i figur 2.1. Første steg er en forbehandling hvor det brukes ulike typer behandlingsmetoder avhengig av biproduktet. For EPH brukes det en hydrolysereaktor som kan kjøres som en batch eller i kontinuerlig modus. Det homogeniserte biproduktet suspenderes i en passende mengde vann, og etter justering av behandlingsbetingelsene (temperatur, pH, ect) tilsettes en valgt protease for å initiere hydrolysen. I noen systemer / prosesser justeres pH til optimal pH for proteasene. Etersom det brukes varmestabil proteaser kjøres prosessene ofte ved 50-60°C (Tavano, 2013 , Pasupuleti og Braun, 2010 Adler-Nissen, 1986 Lindberg mfl., 2021a). Etter riktig hydrolysetid overføres reaksjonsblandingen til protease deaktivering (vanligvis termisk deaktivering). I sluttfasen utføres ulike nedstrømsoperasjoner og prosesseringstrinn. Disse inkluderer faseparasjon (sentrifugering og fjerning av supernatant), ultrafiltrering, avsalting og tørking (eksempel spray eller frysetørking). Disse prosessene er avgjørende for å produsere proteinhydrolysater som oppfyller de ønskede kvalitetsstandardene. (Wubshet mfl., 2019, Etemadian mfl., 2021)



Figur 2.1: Skjematisk oversikt over hovedtrinnene i enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) av industrielle biprodukter. Inkludert er en oppsummering av viktige analytiske faktorer som vurderes på forskjellige punkter i prosessen. Figuren er hentet fra Wubshet mfl., 2018

Enzymatisk hydrolyse er en prosess som utnytter enzymer, enten de er naturlige (endogene) eller tilført (kommersielle proteaser), for å bryte ned proteinene i råvaren til peptider (Adler-Nissen, 1986). Denne prosessen, illustrert i figur 2.1, resulterer i tre hovedfraksjoner: fett/lipidfasen, proteinhydrolysat (vannfase) og sediment (fastfase), i tillegg dannes det en mindre emulsjonsfase. Vannfasen, også kjent som proteinhydrolysat (PH), er den mest verdifulle fraksjonen på grunn av dens høye innhold av protein, peptider og aminosyrer. Målet ved enzymatisk hydrolyse er derfor å maksimere konsentrasjonen av proteiner og peptider i vannfasen, samtidig som løselige proteiner i den faste fasen minimeres. (Tavano, 2013, Petrova mfl., 2018, Hou mfl., 2017, Zhang mfl., 2023b, Chiodza og Goosen, 2023).

Enzymatisk hydrolyse gir en rekke fordeler for utnyttelse av fjørferestråstoff. Ved å bryte ned proteiner til mindre molekyler, frigjør enzymatisk hydrolyse verdifullt proteininnhold som ellers ville være utilgjengelig (Aspevik mfl., 2017, Zhang mfl., 2023a.) Dette proteinhydrolysatet kan brukes i en rekke applikasjoner, inkludert mat- og fôrindustrien, farmasøytisk industri, og kosmetikkindustrien. Enzymatisk hydrolyse kan modifisere proteinstrukturer, noe som gir forbedrede funksjonelle egenskaper, som emulgerende, skumdannende og gellingsegenskaper (Zhang mfl., 2023a, Rivas-Vela mfl., 2021) Zhou mfl., 2023).

Kvaliteten og typen råvare spiller en avgjørende rolle i enzymatisk hydrolyse (Zhang mfl., 2023b). Den kjemiske sammensetningen av råstoffet har en stor innflytelse på hydrolyseprosessen. Råvarens sammensetning kan påvirke hydrolysehastigheten og utvinningsgraden av proteiner. For å optimalisere enzymatisk hydrolyse og oppnå maksimal proteinutvinning, er det avgjørende å kontrollere prosessbetingelsene. Temperatur, pH, hydrolysetid og enzymkonsentrasjon er parametere som kan påvirke hydrolysehastigheten, proteinutvinningen og produktkvaliteten (Chiodza og Goosen, 2023, Kristoffersen mfl., 2022, Hjellnes mfl., 2020).

2.2 Proteaser

Ved bruk av kommersielle enzymer i enzymatisk hydrolyse, finnes det et mangfold av protease varianter fra dyr, planter og mikroorganismer. Valget av enzym er viktig for å oppnå ønskede resultater, da dette direkte påvirker utbyttet av de forskjellige fraksjonene som genereres under hydrolyseprosessen (Neklyudov mfl., 2000, Petrova mfl., 2018, Lindberg mfl., 2021a). Uansett om valget faller på endogene enzymer (autolyse) eller tilsatte kommersielle proteaser (eller begge), brytes proteinene i råvaren ned til vannløselige peptider. Disse peptidene danner proteinhydrolysatet, som er hovedproduktet i enzymatisk hydrolyse (Adler-Nissen, 1986).

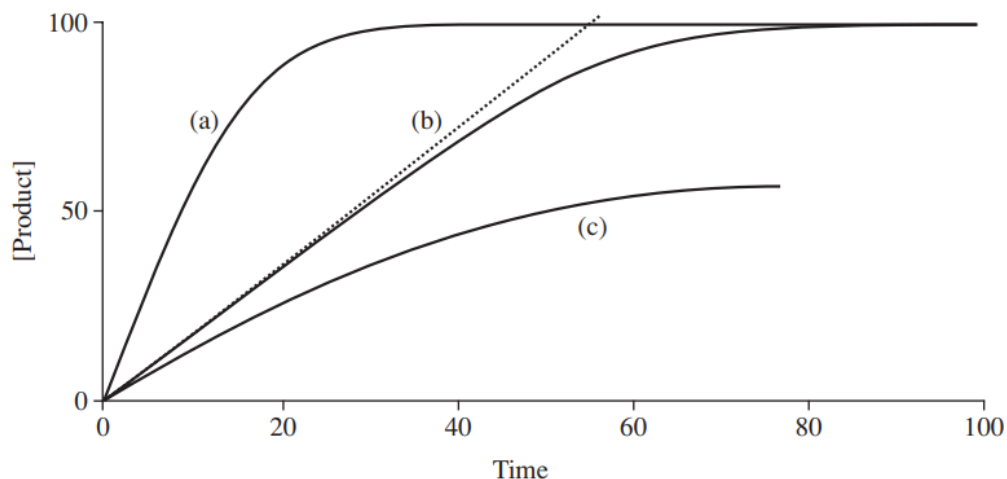
Kinetikken i enzymatisk proteinhydrolyse av fjørferestråstoff påvirkes av flere faktorer, inkludert de spesifikke egenskapene til de benyttede proteasene. Produksjon av peptider og aminosyrer fra restråstoff ved bruk av enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) involverer vanligvis kommersielle proteaser. Disse proteasene er ofte tilgjengelige enten som enkeltstående enzymer eller mer vanlig som en blanding/cocktail. Eksempler på kommersielle proteaser er Alcalase, Papin og Bromelain, Promod og Endocut (Merz mfl., 2016). Disse proteasene kan virke på to forskjellige måter, de kan være endoproteaser eller eksoproteaser. Endoproteaser spalter peptidbindinger i selve polypeptidkjeden, mens eksoproteaser fokuserer på de terminale delene av polypeptidkjeden. I EPH virker proteasene med at de først angriper de mest tilgjengelige peptidbindingene i proteinet. Proteinets struktur er i mange tilfeller foldet til stabile globulære strukturer. De mest tilgjengelige peptidbindingene på overflaten av proteinet brytes først, dette fører til en gradvis nedbrytning av proteinets struktur og proteinet foldes ut. Dette medfører at flere peptidbindinger blir tilgjengelige for videre nedbrytning. Hastigheten på proteinets utfolding under hydrolyseprosessen har en betydelig innflytelse på reaksjonshastigheten. Rask utfolding fører til flere tilgjengelige peptidbindinger for spalting og dette øker hydrolysehastigheten. (Vorob'ev og Kochetkov, 2016, Wubshet mfl., 2019, Adler-Nissen, 1976 Archer mfl., 1973).

Ved EPH av komplekse substrater, som animalske biprodukter, er det generelt foretrukket å bruke proteaser med lavere spesifisitet. Dette skyldes at de ofte kan gi et bredere produktutbytte sammenlignet med proteaser med høy selektivitet. I tilfeller hvor målet er å utvikle EPH-prosesser fokusert på et spesifikt peptid, for eksempel peptid med bioaktivitet, kan det være gunstig å velge en protease med høyere spesifisitet for å sikre presis og målrettet spalting (Wubshet mfl., 2019). Slizyte mfl. (2016) studerte molekylervektfordelingen til proteinhydrolysater fra lakseryggrad produsert ved hjelp av syv forskjellige kommersielle proteaser. Studien viser at avhengig av valg av protease, kan tre typer hydrolyseprodukter med forskjellig molekylvekt oppnås. Andre studier har også kommet frem til at valget mellom en enkelt protease eller en blanding av protease påvirker hydrolyseprosessen spesifisitet, produktutbyttet og hydrolysegraden. (Wubshet mfl., 2019) Lindberg mfl., 2021a Bui mfl., 2021).

Valg av protease er en kritisk faktor i enzymatisk proteinhydrolyse av fjørferestråstoff. Ved å ta hensyn til substratets kompleksitet, ønsket produktutbytte og spesifikke peptider av interesse, kan man velge de optimale proteasene for å oppnå maksimal proteinutvinning, funksjonelle proteinhydrolysater og en effektiv og bærekraftig hydrolyseprosess.

2.3 Enzymkinetikk og regulering

I enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) er det avgjørende å kunne regulere prosesseringen av biprodukter effektivt. I organismer er proteaser nøye regulert, og mange av disse reguleringsteknikkene kan også anvendes i EPH for å styre prosessen på en optimal måte. Overvåking av reaksjonskinetikken er essensielt for å forstå hvordan ulike faktorer påvirker reaksjonshastigheten (Wubshet mfl., 2019, Wang mfl., 2018). En typisk reaksjonskurve for EPH starter med en lineær fase der enzymaktiviteten er høy, etterfulgt av en utflating og nedgang i reaksjonsraten som et resultat av at substratet gradvis blir oppbrukt. Dette er illustrert som linje A og B i figur 2.2. Denne kurven er nært knyttet til graden av hydrolyse, som er et mål på hvor mye substrat som har blitt konvertert til produkt. . Høyere reaksjonshastighet vil føre til en raskere økning i hydrolysegraden over tid. Omvendt vil en lavere reaksjonshastighet resultere i en langsommere økning i hydrolysegraden (Zhang mfl., 2023b, dos Santos Aguilar mfl., 2020) . Avvik fra en normalreaksjonskurve kan indikere problemer under prosessen og tyder på at forholdene ikke er optimale. . Et slik avvik fra en normalreaksjonskurve kan ses som linje C i figur 2.2. EPH forhold som ikke er optimale kan påvirke kvaliteten på det endelige produktet, inkludert molekylvektfordelingen, aminosyresammensetningen og det totale utbyttet (Wubshet mfl., 2019). Studier har vist at reaksjonshastigheten ikke kun avhenger av substratforbruket, men også av flere parallelt påvirkende faktorer som gjør det utfordrende å oppnå fullstendig nedbrytning av substratet og maksimalt produktutbytte (Wubshet mfl., 2019, Sajib mfl., 2020).



Figur 2.2: Progresjonskurver for enzymkatalyserte reaksjoner. I kurvene (A) og (B), observeres en nedgang i reaksjonshastigheten etter hvert som substratet gradvis blir oppbrukt. Begge kurvene representerer scenarier med samme substratkonsentrasjon. I begge tilfeller oppnås en total produktkonsentrasjon på 100, men ved varierende hastigheter. I kurve (C) brukes samme substratkonsentrasjon som i (A) og (B), men her er enzymet ustabil og mister aktivitet over tid. Dette fører til en markant tregere reaksjonsrate og ufullstendig konvertering til produkt fordi enzymet inaktiveres før alt substrat kan konverteres. Figuren er hentet fra Tipton, 1992

2.3.1 Faktorer som påvirker enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) er en viktig bioteknologisk prosess med et bredt spekter av anvendelser innen matindustri, farmasøytisk industri og til og med bioremediering. I denne komplekse prosessen brytes proteiner ned til mindre peptider og aminosyrer ved hjelp av proteaser. Effektiviteten av EPH avhenger av en rekke faktorer som kan kategoriseres i tre hovedgrupper: prosess-spesifikke, substratspesifikke og proteasespesifikke faktorer (Wubshet mfl., 2019, Sajib mfl., 2020).

Prosess-spesifikke faktorer inkluderer parametere som substratkonsentrasjon, forholdet mellom enzym og substrat, hydrolysetid, temperatur, blandingshastighet og pH-nivåer. Disse faktorene styrer reaksjonshastigheten, utbyttet og produktprofilen. Optimalisering av disse faktorene er avgjørende for å oppnå maksimal hydrolysegrad og ønskede funksjonelle egenskaper av hydrolysater (Wubshet mfl., 2019, Bui mfl., 2021, Syed og Erumalla, 2020, Butré mfl., 2014, Sajib mfl., 2020).

Substratspesifikke faktorer inkluderer råstoffets opprinnelse, alder, dyrets fôringsregime og den generelle sammensetningen av råstoffet. Disse faktorene påvirker strukturen til proteinet og aminosyresammensetning, noe som igjen kan påvirke hydrolysehastigheten og utbyttet (Wubshet mfl., 2019). For eksempel kan proteiner fra forskjellige arter ha forskjellige strukturelle egenskaper som krever forskjellige hydrolyseforhold for optimal nedbrytning (Mozhiarasi og Natarajan, 2022, Zhou mfl., 2023).

Proteasespesifikke faktorer inkluderer enzymets spesifisitet, stabilitet og følsomhet for inhibitorer. Enzymets spesifisitet bestemmer hvilke typer peptidbindinger som kan spaltes, mens stabiliteten påvirker enzymets aktivitet under prosessforholdene (Wubshet mfl., 2019). Følsomhet for inhibitorer kan hemme enzymaktiviteten. Valg av riktig protease med passende egenskaper er avgjørende for effektiv EPH (Lindberg mfl., 2021a).

De vanligste årsakene til at maksimal teoretisk substratnedbrytning ofte ikke oppnås, inkluderer naturlig nedbrytning av proteasene eller autolyse, substrat- og produkthemming og begrenset substrattilgjengelighet (Wubshet mfl., 2019). For å sørge for en stor tilgjengelighet av substratproteiner spiller vann/faststoff-konsentrasjon, blanding og kverning en viktig rolle i EPH. De neste avsnittene går dypere i teorien på hvordan disse faktorene påvirker hydrolyseprosessen.

Kverning:

Kverning av råmaterialer er en grunnleggende prosess i EPH. Den øker det totale eksponerte overflatearealet av substratene ved å redusere dem til mindre partikkelstørrelser. Utvidede overflateområder eksponerer et høyere antall potensielle peptidbindinger i substratet for proteolytisk nedbrytning, noe som fører til økt hydrolyseaktivitet (Jung mfl., 2018).

Vann:

Såvidt jeg vet er hvordan mengden vann i forhold til resråstoff lite studert for kyllingrestråstoff. Studier på marint restråstoff som torsk, sardiner og lakseskrog har blitt undersøkt (Chiodza og Goosen, 2023, Valencia mfl., 2021, Slizyte mfl., 2004). Diverse studiene viser at reduksjon av tilsatt mengden vann påvirker EPH. I studien Valencia mfl.

(2021) ble 50/50, 25/75 og 0/100 vann:råstoff studert. Råstoffet bestod av laskeskrog og det ble vist at prosentandelen gjenvunnet nitrogen ble mindre når mindre vann var tilsatt og at det faktiske utbyttet av nitrogen ble mindre. Studien viste at høyere Vann/SF ratio (mindre vann tilsatt) ga mindre produktive hydrolyser. Studien viser også at mindre vann promoterer dannelse av peptider med høyere molekylvekt enn hydrolyse med mye vann tilsatt. Resultatene av denne studien er i overensstemmelse med resultatene i Chiodza og Goosen (2023). Denne omfattende studien undersøkte effekten av blandehastighet (rpm), faststoff-konsentrasjon (% våtvekt) og enzymdosering (% v/w tørt protein) på hydrolysegrad, totalt tørrstoffutbytte, proteingjenvinning, proteintap til emulsjon og protein som er igjen i slammet etter separering ved sentrifugering. Råstoffet brukt i studien var avskjær fra sardiner. Studien viste at faststoff-konsentrasjon fra 26% til 42% reduserer utbytte, men at faststoff-konsentrasjon fra 42% til 50% økte utbytte minimalt, og utbytte over 70% kun var oppnåelig ved faststoff-konsentrasjon under 30%. Studien påpekte at disse resultatene var i tråd med tidligere arbeid der lave substratkonsentrasjoner resulterte i høyere utbytter for enzymassisterte reaksjoner (Chiodza og Goosen, 2023)

Hvordan mengden vann tilsatt i hydrolysen påvirker graden av hydrolyse (DH) ble undersøkt av Chiodza og Goosen (2023). Valencia mfl. (2021) fant at DH ble påvirket av mindre vann tilsatt. Lavere DH ble oppnådd for hydrolyser med lite vann (0:100 og 25:75) sammenlignet med hydrolyse med mye vann (50:50). Chiodza og Goosen (2023) har vist at blandingshastighet, faststoff-konsentrasjon og enzymdosering alle hadde enkeltvis en statistisk signifikant effekt på DH og at samspillet mellom blandingshastighet og faststoff-konsentrasjon var statistisk signifikant med positiv effekt. En mulig årsak til den reduserte DH ved høy faststoff-konsentrasjon er at hydrolyseproduktene kan inhibere enzymaktivitet (Valencia mfl., 2014). I kontrast til dette fant Slizyte mfl. (2004) at DH ikke ble signifikant påvirket av mindre tilsatt vann ved hydrolyse av biprodukter fra torsk og kjørt med 1:0,75 råmateriale:tilsatt vann.

Blandingshastighet

I Chiodza og Goosen (2023) ble det undersøkt hvor mye protein som gikk tapt til emulsjon og slam. Proteintap til emulsjon varierte fra 1,52 til 15,5 %, på tørr basis. Studien kom frem til at blandingshastighet og lav faststoff-konsentrasjon hadde en effekt på hvor mye protein som gikk tapt til emulsjon. Dette forklares i studien med at emulsjonsdannelse krever mekanisk energi, på samme måte slik som majones dannes. I tillegg påpeker studien at hydrolyserte proteiner har høy emulsjonsaktivitet, emulsjonskapasitet og emulsjonsstabilitet. Det hydrolyserte proteinet kan fungere som overflateaktivt middel som stabiliserer emulsjonen. Studien viste også at det var en sammenheng mellom økende faststoff-konsentrasjon og enzymdosering ved konstant blandehastighet for hvor mye protein som gikk tapt til emulsjon. Høyere faststoff-konsentrasjon og mer enzym økte mengden løselig protein som var tilgjengelig for emulsjonsdannelse, noe som resulterte i at mer emulsjon ble dannet. I studien til Slizyte mfl. (2004) ble det påpekt at eliminering av vann eller reduksjon i tilsatt vann kunne redusere dannelse av emulsjon. Videre i Chiodza og Goosen (2023) viste studien at det høyt tap av protein til slam var påvirket av høye blandehastigheter ved lav faststoff-konsentrasjon eller ved høy faststoff-konsentrasjon ved lave blandehastigheter. (Chiodza og Goosen, 2023).

Resultatene fra disse studiene understreker viktigheten av en helhetlig tilnærming til prosessoptimalisering. Det er tydelig at optimalisering av enkeltvariabler isolert kan ha negative effekter på andre viktige responsvariabler innenfor prosessoperasjonen. Dette påpeker behovet for å overvåke og kontrollere påvirkningsparametere som temperatur, pH, og trykk nøye for å sikre optimal substratløselighet. Disse parametrene er sterkt sammenkoblet, og endringer i én kan påvirke hele prosessen (Chiodza og Goosen, 2023). I tillegg må prosessoptimaliseringen ta hensyn til både utformingen av prosessanlegget og økonomiske faktorer, som kan påvirke valg av teknologi og metoder. Mer vann i hydrolyseprosessen vil for det første gjøre det nødvendig med større reaktorvolum for enzymhydrolyse, og for det andre vil det være en økning i nedstrøms prosesseringskostnader for håndtering og fjerning av store volumer vann for å produsere et tørt produkt. En integrert tilnærming som vurderer både oppstrøms- og nedstrømsprosesser samtidig anbefales for å minimere uønskede bivirkninger og maksimere effektiviteten og økonomisk lønnsomhet av prosessen (Chiodza og Goosen, 2023, Slizyte mfl., 2004, Valencia mfl., 2021).

3 karakterisering av endeprodukter fra enzymatisk hydrolyse

3.1 Fett:

Lipidsammensetningen i fjørferester er variert og inneholder primært nøytrale lipider som triacylglycerol men også noen komplekse lipider som fosfatidylkolin, sfingomyelin, og fosfatidyletanolamin. Kyllingfett er spesielt rikt på linolsyre (omega-6 fettsyrer). Denne varierer mellom 17,8% og 22,9% (Sharma mfl., 2013). Fettsyresammensetningen til fett fra kyllingrestråstoff er karakterisert til å bestå av 45-49% oljesyre og ca 16% palmitinsyre som var den viktigste mettede fettsyren som finnes i fett fra kyllingskinn (Fallah-Delavar og Farmani, 2018). Seong mfl. (2015) analyser på kyllingrestråstoff viste at palmitinsyre og stearinsyre, oljesyre, linolsyre og arakidonsyre var de mest dominerende fettsyrene påvist i alle kyllingbiprodukter. Variasjonen av fettinnholdet i fjørfeorganer varierer fra hjertet med det høyeste nivået av fett på 4,53%, etterfulgt av levren på 2,89% og tarm på 2,55% (Seong mfl., 2015) Kyllingskinn er vist å inneholde mellom 30-50% fett og ha et høyere nivå av umettede fettsyrer og et lavere innhold av mettede fettsyrer enn smult og talg. Sharma mfl., 2013,

Fett har flere applikasjoner i industrien. I fôrindustrien øker fettet energiinnholdet i fôret på en økonomisk måte. Videre kan animalsk fett brukes som ingrediens i kjøttprodukter, såpeproduksjon, matolje, vaskemidler kosmetikk eller som råstoff i fremstilling av biodiesel, hvor det er et kostnadseffektivt alternativ til vegetabilsk olje (Pop mfl., 2016, Coppini mfl., 2019, Lasekan mfl., 2013, Sharma mfl., 2013). Fett er viktig i kostholdet fordi det bidrar til energiinntaket og er nødvendig for absorpsjon av vitaminer. Imidlertid kan et høyt daglig inntak av fett være knyttet til ulike helseproblemer, som overvekt og hjerte- og karsykdommer (Seong mfl., 2015).

3.1.1 Emulsjon

Emulsjoner utgjør en mindre, men betydelig fraksjon av hydrolyseproduktene generert under enzymatisk hydrolyse. Disse emulsjonene dannes når denaturerte proteiner fungerer som surfaktanter og stabilt omslutter fettdråper, noe som skaper en kontinuerlig membran mellom fett- og vannfasene. Denne prosessen resulterer ikke bare i tap av hydrolysat utbytte i sedimentfraksjonen, men også i betydelige proteintap i selve emulsjonene, med rapporterte tap på 1,5 til 15,5% (Chiodza og Goosen, 2023, Tavano, 2013). Som nevnt gir mengde løselig protein en økende sannsynlighet for emulsjonsdannelse, noe som videre kan føre til dannelsen av mer omfattende emulsjoner. Den høyeste emulgeringskapasiteten skjer når det er en lav grad av proteinhydrolyse og det skjer en opphopning av større peptider som interagerer med vann-olje-grensen, resultatet er en høyere emulsjonsdannelse (Tavano, 2013, Šližytė mfl., 2005). Turgeon mfl. (1992) viste at små peptider som ble dannet fra β -laktoglobulin av trypsin hadde en mye lavere egenskaper for å danne emulsjon, trolig fordi peptidene var for små til å interagere med både vann og oljefasen. Variasjon i behandlingsforholdene under studiene påviste at forskjellige faktorer bidrar til dannelsen og stabiliteten av disse emulsjonene, noe som underbygger kompleksiteten i enzymatisk hydrolyse og behovet for nøye kontroll av prosessparametere (Chiodza og Goosen, 2023).

3.2 Sediment:

Sediment er den ikke-vannløselig fraksjonen, og er en betydelig fraksjon av hydrolyseproduktene fra kyllingråstoff. Sediment fraksjonen inneholder mineraler, proteiner, ikke-vannløselige protein/peptider og lipider. Proteinet i sedimentet kan potensielt deles inn i fire typer proteinkilder. Proteinet i sedimentet anses å ikke være gjenvinnbart siden det ikke er vannløselig eller det vil kreve mer prosessering for å få det ut (Chiodza og Goosen, 2023).

ikke-hydrolysert muskelprotein: Dette skyldes begrenset enzymatisk tilgang eller uløselig protein under hydrolyseprosessen. ikke-hydrolysert protein indikerer behov for optimalisering av enzym-substrat-interaksjon og løselighet.

Løselige proteiner gjenværende i vann: Sediment inneholder vann med potensielt løselige proteiner som ikke er nedbrutt av enzymet. Utvinning av disse proteinene kan øke det totale utbyttet (Chiodza og Goosen, 2023).

