



UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi,
Norges fiskerihøgskole

Protein og kitin i grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil

Therese Christina Udin

Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2017



Protein og kitin i grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil

av

Therese Christina Udin

Norges fiskerihøgskole,
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi,
UiT Norges arktiske universitet

og

Calanus AS

Tromsø
Mai 2017



Forord

Dette masterprosjektet ble utført og skrevet ved Norges fiskerihøgskole (NFH) ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), UiT Norges arktiske universitet i perioden høsten 2016 og våren 2017. Prosjektet ble gjort i samarbeid med bedriften Calanus AS.

Jeg vil starte med å takke min fantastiske veileder professor Ragnar Olsen. Ditt gode humør og hjelp har vært uvurderlig. Døren er alltid åpen og bedre veiledning tror jeg ikke man kan få. Min biveileder Alice Marie Pedersen hos Calanus AS, tusen takk for veiledning og for samarbeidet med bedriften. Det har vært en lærerik og interessant tid.

Til forskningsgruppa Sjømatvitenskap som jeg har vært så heldig å være en del av, tusen takk for å ha bli tatt godt imot. Dere er en flott gjeng! Tusen takk til dere som har hjulpet meg på laboratoriet og for gode samtaler underveis.

Til alle mine medstudenter, takk for alt gjennom hele studieperioden. Dere har bidratt med latter, glede, gode samtaler og mer igjennom disse årene. Tusen takk alle sammen for fem gode år!

Og selvfølgelig, tusen takk til hele min familie. Dere har støttet meg igjennom disse fem årene. Spesielt min gode mamma og pappa som har vært oppmuntrende, tålmodig og omsorgsfull under hele min studieperiode. Uten deres støtte hadde jeg ikke kommet i mål.

Tromsø, mai 2017



Sammendrag

Letingen etter nye ressurser som er rik på flerumettede langkjedede omega-3 fettsyrer, har ført til utnyttelse av dyreplanktonet *Calanus finmarchicus*, det mest tallrike dyreplanktonet i Norskehavet. Det blir høstet inn ved tråling i overflaten under de mest lipidrike stadiene i vår- og sommermånedene. Den største andelen av lipidene er voksesterer med et høyt innhold av omega-3 fettsyrer; stearidonsyre (18:4n-4), EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3). Firmaet Calanus AS utvinner ut olje (Calanus[®] Oil) fra *C. finmarchicus* og flere publikasjoner har indikert positive helseeffekter som kan komme fra andre komponenter enn kun EPA og DHA. Den industrielle prosesseringen gir i tillegg til oljen to andre produkter; et proteinhydrolysat og en presskake/grakse.

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke egenskapene til to bestanddeler i graksen, protein og kitin. Dette kan gi kunnskap som kan bidra til kommersialisering av grakse-produktet. Graksen inneholdt omtrent lik andel fett, kitin og protein. Til sammenligning er fettinnholdet i fiskemel lavere enn i graksen. Proteininnholdet derimot høyere i fiskemel enn i graksen. Graksen anses derfor ikke som en god kilde for protein, men det høye fettinnholdet kan være en positiv egenskap. Andelen kitin i graksen var 23,5 % på tørrstoffbasis, mens kitininnholdet i rekeskallmel er litt lavere (18 %). Til tross for dette, stilles det spørsmål med om det vil være lønnsomt å utvinne kitin fra graksen, med tanke på at raudåte har et lavt innhold av kitin. I tillegg inneholdt kitinet som ble utvunnet fra graksen små mengder med aske og protein, så en mer omfattende metode må nok anvendes og dette kan bli kostbart. Størrelsesfordelingen av proteiner i graksen varierte, det ble funnet både intakte og delvis