Denaturerte proteiner som kan felles ut: Termisk eller kjemisk stopp av hydrolysereaksjonen kan føre til utfelling av denaturerte proteiner i sedimentet. Videreutvinning av disse proteinene kan være aktuelt (Chiodza og Goosen, 2023).

Store lipid-protein komplekser: Emulsjonsdannelse under hydrolyse kan resultere i store nedbrytbare komplekser av fett og proteiner i sedimentet. Finjustering av prosessen kan redusere dannelsen av disse, men utvinning kan være mulig (Chiodza og Goosen, 2023).

Til tross for sin betydelige mengde er utnyttelsen av sediment i stor grad utforsket i litteraturen, og det anses ofte som et produkt med lav verdi (Kristoffersen mfl., 2022). Denne mangelen på fokus er uheldig, da sediment representerer en potensiell kilde til verdifulle næringsstoffer, inkludert proteiner og mineraler. Målet med enzymatisk hydrolyse

er å trekke protein ut av sedimentet og inn i vannfraksjonen. Over tid vil proteinet fra sediment skli over i vannfasen og dette vil redusere mengden sediment, derfor kan sediment fra EPH være et mål på hvor god hydrolysen har vært og hvor mye protein og fett som er blitt hentet ut.

4 Proteiner i kyllingråstoff

Seksjon 4 går nærmere inn på å forstå proteinet ved restråstoff av kylling og hvordan fysiske forhold tilstede i enzymatisk hydrolyse kan påvirke disse. Det er viktig å forså hvordan karakteristikker som proteinstruktur, stabilitet og løselighet endrer seg ved ulike behandlingsbetingelser i den enzymatisk hydrolyseprosessen. Dette er avgjørende for å få til en optimalisert porsess, da disse variablene kan påvirke effektivitet og kvaliteten på sluttproduktet (Pasupuleti og Braun, 2010, Lindberg mfl., 2021a).

4.1 Proteiner:

Kyllingrestråstoff er en utmerket kilde til protein. Innvoller rapporteres å ha et protein innhold på mellom 11-12%, tarm 53-60% og hode og føtter 16% protein. Tabell 1.1 fra seksjon 1.4.1 viser variasjonen av protein innhold fra ulike restråstoff fraksjoner fra kylling.

Proteinfunksjonalitet er direkte knyttet til proteinets konformasjon under ulike fysiske forhold. Ugunstige fysiske forhold kan potensielt forstyrrer strukturelle bindinger og fører til denaturering og tap av proteinets funksjon (Yousefi og Abbasi, 2022). Forskning har vist at endringer i miljøforhold som pH, temperatur, trykk og løsningsmidler kan påvirke proteinfolding og strukturen betydelig. For eksempel kan forhøyede temperaturer forstyrre intra- og intermolekylære bindinger og hydrofobe interaksjoner, noe som fører til denaturering og termisk inaktivering av proteiner (Yousefi og Abbasi, 2022). I studien til Kristoffersen mfl. (2022) ble det demonstrert at kollagen ble smeltet ut av sedimentet, når enzymet innaktiveres ved høy temperatur. Studien vist at varmeenergi kan effektiv tilgjengeliggjøre kollagen ved å forstyrre hydrofobe interaksjoner og hydrogenbindinger i kollagenstrukturen, og øke den kinetiske energien. Dette trinnet i den enzymatiske hydrolyseprosessen bidrar til frigjøring av større kollagenfragmenter og peptider fra fjørfebiprodukter, noe som understreker den termiske behandlingens rolle i å optimalisere utvinningen av verdifulle proteinfraksjoner (Kristoffersen mfl., 2022).

4.1.1 Protein hydrolysat

Proteinhydrolysater (PH) er proteiner som er blitt kjemisk eller enzymatisk brutt ned til peptider av ulik størrelse (Tavano, 2013). Proteinhydrolysat er vist å inneholde essensielle aminosyrer, ha anti-oksidant effekt, og kan anvendes i produktet som husdyrfôr, kjæledyrfor, produksjon av bioaktive peptider og som næringsmiddelingsrediens. Aspevik mfl., 2017 Delvis hydrolyserte proteiner fra PH har gode funksjonelle egenskaper som løselighet, skumdanningsevne, fettabsorpsjon og emulgerende egenskaper som gjør at de kan brukes som matingrediens. (Tavano, 2013, Yousefi og Abbasi, 2022) (Yousefi og Abbasi, 2022, Seong mfl., 2015, Gómez-Guillén mfl., 2011). Proteinhydrolysater kan også brukes

som ernæringsblandinger, morsmelkerstatninger og kosttilskudd for pasienter som ikke kan fordøye intakt protein (Clemente, 2000). Kontrollert hydrolyse er rapportert å forbedre de emulgerende egenskapene. Skånsom hydrolyse kan øke kapasiteten, mens overdreven hydrolyse kan resultere i tap av emulgerende egenskaper (Tavano, 2013). Kvaliteten og ferskheten på råstoffet er viktig dersom utbyttet skal være høyt og av bra kvalitet. Fersk restråstoff fra fisk er vist å gi en økt utbytte av fiskeprotein hydrolysat og færre urenheter i pulveret. Itillegg vil innholdet i restrå materialet påvirke utbytte og kvalitet, for eksempel mengden bein, skinn, skrotter og vev vil påvirke utbytte av hydrolysat i den forstand at dette råstoffet har et høyt innhold av kollagen (Kristinsson og Rasco, 2000).

4.1.2 Kollagen og gelatin:

Kollagen

Fjørfeindustriens biprodukter inneholder en sammensatt blanding av forskjellige typer vev, som bindevev og muskelvev. Bindevevet er spesielt rikt på kollagenproteiner, mens muskelvevet hovedsakelig består av myofibrillære proteiner som aktin og myosin, samt vannløselig protein. Disse proteinene har ulike aminosyresammensetning og strukturelle egenskaper, noe som resulterer i at de har forskjellige fysiske stabiliteter og ernæringsmessige kvaliteter (Kristoffersen mfl., 2022). Kollagenproteiner kan ha forskjellige strukturer og ulikheten i disse gir kollagen sine respektive funksjoner (Lasekan mfl., 2013). Til nå har 27 forskjellige kollagentyper blitt bevist. (Gómez-Guillén mfl., 2011). De viktigste er av typen I, II og III. Type I kollagen er avledet fra bindevev som bein, skinn og sener. Kollagen av type II forekommer mye i bruskev og type III kollagen finnes typisk i fibre rundt fettceller, muskelceller, blodkar og tarm. Kollagen type III er vist å være relatert til alder, hvor det er vist at ungt skinn kan inneholde opptil 50% og at denne noen ganger reduseres til 5-10% ved eldre dyr (Abedinia mfl., 2020). Dette kan bidra til å øke kompleksiteten og variasjonen av næringsstoff i restråstoffet. I industrien er det vanlig å bruke ben, skinn, luftrør og bein til ekstraksjon av kollagenproteiner fra fjørfe. Kollagen står for opp til 90% av proteininnholdet i kyllingbein (Lasekan mfl., 2013) og kyllingskinn inneholder 75 % av type I kollagen og 15 % av type III (Fisinin mfl., 2017). Kollageninnholdet i kylling- og andeføtter er registrert å være 30,74% og 28,37% (Abedinia mfl., 2020). De unike egenskapene til kollagen og kollagenavlede peptider, som fysiske egenskaper, bio-kompatibilitet, biologisk nedbrytbarhet og lav allergenisitet, har blitt mye brukt i for eksempel matvarer, legemidler, medisinske produkter og kosmetikk (Kristoffersen mfl., 2022, Fisinin mfl., 2017)

En karakteristisk egenskap for Kollagen er at det inneholder aminosyren hydroksyprolin. Dette kan brukes som et kjennetegn ved aminosyreprofilen for å bestemme mengden kollagen i restråstoffet (Lasekan mfl., 2013). Hydroksyprolin er en aminosyre som nesten utelukkende finnes i kollagen og hydroksyprolin bestemmelse kan derfor brukes til å bestemme mengden kollagen. De karakteristiske egenskapene til kollagenet er mekaniske egenskaper, kjemisk inert som vil si at de ikke reagerer med andre stoffer, aminosyresammensetning og evne til å omforme til lavmolekylært proteinprodukt (gelatin). I tillegg har kollagen noen tekniske egenskaper som for eksempel er de stabile ved ekstraksjon, de er enkle å separere fra andre komponenter og har evnen til å gå tilbake til sin opprinnelige form etter delvis utfolding. Disse

egenskapene kan bli påvirket av ulike fysiske og kjemiske faktorer som temperatur og pH og utvider mulighetene for kollagenproduksjon. (Fisinin mfl., 2017, Gómez-Guillén mfl., 2011). For eksempel kan kollagen bli ekstrahert ved bruk av varme, med og uten justering av pH. Dette er mulig på grunn den økende energien som blir tilført får kollagen molekylene til å vibrere så voldsomt at de hydrofobe interaksjonene og hydrogenbondene i kollagen strukturen blir ødelagt (Kristoffersen mfl., 2022).

Gelatin

Det største volumet av gelatinproduksjon kommer fra pattedyrkilder som kyr og griser. I dag er det økt etterspørsel etter gelatin fra andre kilder enn pattedyr på grunn av kulturelle og religiøse grunner. Fjørfebiprodukter har et godt potensial for å erstatte pattedyrkilder for gelatineekstraksjon (Abedinia mfl., 2020).

Gelatin er et vannløselig materiale oppnådd fra det fibrøse proteinkollagenet, som er hovedkomponenten i dyrebene, skinn og bindevev. Som tidligere nevnt finnes det flere typer kollagen og hvilke typer som dominerer kan være avhengig av alderen på dyret. Derfor er arten, kollagentypen og alderen til dyreartene faktorer som kan påvirke gelatineegenskapene (Abedinia mfl., 2020).

Gelatin, et delvis hydrolysert protein avledet fra kollagen, har vist seg å ha en rekke verdifulle egenskaper og anvendelser. Det er biologisk nedbrytbart og har bred anvendelse i matindustrien, der det kan fungere som skummiddel, emulgator og fortykningsmiddel. I tillegg har gelatin potensiale som et miljøvennlig emballasjemateriale. Innen medisin er gelatin anvendelig på flere områder, blant annet reparasjon av beindefekter, som nanopartikler for medikament- og genlevering, som matrise for implantater, som stabilisator for levende svekkede virale vaksiner, i produksjon av harde og myke kapsler, i sårpleie, og til ulike kosmetiske formål. Gelatin kan ekstraheres fra ulike deler av fjørfe med høyt proteininnhold, inkludert hoder (16% protein) og føtter (23-24% protein). Spesielt kylling- og andeføtter har et betydelig kollageninnhold på henholdsvis 30,74% og 28,37%. (Abedinia mfl., 2020, Liu mfl., 2015, Mohammadnezhad og Farmani, 2022, Aykın-Dinçer mfl., 2017)

5 Mål med studien

Målet med denne studien var å undersøke enzymkinetikken til to ulike enzymer under enzymatisk hydrolyse ved to ulike vannforhold (Vann:RRS). Målet er å forstå hvordan hydrolysetid og mengden vann tilsatt restråstoff blandingen påvirker utbyttet av fett, sediment og proteinhydrolysat.

Delmål:

- Undersøke hvordan utbyttet av fett, sediment og proteinhydrolysat endres med varierende tilsatt vannmengde.
- Vurdere den optimale vannmengden for maksimalt utbytte av ønskede fraksjoner.
- Vurdere effekten av vannmengde på enzymkinetikk.

Restråstoff:

- Bein og skinnfraksjoner

Vanninnhold i hydrolyseblandingen:

- 60%vann og 40% restråstoff
- 45% vann og 55% restråstoff

Utbytte:

- Fettutbytte
- Tørrstoffutbytte
- Proteingjenvinning
- Fett, aske og protein i sediment

6 Materiale og metode

I denne studien har fokuset vært rettet mot utnyttelsen av kyllingrestråstoff ved hjelp av enzymatisk hydrolyse. Enzymkinetikken og utbytte av de ulike fraksjonene ble undersøkt for to enzymer. I denne studien ble to ulike vannforhold undersøkt - henholdsvis 45:55 og 60:40 vann:råstoff forhold. Disse er videre omtalt som 45% vann og 60% vann. Hydrolysetidene som ble anvendt for å vurdere hydrolyseprosessene var 15, 30, 45 og 60 minutter. Enzymene i denne studien er betegnet som enzym 0 (E0) og enzym 1 (E1). Den spesifikke kombinasjonen av enzym, hydrolysetid, og mengden vann tilsatt i hydrolyseblandingen blir referert til med en identifikasjonskode. Eksempelvis vil Enzym 0, 30 min, 60% vann bli forkortet til (E03060), og Enzym 1, 45min, 45% vann til (E14545).

6.1 Kyllingrestråstoff

Restråstoff (RRS) fra fjørfe bestod av biprodukter fra kategori 3 som inkluderer skinn og beinfraksjoner. Restråstoffet ble behandlet og klargjort til hydrolyse av tidligere masterstudent Bao Phuc Vo og informasjonen om råstoffet og behandling er hentet fra hans masteroppgave (Phuc Vo, 2023). Nortura slakteri og prosesserings anlegg i Hærland i Norge står for leveringen av RRS. Fersk RRS produsert under prosessering ble frosset til -18°C , transportert innen 24 timer til NTNU Gløshaugen i isoporkasser, og lagret ved -40°C . Tining av RRS foregikk over natt ved 4°C og råstoff ble homogenisert ved bruk av en Savioli meat grinder 32 (Sant 'Andrea, Italy), med 6mm hullstørrelse, før det ble oppbevart ved -80°C inntil videre bruk (Phuc Vo, 2023).

6.2 Enzymer

I gjennomføringen av de eksperimentelle hydrolyseforsøkene ble det benyttet kommersielle enzymer levert av Bioco. Studien bygger videre på tidligere studien utført av Phuc Vo, som evaluerte effektiviteten og utbyttet ved bruk av fire forskjellige enzymer levert av samme enzymprodusent (Phuc Vo, 2023). Basert på Phuc Vo sin analyse, viste spesielt to av de testede enzymene (her betegnet som enzym



Figur 6.1: Kyllingrestråstoff, kvernet og homogenisert skinn og beinfraksjoner.

0 og enzym 2) seg å gi høye utbytter. Disse enzymene er inkludert i denne studien og omtales her som henholdsvis enzym 0 (E0) og enzym 1 (E1). En beskrivelse av enzymenes egenskaper, samt deres tilhørende kodenavn, er gitt i Tabell 6.1. Disse tallene er hentet fra i Lindberg sine funn (Lindberg mfl., 2021a).

Tabell 6.1: Informasjon om enzymene brukt i denne studien. Hentet fra Lindberg mfl., 2021a

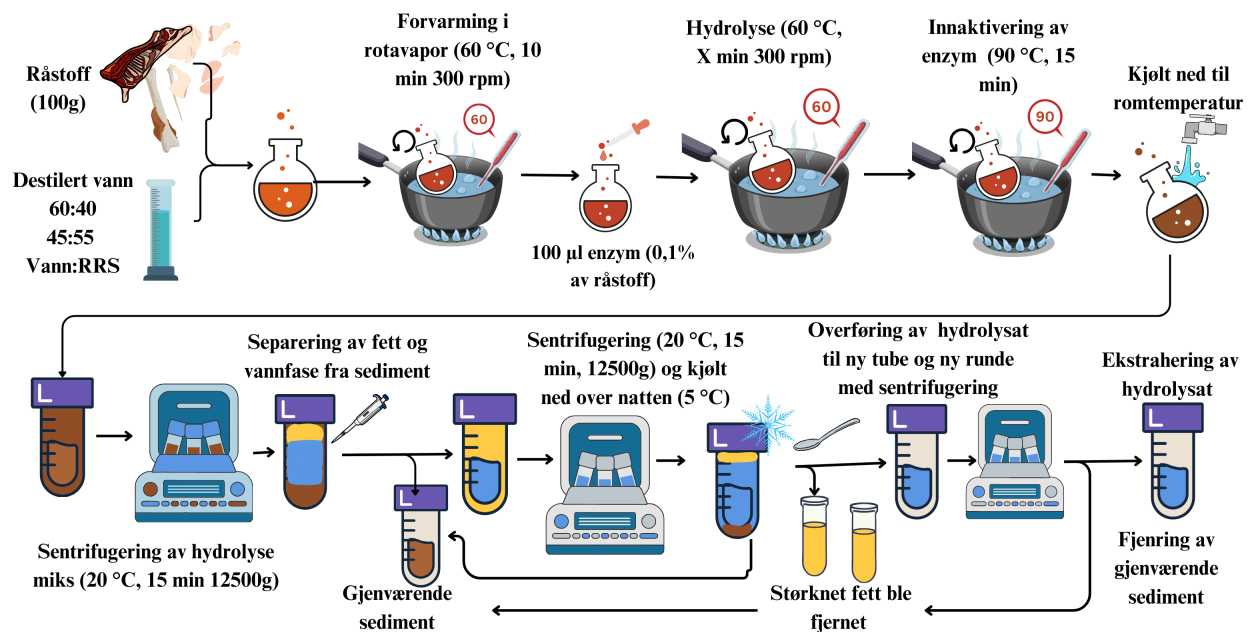
Enzyme	Kode	Opprinnelse	Aktivitet	Protease	pH aktivitet	Temperatur °C
Enzym 0	E0	Carica papaya	Endo	Serine	5,0-7,0	50-60
Enzym 1	E1	Bacilus Licheniformis	Endo	Serine	7,0 -10	55-65

6.3 Enzymatisk hydrolyse

I denne studien ble det undersøkt hvordan faktorer som tid og vannforhold påvirker utbyttet. Evaluering av utbyttet ble gjort for hydrolysetidene 15, 30, 45 og 60 minutter for enzym 0 (E0) og enzym 1 (E1) som tilsvarer totalt åtte hydrolysegjennomganger. Neste avsnitt beskriver en generell gjennomgang av hydrolysemetoden.

Homogenisert råstoff (ca 100g) ble tint over natten ved 4°C. Destillert vann (20°C) ble tilsatt til ønsket vann:restråstoff forhold 60% eller 45% (60:40 eller 45:55) i en 500-ml-rundflaske. Figur 6.2 illustrer en enkelt gjennomgang av hydrolysen. Innholdet i rundflasken ble forvarmet i 10 minuttet i en *IKA RV 8 V rotavapor*] (*Staufen, Tyskland*) ved 300 omdreininger per minutt (o/min) i et vannbad med en temperatur på 60 °C. Hydrolysen ble i satt i gang ved å tilsette 100 µl enzymløsning. Dette utgjør 0,1% av RRS vekten dersom enn antar at 1 ml enzymløsning veier 1 gram. Tilsetningen av enzymløsningen markerte starten for hydrolysereaksjonen som $\ll(t) = 0\gg$. Etter ønsket hydrolysetid ($t = 15, 30, 45, 60$ min) ble rundflasken overført til *VWR 18L vannbad*] (*Radnor, PA, USA*), 90°C i 15 minutter for å inaktivere enzymene og stoppe hydrolysen.

Inaktiverte prøver ble overført til 250 ml sentrifugekopper og sentrifugert i en *ThermoFisher Multifuge X4RF Pro-MD*] gulv sentrifuge i 15 minutter ved 12 500g og 20°C. Etter sentrifugeringen ble hydrolysat og fettfase pipettert over i 50 ml rør, før rørene ble satt i kjøleskap ved 4 °C over natten slik at fettstivnet. Stivnet fett ble manuelt tatt over i nye 50 ml rør ved bruk av skje og spatel. Vannfasen ble overført til en ny 250 ml sentrifugekopp, med sediment liggende igjen i den gamle 250 ml sentrifugekoppen. Dagen etter ble fettstivnet manuelt overført til ny 50 ml tube, mens hydrolysatet ble helt over i en ny sentrifugekopp, gelefasen som oppstod ble samlet i 50 ml rør og bunnfallet ble værende igjen. Hydrolysatet ble sentrifugert på ny ved 12500g og 4°C og overført til beholder egnet for fryse-tørking. Bunnfallet fra sentrifugeringen av hydrolysatet ble slått sammen med bunnfallet fra tidligere sentrifugering. Mengden fett ble bestemt gravimetrisk. Hydrolysat og sediment ble frysetørket i en *Chris alpha 1-4 LD plus* frysetørker for videre analyser. En oversikt over hele prosessen kan ses i figur 6.2.



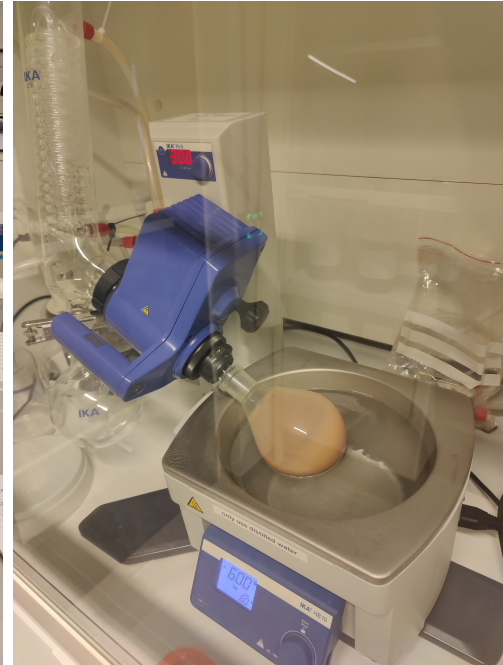
Figur 6.2: Flytskjema med alle stegene og prosedyrene involvert i ekstraksjon av proteinhydrolysat.

Avvik fra protokoll

For å effektivisere forsøket ble Enzym 0 kjørt i *IKA RV 8 V rotavapor*, 60°C med 300 (o/min), samtidig ble enzym 1 kjørt i *Büchi Rotavapor R-200*, 60°C med 280 (o/min) (6.3).



(a) Büchi Rotavapor R-200



(b) IKA RV 8 V rotavapor

Figur 6.3: To ulike rotavaporer ble brukt, IKA RV 8 V rotavapor ble brukt for hydrolyser med enzym 0, mens Büchi Rotavapor R-200 ble brukt for hydrolyser gjort med enzym 1.

Under første del av enzymatisk hydrolyse med vannforhold på 60% ble det dannet et geleaktig bunnfall i hydrolysatet. Dette ble fjernet fra hydrolysatet og plassert i egne 50 ml rør. I den andre halvdel med vannforhold på 45% ble gelelaget som ble dannet i hydrolysatet tatt med og frysetørket sammen med hydrolysatet.

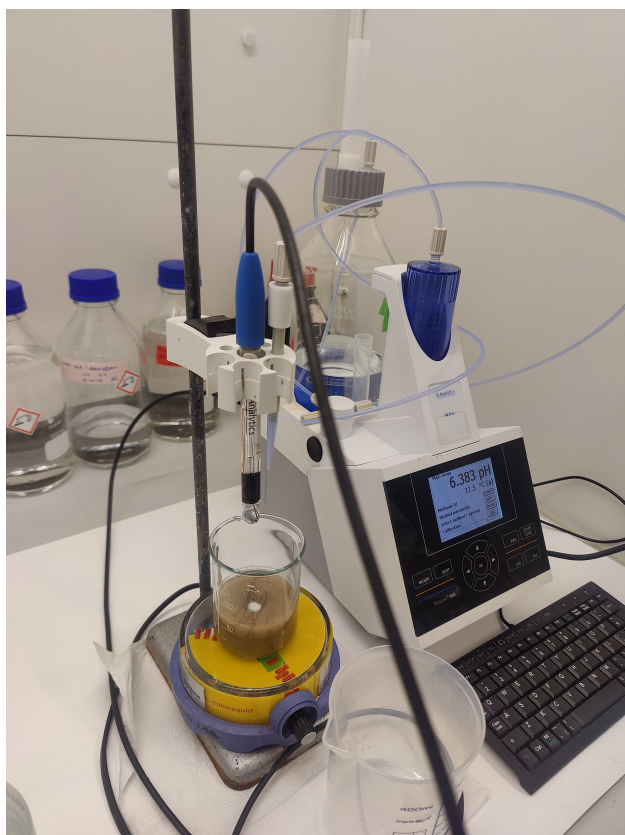
Enzymatisk hydrolyse i 60 minutter ble gjort to ganger for både E0 og E1 for vannforholdene 60% og 45%. Første gang ble en gelfase tatt ut fra forsøk med 60% vann, men dette var ikke tilfellet for gang nummer to. For de andre hydrolysetidene 15, 30 og 45 ble hydrolyse bare gjort en gang. Det ble ikke tatt ut gel fase i runde to av hydrolysen.

6.4 Bestemmelse av mengden vannløselig protein i hydrolysat

I denne studien ble Lowry-metoden, som først ble beskrevet av Lowry mfl., 1951, anvendt for å bestemme mengden vannløselige proteiner i frysetørkede hydrolysater. Absorpsjon ble avlest ved 750nm på et *Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000* spektrofotometer. Flere løsninger ble anvendt: 2 % natriumkarbonat (Na_2CO_3) oppløst i 0,1 M natriumhydroksid (NaOH) (Løsning A), 1 % kobber(II)sulfat (CuSO_4) (Løsning B), og 2 % kaliumnatriumtartrat (Løsning C). Disse ble kombinert for å danne en alkalisk kobberreagens (Løsning D). I tillegg ble fortynnet Folin-reagens (Løsning E) tilberedt ved å blande en del Folin-reagens med to deler destillert vann. Bovint serumalbumin (BSA) med ulike konsentrasjoner ($\mu\text{g/ml}$) ble benyttet for å lage en standardkurve, detaljert beskrevet i Appendiks A.1

6.5 Total hydrolysegrad ved formoltitrering

Formoltitreringsmetoden (Taylor, 1957) ble brukt for å bestemme hydrolysegrad. I denne prosedyren ble en prøvemengde på mellom 1 og 1,5 g nøyaktig veid, hvorpå destillert vann ble tilsatt til totalvekten nådde 50 g. En stabil pH-verdi på 7 ble oppnådd ved å tilsette 0,1M natriumhydroksid (NaOH) til løsningen. Dette ble etterfulgt med tilsetning av 10 ml formaldehyd. Løsningen ble deretter rørt i fem minutter, og titrert til en endelig pH-verdi på 8,5 ved bruk av 0,1 M NaOH og en Titrator SI Analytics Titroline 7000. Beregningen av den totale hydrolysegraden ble gjort ved bruk av formelen A.2.1 og A.2.2 og er gjengitt i appendiks A.2.



Figur 6.4: Oppsett for analyse av den totale hydrolysegraden

6.6 Bestemmelse av tørrstoff og aske

Tørrstoff og aske ble analysert på sedimentprøvene E160 og E060 for begge vannforhold.

Tørrstoffanalyse: Digler ble tørket ved 105 °C og deretter veiet nøyaktig. Kvernet og homogenisert sedimentprøve ble veiet inn til ca 2 gram. Prøvene ble deretter tørket i varme ovn på 105 °C i ca 22 timer. Etter 22 timer ble prøvene satt direkte i en eksikator til de var kjølt ned til romtemperatur.

Askeanalyse: Samme digler med prøve ble brukt til aske analyse. Etter at prøvene var veiet for tørrstoff, ble prøvene satt inn i en kald ovn (*Nabertherm, Tyskland*) med temperatur

på 550 °C. Etter at prøvene hadde stått over nattan og kjølt ned neste dag ble de veiet og askeinnholdet ble bestemt.

6.7 Fettanalyse - (Bligh & Dyer)

Lipidinnholdet i sediment ble analysert ved hjelp av en modifisert versjon av Bligh og Dyer (1959). Analysen ble gjort på frysetørket prøver. Ca 1 gram sediment fra hydrolyse med E06060, E16060, og E06015, E16015 ble homogenisert i 2 min sammen med 1,6 ml H₂O, 4 ml MeOH og 2 ml CHCl₃. Deretter ble 2 ml CHCl₃ tilsatt og løsningen ble homogenisert på ny i 40 sekunder. Videre ble 2 ml H₂O tilsatt og løsningen ble på ny homogenisert i 40 sekunder. Løsningen ble tilsatt sentrifugert ved 13200g i 10 minutter.

Kloroformen ble pipetert ut og 1 ml kloroformfase ble overført til forhåndsveide reagensrør. Rørene ble satt til fordamping med nitrogen og veiet dagen etter. Lipidinnholdet ble beregnet ved bruk av likning A.3.1, der $a = g$ inndampet fett, $b =$ tilsatt ml kloroform, $c =$ ml inndampa kloroform og $v =$ innveid g prøve. Formel for utregning er gitt appendiks A.3.

6.8 C/N av frysetørket proteinhydrolysat og sediment

Proteinkonsentrasjonen i frysetørket proteinhydrolysat og sediment fra hydrolyse med E0 og E1 etter 60 min ved vannforhold 45 og 60% ble analysert ved C/N metoden. Totalt ble det laget fem paralleller med mellom 3-4 mg hydrolysat eller sedimentprøve. Nitrogen innholdet ble analysert og deretter ble proteinkonsentrasjonen bestemt ved å multiplisere % nitrogen med omregningsfaktoren 6,25.

6.9 Molvektsfordeling

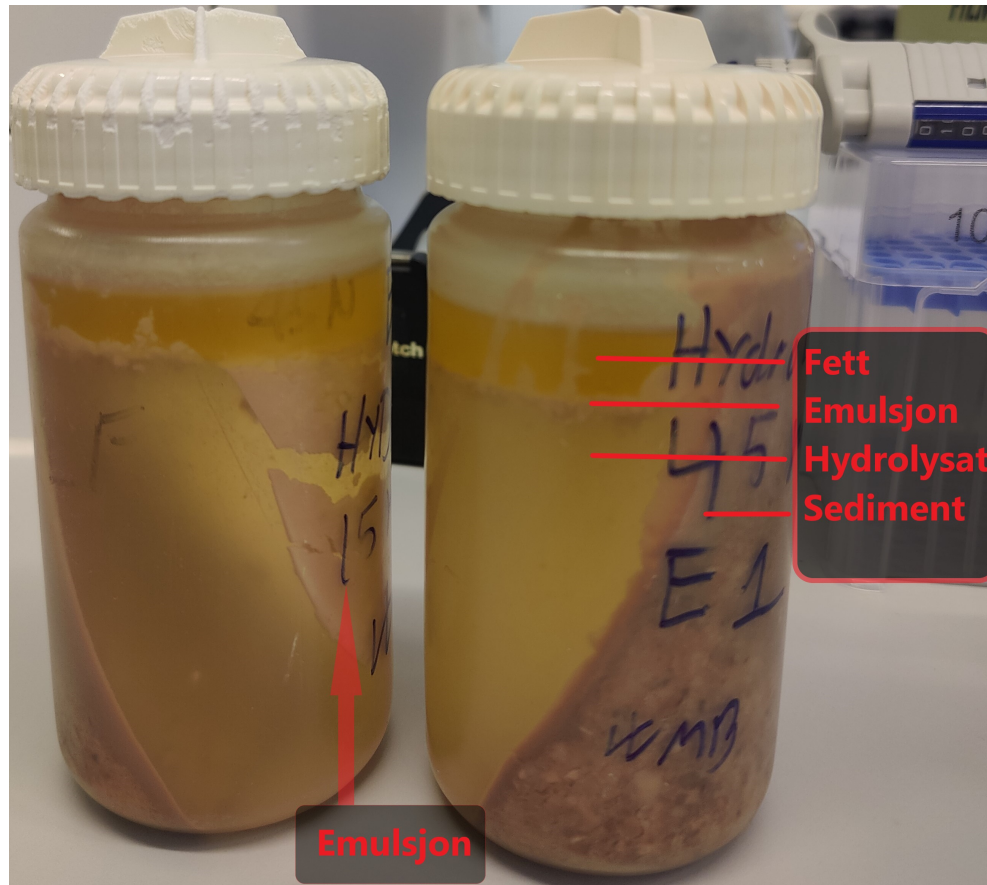
Molvektsfordeling til peptidene i proteinhydrolysatet (PH) ble analysert ved gelfiltrering i et FPLC-instrument. I 10 ml ble 0,1 g PH løst opp, deretter ble 1 ml av den oppløste prøven fortynnet i 9 ml bufferløsning (PBS med pH på 7,4). I FPLC-instrumentet *Åkta Go (sverige)*, med kolonne *Superdex Increase 75, 10/300 GL* ble 100 µl fortynnet prøve injisert. Programmet ble kjørt med en flow på 0,8ml/min, equilibrering på 0,2 CV (kolonnevolum) og isokratisk eluering på 1,5 CV med deteksjon ved 280 nm. Analysen ble gjennomført av Tarjei Haugbro avdelingsingeniør, Institutt for bioteknologi og matvitenskap.

6.10 Statistiske analyser

Microsoft Excel ble brukt til statistisk analyse av resultatene i denne studien. For å finne signifikante forskjeller mellom resultatene ble student t-test brukt. I denne studien ble resultatene definert som signifikante dersom $P < 0,05$, og avhengig av metode ble en, to eller tre paralleller benyttet.

7 Resultat og diskusjon

Enzymkinetikken til to enzymer ble undersøkt. Hydrolysen ble kjørt ved fire ulike hydrolysetider (15,30,45,og 60) og med to ulike mengder tilsatt vann (40:60 og 45:55 vann:RRS), for å undersøke om mengde tilsatt vann påvirker utbyttet av sediment, fett og proteinhydrolysat (7.1). Enzymene valgt for disse forsøkene har i tidligere masterstudie (Phuc Vo, 2023) demonstrert høyest produktutbytt. Tabell 7.1 gir en oppsummert oversikt over utbyttet av fraksjonene oppnådd i denne studien.



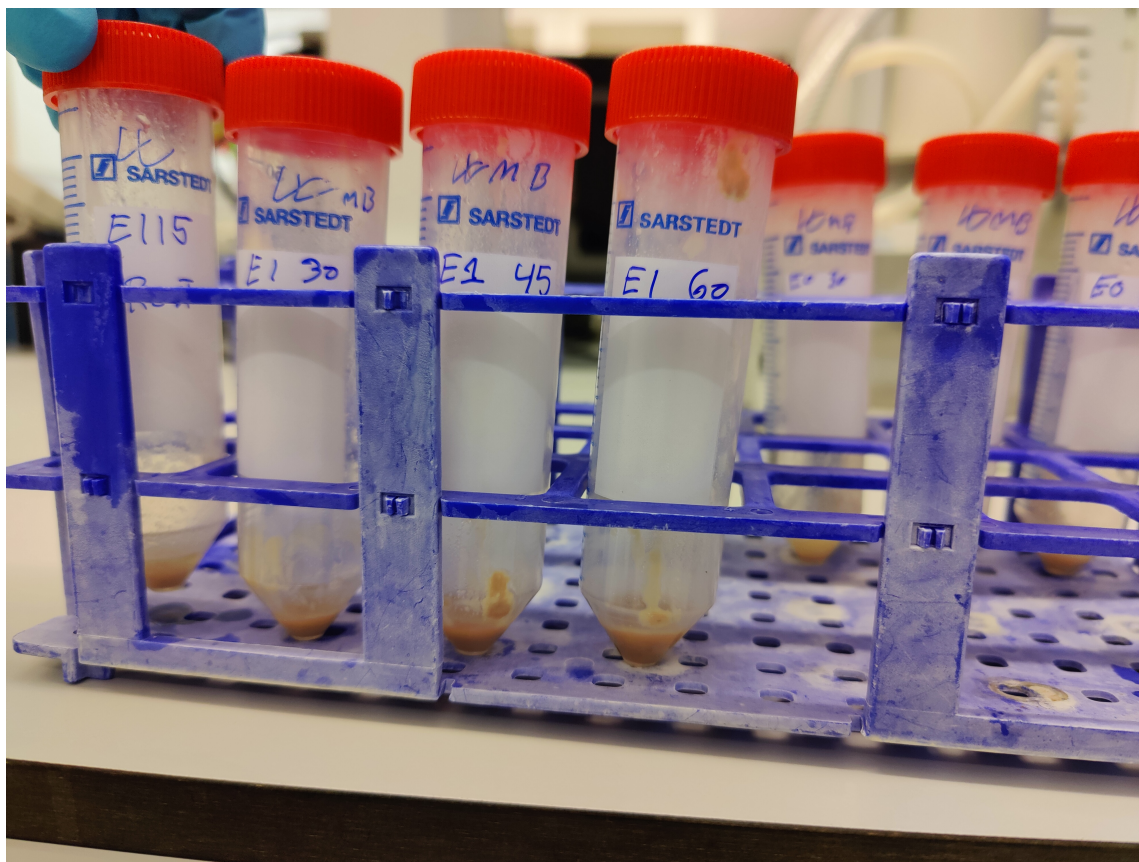
Figur 7.1: Hydrolyseblandingen etter hydrolyse, inaktivering og sentrifugering. Øverst en fettfraksjon, i midten hydrolysat og nederst på bunnen sediment fraksjon. Emulsjon mellom fett og hydrolysat og på veggen

Tabell 7.1: Oppsummering av alle utbyttene fra hydrolyse med 45 og 60 % vann, 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, med en enzymløsning på 0,1% av råstoffet. I tillegg ble det for forsøk med 60% vann tatt ut en gelfraksjon som var tilstede under separasjon, denne er ikke tatt med i denne oppsummeringen men finnes i seksjon

	Tid (min)	Sediment (g)		Fett (g)		Protein Hydrolysat (g)	
		60%	45%	60%	45%	60%	45%
Vannforhold		60%	45%	60%	45%	60%	45%
E0	15	16,97	16,79	18,51	19,99	4,51	3,66
	30	16,5	16,1	18,06	16,62	3,9	3,88
	45	14,18	16,06	19,12	19,99	5,97	5,51
	60	14,06	13,7	19,40	19,47	5,52	5,73
E1	15	15,39	13,12	19,53	22,00	5,51	5,46
	30	12,85	12,81	20,91	18,97	6,48	6,56
	45	11,99	13,01	20,75	21,21	4,29	6,78
	60	11,73	10,7	20,73	20,42	9,02	7,75

Dannelse av emulsjon

Dannelse av emulsjoner kan ses som et tynt brunt lag mellom hydrolysatet og fett (7.1). Flere faktorer som konsistens, mengde og tilgjengelig utstyr gjorde det utfordrende å få til en god separasjon av og bestemmelse av mengde emulsjon. Derfor har det i denne studien ikke blitt tatt hensyn til utbyttet av emulsjonsfasen. Under ekstraheringen av fett og hydrolysat fra sedimentet, var det ved flere tilfeller at emulsjonen ble med. En mindre mengde av denne emulsjonen ble samlet opp i rør (7.2), men trolig ble partiklene med videre i sedimentet, proteinhydrolysatet eller i fettfraksjonen.



Figur 7.2: Oppsamling av emulsjon. Etter separasjon av fett fra hydrolysat ble det liggende igjen en brun, tykk væske, som trolig er emulsjon. Bildet er fra enzym 1, 100g RRS, 60% vann, men resultatet reflekterer også tilfellet for de andre forsøkene med enzym 0 og 1.

7.1 Massebalanse

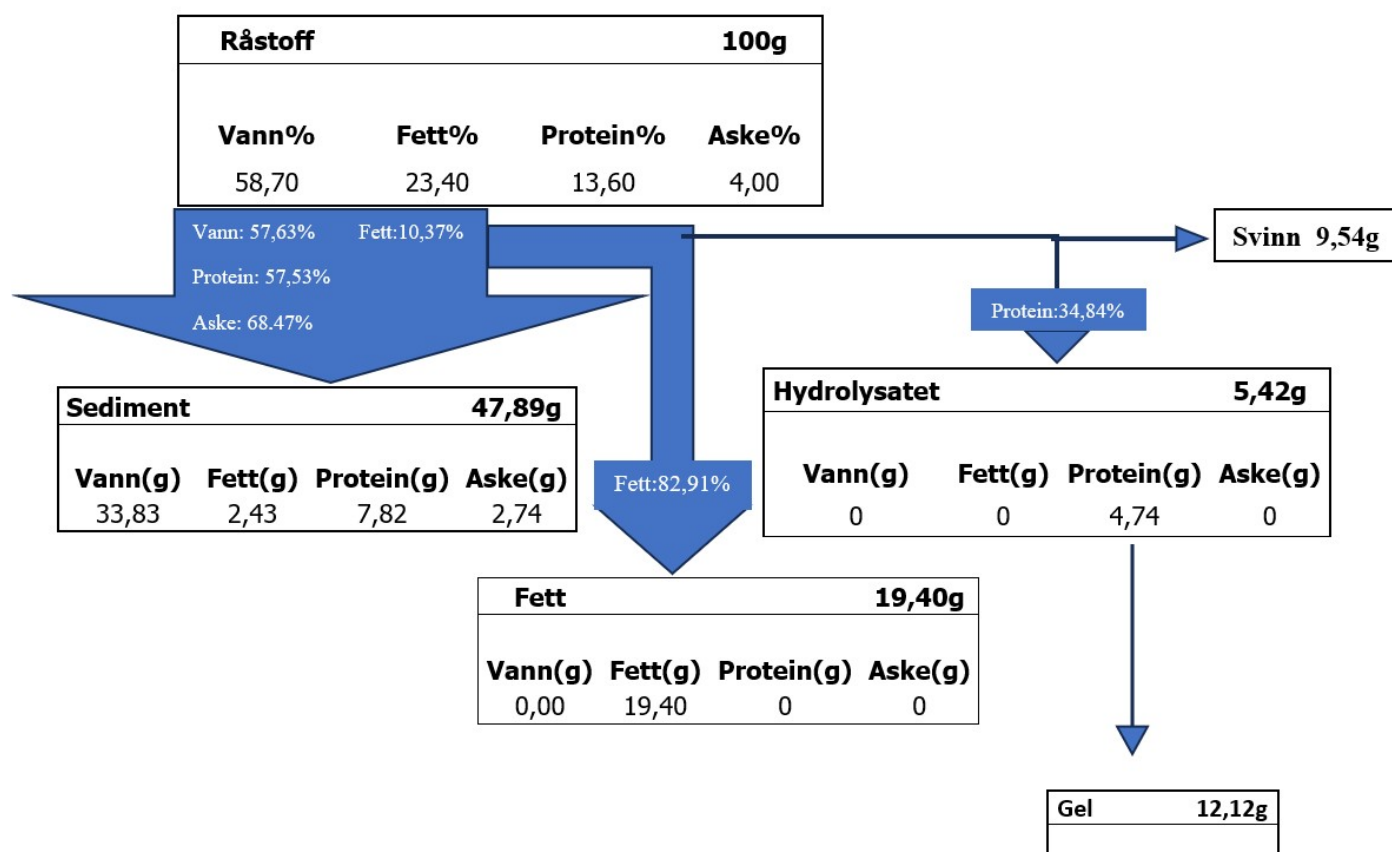
Massebalansen ga et innsyn i den kjemiske sammensetningen av råstoffet. Data fra den totale kjemiske sammensetningen av 100g ble hentet fra masteroppgaven til tidligere student Phuc Vo (2023), og brukt for å undersøke hvor stor andel av fett, protein, vann og aske som ender opp i de ulike fraksjonene oppnådd etter enzymatisk hydrolyse. Massebalansen ble undersøkt for enzym 0 (E0) og enzym 1 (E1) etter hydrolyse i 60 minutter for 60% vann og 45% vann.

Massebalanse E06060:

Tabell 7.2 oppsummerer den kjemiske sammensetningen av råstoffet (RRS) og de ulike fraksjonene etter hydrolyse med enzym E0 i 60 minutter ved 60% vanninnhold. Resultatene viser at ca. 10% av RRS går tapt som svinn under ekstraksjonen. Videre indikerer resultatene at en betydelig andel av proteinet (ca. 50%) forblir i sedimentet (7.3). Selv om utnyttelse og anvendelse av sediment er lite diskutert i litteraturen, åpner det høye proteininnholdet for en rekke muligheter. Fremtidig forskning bør utforske potensialet for å bruke sedimentet som en kilde til protein i ulike produkter, for eksempel fôr eller ingredienser i matvarer.

Tabell 7.2: Kjemisk sammensetning og massefordelingen av 100 gram kyllingrestråstoff. Data om sammensetningen av råstoffet er hentet fra Phuc Vo (2023). Kolonne syv viser den totale sammensetningen av sediment, hydrolysat, fett og gel og kan sammenlignes med kolonne to som er sammensetningen av råstoffet. Rad syv viser den totale sammensetningen av vann, fett protein og aske i sediment, hydrolysat, fett og gel og er kalkulert ved å legge sammen fett, vann, protein og aske. Protein innholdet i sediment og i hydrolysatet er bestemt ved C/N.

E06060	100g råstoff %	Sediment (g)	Hydrolysat(g)	Fett(g)	Gel(g)	Total(g)
Våtvekt	100g	47,89	153,30	19,40	12,12	90,46
Vann	58,7	33,83	147,88	19,40	N/A	58,86
Fett	23,4	2,43	N/A	19,40	N/A	21,83
Protein	13,6	7,82	4,74	N/A	N/A	12,56
Aske	4	2,74	N/A	N/A	N/A	2,74
Total	99,7	46,82	152,62	19,40	12,12	



Figur 7.3: Oversikt over hvordan 100 gram restråstoff fordeler seg til tre mellom produkter (sediment, protein-hydrolysat og fett) som resultat av enzymatisk hydrolyse i 60 minutter. Nesten 50% av råstoffet ble til sediment, ca 20% ble fett og litt over 5% ender opp som protein hydrolysat. Figuren er basert på resultatene fra hydrolyse med enzym 0, 60 minutter og med et vannforhold på 60%. En gel fase ble tatt ut fra det våte hydrolysatet og veiet 12,12g. Nesten 10g av råstoffet forsvinner under separasjon.

Massebalanse E16060:

Tabell 7.3 oppsummerer råstoffet og fasenes kjemiske sammensetning for hydrolyse gjort med enzym 1, 60 minutter med 60% vannforhold.

Tabell 7.3: Kjemisk sammensetning og massefordelingen av 100 gram kyllingrestråstoff. Data om sammensetningen av råstoffet er hentet fra Phuc Vo, 2023. Kolonne syv viser den totale sammensetningen av sediment, hydrolysat, fett og gel og kan sammenlignes med kolonne to som er sammensetningen av råstoffet. Rad syv viser den totale sammensetningen av vann, fett protein og aske i sediment, hydrolysat, fett og gel og er kalkulert ved å legge sammen fett, vann, protein og aske. Protein innholdet i sediment og i hydrolysatet er bestemt ved C/N.

E16060	100g råstoff %	Sediment (g)	Hydrolysat(g)	Fett (g)	Gel (g)	Total (g)
Våtvekt	100g	35,84	170,58	20,73	2,17	87,32
Vann	58,7	24,11	161,564	20,73	2,17	64,40
Fett	23,4	2,47	N/A	20,73	N/A	23,20
Protein	13,6	6,35	8,16	N/A	N/A	14,50
Aske	4	3,26	N/A	N/A	N/A	3,26
Total	99,7	36,19	169,72	20,73	2,17	

Massebalanse E06045:

Tabell 7.4 oppsummerer råstoffet og fasenes kjemiske sammensetning for hydrolyse gjort med enzym 0, 60 minutter med 45% vannforhold.

Tabell 7.4: Kjemisk sammensetning og massefordelingen av 100 gram kyllingrestråstoff. Data om sammensetningen av råstoffet er hentet fra Phuc Vo, 2023. Kolonne syv viser den totale sammensetningen av sediment, hydrolysat og fett og kan sammenlignes med kolonne to som er sammensetningen av råstoffet. Rad syv viser den totale sammensetningen av vann, fett protein og aske i sediment, hydrolysat, fett og gel og er kalkulert ved å legge sammen fett, vann, protein og aske. Protein innholdet i sediment og i hydrolysatet er bestemt ved C/N.

E06045	100g råstoff %	Sediment (g)	Hydrolysat(g)	Fett (g)	Total (g)
Våtvekt	100g	43,96	107,09	19,466	90,52
Vann	58,7	33,26	101,36	19,466	74,09
Fett	23,4	2,74	N/A	19,466	19,47
Protein	13,6	6,26	5,061	N/A	11,32
Aske	4	2,88	N/A	N/A	2,88
Total	99,7	45,14	106,42	19,466	

Massebalanse E16045:

Tabell 7.5 oppsummerer råstoffet og fasenes kjemiske sammensetning for hydrolyse gjort med enzym 1, 60 minutter med 45% vannforhold.

Tabell 7.5: Kjemisk sammensetning og massefordelingen av 100 gram kyllingrestråstoff. Data om sammensetningen av råstoffet er hentet fra Phuc Vo, 2023. Kolonne syv viser den totale sammensetningen av sediment, hydrolysat og fett og kan sammenlignes med kolonne to som er sammensetningen av råstoffet. Rad syv viser den totale sammensetningen av vann, fett protein og aske i sediment, hydrolysat, fett og gel og er kalkulert ved å legge sammen fett, vann, protein og aske. Protein innholdet i sediment og i hydrolysatet er bestemt ved C/N.

E16045	100g råstoff %	Sediment (g)	Hydrolysat(g)	Fett (g)	Total (g)
Våtvekt	100	37,68	111,7	20,42	88,80
Vann	58,7	26,98	103,95	20,42	70,35
Fett	23,4	1,85	N/A	20,42	20,42
Protein	13,6	6,29	6,80	N/A	13,09
Aske	4	2,10	N/A	N/A	2,10
Total	99,70	55,78	110,75	20,42	

Tabell 7.6 viser hvordan vann, fett, protein og aske fra RRS fordeler seg prosent vis utover fraksjonene. Resultatene fra tabellen indikerer at 10-12% av RRS forsvinner under forsøket.

Resultatene presentert i denne seksjon (7.1) viser tydelig forskjeller i proteinutbytte mellom prøvene, særlig for E06060. Denne prøven utmerker seg med et markant lavere mengden protein i proteinhydrolysatet (PH) (34,85 %) og et tilsvarende høyere innhold i sediment (57,53 %). De øvrige prøvene (E16060, E06045, og E16045), hadde jevnere fordeling, med rundt 46 % protein i sediment og varierende mengder protein i PH (37-60%). E16060 ga det høyeste proteinutbyttet i PH (gjennomsnitt 8,16g, 59,97%) , men den totale mengden protein i sediment og PH (14,50 g) overstiger proteininnholdet i restråstoffet med 6%. Resultatene fra seksjon *Mengde protein i PH* 7.8, *Protein i sediment* 7.4.4 og *Utbytte proteinhydrolysat* 7.5 indikerer at E1 gir høyere proteingjenvinning enn E0. Det er imidlertid viktig å merke seg de høye verdiene for E16060, kan være overestimert, noe som diskuteres nærmere i de respektive seksjonene.

Jevnt over hydrolysetidene oppnås nesten maksimalt utbytte av fett for begge enzymene under begge vannforholdene. Senere i seksjon *Utbyttet fett* 7.5 blir det vist at etter 15 min oppnås det > 80% fett i fettfasen og at store deler av resterende fett blir værende igjen i sedimentet.

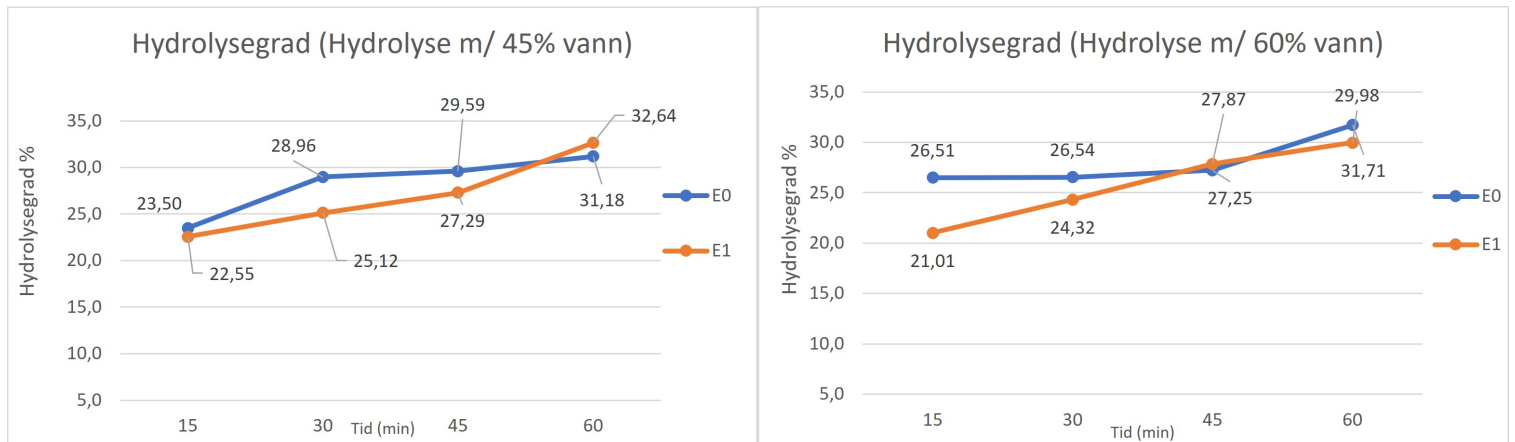
Tabell 7.6: Prosentvis fordeling av vann, fett, protein og aske i prøven E06060 E16060, E06045 og E16045. Total våtvekt er regnet ut ved å legge sammen våtvekten til de ulike fraksjonene og trekke fra mengden vann som ble tilsatt. Totalen til vann, fett, protein og aske er regnet ut ved å legge sammen de ulike fraksjonene. Hydrolyse med 100g RRS, enzymløsning 0.1% av RRS, enzym 0 og enzym1, 60% og 45% vann, 60 min hydrolysetid.

E06060 (%)	RRS	Sediment	Hydrolysat	Fett	Gel	Total (%)
Våtvekt	100,00	47,89	153,30	19,40	12,12	90,46
Vann	100,00	57,63	NA	NA	NA	57,63
Fett	100,00	10,37	NA	82,91	NA	93,28
Protein	100,00	57,53	37,84	NA	NA	95,37
Aske	100,00	68,47	NA	NA	NA	68,47
E16060 (%)						
Våtvekt	100,00	35,84	170,58	20,73	2,17	87,32
Vann	100,00	41,07	NA	NA	NA	41,07
Fett	100,00	10,55	NA	88,59	NA	99,14
Protein	100,00	46,67	59,97	NA	NA	106,65
Aske	100,00	81,57	NA	NA	NA	81,57
E06045 (%)						
Våtvekt	100,00	43,96	107,09	19,466	NA	90,52
Vann	100,00	56,66	NA	NA	NA	56,66
Fett	100,00	11,72	NA	83,19	NA	94,91
Protein	100,00	46,02	37,21	NA	NA	83,23
Aske	100,00	71,91	NA	NA	NA	71,91
E16045 (%)						
Våtvekt	100,00	37,68	30,7	20,42	NA	88,80
Vann	100,00	45,96	NA	NA	NA	45,96
Fett	100,00	7,89	NA	87,25	NA	95,14
Protein	100,00	46,24	50,01	NA	NA	96,26
Aske	100,00	52,43	NA	NA	NA	52,43

7.2 Hydrolysegrad

Hydrolysegrad (DH) ble bestemt ved formol titrering i henhold til Taylor (1957). Resultatet viste at hydrolysegraden økte over tid for begge enzymer. Laveste registrerte hydrolysegrad ved vannforhold på 60%, for E0 (26,51) og E1 (21,01%) etter 15 min hydrolysetid. Som vist i Figur 7.4, fortsatt hydrolysegraden å stige med tiden for begge enzymene. E0 hadde høyest hydrolysegrad og økte minimalt frem til 45 minuttersmerke, der E0 og E1 konvergere før E0 steg til 29,98% ved 60 minuttersmerke. Til tross for å ha lavest start hydrolysegrad hadde E1 en jevn økende hydrolysegrad med tiden og endte på en hydrolysegrad på 31,71%.

Under vannforholdene på 45%, ble det observert en stigende trend i hydrolysegraden for E0, som startet på 23,50% etter 15 minutter og økte til 31,18% etter 60 minutter. E1 viste en DH på 22,55% etter 15 minutter, og avsluttet med 32,64% etter 60 minutters hydrolyse (6.4).



Figur 7.4: Den totale hydrolysegraden ble undersøkt for enzym 0 og enzym 1. Hydrolyse med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1. Enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoffet. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min), og ulikt vannforhold, forsøk 1, 60% vann (60:40 vann:råstoff) og forsøk 2 ved 45% vann (45:55 vann:råstoff).

Hydrolysegraden (DH) er et mål på andelen peptidbindinger som er brutt ned til mindre peptider og aminosyrer under hydrolyse. Typisk vil DH øke over tid, inntil den stabiliserer seg når majoriteten av tilgjengelige peptidbindinger er hydrolysert. Imidlertid kan DH fortsette å øke selv om proteinutbyttet ikke gjør det. Dette skyldes at allerede hydrolyserte peptider kan spaltes videre til enda mindre fragmenter, uten at det nødvendigvis fører til økt utbytte av ønskede produkter (Wubshet mfl., 2019).

I flere studier av enzymatisk hydrolyse av beinråstoff fra fjørfe er det rapportert om varierende grader av hydrolyse (DH). Zhang mfl. (2023b) undersøkte hydrolyse av kalkunbeinfraksjoner og fant at proteasekomplekset PB02 ga høyest DH ($43,95 \pm 1,24\%$) etter 4 timer, mens andre enzymer som PB03, Flavourzyme, PB01 og Protamex ga lavere DH-verdier. Etter 1 time var DH mellom 25 og 35%, avhengig av enzym.

Også andre studier har rapportert DH-verdier i samme størrelsesorden. Kristoffersen mfl. (2022) fant DH-verdier fra 22-30% etter 60 minutters hydrolyse, mens Lindberg mfl. (2021b) rapporterte DH mellom 25 og 30% for ulike enzymer og restråstoff. Tveit (2014) oppnådde DH mellom 20 og 25% etter 60 minutters hydrolyse av bein- og skinnfraksjoner, avhengig av enzym. Lindberg mfl. (2021b) fant også at type råstoff ser ut til å ha liten innflytelse på resulterende DH%-verdier, sammenlignet med effekten av proteasetype.

Samlet sett viser disse studiene at graden av hydrolyse av beinråstoff fra fjørfe kan variere avhengig av enzymvalg og hydrolysetid, men generelt sett oppnås DH-verdier mellom 20 og 45% etter 1-4 timers hydrolyse. Disse studiene er i en overensstemmelse med funne gjort i denne studien.

I studien Schmidt mfl. (2020), ble det vist at mengden lipid og kollagen i restråstoffet (RRS) kan påvirke graden av hydrolyse (DH). Et høyt lipidinnhold kan redusere DH, mens kollageninnholdet kan påvirke DH avhengig av enzymets spesifisitet for kollagenbindinger. I denne studien var forskjellen i DH mellom de to vannforholdene (45% og 60%) relativt liten. Begge enzymene (E0 og E1) viste en lignende økning i DH over tid, fra rundt 22-23%

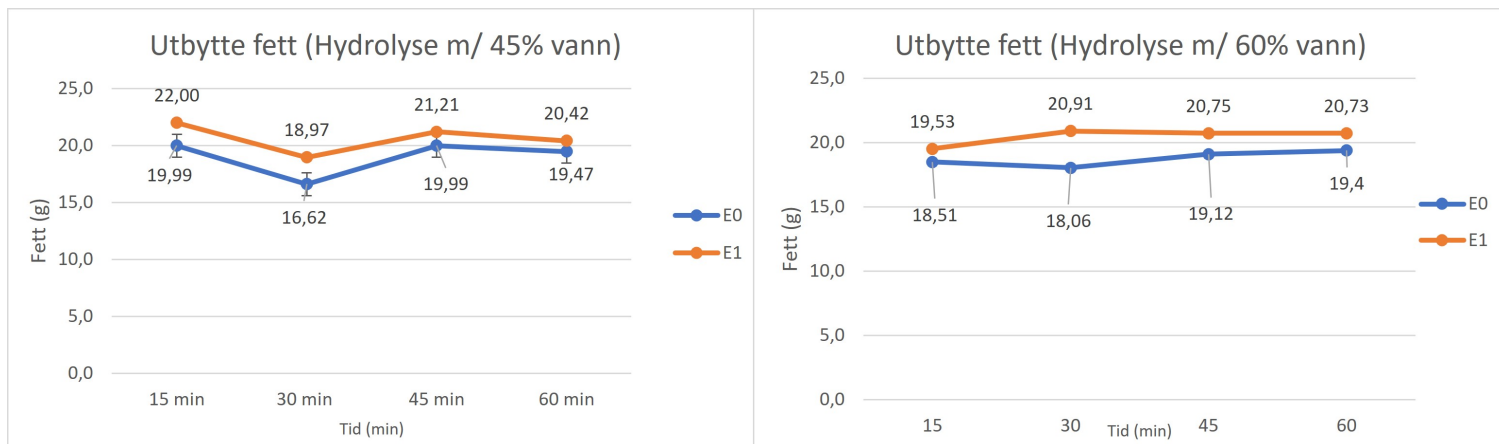
til 30-32%. I studien Slizyte mfl. (2004) hadde mengden vann tilatt redusert eller økt, ingen effekt på resultatet for graden av hydrolyse. I kontrast fant Valencia mfl. (2021) at DH ble påvirket av mindre vann tilsatt. Lavere DH ble oppnådd for hydrolyser med lite vann (0:100 og 25:75) sammenlignet med hydrolyse med mye vann (50:50). Resultatene i denne studien peker på at den mengden vann redusert i denne studien ikke er tilstrekkelig nok til å påvirke DH.

Resultatene fra seksjon *Utbytte proteinhydrolysat* 7.5 og *Mengde protein i PH* 7.8 viser tydelig at E1 gjenvinner mer protein fra RRS sammenlignet med E0 til tross for at enzymene har lik DH. Dette kan skyldes at E0 fortsetter å spalte protein og peptider tilgjengelig i PH til mindre peptider. Resultatet fra seksjon *Molvektdeling* 7.6 indikerer at E0 produserer flere molkyler med lavvekt, sammenlignet med E1. Dette vil bli mer diskutert i seksjon 7.6.

7.3 Utbytte fett

Gravimetrisk analyse ble benyttet for å kvantifisere fettutbyttet. Data presentert i figur 7.5 gir en direkte sammenligning av fettutbyttet under to forskjellige vannforhold og hydrolysetidene 15, 30, 45 og 60 minutter. Det laveste fettutbytte ble observert i prøve E03045 (16,62g) mens det høyeste ble observert i E11545 (22,00g). For alle hydrolysetider ble det registret høyere fettutbytte for prøven E1, sammenlignet med prøver behandlet med enzym E0, uavhengig av vannforholdene. Variasjonen i fettutbytte mellom E0 og E1 varierte fra 0,97g til 2g. Disse observasjonene indikerer at enzym E1 fremviser en generelt forbedret evne til å hydrolysere fett fra restråstoff (RRS) under de eksperimentelle betingelsene anvendt i denne studien.

Fra to parallelle hydrolyser med ulikt vannforhold i 60 minutter indikerte resultatene at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom vannforholdene når det kommer til utbyttet av fett for verken E0 eller E1 etter 60 minutters hydrolyse. I snitt hadde E06045 = 18,31g ± 1,55 fett og E06060 = 19,03g ± 0,62 fett, mens E16045 = 20,81g ± 0,11 fett og E16060 = 20,78g ± 0,52 fett. Ved å senke vannforholdet fra 60% til 45% vil det ikke ha en negativ konsekvens på utbyttet av fett.



Figur 7.5: Utbytte av fett fra to hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1. Enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoffet. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min), og ulikt vannforhold, forsøk 1, 60% vann (60:40 vann:råstoff) og forsøk 2 ved 45% vann (45:55 vann:råstoff).

Resultatene fra utbyttet av fett indikerer at det ikke observeres noen statistisk signifikant forskjell i utbytte mellom 60 % og 45 % vann ($P > 0,05$). Dette tyder på at en reduksjon i tilsatt vann fra 60 % til 45 % ikke medfører en signifikant endring i mengden fett som ekstraheres gjennom hydrolyseprosessen. Videre antyder observasjoner fra figur 7.5 at varigheten av hydrolysetiden ikke påvirker mengden ekstrahert fett i betydelig grad, med kun en marginal forskjell på ca. 1g mellom 15 og 60 minutters hydrolysetid. Imidlertid illustrerer samme figur at Enzym 1 (E1) konsekvent fremmer en mer effektiv ekstraksjon av fett fra det anvendte råstoffet sammenlignet med Enzym 0 (E0), hvilket korrelerer med funn fra tidligere forskning som involverte de samme enzymene (Phuc Vo, 2023). Phuc Vo (2023) undersøkte utbyttet av fett-fraksjonen og fikk et utbytte på 15,5g for E06060 og 16,3g for E16060 fra hydrolyse gjort med 100g RRS 60% vann, enzymløsning på 0,1% av RRS. Resultatene fra denne studien viser at det ble ekstrahert mer fett, som kan skyldes en endring i metode for ekstraksjon. I denne studien ble fett og hydrolysat pipetert ut etter sentrifugering for deretter å bli satt til kjøling, mens i metoden brukt i Phuc Vo (2023) ble prøven satt til kjøling etter sentrifugering og dagen etter ble fett og hydrolysat separert fra sedimentet.

Forskjellen mellom vannforholdene er minimale. Hydrolyse med 45% vann har høyere utbytte av fett enn hydrolyse med 60% vann. En mulig forklaring er at dette skyldes bedre tekniske ferdigheter i den manuelle ekstraksjonen, fremfor vannets påvirkning. I studien Slizyte mfl. (2004) ble det vist at reduksjon av vann ikke påvirket utbyttet av fett, som er i overensstemmelse med resultatene i denne studien.

Mohammadnezhad og Farmani (2022) oppnådde en gjenvinningsprosent mellom 24.01%–27.91%, ved å koke 240 g kyllingskinn ved ulike temperaturer. En tidligere studie av Fallah-Delavar og Farmani (2018) rapporterte at fettutbyttet fra kyllingskinn varierte mellom 30,40 % og 35,84 %, avhengig av typen protease som ble anvendt (Fallah-Delavar og Farmani, 2018). Dette underbygger at forskjeller i enzymatisk aktivitet og spesifisitet kan spille en rolle i effektiviteten av proteinhydrolyse, og dermed påvirke fettutbyttet. Tilsvarende, i studien utført av Farmani og Rostammiri (2015), ble det rapportert et

fettutbytte på 38,95 % fra 100g kyllingskinn restråstoff. (Farmani og Rostammiri, 2015). Disse funnene understreker at enzymvalg kan ha en betydning for optimalisert fettutbyttet. Dette er i Overensstemmelse med resultatene i denne studien.

Phuc Vo (2023) undersøkte den kjemisk sammensetning av kylling restråstoff. Studien kom frem til at råstoffet består av ca 23,4g \pm 2,0 fett. Resultatene i figur 7.5 tyder på at mellom 82-88% fett fra råstoffet utvinnes etter 15 minutter hydrolyse. Fra seksjon *Fett i sediment* 7.4.3 viser resultatene et estimat på 10-15% av fett var igjen i sedimentet etter 60 minutter hydrolyse. Fettinnholdet i proteinhydrolysatet ble ikke analysert, men det er grunn til å tro at fettinnholdet i proteinhydrolysatet er veldig lite basert på resultatene fra seksjon *utbytte fett* og seksjon *Fett i sediment*. Mengden fett i sediment og PH blir nærmere diskutert i senere seksjon *Fett i sediment* 7.4.3

Studien Šližytė mfl. (2005) så på utbytte og sammensetning av forskjellige fraksjoner oppnådd etter enzymatisk hydrolyse av biprodukter fra torsk. Funnene i studien viste at mengden emulsjon økte med mengden fett i reststoffet og det ble vist at prosentandelen løselig protein var avhengig lipidinnholdet i reststoffet. Studien sier at mengden fett i restråmaterialet bør minimum være 8.5g/100g RRS for at det skal dannes emulsjon og at det bør være over 16.5 g/100g proteiner i restråmaterialet for å minimere emulsjon. Dette gir grunnlag for videre studier å se på effekten av å fjerne fett fra RRS før i gangsetting med enzymatisk hydrolyse og studere hvordan dette påvirker mengden emulsjon dannet og utbytte av protein i PH. I studien Mohammadnezhad og Farmani (2022) ble mellom 24.01%–27.91% fett gjenvunnet ved å koke 240 g kyllingskinn ved ulike temperaturer. I studien Piette mfl. (2001) blir det sagt å ekstrahere fett ved 60 °C eller mer i 15 minutter (hovedsaklig for å unngå kontaminering av bakterier) , men at det også var mulig å ekstrahere store mengder fett ved 50 °C, dersom skinnen ble godt kvernet. Ved 50 °C og kverningsgrad på 9.5 og 0.2 ble 51.5% og 87.3% fett ekstrahert respektivt. For 80 °C var det 75,6 og 89,6% respektivt. Yao mfl. (2020) undersøket effekten av forhåndsbehandling med lipase på pulverisert benfraksjoner. Studien konkluderer med at lipase forbehandling ville være en økonomisk og effektiv forbehandlingsmetode for ekstraksjon og utnyttelse av beinproteiner. Disse studiene danner et grunnlag for å utforske produktutbytte av PH ved å fjerne fett før hydrolysestart.

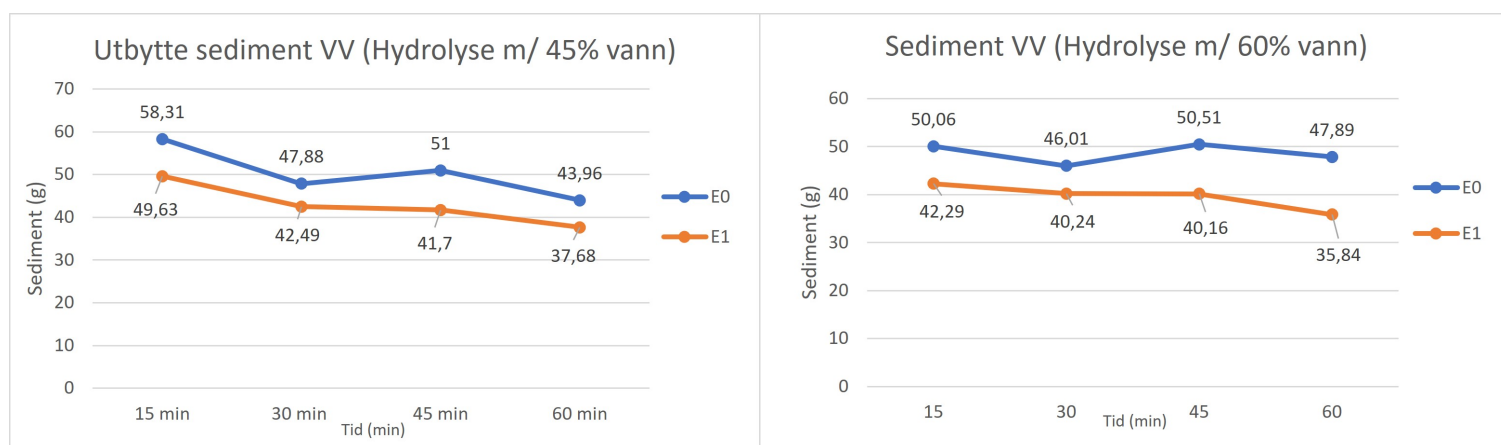
7.4 Utbyttet sediment

7.4.1 Vått sediment

Sedimentutbyttet fra hydrolyse ble målt gjennom gravimetrisk analyse etter en initiell hydrolyserunde og separasjon av faser. Resultatene av disse målingene er illustrert i figur 7.6, som presenterer sammenligningen av våtvekten av sediment produsert av enzymene E0 og E1 fra hydrolysetidene 15, 30, 45 og 60 minutter, ved vannforhold 45% (45:55) og 60%(60:40). En markant reduksjon i sedimentmengden ble observert for begge enzymene, E0 og E1, ved et vannforhold på 45%. For enzym E0 (E01545) ble en vekt på 58,31g registrert, som deretter avtok til 43,96g etter 60 min hydrolysetid. Tilsvarende hadde enzym E1 (E11545) en reduksjon fra 49,63g til 37,68g over samme tidsramme, noe som tilsvarer en netto reduksjon på henholdsvis 14,35g og 11,95g. I kontrast til dette ble ikke en lignende nedgang i sedimentvekt observert ved et vannforhold på 60%. Høyeste utbytte av

sediment for 60% vann var på 50, 51 etter 45 minutter og 42,29 etter 15 minutter for E0 og E1 respektivt. Differansen i sedimentvekt mellom 15 minutter og 60 minutter for E0 og E1 ble målt til henholdsvis 2,17g og 6,45g. For både 45% og 60% vann viste E1 lavere sediment utbyttet.

Fra to parallelle hydrolyser med ulikt vannforhold i 60 minutter indikerte resultatene at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom vannforholdene når det kommer til utbyttet av vått sediment for verken E0 eller E1 etter 60 minutters hydrolyse. I snitt hadde E06045 = 41,85g ± 2,98 og E06060 = 47,97g ± 0,11 vått sediment, mens E16045 = 42,01g ± 6,12 og E16060 = 40,35g ± 6,38 vått sediment. Ved å senke vannforholdet fra 60% til 45% er det grunn til å tro at mindre vann ikke påvirker utbyttet av vått sediment etter 60 minutter hydrolyse.



Figur 7.6: Utbytte av vått sediment fra to hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1. en av enzymløsning var 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min), og ulikt vannforhold, forsøk 1, 60% vann (60:40 vann:råstoff) og forsøk 2 ved 45% vann (45:55 vann:råstoff)

Som det fremkommer senere i denne studien, i Seksjon 7.1, utgjør sedimentfraksjonen en vesentlig del av det gjenværende råmaterialet etter hydrolyseprosessen, og kan derfor være relevant å undersøke nærmere.

Videre viser resultatene at justeringer i vannmengden som tilsettes hydrolyseprosessen, fra et forhold på 60:40 vann:råstoff til 45:55, ikke signifikant påvirker sedimentutbyttet etter 60 minutter. Det som observeres i resultatene og som skiller vannforholdene er utbyttet etter 15 minutter. Utbytte fra 45% vann er ca 8 og 7 gram høyere for E0 og E1 respektivt, sammenlignet med utbyttet fra 60% etter 15 minutter. Med 45% vann har enzymene en mye brattere nedgang i sediment enn det som blitt observert for enzymene under 60% vann. Etter 60 minutter er forskjellen mellom vannforholdene ikke like store, det er ca 2 gram forskjell mellom E1 og 4 gram forskjell mellom E0. Interessant er nedgangen til E0 60% vann som starter på 50g går ned til 46g, opp igjen til 50 og etter 60 min hydrolyse avslutter på 47,89g som er 4g høyere enn E0 ved 45%. Dette kan skyldes faktorer som mer vann, fett eller emulsjon i prøven som ikke ble ekstrahert. Resultatet fra 7.4.2 viser en tydelig forventet

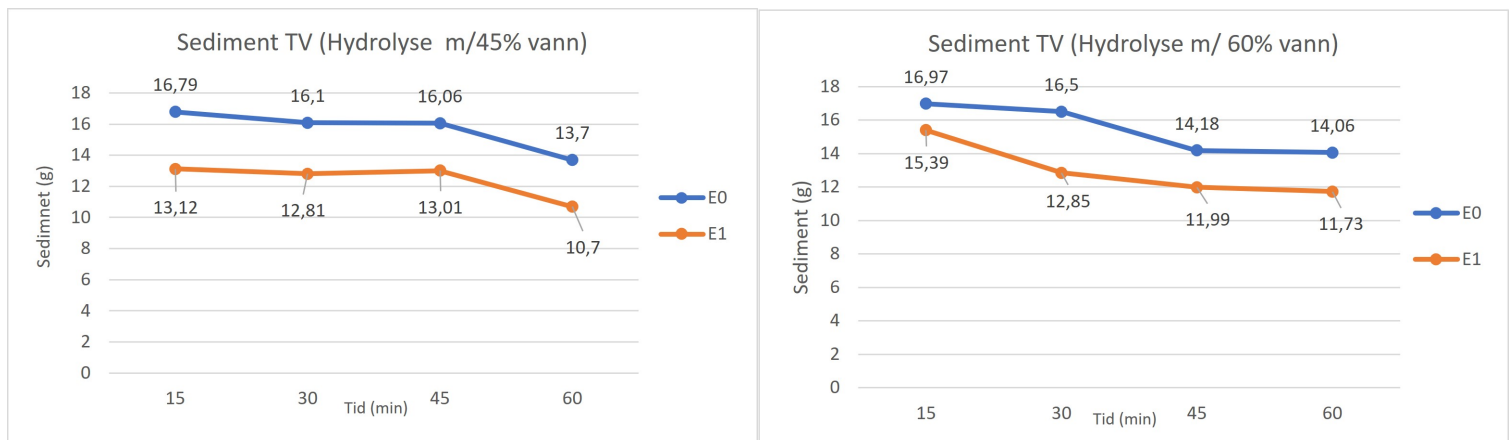
nedgang i utbyttet av sediment for E0/E1, 45/60% vann som er i tråd med senere resultater i seksjon 7.5 utbytte proteinhydrolysat (PH).

Det er regelmessig observert at enzym 1 resulterer i det laveste sedimentutbyttet. Dette antyder at Enzym 1 er mer effektivt i å tilgjengeliggjøre proteiner i sedimentet, slik at disse kan overføres til hydrolysatet. Dette resultatet stemmer også overens med resultatet fra utbyttet av proteinhydrolysat 7.5. Analyser av utbyttet fra vått sediment avslører at det er en invers korrelasjon mellom hydrolysetidens lengde og sedimentutbytte, en observasjon som er i overensstemmelse med forventningene. Den enzymatiske nedbrytningen av proteinbindinger til mindre proteiner og peptider forklarer denne tendensen, da peptidene lettere kan diffundere fra sedimentet til hydrolysatet Adhikari mfl., 2018 Tavano, 2013, Zhou mfl., 2023. Dette resultatet kombinert med resultatet fra utbytte tørket sediment 7.4.2 og resultatene fra seksjon 7.5 utbytte proteinhydrolysat tyder på at hydrolysen bør gå i minst 60 minutter, men at vannforholdet ikke nødvendigvis påvirker utbyttet av PH.

7.4.2 Tørekt sediment

Utbytte av det frysetørkede sedimentet ble gravimetrisk bestmet. Enzym 0 hadde jevnt over høyest utbyttet av sediment for begge vannforholdene. Etter 15 minutter var utbyttet 16,79g for E0 og 13,12g for E1 ved 45% vann. Etter 60 minutter var utbyttet 13,7g og 10,7g for E0 og E1 respektivt etter hydrolyse med 45% vann. For hydrolyse med 60% vann var utbyttet 16,97g og 15,39g etter 15 min for E0 og E1 respektivt. Utbyttet sank til 14,06g og 11,73g for E0 og E1 respektivt.

Fra to parallelle hydrolyser med ulikt vannforhold i 60 minutter indikerte resultatene at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom vannforholdene når det kommer til utbyttet av tørket sediment for verken E0 eller E1 etter 60 minutters hydrolyse. I snitt hadde E06045 = 12,97 g \pm 1,03 og E06060 = 14,73g \pm 0,95, mens E16045 = 12,57g \pm 2,64 og E16060 = 11,14g \pm 0,84. Ved å senke vannforholdet fra 60% til 45% er det grunn til å tro at mindre vann ikke påvirker utbyttet av tørekt sediment etter 60 minutter hydrolyse.



Figur 7.7: Utbytte av frysetørket sediment fra to hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min), og ulikt vannforhold, forsøk 1, 60% vann (60:40 vann:råstoff) og forsøk 2 ved 45% vann (45:55 vann:råstoff)

Utbyttet av tørket sediment reflekterer forventede mønstre, med en nedgang i sedimentutbyttet over tid for begge vannforhold. Enzym 1 (E1) oppnår det laveste sedimentutbyttet ved alle hydrolysetidene for 45% og 60% vann, et mønster som også gjenspeilet seg i seksjon 7.4.1 vått sediment. Denne nedgangen i sedimentutbyttet kan tilskrives en separasjon av protein og fett fra sedimentet, der proteinet diffunderer ut i vannfasen (hydrolysatet) og fettene danner en fettfase.

I studien Phuc Vo (2023) ble det oppnådd et utbyttet av tørket sediment på 17.4 og 14.0g for E0 og E1 respektivt etter 60 min hydrolyse, et klart høyere utbytte kontra resultat i denne studien (14,06g og 11,73g respektivt) I Phuc Vo (2023) viser E1 et lavere utbyttet av sediment kontra E0 som er i overensstemmelse med denne studien. I studien Tveit (2014), ble det rapportert at gjennomsnittlig utbytte av frysetørket sediment fra enzymatisk hydrolyse varierte mellom 17,9 og 25,0 g/100g. Det laveste sedimentutbyttene ble observert ved bruk av enzymene Papain og Bromelain, mens det høyeste utbyttet ble oppnådd ved anvendelse av kun endogene enzymer. Dette resultatet kan indikere at Enzym 1 (E1) og Enzym 0 (E0) er mer effektive i å tilgjengeliggjøre protein enn de kommersielle og endogene enzymene benyttet i studien fra 2014. Reinstråstoffet bestod hovedsakelig av en blanding av brusk, knuste bein, skinn, muskler og fettvev. Et råstoff som i likhet med denne studien består av skinn og beinfraksjoner.

Kurven for E0 og E1 ved 45% vann har i figur 7.7 tilnærmet lik progresjon, med en brattere nedgang i utbytte fra hydrolysetid 45 til 60min. Dette kan bety at ved 45% vann bruker begge enzymene like lang tid på å bearbeide råstoffet til vannløselige peptider og proteiner. Resultatet tyder på at det etter hydrolyse i 60 min ble skilt ut mer av det som trolig er løselig protein. Denne markante nedgangen i figur 7.7 kan ikke dirkete sammenlignes med figur 7.12 fra seksjon *Mengde protein i PH* 7.5, annet enn at det er mer tørket PH etter 60 minutter, enn ved 45 minutter hydrolysetid.

E0 og E1 ved 60% vann har ikke samme progressive kurve som det enzymene ved 45% vann hadde. Ut i fra 7.7 ser det ut til at det meste av tilgjengeliggjøring av proteiner skjer mellom 30 og 45 minutter hydrolysetid for E0 og mellom 15 og 45min for E1, da det for disse tidene er en merkbar nedgang i utbyttet, mens for hydrolysetid 60 er kurven nesten flat for både E0 og E1. Dette står i kontrast med enzymene med 45% vann, da det her ser ut som det meste av tilgjengeliggjøringen skjer mellom 45 min og 60 min hydrolysetid.

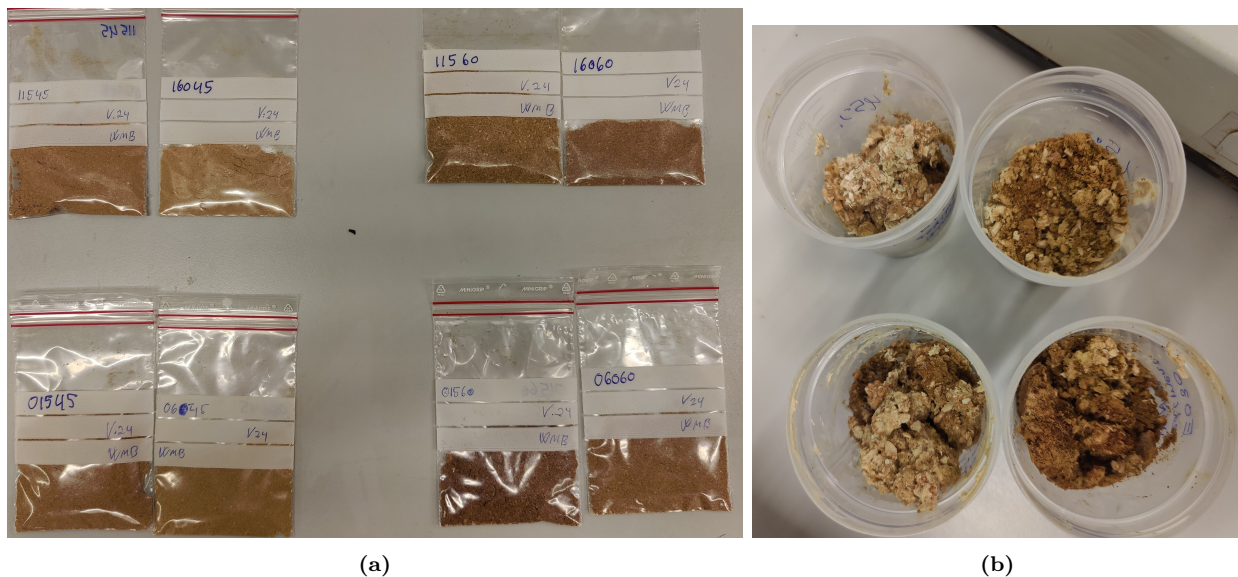
En viktig forskjell som observeres er mellom vannforholdene er E06045 har et lavere utbytte enn E06060. Enzymene starter på nesten samme vekt 16,79g og 16,97g og ender på 13,7g og 14,06g respektivt. En forskjell på nesten 1 g ble observert, noe som reiser spørsmål om hvorvidt E0 oppnår et bedre utbytte med mer vann i hydrolysen. Denne hypotesen blir ytterligere forsterket av resultatene fra *Utbytte Protein hydrolysat* 7.5 og *Mengde protein i sediment og PH* 7.8. Resultatet fra 7.5 viser et marginalt høyere utbytte av PH for E06045 sammenlignet med E06060 og fra 7.8 viser resultatet (Tabell 7.8) at det er over 10 gram mer protein i sedimentet for E06060 enn hva det er for E06045.

Derimot, ble det for alle hydrolysetidene med 60% vann tatt ut en gelfase. Det observerte laget av gelfase kan potensielt være koagulerte proteiner. For å bekrefte denne hypotesen er flere analyser nødvendig, ettersom det ikke ble gjort analyser på gelen i denne studien.

Mengden gel i våtvekt som ble tatt ut for E0 var på det laveste 1,4 og det høyeste 18,25g. Det må tas i betraktning at fjerning av gel fasen ikke påvirker utbyttet av tørket sediment, men kan forklare ujevnt utbytte av PH. Dette blir gått mer innpå i seksjon *Utbytte gel 7.5.1*.

Resultatene viser at E16060 har et høyere utbytte av tørket sediment i motsetning til E16045, men dette kan i motsetning skyldes at startvekten til E16060 er vesentlig høyere enn E16045. I tillegg har E16060 mistet mer masse mellom 15 og 60 min hydrolyse enn E16045. Derfor er det ikke like klart om E1 oppnår lik eller mindre utbyttet med mindre vann tilsatt. Dette støttes også av resultatene fra seksjon *7.5 Utbytte PH* som viser et merkant høyere utbyttet av PH .

En interessant observasjon relatert til det tørkede sedimentet er at sedimentet fra hydrolyseprosessen med 60% vanninnhold syntes å være mørkere enn sedimentet fra prosessen med 45% vanninnhold, som illustrert i Figur 7.8. Det kan være flere årsaker til denne fargeforskjellen. En av disse kan være graden av tørking sedimentet har gjennomgått, en annen kan være forskjeller i fettinnholdet i sedimentet. Imidlertid, som det senere blir diskutert i seksjon *Fett i sediment 7.4.3*, var det minimalt med fett i sedimentene, noe som indikerer at fettinnholdet sannsynligvis ikke er hovedårsaken til fargeforskjellen. Uten ytterligere analytiske data er det imidlertid vanskelig å fastslå den nøyaktige årsaken til fargeforskjellen mellom de to sedimentene.



Figur 7.8: a= frysetørket og kvernet sediment, b= frysetørket sediment.

7.4.3 Fett i sediment og fettgjenvinning

Bligh og Dyer (1959) tilpasset for å ekstrahere fett fra tørket sedimentet ble brukt på prøvene E06060, E16060, E06045 og E16045. Fra 1g sediment ble det ekstrahert mellom 1,85 - 3,51g fett. Prosent andelen fett i sediment varierte mellom 17,25 % til 25,64%. Størst mengde fett ekstrahert var fra E06045 (25,64% tilsvarende 3,51g fett) og laveste var fra E16045 (17,25% tilsvarende 1,85g fett). Tabell 7.7 oppsummerer resultatet fra ekstraksjonen av fett fra tørket sediment. Ekstraksjon av fett fra sedimentet ved hjelp av mikrometoden viste seg å være utfordrende, hovedsakelig på grunn av det lave fettinnholdet i prøvene. Selv om analysen ble utført med tre paralleller, kunne kun én parallell brukes for beregning av resultatet, noe som reduserer påliteligheten til disse resultatene.

Tabell 7.7: Tabellen presenterer en oversikt over fett ekstrahert fra hydrolyseprosessen, fett gjenvunnet fra sediment og den totale prosentandel fet i RRS. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Hydrolysetid på 60 min, vannforhold, 45% og 60%

Type Hydrolyse	E06060	E16060	E06045	E16045
Fett i fettfraksjon (g/100g RRS)	19,4	20,73	19,47	20,42
Fett i sediment (g/100g RRS)	2,43	2,47	3,51	1,85
Totalt fett (g/100g RRS)	21,83	23,16	22,98	22,27
Fettgjenvinning (%) fettfraskjon	82,91	88,59	83,21	87,26
Fettgjenvinning (%) sediment	10,36	10,55	15,01	7,89
Totalt fett gjenvunnet fra RRS (%)	93,27	99,14	98,22	95,15

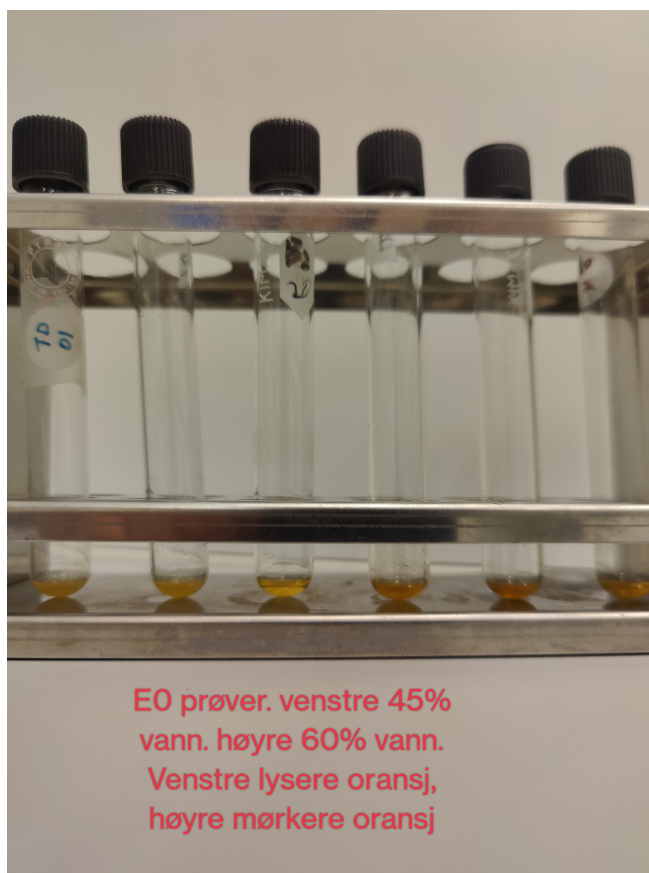
Tabell 7.7 oppsummerer resultatene for fettutbyttet etter 60 minutters hydrolyse med 45% og 60% tilsatt vann. Resultatene viser ingen signifikant forskjell i fettutbytte mellom de to vannforholdene, eller mellom enzymene E0 og E1. Totale fettgjenvinningen var høy for begge enzymene og vannforholdene (93-99%), noe som indikerer at mesteparten av fett ble ekstrahert til fettfasen og sedimentet. Dette samsvarer med funnene til Tveit (2014) som rapporterte en total fettgjenvinning på 93-103% fra restråstoff med bein og skinnfraksjoner etter 60 min hydrolyse.

Midlertid ble det observert en noe høyere andel fett i sedimentet i denne studien (10-15%) sammenlignet med Tveit (2014) (5-6%). Forskjellen i fettinnhold i sedimentet mellom denne studien og Tveit (2014) kan skyldes variasjoner i råstoffets sammensetning eller hydrolysebetingelsene. Imidlertid kan ikke metodologiske faktorer utelukkes som en mulig bidragsyter til de høyere verdiene observert i denne studien. En gjentatt analyse med Bligh og Dyer-metoden (1959) kunne bidratt til å avklare dette. Det er også verdt å merke seg at Tveit (2014) fant mellom 0.0 – 0.1% fett i frysetørket proteinhydrolysat (PH), noe som støtter antagelsen om at fettinnholdet i PH i vår studie også er lavt.

Resultatene indikerer en mulig, men ikke statistisk signifikant, tendens til at E1 gir et marginalt høyere fettutbytte i fettfasen sammenlignet med E0. Det ble ikke observert noen klar trend som indikerer at en spesifikk kombinasjon av enzym og vannforhold er optimal for fettgjenvinning. Selv om E1 ved 60 minutters hydrolyse og 60% vann ser ut til å gi

høyest fettutbytte (estimert til 99%), må denne observasjonen tolkes med forsiktighet på grunn av det begrensede datagrunnlaget. Ytterligere undersøkelser med flere replikater og statistisk analyse er nødvendig for å kunne trekke definitive konklusjoner om optimale betingelser for fettgjenvinning.

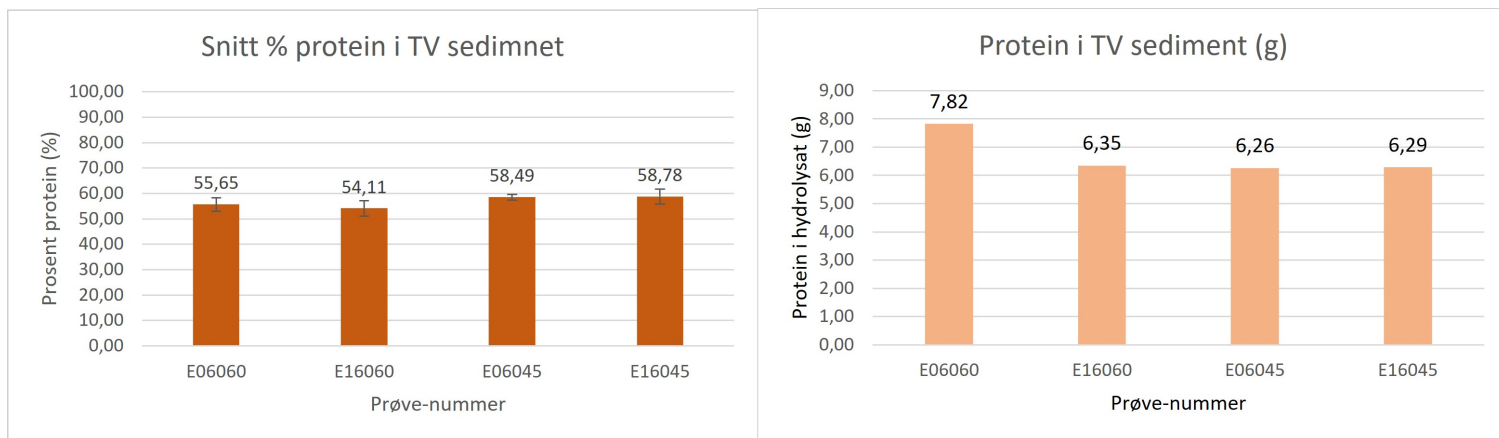
En interessant observasjon relatert til fettutvinningen er den påviste fargeforskjellen på fettene som er avhengig av vannforholdene. Fettet fra prøver med 60 % vannforhold var mørkere enn fettene fra prøver med 45 % vann. Denne fargeforskjellen, som er dokumentert i 7.9 kan indikere ulike aspekter ved fettets kvalitet eller sammensetning. Fargen på fett er hovedsakelig relatert til tilstedeværelsen av karotenoidpigmenter (gul-rød farge) (Mohammadnezhad og Farmani, 2022).



Figur 7.9: Mengden fett ekstrahert fra sediment. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Hydrolysetid på 60 min, vannforhold, 45% og 60%

7.4.4 Mengden protein i sediment

Sedimentutbyttet for prøver hydrolysert i 60 minutter under 60% vann ga et gjennomsnitt på 55,65% for Enzym 0 og 54,11% for Enzym 1 over fem paralleller. For prøver hydrolysert under 45% vann, var det gjennomsnittlige sedimentutbyttet for Enzym 0 og Enzym 1 henholdsvis 58,49% og 58,78%. Figur 7.10 viser en sammenligning mellom prosentandelen protein i sediment og hvor mange gram protein dette utgjør totalt i sediment.



Figur 7.10: Sammenligning mellom prosentandel protein i tørket sediment og hvor mange gram protein dette utgjør totalt i sedimentet. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Hydrolysetid på 60 min, vannforhold, 45% og 60%

Fra analysen av proteininnholdet i sedimentet, viser det seg at det generelt ikke er store forskjeller mellom de ulike vannforholdene eller enzymene. Imidlertid viser resultatene at prøven E06060 skiller seg ut med et høyere proteininnhold på 7,82 gram i sediment, sammenlignet med de andre prøvene (E16060, E06045, og E16045) som har proteinverdier i området 6,29 til 6,35 gram. Denne observasjonen av høyere proteinmengde i sedimentet fra E06060 kan bidra til å forklare hvorfor denne prøven viste lavt proteininnhold i proteinhydrolysatet (PH). Dette indikerer at en større del av proteinene ikke ble brutt ned og gjort tilgjengelig i hydrolysat under prosessen, men ble heller igjen i sedimentet.

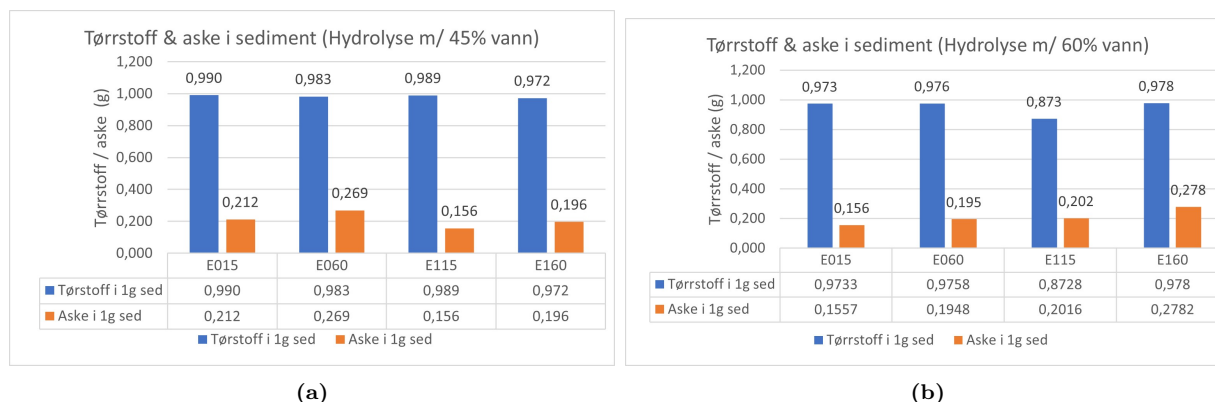
Tabell 7.8 viser hvordan protein fra råstoffet fordeler seg på protein og sediment. Resultatet viser at det er en stor forskjell mellom Enzym 0 (E0) og Enzym 1 (E1) for gjenvinning av protein i PH. E06060 hadde den laveste gjenvinningen med kun 34,84 %, etterfulgt av E06045 med 37,21 %. På den annen side oppnådde E16060 en gjenvinningsprosent på 59,97 % og E16045 på 50,01 %. Samme gjenvinningsprosent ble observert for enzym 1 i tidligere studie gjort av Lindberg mfl. (2021a). I seksjon *Mengde protein i hydrolysat* 7.8 blir fordeling av proteiner fra RRS i sediment og PH gått nærmere inn på.

Tabell 7.8: Mengden protein fra 100g restråstoff fordelt på sediment og proteinhydrolysat. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Hydrolysetid på 60 min, vannforhold, 45% og 60%

Protein fra 100g råstoff fordelt i PH og sediment (%)				
	E06060	E16060	E06045	E16045
Protein hydrolysat	34,84	59,97	37,21	50,01
Sediment	57,53	46,67	46,02	46,24

7.4.5 Tørrstoff og aske i sediment

Tørrstoff- og askeinnhold ble bestemt for frysetørket sedimentprøver E01560, E06060, E11560, E16060, E01545, E06045, E11545, og E16045. Resultatene viser at tørrstoffinnholdet generelt varierte mellom 97-99%, mens askeinnholdet lå i området 15-20%. Imidlertid ble det observert et markant høyere askeinnhold for prøvene E06045 (26,9%) og E16060 (27,8%).



Figur 7.11: a = tørrstoff og aske fra hydrolyse med 45% vann, hydrolysetid 15,60 min. b = Tørrstoff og aske fra hydrolyse med 60% vann, hydrolysetid 15,60 min. Hydrolysen ble gjennomført med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1. en av enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoffet.

Vanninnholdet i sedimentet er vist å være mellom 1-3% for prøver med 15 og 60 minutters hydrolysetid og er i overensstemmelse med studien Tveit (2014) som dokumenterte et vanninnhold på (5 – 7,5%). Unntaket var for prøve E11560 som hadde et tørrstoff innhold på 87% og et vanninnhold på 13%. Dette avviket kan skyldes ufullstendig frysetørring av prøven.

Resultatet fra askeinnhold er i overensstemmelse med resultatene fra Phuc Vo (2023), som også rapportert askeinnhold som en indikator på tilstedeværelsen av mineraler, ofte forbundet med beinvev. Andre tidligere studier har vist en sammenheng mellom høyt askeinnhold og tilstedeværelsen av beinvev (Volpato mfl., 2022, Garcia og Phillips, 2009). Disse studiene ble gjort i sammengen med produkter fra enzymatisk hydrolyse av fjørfe der restråstoffet inneholdt betydelige mengder bein. Dette gir nyttig innsikt i sammensetningen av sedimentene og kan være spesielt relevant for anvendelser hvor mineralinnholdet er av interesse, som i tilfeller av næringsmiddelproduksjon.

Asken i sedimentet utgjør en betydelig andel av den totale asken i restråstoffet (RRS). For prøvene E01560, E06060, E11560 og E16060 (60% vann) utgjør asken i sedimentet 77,71, 68,46, 77,57, 81,57% av den totale asken i RRS respektivt. For prøvene E01545, E06045, E11545 og E16045 (45%) vann utgjør asken i sedimentet 88,84, 92,07, 51,31, 52,43% av den totale asken i RRS. Økningen i askeinnhold over tid skyldes sannsynligvis at protein gradvis fjernes fra sedimentet, noe som øker forholdet mellom aske og tørrstoff.

Resultatene viser ingen klar forskjell i askeinnhold mellom enzymene eller mellom vannforholdene, med unntak av de lave verdiene for E11545 og E16045 (51% og 52%). Årsaken til dette avviket er uklart, og tidligere resultater i denne studien gir ingen entydig

forklaring. I denne studien ble askeinnhold ikke gjort på fett eller PH fasen, men i tidligere stuide av bein og skinnfraksjoner gjort av Tveit (2014) ble det vist at askeinnholdet i proteinhydrolysatet (PH) kan variere mellom 6,2% og 13,1%, avhengig av enzym. For å få en dypere forståelse av askefordelingen i de ulike fraksjonene, vil det være nødvendig med ytterligere analyser av PH, fettfasen og emulsjonen i fremtidige studier.

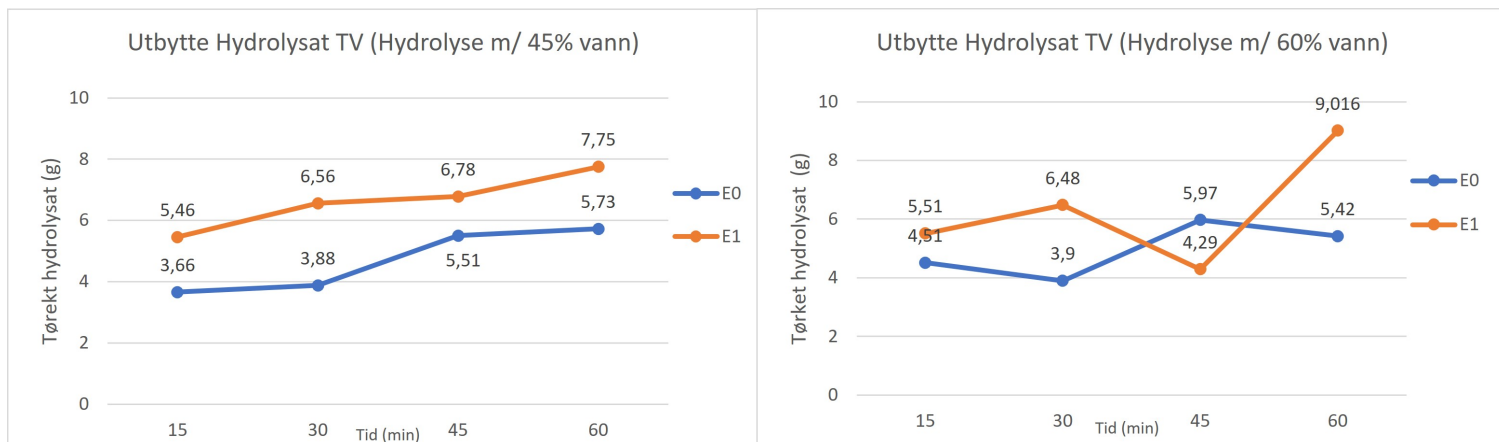
7.5 Utbytte proteinhydrolysat

Frysetørkede prøver ble gravimetrisk bestemt og utbyttet er illustrert i figur 7.12. Hydrolyse med 60% vann ga et utbytte på mellom 3,9-5,97g og 4,20 - 9,016g PH for E0 og E1 respektivt. E1 hadde det høyeste utbytte på 9,016g etter 60 minutter, mens E0 hadde sitt høyeste utbytte etter 45 minutter på 5,97g. Etter 60 minutter var utbyttet for E0 5.42g. Laveste utbyttet ble registrert av E1 etter 45 min på 4,20g. Det lave utbyttet er et resultat av en skade på frysetørkkoppen, noe som resulterte i tap av PH. Figur 7.12 illustrer en stigende trend i utbyttet for E1, med unntak for 45 min hydrolyse som skyldes tap PH. Sitt bort i fra 45 min hydrolyse har E1 jevnt over et høyere utbytte sammenlignet med E0. Sammenlignet med E1 har E0 en ikke like klar trend i utbyttet. Etter 30 min hydrolyse synker utbyttet (4,51-3,9g) før det igjen stiger etter 45min (3,9-5,97g) og synker igjen etter 60 min hydrolyse (5,97-5,42g). Denne svingingen i utbytte kan muligens forklares ved tap av protein gjennom en gelfase som ble tatt ut for E0 og E1 ved 60% vann. Dette blir gått nærmere på i seksjon 7.15.

Ved et vannforhold på 45% ble det observert en uniform økning i hydrolysatutbyttet over tid for E0 og E1. For alle hydrolysetider hadde E1 størst utbytte. Det laveste utbyttet ble produsert av Enzym 0 (E0) etter 15 min (3,66g), deretter etter E0, 30 min (3,88g). I kontrast genererte E1 et større utbytte ved alle tidspunktene. Største utbyttene ble registrert for E14545 (6,78g) og E16045 (7,75g).

Fra to parallelle hydrolyser med ulikt vannforhold i 60 minutter indikerte resultatene at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom vannforholdene når det kommer til utbyttet av PH for verken E0 eller E1 etter 60 minutters hydrolyse. I snitt hadde E06045 et utbytte på $5,76g \pm 0,06$ PH og E06060 hadde et utbytte på $5,67g \pm 0,21$, mens E16045 hadde et utbytte på $7,48g \pm 0,38$ og E16060 hadde $8,48g \pm 0,75$. Resultatene fra forsøkene viste at det ikke var noen statistisk signifikant forskjell på utbytte mellom vannforholdene 60% og 45% for verken E0 eller E1, gitt en p-verdi terskel på 0.05. Senke vannforholdet fra 60% til 45% vil ikke påvirke utbyttet av PH.

Signifikante forskjeller mellom E0 og E1 ble også vurdert. P-verdiene som ble registrert for (E16045) og (E06045) var 0,09. (E16060) og E0 (E06060) 0,10. Dette betyr at gitt en p-verdi terskel på 0.1 er det en signifikant forskjell i utbyttet av PH mellom E16045 og E06045. For E06060 og E16060 er det mulig, men ikke statistisk bevist, at det er en forskjell i utbyttet av PH mellom E16060 og E06060. Resultatene fra seksjon 7.4 og resultatene i denne seksjonen fra figur 7.12, samt tidligere studier (Phuc Vo, 2023) indikerer at E1 gir oftest gir høyere utbytte av PH enn E0.



Figur 7.12: Utbytte av protein hydrolysat fra to hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min), og ulikt vannforhold, forsøk 1, 60% vann (60:40 vann:råstoff) og forsøk 2 ved 45% vann (45:55 vann:råstoff)

Resultatene for proteinhydrolysat (PH) er i overensstemmelse med tidligere studie gjort av Phuc Vo (2023), hvor det observeres en økning i utbyttet av PH over tid. Phuc Vo (2023) registrert et utbytte på 5.2 og 6.6g for E0 og E1 respektivt etter 60 min hydrolyse 60% vann og hadde et lavere utbytte sammenlignet med utbytte i denne studien (5,43 og 9,02 for E0 og E1 respektivt). En grunn til det lave utbytte i studien Phuc Vo (2023) kan være tap av PH til gelfase som ble liggende igjen i sedimentet, men det må legges til at lignende ble gjort i denne studien. For E0 ble det tatt ut i våtvekt en gelfase, 1,54g på det laveste og 18,25g på det høyeste, som kan ha påvirket utbyttet av PH. I seksjon 7.15 blir dette nærmere diskutert.

Gjennomgående viser E1 høyest utbyttet for alle hydrolysetidene (15, 30, 45 og 60min). Dette er i tråd med resultatene fra seksjon *Utbytte sediment* 7.4 og funn rapportert i studien Phuc Vo (2023). Dette demonstrer at E1 har en bedre evne til å bryte ned proteiner til mindre proteiner og peptider og gjør dem tilgjengelige i hydrolysatet sammenlignet med E0.

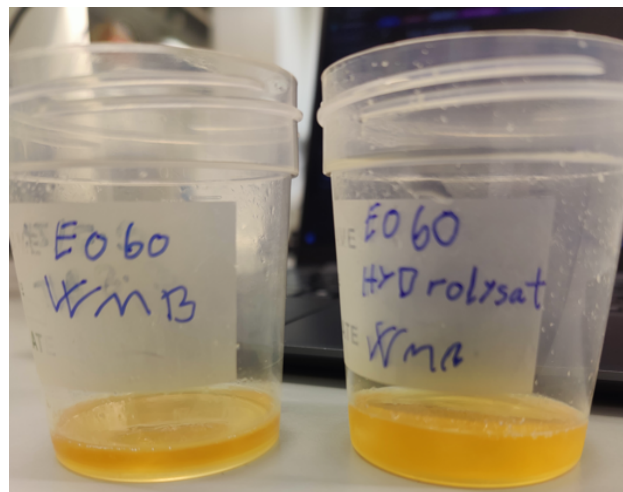
Hovedforskjellen mellom forsøk 1 (60% vann) og forsøk 2 (45% vann) er den tilsatte mengden vann. Det er flere faktorer som spiller inn under hydrolysen og som avgjør hvor stort utbyttet blir. Mengden tilsatt vann er en faktor som er vist å ha effekt på utbyttet av PH (Chiodza og Goosen, 2023, Valencia mfl., 2021, Syed og Erumalla, 2020). Tidligere omtalt i teorien 2.3.1 *Faktorer som påvirker EPH* kan mengden vann fremme tap av PH til sediment og emulsjon. I studiene Valencia mfl. (2021) og Chiodza og Goosen (2023) ble det demonstrert lavere utbytte av nitrogen og PH (respektivt) ved mindre tilsatt vann i hydrolysen. Basert på resultater i denne studien ser det ut til at reduksjon fra 60% til 45% vann ikke påvirker utbyttet negativt i stor grad. Dette kan skyldes at 45% vanninnhold gir tilstrekkelig substrattilgjengelighet, som opprettholdes og potensielt forbedres gjennom kontinuerlig røring under hydrolysen. Resultatet fra denne seksjonen 7.5 viser at optimal hydrolyse for høyest proteinutbytte ville vært enzym 1, 60 min, 60:40 vann:RRS, men som diskutert i teorien tidligere må dette avgjøres opp i mot de økonomiske aspektene. Mer vann i hydrolyseprosessen vil for det første gjøre det nødvendig med større reaktorvolum for enzymhydrolyse, og for det andre vil det være en økning i kostnader i nedstrømsprosesser for håndtering og fjerning av store

volumer vann for å produsere et tørt produkt.

Metodologiske variable spiller en vesentlig rolle i utførelsen og resultatene av vitenskapelige eksperimenter. I denne sammenhengen ble forsøk 1 gjennomført høsten 2023, mens forsøk 2 fant sted våren 2024. Selv om metodene for hydrolyse og ekstraksjon var identiske for begge forsøkene, og det samme råstoffet ble benyttet, er det viktig å anerkjenne at gjentatte gjennomføringer av et eksperiment kan bidra til forbedringer i utførelsen over tid.

Under frysetørking av PH var noen prøver vanskeligere å tørke enn andre. Dette virket tilfeldig og ikke relatert til spesifikke faktorer, men det ble observert en tendens til at prøver med lengre hydrolysetid også var vanskeligere å tørke (Figur 7.13). Selv om dette ble observert hyppigere ved lengre hydrolysetider, oppstod det også tilfeller etter kun 15 minutter (Figur 7.14). For å fastslå om det er en relasjon mellom hydrolysetid og tørkeproblemer, er det nødvendig med ytterligere undersøkelser.

Det er verdt å merke seg at alle prøver til slutt ble tørre etter gjentatte tørkesykluser, og oppnådde samme konsistens som de andre prøvene. Dette tyder på at årsaken til den ufullstendige tørkingen sannsynligvis kom av faktorer knyttet til frysetørkeren, snarere enn egenskapene til hydrolysatet.



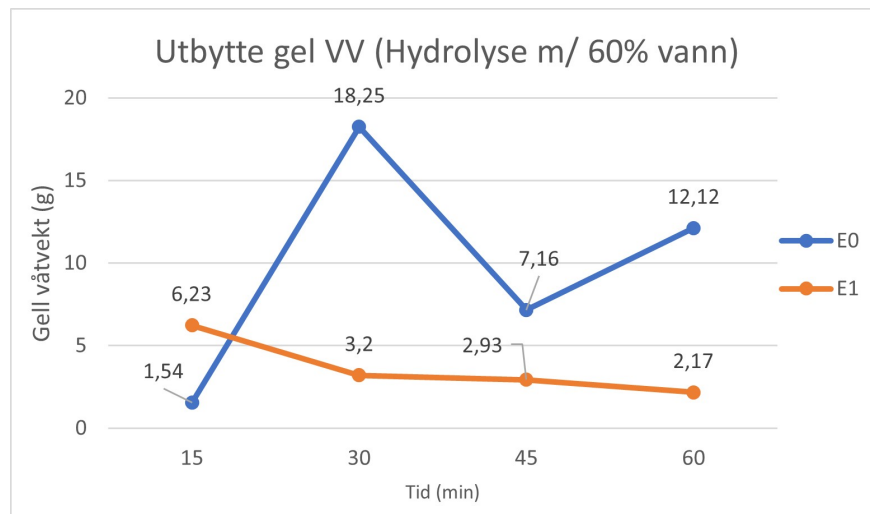
Figur 7.13: Ufullstendig frysetørket proteinhydrolysat fra 60 min hydrolyse.



Figur 7.14: Frysetørket proteinhydrolysat. To prøver fra E06060, en prøve fra E04560 og en prøve fra E01560 måtte gjennom ekstra tørking for å bli fullstendig tørr.

7.5.1 Utbytte gel

Under utførelsen av hydrolysen med et vannforhold på 60%, ble det observert en geléfase som oppstod i løpet av separasjon av fasene. Resultatet ble en tydelig mengde gele separert fra hydrolysatet for E0 og E1 etter hydrolysetidene 30, 45 og 60 minutter (7.15). E1 hadde lavest utbytte av gel, det ble registret 6,23g 3,2g 2,93g og 2,17g for hydrolysetidene 15, 30, 45, og 60 min respektivt. E0 registrerte et utbytte av gel på 1,54g 18,25g 7,16g og 12,12g etter 15, 30, 45 og 60 min hydrolysetid. Høyeste gel utbyttet var etter 30 min for enzym E0.



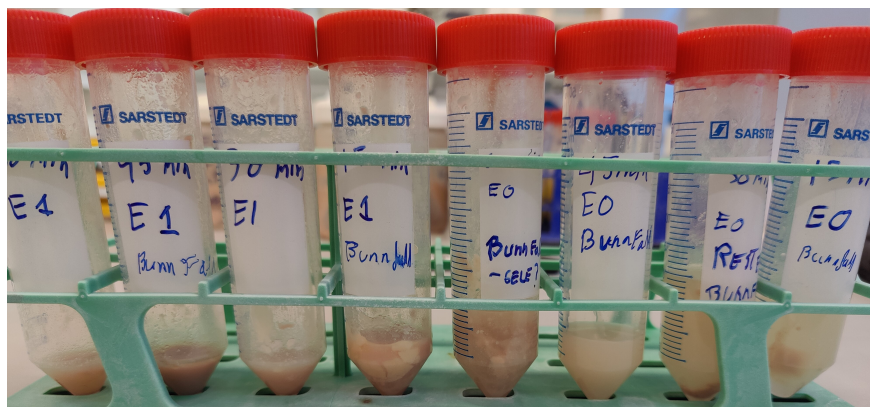
Figur 7.15: Utbytte av gel fra forsøke 1 med 60% vann. Fra to hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, 60:40 (vann:RRS) enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min)

Geléutbyttet fra hydrolyseprosessen ble separert fra resten av hydrolysatet oppnådd fra forsøk 1. E0 demonstrerte et høyere geléutbytte ved 30, 45, og 60 minutters hydrolysetid, som detaljert i figur 7.15. I kontrast, E1 oppnådde sitt høyeste geléutbytte etter bare 15 minutters hydrolysetid, med et påfølgende lavere utbytte sammenlignet med E0 ved lengre hydrolysetider.

En viktig observasjon, illustrert i figur 7.16, er at den innsamlede geléen ikke kun besto av gel, men også en betydelig mengde av urenheter, bunnfall og trolig emulsjoner. PH og fett var samlet i 50ml rør og kjølt ned over natten. Stivnet fett var igjen på toppen og PH var på bunnen. Fett ble overført til nye 50ml tuber og hydrolysat over til sentrifugekopp. Det som ble liggende igjen i 50ml rør var en geleaktig masse. Som illustrert i figur 7.16 var denne gelen litt brun for noen av prøvene. Det er derfor grunn til å tro at spesielt for enzym 1 var mye av innhode i denne gelen bunnfall og emulsjon eller andre urenheter som var blitt med over i røret da fett og PH ble separert fra sedimentet. For E1 var andelen bunnfall spesielt høy, sammenlignet med gel fra E0. Dette bunnfallet og urenheterne ble inkludert i det totale rapporterte utbyttet av gel.

For E0 var det generelt sett mer gel enn bunnfall for de fleste hydrolysetider. Dette skyldes at det meste av gel fra E0 kom etter sentrifugering av rent PH (se figur 7.17b), og ikke etter

separasjon av fett fra PH slik som gelen i figur 7.16 viser. Unntaket var ved 15 minutters hydrolysetid, hvor en betydelig mengde brunt bunnfall ble observert, som vist i figur 7.16.



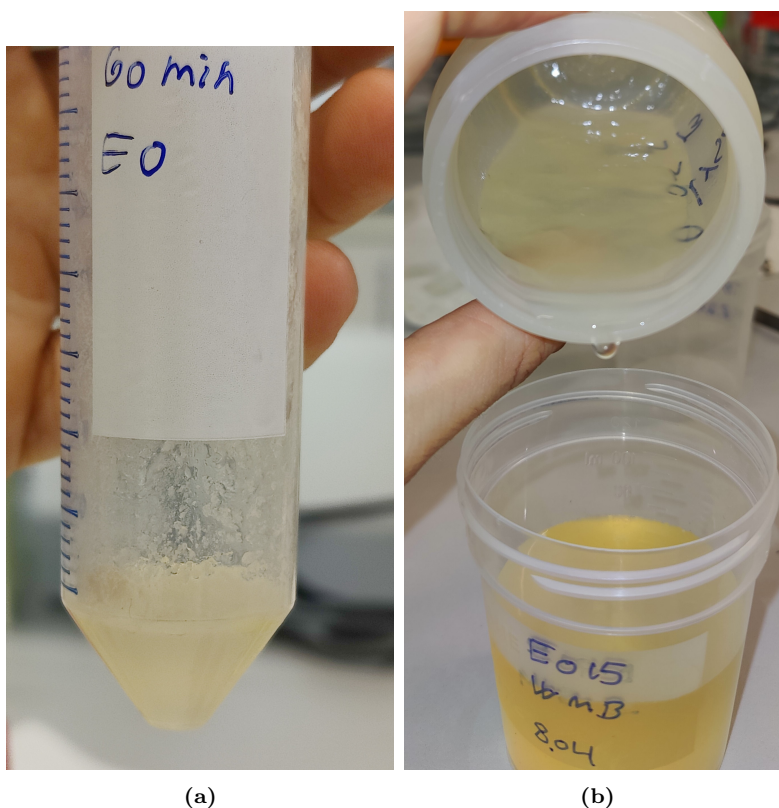
Figur 7.16: Utbytte av gel fra E1 og E0 forsøke 1 med 60% vann. Fra venstre prøve E16060, E14560, E13060, E11560, E06060, E04560, E03060, E01560. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, 60:40 (vann:RRS) enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min)

Gelen som oppstår i hydrolysatet er sannsynligvis en fraksjon hvor proteiner har koagulert og absorbert vann. Dette fenomenet blir tydelig i bildene, spesielt figur 7.17b, hvor det er observert betydelig gelédannelse. Hvis hypotesen om at gelen hovedsakelig består av koagulert protein som har bundet til seg vann holder stikk, kan dette bety at betydelige mengder protein potensielt har blitt fjernet fra hydrolysatet før frysetørking. Dette vil ha resultert i et redusert utbytte av løselige proteiner i det endelige tørkede produktet.

I denne studien ble det ikke gjort noen analyser på gelfasen. Det kan antas at denne gelen består av peptid som har aggregert eller vannløselig kollagen og gelatin. Råstoffet i denne studien består av skinn og beinfraksjoner. Kollagen er vist å være et vanlig protein i både skinn og bein (Fisinin mfl., 2017, Cliche mfl., 2003, Lasekan mfl., 2013, Schmidt mfl., 2020, Aykın-Dinçer mfl., 2017).

Phuc Vo (2023) undersøkte kollagen innholdet i proteinhydrolysatet og fant ut at per 100g prøve så ekstraherte E0 $21.2\text{g} \pm 6.4$ kollagen som tilsa en gjenvinning på $20.9\% \pm 6.3$. E1 ekstraherte $21.6\text{g} \pm 4.3$ per 100g hydrolysat prøve som tilsa en gjenvinning på $28.5\% \pm 5.7$. Kollagen kan ha en molekylvekt på opp i mot 125 KDa (Schmidt mfl., 2020) og når kollagen blir gjort tilgjengelig i PH vil den med tiden sette seg på bunnen av 50 ml rør og ses som en tykk gel. Nedbrytning av kollagen kan videre føre til dannelsen kollagenkjeder, kjent som alfa- og gamma-kjeder. Når disse blir frigjort i proteinhydrolysatet kan de ha en gelerende effekt (Lindberg mfl., 2021a). Delvis utfoldet proteiner er vist å ha en større vannbindingsevne enn proteiner i sin opprinnelige form på grunn av en økning i overflate og eksponeringen av tidligere utilgjengelige hydrofile grupper (Slizyte mfl., 2004). Videre kan dannelse av gel være forårsaket av små peptider som aggregerer. Proteinhydrolysater, spesielt fra kollagen, er kjent for å aggregere (Meyer og Morgenstern, 2003). Plastein (som det blir kalt i litteraturen) er peptider som aggregerer og danner et gel-liknende produkt. (Gong mfl., 2015). I studien Sukan og Andrews (1982) ble det vist at optimal peptid-størrelse for dannelse av plastein

var mellom 400 og 800 Da. Fra seksjon *Molekylfordeling* 7.6 indikerer resultatene at store deler av PH består av peptider ≤ 1355 Dalton (Da). Derimot er relasjonen mellom peptidets molekylære størrelse og utbytte av plastein lite undersøkt i litteraturen og det påpekes at det trengs klarer definering og mer undersøkelse (Gong mfl., 2015). Disse funnene fra tidligere studier kan forklare hvorfor vi observerte gel i hydrolysatet i denne studien. Spesielt kan tilstedeværelsen av kollagen, delvis utfoldede proteiner og peptider innenfor det optimale størrelsesområdet for plastein-dannelse ha bidratt til gel-dannelsen.



Figur 7.17: Gelfase samlet fra enzym 0 etter sentrifugering av proteinhydrolysat. a= gelfase fra 60 min hydrolysetid. b= gelfase fra 15 min hydrolysetid. Fra hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, 60:40 (vann:RRS) enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min)

Ved hydrolysen med 45% vanninnhold ble ikke gelen separert fra hydrolysatet, men inkludert videre i analyser. Basert på tidligere diskusjon om faktorer som kollagen, gelatin og plastein, som alle har gelerende egenskaper, er det sannsynlig at gelen består av aggregerte proteiner som binder vann. Ved å fjerne denne gelen før videre prosessering, er det mulig at proteininnholdet i hydrolysatet ville blitt redusert. For å få en dypere forståelse av sammensetningen av denne gel-fasen, ville det være interessant i fremtidige studier å analysere utbyttet tørrstoff, aminosyresammensetning, molekylvektfordeling og SDS-PAGE. Dette vil gi en mer detaljert oversikt over hvilke proteiner og peptider som bidrar til gel-dannelsen.

7.6 Molvektsfordeling

Molvektsfordeling til proteinhydrolysatet (PH) for hydrolysetidene 15, 30, 45 og 60 min ble analysert ved gelfiltrering. SEC ble brukt til å evaluere effekten av prosesseringsbetingelsene (tid og vann) på resulterende hydrolysatene. Figur 7.18 viste kromatogrammer fra ulike hydrolysetidene gjennomført med enzym 0 og enzym 1. Kromatogrammene var fra størrelsesutelukkeskromatografi (SEC), også kjent som gelfiltreringskromatografi (GFC), utført på et FPLC-system (Fast Protein Liquid Chromatography). Det ble kjørt en standard B12 som i figuren 7.18 er markert med en grønn stjerne og har en elueringstid ved 18-19 minutter. I studien Tveit (2014) ble standardene B12, Aprotinin og cytochrome c kjørt med en flow på 0,5 i motsetning til 0,8 som i denne studien. De to sist nevnte standardene ble ikke kjørt i dette forsøket, men er tatt med basert på elueringstiden oppgitt i Tveit (2014).

Resultatet viste et skifte i molekylvekten ved lenger hydrolysetid fra større molekylvekt til mindre. I figur 7.18 viste det et tydelig skift av topper mot høyre i kromatogrammet for 60 min hydrolyse, sammenlignet med hydrolyse i 15 min. Dette indikerte at det var flere molekyler med lav molekylvekt tilstede i prøven som hadde gjennomgått hydrolyse i 60 minutter, sammenlignet med hydrolyse som hadde kjørt i 15 minutter. Dette er i samsvar med Lindberg mfl., 2021a som også undersøkte molvektsfordelingen ved ulike hydrolysetider.

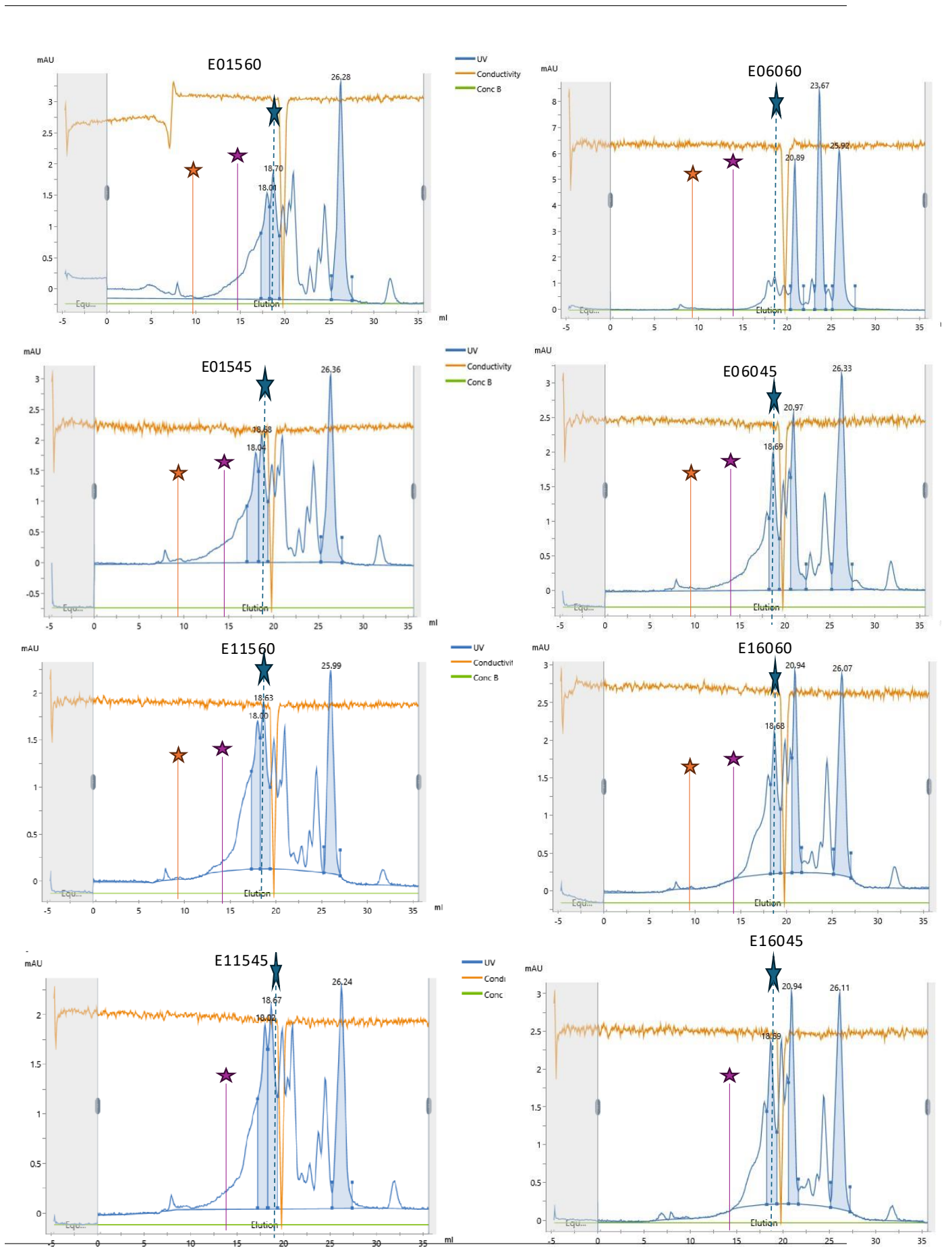


Figure 7.18

Figur 7.18: Molekylvektfordelingen til peptider fra proteinhydrolysat. Grønnstjerne = B12 (1355 Da), Lilla = Aprotinin (6511 Da), Oransje = cytochrome C (12384 Da). Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, 60:40 og 45:55 (vann:RRS) enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min)

Alle prøvene hadde en liten topp ved 6 ml (> 12000 Da), denne ble merkbart mindre med lenger hydrolysetid for alle prøvene. Videre hadde alle prøvene et lavt innhold av peptider med elueringstid 13 – 15 ml (ca. 6000 – 2000 Da), og mer fremtredende topper ved elueringstid 17 – 26 ml (< 2000 Da)

Etter 15 min hydrolyse indikerer figur 7.18 at det er lite som skiller molekylvekten mellom vannforholdene, dette gjelder for E0 og E1. Største andel av peptider har en elueringstid på mellom 17-22ml, som betyr at de har en størrelse på rundt 1350 (standard B12). Det kan derimot se ut som at etter 60 min hydrolyse har enzym 0 med vannforhold 60% flere molekyler med lav molekylvekt sammenlignet med et vannforhold ved 45%. For E06060 vises tre klare topper ved 20-22, 24-25 og 25-26. I motsetning har E0 ved 45% tre topper i området 18-20, 20-22 og 25-26 ml. Dette tyder på at E0 er mer effektiv til å bryte ned proteiner til mindre peptider ved 60% vann enn ved 45% vann. Dette kan komme av som diskutert tidligere i teorien (*Faktorer som påvirker EPH 2.3.1*) at mer vann gjør proteinet mer tilgjengelig for enzymet, og det skjer hyppigere kollisjoner mellom enzym og substrat, sammenlignet med mindre vann (Syed og Erumalla, 2020, Chiodza og Goosen, 2023)

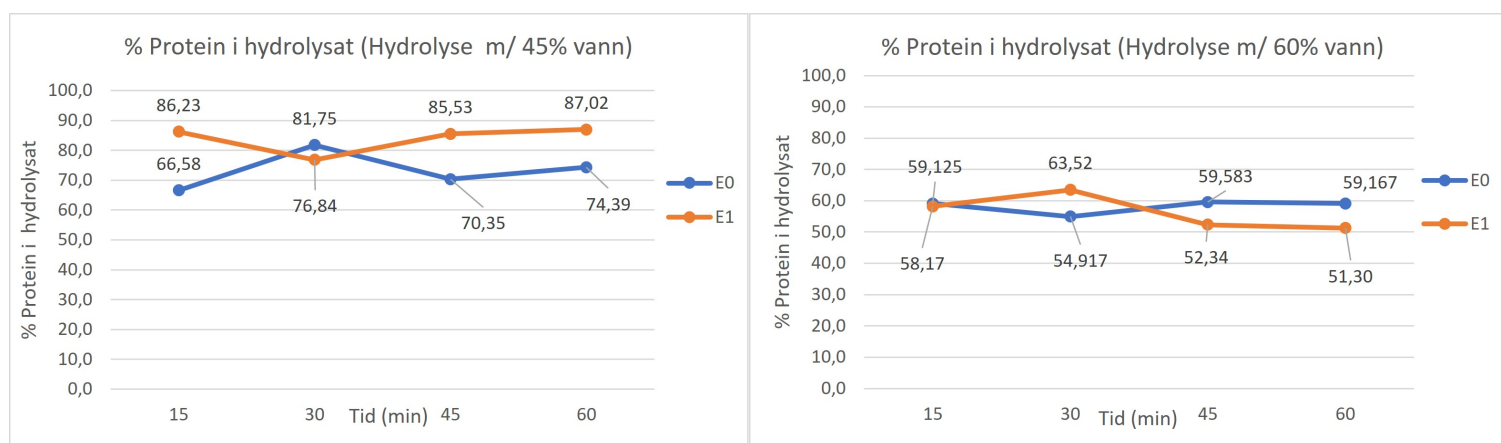
Etter 60 minutter med hydrolyse med E1 ble det vist et skift mot høyre i kromatogrammet for begge vannforholdene, som indikere at flere peptider med lav molekylvekt er tilstede. Det var derimot mindre forskjell mellom vannforholdene 60% og 45% for E1 etter 60 min hydrolyse. Elueringstiden av de de mest fremtredene toppene skjer ved 18-19ml, 21-22ml og 26-27ml. Dette ble resultatet for både E06045 og E16045. Det vil si at i begge prøvene et peptid størrelsen mindre enn 1355 Da, men at E1 har størst mengde peptide med høyere molekylvekt sammenlignet med E0. Dette er i overensstemmelse med funn fra Lindberg mfl. (2021b) som så på kyllingkjøtt, vev og sener.

Et avvik mellom E06045, E16045, E16060 og E06060 var at for de tre første prøvene ble det observert en topp ved 32-33ml, men denne finnes ikke for E06060. En annen viktig observasjon er skalaen mAu. For alle prøver utenom E06060 viser den at toppene ligger mellom 1.5-2.5 mAU, mens for E06060 når disse toppene opp til 6-8mAu. Dette tyder på at det er en større mengde av forbindelsen som eluerer fra kolonnen på det tidspunktet, dette indikere også en høyere konsentrasjon av peptider i prøven. Fra seksjon *Hydrolysegrad* viser E0 en minimalt høyere DH enn E1. En mulig forklaring på dette kan støttes av resultatene i denne seksjonen. E0 er vist i kromatogrammet å ha flere peptider med lavere. Derfor er det mulig at E0 har spaltet proteinet til mindre peptider og som et resultat av det har det blitt frigjort flere amino-grupper som vises igjen på DH.

Toppen som eluerer ved 7-8ml kan i følge Kristoffersen mfl. (2022) være kollagen som separeres fra sediment etter under inaktivisering av enzym. Det ble demonstrert i studien ved SEC kromatogram at store protein, da trolig kollagen blir smeltet ut av sediment under inaktivisering av enzymer ved 90°C i 15 minutter.

7.7 Mengde vannløselig protein i proteinhydrolysat

Mengde vannløselig protein for proteinhydrolysatene ble bestemt med lowry metoden (Lowry mfl., 1951). Figur 7.19 illustrerer forskjellen på utbytte av mengde vannløselig protein i proteinhydrolysatet for Enzym 0 (E0) og Enzym 1 (E1) for hydrolysetidene 15, 30, 45, og 60 minutter, 45% og 60% tilsatt vann. Fra forsøk 1 med 60% vann, bestod PH av av 58-63% vannløselig protein og 51-59% for E0 og E1 respektivt. For E1 ble den høyeste prosentandelen av protein observert etter 30 min hydrolyse, med en verdi på 63,5%, etterfulgt av henholdsvis 59,1%, 52,3% og 51,3% etter 15, 45 og 60 min hydrolyse respektivt. Figur 7.19 illustrerer en nedgang i prosentandelen av protein i tørket hydrolysat for E1, mens for E0 forble andelen relativt stabil gjennom eksperimentet. Den høyeste registrerte verdien for E0 ble notert etter 45 minutter, med 59,5%, etterfulgt av 59,17%, 59,13 og 54,9% 60, 15 og 30 minhydrolyse respektivt.



Figur 7.19: Mengden vannløselig protein i proteinhydrolysat. Hydrolyseforsøk med 100g restråstoff, enzym 0 og enzym 1, 60:40 og 45:55 (vann:RRS) enzymløsning 0,1% av vekten til restråstoff. Fire separate hydrolyser med hydrolysetidene (15, 30, 45, og 60 min).

I forsøk med et vannforhold på 45%, hadde E1 et høyere innhold av vannløselig protein for alle hydrolysetidene utenom 30 min. For Enzym 0 ble det målt et innhold av vannløselig protein fra 66,7 - 76,8% og 81,8 - 87,0% for E0 og E1 respektivt. Høyest proteininnholdet fra E0 var 81,75, 74,39, 70,35 og 66,58% for hydrolysetidene 30, 60, 45 og 15min respektivt. Høyeste proteininnholdet for E1 var 87,02, 86,23, 85,53 og 76,84% for hydrolysetidene 60, 15, 45 og 30 min. Dette er i tråd med resultatene fra Phuc Vo (2023) (bein og skinnfraksjoner fra kylling), Lindberg mfl. (2021a) (kalkun sener, kyllingkjøtt, kyllingbeinfraksjoner), Hjellnes mfl. (2020) (Høner) og fra C/N analysen (7.20) gjort på PH for hydrolysetid 60 min (88,33 og 87,76% for E06045 og E16045 respektivt). Figur 7.19 illustrerer prosentandelen vannløselig protein i hydrolysatet under vannforholdet 45% for E0 og E1. E1 viste et gjennomgående høyere proteininnhold sammenlignet med E0 forutenom for 30 min hydrolysetid. De resterende 20% i proteinhydrolysatet (PH) antas å være fett og aske som ble skilt ut fra sedimentet og ut i PH. Resultatene fra tidligere seksjon *Massebalanse 7.1*) viser at mellom 50-70% av asken fra råstoffet (RRS) ender opp i sedimentet. Phuc Vo (2023) fant at 100g RRS består av ca. 4% aske og 23,4% fett. Basert på resultatene kan det antas at de resterende prosentene av asken

fordeler seg i PH, fettfasen, emulsjonen eller går tapt som svinn. I seksjon *Utbytte av fett* ble fettinnholdet i PH diskutert og kom frem til at PH muligens innholder lite fett basert på resultater i denne studien og tidligere resultater fra Tveit (2014). Kort forklart massebalansen 7.1 viser at mesteparten av fett fra RRS havner i fettfasen, men en betydelig andel (17-25%) ender opp i sedimentet. Dette tyder på at det er lite fett igjen i den flytende proteinfasen (PH).

Ved hydrolyse med 45% vann ble det observert det som ser ut som et avvik i resultatet etter 30 minutter, med en økning i vannløselig protein for E0 (81,75%) og en nedgang for E1 (76,84%). Dette kan muligens skyldes økt utskillelse av fett og aske ved denne hydrolysetiden. Analyse av askeinnhold ble ikke gjort for proteinhydrolysat, og ble ikke analysert på sediment ved 15, 30 og 45 hydrolysetid. Analyse av fettinnhold ble ikke gjort for PH og ble bare analysert for 60 min hydrolyse i sediment. Det ble ikke registrert noen unaturlige utslag i utbyttet av fett, tørket sediment eller hydrolysegrad som kan tilsi utslaget i dette resultatet.

Mengden vannløselig protein i PH for hydrolyse med 60% vann var lavere enn for hydrolyse med 45% vann. Resultatene fra figur 7.19 er ikke i samsvar med resultatet fra seksjon C/N analyse og figur 7.20 for hydrolyse med 60% vann. Dette avviket er også i strid med tidligere studier gjort på høner, kylling og kalkun (Hjellnes mfl., 2020, Phuc Vo, 2023, Lindberg mfl., 2021a) og på marint restråstoff (Schmidt mfl., 2020, dos Santos Aguilar mfl., 2020), hvor det ble oppnådd proteininnhold over 70% i PH med 50% eller mer tilsatt vann.

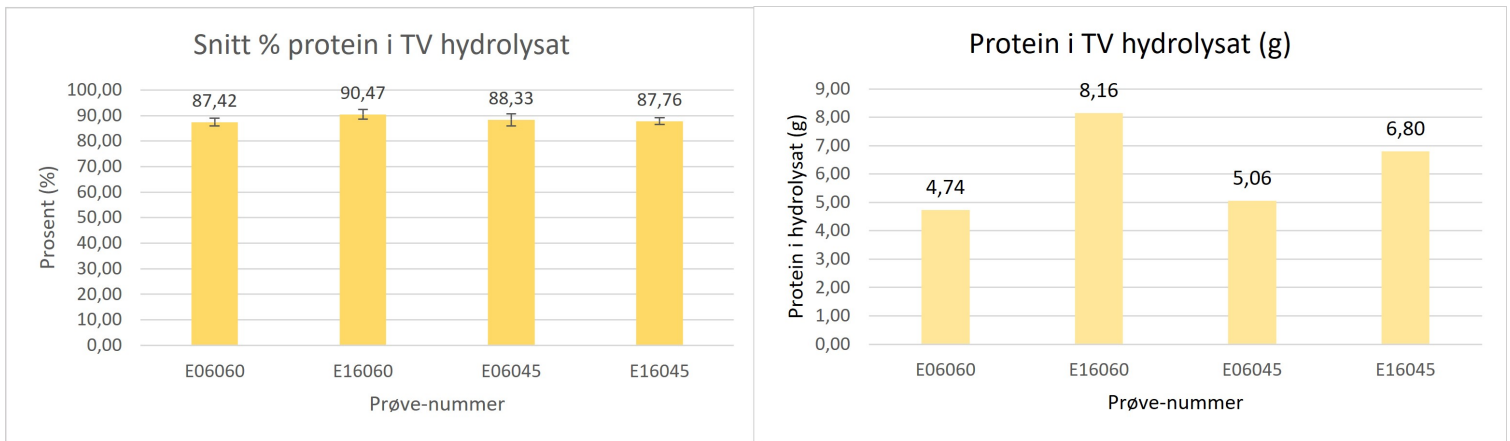
Hypotese forskjell mellom 60% og 45% var tap av protein gjennom ekstrahert gel. Dette er enda en plausibelt, men hypotesen svekkes som følge av resultatene fra C/N analyse (figur 7.8). viser høye proteinverdier i proteinhydrolysatet (PH) for både E16060 og E06060, 87,42 og 90,47% protein respektivt i PH.

Ved å analysere fordelingen av protein fra restråstoffet (RRS) mellom de ulike fraksjonene, ble det observert ved 60% vann og 60 minutters hydrolysetid, kun 23% og 33% av proteinet blir tilgjengeliggjort til proteinhydrolysatet (PH) for henholdsvis E0 og E1. Fra seksjon *Protein i sediment* 7.10 vises at en betydelig andel protein, 57% og 46%, ender opp i sedimentet. Totalt gjenvinnes dermed 80% av proteinet, mens de resterende 20% må da antas å gå tapt i emulsjonen, fettfasen eller som svinn. Denne lave proteingjenvinningen i PH ved 60% vann, sammenlignet med 81% og 96% for henholdsvis E0 og E1 ved 45% vann, kan tyde på at noe av proteinet ikke er blitt korrekt kvantifisert. En mulig forklaring er at en del av proteinet er fanget i emulsjonen, og dermed ikke blir registrert i PH-analysen, men forfatter tror at det heller skyldes metodologiske variabler og ved en ny gjennomførelse av metoden vil det produsere svar tilnærmet sett for hydrolyse med 45% vann.

7.8 Mengde protein i proteinhydrolysat

Mengden protein i frysetørket PH ble analysert ved å bestemme det totale nitrogeninnholdet i PH. Ved et vannforhold på 60% ble det gjennomsnittlige proteininnholdet i PH for enzym 0 (E06060) målt til 87,41% og 90,45% for enzym 1 ((E16060)) under samme betingelser. Ved redusert mengde tilsatt vann (45%), ble gjennomsnittlig proteininnhold for enzym 0 (E06045 PH) målt til 88,33% og 87,76% for enzym 1 (E16045). Disse funnene er illustrert

i figur 7.20, som viser en sammenligning mellom prosentandelen protein i PH og hvor mange gram protein dette utgjør totalt i PH.



Figur 7.20: Sammenligning mellom prosentandel protein i tørket hydrolysat og hvor mange gram protein dette utgjør totalt i hydrolysatet. Protein (g) er regnet ut ved å gange mengden PH fra seksjon *Utbytte PH 7.5* med prosentandelen oppnådd fra C/N analysen i seksjon *Mengde protein i hydrolysat*. Resultat fra hydrolyse med 100g restråstoff, enzym 0, enzym 1, enzymløsning 0,1% av RRS, hydrolysetid 60 minutter, vann:RRS 60:40 og 45:55. 7.8.

Resultatet i denne studien er i overensstemmelse med Lindberg mfl. (2021b) som hadde proteinkonsentrasjon mellom 80 og 90% ved hydrolyse av vev og beinfraksjoner fra kalkun. Proteinkonsentrasjonen varierte lite mellom hydrolyse med 60% og 45% vann, med en forskjell på mindre enn 3 prosentpoeng for E1 og E0. E1 ga høyest proteinutbytte (i gram) ved 60% vann, mens E0 hadde høyest utbytte ved 45% vann. Den lavere proteinmengden (i gram) for E06060 stemmer overens med tidligere resultater i denne studien, hvor denne prøven hadde det høyeste utbyttet av frysetørket sediment og laveste utbytte av PH. Fra seksjon *Protein i sediment 7.4.4* viste resultatet at sedimentet for prøven E06060 inneholdt markant mer protein sammenlignet med de andre prøvene. Tilsvarende hadde E16060 som gjennomgående viste høyt proteinutbytte og lavt sedimentutbytte, også en lav andel protein i sedimentet. (7.20).

For prøvene med 45% vann stemmer resultatene for E1 godt overens med funnene i seksjon *mengde løselig protein 7.7*, med et proteininnhold på 87%. For prøven E06045 var imidlertid mengden vannløselig protein i PH (74,39%) betydelig lavere enn det som ble målt ved C/N-analyse. Dette kan skyldes sammensetningen av råstoffet, som består av bein- og skinnfraksjoner som tidligere studier har vist inneholder mye kollagen. Dette diskuteres nærmere, senere i denne seksjonen. For prøvene E16060 og E06060, samsvarer ikke C/N-resultatene med resultatet fra seksjon 7.7, der proteininnholdet ble rapportert til å være henholdsvis 51% og 59%. Dette avviket antyder en mulig feil i utførelsen av Lowry-metoden, noe som kan ha ført til underestimering av proteininnholdet i disse prøvene. Dette støttes som nevnt i seksjon *Mengde vannløselig protein i PH 7.7* og som nevnt har E16060 gjennomgående vist et høyt PH utbytte, lavt sediment utbytte og tilsvarende lik prosentandel protein i sediment som vist i tabell 7.9.

Tabell 7.9 viser en forskjell i mengden protein gjort tilgjengelig fra restråstoffet til proteinhydrolysatet mellom enzym E0 og E1. Prøvene behandlet med E0 (E06060 og E06045) hadde lavest gjenvinning, med henholdsvis 34,84% og 37,21%. Prøvene behandlet med E1 (E16060 og E16045) viste at 50 og 60% (respektivt) av proteinet fra RRS ble tilgjengeliggjort og havnet i hydrolysatet. Resultatene for E1 samsvarer med tidligere funn i studien Lindberg mfl. (2021a).

Tabell 7.9: Mengden protein fra 100g restråstoff fordelt på sediment og proteinhydrolysat. Resultat fra hydrolyse med 100g restråstoff, enzym 0, enzym 1, enzymløsning 0,1% av RRS, hydrolysetid 60 minutter, vann:RRS 60:40 og 45:55.

Protein fra 100g RRS fordelt i PH og sediment (%)				
	E06060	E16060	E06045	E16045
Protein hydrolysat (%)	34,84	59,97	37,21	50,01
Sediment (%)	57,53	46,67	46,02	46,24
Totalt (%)	92,27	106,64	83,23	96,25

En viktig observasjon fra tabell 7.9 var den totale mengden protein i sediment og proteinhydrolysat overstiger 100 % for prøven E16060. Dette indikerer en uoverensstemmelse i dataene, som kan skyldes feil i målingene eller beregningene. En sannsynlig årsak til det tilsynelatende høye proteininnholdet kan være relatert til råstoffets sammensetning og den brukte analysemetoden. Restråstoffet (RRS) i denne studien inneholder bein og skinnfraksjoner, som er rikt på kollagen (Fisinin mfl., 2017, Cliche mfl., 2003). Som studien Lindberg mfl. (2021a) påpeker, kan kollagenrikt vev, (bein og skinnfraksjoner), vise et uvanlig høyt proteininnhold på grunn av kollagens høye nitrogeninnhold (over 18% sammenlignet med ca. 16% for muskelproteiner). I C/N-analysen ble det brukt en standard omregningsfaktor på 6,25 for å estimere proteinkonsentrasjonen basert på nitrogeninnholdet. Denne faktoren antar et gjennomsnittlig nitrogeninnhold på 16% i proteiner. Imidlertid kan denne antagelsen føre til unøyaktige resultater når prøven inneholder proteiner med avvikende nitrogeninnhold, slik som kollagen, eller andre nitrogenholdige forbindelser som nukleinsyrer og urea. I slike tilfeller vil bruk av en fast faktor på 6,25 kunne overestimere proteinkonsentrasjonen (Wubshet mfl., 2019). Phuc Vo (2023) undersøkte hydroxyproline innholdet i sediment og PH for å bestemme kollageninnholdet, resultatene viste at proteinhydrolysatet inneholdt $21,6 \pm 4,3$ g/100g kollagen, mens sedimentet inneholdt $1,9 \pm 1,2$ g/100g kollagen. Dette støtter hypotesen om at det høye kollageninnholdet i RRS kan ha påvirket det målte proteininnholdet.

8 Konklusjon

Målet med denne studien var å undersøke enzymkinetikken og utbyttet av fett, proteinhydrolysat og sediment til to ulike enzymer under enzymatisk hydrolyse ved to ulike vannforhold.

Blant hydrolysetidene var ble det oppnådd høyest utbytte for E0 og E1 ved hydrolyse i 60 minutter (E06045 = 5,73g), (E16045 = 7,75g) (E16060 = 9,02g), med unntak for E0 60% vann, da denne hadde høyest utbytte ved 45 min hydrolysetid (E06045 = 5,97g). Resultat for sistnevnte kan skyldes ekstraksjon av en gelfase og dermed tap av protein til denne fasen. Gel-fasen hadde høyere utbytte for E0 (1,54-18,5 g) enn for E1 (2,17-6,23 g). Det ble vist at reduksjon av vann fra 60% til 45% ikke hadde en signifikant innflytelse på utbyttet av proteinhydrolysat, fett eller sediment. Videre viste molvektfordelingen at 60 minutter hydrolyse ga flere peptider med størrelse < 2000Da, sammenlignet med lavere hydrolysetid. Det ble også vist at E0 produserte peptider med lavere molekylvekt etter 60 min hydrolyse, sammenlignet med E1 uavhengig av mengden vann tilsatt.

Hydrolysegraden ble målt til tilsvarende det samme for alle hydrolysene. E16045 (22,55 - 32,64) E06045 (23,50-32,64) E16060 (21,01-29,98). E06060 (26,51-29,98) Dette tyder på at vannforhold har hatt liten innflytelse på hydrolysegraden. E1 ga for alle hydrolysetider et høyere proteinutbytte (9,02 g og 7,75 g), fettutbytte (20,91 g og 22,00 g), og lavere utbytte av frysetørket sediment (11,73 g og 10,70 g) enn E0 ved begge vannforhold. Over 80% av fettene ble ekstrahert til fettfasen etter 15 minutter, uavhengig av enzym og vannforhold, mens 8-15% fett ble funnet i sedimentet etter 60 minutter.

Analyser av sediment og PH ble gjort på prøver fra hydrolyse i 60 min, E0 / E1, 60% / 45%. For disse prøvene var det ikke mulig å trekke noe direkte konklusjon hvor vidt mengden vann og type enzym påvirket utbyttet. Sedimentsammensetningen etter 60 minutters hydrolyse (60% vann) varierte noe mellom prøvene, med proteininnhold på 46-57%, askeinnhold på 15-28%, vanninnhold på 2-13% og fettinnhold på 10-11%. Tilsvarende resultater ble også oppnådd ved 45% vann, med proteininnhold på 46%, askeinnhold på 16-27%, vanninnhold på 1-3% og fettinnhold på 8-15%.

Vannforhold og type enzym viste å ha lite innflytelse på proteinkonsentrasjonen i proteinhydrolysatet (87-90%). Ved 60 minutters hydrolyse ble 50-60% av proteinet i restråstoffet tilgjengeliggjort av E1 til PH og 35-37% ble tilgjengeliggjort av E0. Total proteingjenvinning i PH og sediment varierte mellom 83% og 107%, med det høyeste utbyttet for E16060 og det laveste for E06045. Det uvanlig høye utbyttet for E16060 kan skyldes det høye kollageninnholdet i restråstoffet. Resultatene tyder på at optimale betingelse for å oppnå størst mengde PH er hydrolyse i 60 min, enzym 1, 60% vann : 40% restråstoff. Imidlertid må dette vurderes opp mot de økonomiske konsekvensene, da det ikke ble observert en signifikant forskjell i proteinutbytte mellom hydrolyse med 60% og 45% vann. Økt vannmengde krever større reaktorvolum og medfører økte kostnader knyttet til energikrevende nedstrøms prosesser, som inndamping eller tørking, for å fjerne overflødig vann og produsere et tørt produkt.

9 Videre forskning

Basert på resultatene fra denne studien, anbefales det at videre forskning undersøker effekten av lavere vannforhold i større skala. Resultatene indikerer at en reduksjon i vannmengde fra 60:40 til 45:55 (RRS:vann) ikke har signifikant innvirkning på proteinutbyttet etter 60 minutters hydrolyse, men videre studier i større skala er nødvendig for å bekrefte dette.

Videre forskning bør også fokusere på å undersøke hvordan fettfjerning tidlig i EPH-prosessen påvirker emulsjonsdannelse og utbytte av proteinhydrolysat. I tillegg kan det være relevant å undersøke nærmere forskjellene i peptid- og proteinegenskaper mellom E0 og E1, da resultatene i denne studien indikerer at E0 produserer peptider med lavere molekylvekt enn E1.

Til slutt, gitt det høye proteininnholdet i sedimentet som observert i denne studien, bør fremtidig forskning utforske mulighetene for å utnytte dette sedimentet bedre. Dette kan inkludere undersøkelser av ulike metoder for proteinutvinning og potensielle anvendelser av det ekstraherte proteinet.

References

- Abedinia, A., Mohammadi Nafchi, A., Sharifi, M., Ghalambor, P., Oladzadabbasabadi, N., Ariffin, F., & Huda, N. (2020). Poultry gelatin: Characteristics, developments, challenges, and future outlooks as a sustainable alternative for mammalian gelatin. *Trends in Food Science & Technology*, *104*, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.001>
- Adhikari, B. B., Chae, M., & Bressler, D. C. (2018). Utilization of slaughterhouse waste in value-added applications: Recent advances in the development of wood adhesives [Number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Polymers*, *10*(2), 176. <https://doi.org/10.3390/polym10020176>
- Adler, S., & Løes, A.-K. (2018). Utnyttelse av utrangerte verpehøner til fôr. *Norsk institutt for bioøkonomi*, *4*(31), 23.
- Adler-Nissen, J. (1976). Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *24*(6), 1090–1093.
- Adler-Nissen, J. (1986 januar). *Enzymic Hydrolysis of Food Protein* (Bd. 8).
- Alao, B. O., Falowo, A. B., Chulayo, A., & Muchenje, V. (2017). The Potential of Animal By-Products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. *Sustainability*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/su9071089>
- Animalia. (2023 oktober). *kjøttets tilstand 2023 - Status i norsk kjøtt- og eggproduksjon*. Animalia. Oslo. Hentet 23. januar 2024, fra <https://www.animalia.no/contentassets/33a3c6bc537a4458b381f3dcd180a35e/kjottets-tilstand-2023.pdf>
- Archer, M. C., Ragnarsson, J. O., Tannenbaum, S. R., & Wang, D. I. (1973). Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process and kinetic considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, *15*(1), 181–196.
- Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S. B., Altintzoglou, T., Wubshet, S. G., Gildberg, A., Afseth, N. K., Whitaker, R. D., & Lindberg, D. (2017). Valorization of proteins from co- and by-products from the fish and meat industry. *Topics in Current Chemistry*, *375*(3), 53. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0143-6>
- Aykin-Dinger, E., Koç, A., & Erbaş, M. (2017). Extraction and physicochemical characterization of broiler (*Gallus gallus domesticus*) skin gelatin compared to commercial bovine gelatin. *Poultry Science*, *96*(11), 4124–4131.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bui, X. D., Vo, C. T., Bui, V. C., Pham, T. M., Bui, T. T. H., Nguyen-Sy, T., Nguyen, T. D. P., Chew, K. W., Mukatova, M. D., & Show, P. L. (2021). Optimization of production parameters of fish protein hydrolysate from sarda orientalis black muscle (by-product) using protease enzyme [Company: Springer Distributor: Springer Institution: Springer Label: Springer Number: 1 Publisher: Springer Berlin Heidelberg]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *23*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01867-2>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2014). Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, *49*(11), 1903–1912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.009>
- Chiodza, K., & Goosen, N. J. (2023). Influence of mixing speed, solids concentration and enzyme dosage on dry solids yield and protein recovery during enzymatic hydrolysis of sardine (*sardina pilchardus*) processing by-products using alcalase 2.4L: A multivariable optimisation approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03829-2>
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(7), 254–262. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3)
- Cliche, S., Amiot, J., Avezard, C., & Garipey, C. (2003). Extraction and characterization of collagen with or without telopeptides from chicken skin. *Poultry Science*, *82*(3), 503–509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ps/82.3.503>
- Coppini, M., Magro, J. D., Martello, R., Valério, A., Zenevich, M. C., Oliveira, D. d., & Oliveira, J. V. (2019). PRODUCTION OF METHYL ESTERS BY ENZYMATIC HYDROESTERIFICATION OF CHICKEN FAT INDUSTRIAL RESIDUE [Publisher: Brazilian Society of Chemical Engineering].

-
- Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36, 923–928. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180389>
- dos Santos Aguilár, J. G., de Souza, A. K. S., & de Castro, R. J. S. (2020). Enzymatic hydrolysis of chicken viscera to obtain added-value protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 717–725. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09879-3>
- Etemadian, Y., Ghaemi, V., Shaviklo, A. R., Pourashouri, P., Mahoonak, A. R. S., & Rafipour, F. (2021). Development of animal/ plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123219>
- Fallah-Delavar, M., & Farmani, J. (2018). Recovery and characterization of enzymatic protein hydrolysates and fat from chicken skin [eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/aocs.12131>]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(9), 1151–1161. <https://doi.org/10.1002/aocs.12131>
- Farmani, J., & Rostamiri, L. (2015). Characterization of chicken waste fat for application in food technology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(2), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9219-y>
- Fisinin, V., Ismailova, D. Y., Volik, V., Lukashenko, V., & Saleeva, I. (2017). Deep processing of collagen-rich poultry products for different use. *Agricultural biology*, 52(6), 1105–1115.
- Garcia, R. A., & Phillips, J. G. (2009). Physical distribution and characteristics of meat and bone meal protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), 329–336. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.3453>
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gong, M., Mohan, A., Gibson, A., & Udenigwe, C. C. (2015). Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates. *Biotechnology Reports*, 5, 63–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.003>
- Helgeland-Rossavik, M.-K. (2021). *Characterisation and preprocessing of chicken rest raw material to be used in enzymatic hydrolysis* [Prosjektoppgave]. Norwegian University of Science og Technology.
- Helsedirektoratet. (2016). *Nasjonale faglige råd om kostrådene og næringsstoffer* (siste faglige endring 22. november 2023). Helsedirektoratet. Oslo. Hentet 15. mai 2024, fra <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer>
- Hjellnes, V., Šližyte, R., Rustad, T., Carvajal, A. K., & Greiff, K. (2020). Utilization of egg-laying hens (*Gallus Gallus domesticus*) for production of ingredients for human consumption and animal feed. *BMC Biotechnology*, 20(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00618-x>
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2017). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Jung, H., Lee, Y. J., & Yoon, W. B. (2018). Effect of moisture content on the grinding process and powder properties in food: A review [Number: 6 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Processes*, 6(6), 69. <https://doi.org/10.3390/pr6060069>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties [PMID: 10674201]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Kristoffersen, K. A., Afseth, N. K., Böcker, U., Dankel, K. R., Rønningen, M. A., Lislelid, A., Ofstad, R., Lindberg, D., & Wubshet, S. G. (2022). Post-enzymatic hydrolysis heat treatment as an essential unit operation for collagen solubilization from poultry by-products. *Food Chemistry*, 382, 132201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132201>
- Lasekan, A., Abu Bakar, F., & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 33(3), 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>
- Lindberg, D., Kristoffersen, K. A., Wubshet, S. G., Hunnes, L. M. G., Dalsnes, M., Dankel, K. R., Høst, V., & Afseth, N. K. (2021a). Exploring effects of protease choice and protease combinations in
-

-
- enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products [Number: 17 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Molecules*, 26(17), 5280. <https://doi.org/10.3390/molecules26175280>
- Lindberg, D., Kristoffersen, K. A., de Vogel-van den Bosch, H., Wubshet, S. G., Böcker, U., Rieder, A., Fricke, E., & Afseth, N. K. (2021b). Effects of poultry raw material variation and choice of protease on protein hydrolysate quality. *Process Biochemistry*, 110, 85–93.
- Lindberg, D., Aaby, K., Borge, G. I. A., Haugen, J.-E., & Nilsson, A. (2016, 31. desember). *Kartlegging av restråstoff fra jordbruket* (Nr. 67/2016) (ISBN: 978-82-8296-476-0 ISSN 1890-579X). Nofima.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual review of food science and technology*, 6, 527–557.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Merz, M., Claaßen, W., Appel, D., Berends, P., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2016). Characterization of commercially available peptidases in respect of the production of protein hydrolysates with defined compositions using a three-step methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.002>
- Meyer, M., & Morgenstern, B. (2003). Characterization of gelatine and acid soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). *Biomacromolecules*, 4(6), 1727–1732.
- Mohammadnezhad, S., & Farmani, J. (2022). Rheological and functional characterization of gelatin and fat extracted from chicken skin for application in food technology. *Food Science & Nutrition*, 10(6), 1908–1920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.2807>
- Mozhiarasi, V., & Natarajan, T. S. (2022). Slaughterhouse and poultry wastes: Management practices, feedstocks for renewable energy production, and recovery of value added products. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02352-0>
- Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Production and purification of protein hydrolysates (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(4), 317–324. <https://doi.org/10.1007/BF02738038>
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. I V. K. Pasupuleti & A. L. Demain (Red.), *Protein hydrolysates in biotechnology* (s. 11–32). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_2
- Petrova, I., Tolstorebrov, I., & Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: Technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*, 10(3), 223–241. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>
- Phuc Vo, B. (2023). *Enzymatic Hydrolysis of Poultry Raw Material: Investigating Enzyme Efficiency, Product Quality, and Property* [Masteroppgave]. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Piette, G., Hundt, M., Jacques, L., & Lapointe, M. (2001). Influence of extraction temperature on amounts and quality of rendered chicken fat recovered from ground or homogenized skin. *Poultry science*, 80(4), 496–500.
- Pop, F., Semeniuc, C. A., & Mihalescu, L. (2016). Oxidative and hydrolytic stability of alimentary poultry fats under refrigeration and freezing [_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ejlt.201500324>]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(11), 1795–1798. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500324>
- Regjeringen.no. (2021, 16. juni). *Nasjonal strategi for ein grøn, sirkulær økonomi* (Plan/strategi) (ISBN: 978-82-457-0524-9 Publikasjonskode: T-1573 N). Hentet 30. april 2024, fra <https://www.regjeringen.no/nm/dokumenter/nasjonal-strategi-for-ein-gron-sirkular-okonomi/id2861253/>
- Ritchie, H., Rosado, P., & Roser, M. (2022). Environmental impacts of food production. *Our world in data*.
- Rivas-Vela, C. I., Amaya-Llano, S. L., Castaño-Tostado, E., & Castillo-Herrera, G. A. (2021). Protein hydrolysis by subcritical water: A new perspective on obtaining bioactive peptides [Number: 21 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Molecules*, 26(21), 6655. <https://doi.org/10.3390/molecules26216655>
- Rotz, A. (2020). Environmental sustainability of livestock production. *Meat and Muscle Biology*, 4(2).
-

-
- Sajib, M., Albers, E., Langeland, M., & Undeland, I. (2020). Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (*clupea harengus*) filleting co-products. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66152-0>
- Schmidt, M. M., Fontoura, A. M. D., Vidal, A. R., Dornelles, R. C. P., Kubota, E. H., Mello, R. D. O., Cansian, R. L., Demiate, I. M., & Oliveira, C. S. D. (2020). Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. *Food Science and Technology*, *40*, 355–362. <https://doi.org/10.1590/fst.14819>
- Seong, P. N., Cho, S. H., Park, K. M., Kang, G. H., Park, B. Y., Moon, S. S., & Ba, H. V. (2015). Characterization of Chicken By-products by Mean of Proximate and Nutritional Compositions. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *35*(2), 179–188. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.179>
- Sharma, H., Giriprasad, R., & Goswami, M. (2013). Animal fat-processing and its quality control. *J. Food Process. Technol*, *4*(8), 1000252.
- Slizyte, R., Nguyen, J. V., Rustad, T., & Storro, I. (2004). Hydrolysis of Cod (*Gadus morhua*) By-Products: Influence of Initial Heat Inactivation, Concentration and Separation Conditions [Publisher: Taylor & Francis eprint: https://doi.org/10.1300/J030v13n02_04]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *13*(2), 31–48. https://doi.org/10.1300/J030v13n02_04
- Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K., & Rustad, T. (2016). Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports*, *11*, 99–109.
- Šližytė, R., Rustad, T., & Storrø, I. (2005). Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, *40*(12), 3680–3692. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.007>
- Sukan, G., & Andrews, A. T. (1982). Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder: I. Protein hydrolysis and plastein formation. *Journal of Dairy Research*, *49*(2), 265–278.
- Syed, M. B., & Erumalla, V. (2020). Factors like dilution and mixing influence enzymatic reactions [Number: 4]. *Mapana Journal of Sciences*, *19*(4), 31–35. <https://doi.org/10.12723/mjs.55.3>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *90*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Taylor, W. (1957). Formol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst*, *82*(976), 488–498.
- Tipton, K. F. (1992). Principles of enzyme assay and kinetic studies. *Enzyme assays, a practical approach. IRL, Oxford*, 1–58.
- Turgeon, S. L., Gauthier, S. F., Molle, D., & Leonil, J. (1992). Interfacial properties of tryptic peptides of beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(4), 669–675.
- Tveit, G. M. (2014). *Enzymatic Hydrolysis of Chicken Rest Raw Material* [Masteroppgave]. Norwegian University of Science og Technology. <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/246099>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, *49*(2), 258–264.
- Valencia, P., Valdivia, S., Nuñez, S., Ovissipour, R., Pinto, M., Ramirez, C., Perez, A., Ruz, M., Garcia, P., Jimenez, P., & Almonacid, S. (2021). Assessing the enzymatic hydrolysis of salmon frame proteins through different by-product/water ratios and pH regimes [Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Foods*, *10*(12), 3045. <https://doi.org/10.3390/foods10123045>
- Volpato, J. A., Ribeiro, L. B., Torezan, G. B., da Silva, I. C., de Oliveira Martins, I., Genova, J. L., de Oliveira, N. T. E., Carvalho, S. T., de Oliveira Carvalho, P. L., & Vasconcellos, R. S. (2022). Characterization of the variations in the industrial processing and nutritional variables of poultry by-product meal. *Poultry Science*, *101*(7), 101926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101926>
- Vorob'ev, M. M., & Kochetkov, K. A. (2016). Determination of kinetic parameters for casein hydrolysis by chymotrypsin using two ranges of substrate concentration. *International Dairy Journal*, *61*, 76–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.003>
- Wang, D., Zhang, M., Zou, Y., Sun, Z., & Xu, W. (2018). Optimization of Flavourzyme Hydrolysis Condition for the Preparation of Antioxidant Peptides from Duck Meat using Response Surface Methodology. *The Journal of Poultry Science*, *55*(3), 217–223. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0160155>
- Wubshet, S. G., Lindberg, D., Veiseth-Kent, E., Kristoffersen, K. A., Böcker, U., Washburn, K. E., & Afseth, N. K. (2019, 1. januar). Chapter 8 - Bioanalytical Aspects in Enzymatic Protein Hydrolysis
-

-
- of By-Products. I C. M. Galanakis (Red.), *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (s. 225–258). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00008-8>
- Wubshet, S. G., Wold, J. P., Afseth, N. K., Böcker, U., Lindberg, D., Ihunegbo, F. N., & Måge, I. (2018). Feed-forward prediction of product qualities in enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products: A spectroscopic approach. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(11), 2032–2043. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2161-y>
- Yao, Y., Wang, M., Liu, Y., Han, L., & Liu, X. (2020). Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment. *Food chemistry*, *302*, 125199.
- Yousefi, N., & Abbasi, S. (2022). Food proteins: Solubility & thermal stability improvement techniques. *Food Chemistry Advances*, *1*, 100090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100090>
- Zhang, ., Ren, J., & Bai, W. (2023a). A review of poultry waste-to-wealth: Technological progress, modeling and simulation studies, and economic- environmental and social sustainability [Number: 7 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Sustainability*, *15*(7), 5620. <https://doi.org/10.3390/su15075620>
- Zhang, Li, X., & Liu, S.-Q. (2023b). Enzymatic hydrolysis of minced chicken carcasses for protein hydrolysate production. *Poultry Science*, *102*(8), 102791. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102791>
- Zhou, J., Li, D., Zhang, X., Liu, C., & Chen, Y. (2023). Valorization of protein-rich waste and its application. *Science of The Total Environment*, *901*, 166141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166141>

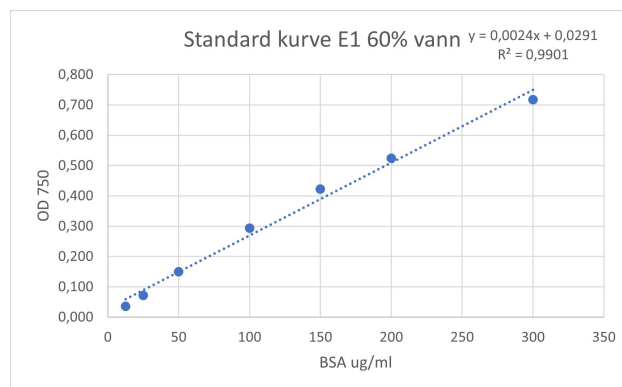
A Appendiks A

A.1 Bestemmelse av konsentrasjon - Lowry

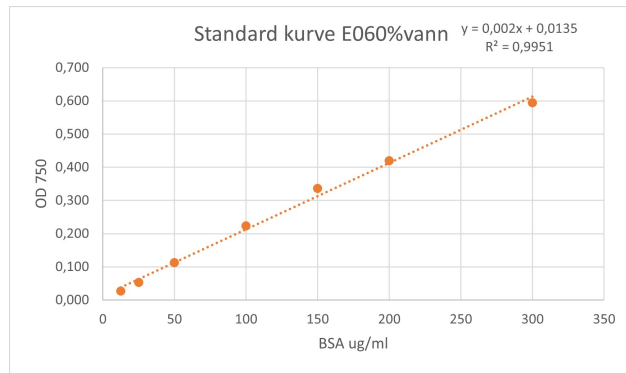
Standard kurve BSA Lowry metoden for å bestemme konsentrasjonen av protein:

Tabell A.1: Oversikt over konsentrasjon av BSA brukt for å lage standard kruve til lowry metoden

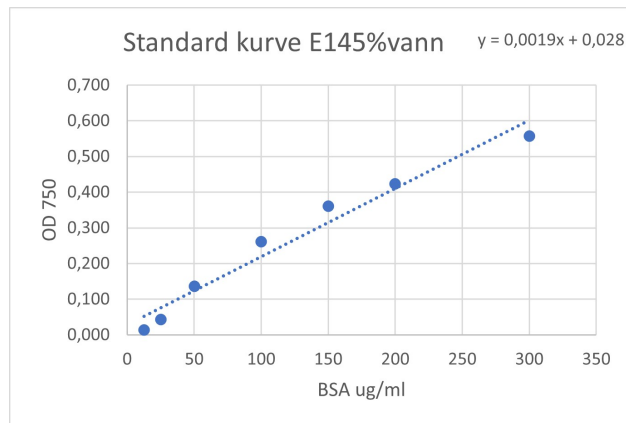
Nummer	Endelig konsentrasjon $\mu\text{g/ml}$	Målekolbe	μl BSA solution (100 $\mu\text{g/ml}$)
1	12,5	10ml	125 μl
2	25	10ml	250 μl
3	50	10ml	500 μl
4	100	10ml	1000 μl
5	150	10ml	1500
6	200	10ml	2000
7	250	10ml	3000



Figur A.1: Standardkurve brukt for å beregne konsentrasjon av protein i hydrolysat ekstrahert fra hydrolyse med enzym 1 og 60% vann



Figur A.2: Standardkurve brukt for å beregne konsentrasjon av protein i hydrolysat ekstrahert fra hydrolyse med enzym 0 og 60% vann



Figur A.3: Standardkurve brukt for å beregne konsentrasjon av protein i hydrolysat ekstrahert fra hydrolyse med enzym 0 og 1 med 60% vann

A.2 Total hydrolysegrad

A = ml NaOH forbrukt B = Konsentrasjon av titrant (0,1 M Na OH) C = Vekt prøve D = % Frie Aminogrupeer E = % N (protein% dividert med 6,25)

$$\frac{A \times B \times 14,007 \times 100}{C \times 100} = \% \text{ Frie Aminogrupeer} \quad (\text{A.2.1})$$

$$\frac{D \times 100}{E} = \% \text{ Hydrolysegrad} \quad (\text{A.2.2})$$

A.3 Fettanalyse - Bligh & Dyer

$$\frac{a \times b \times 100}{c \times v} = \% \text{ Totalt lipidinnhold} \quad (\text{A.3.1})$$

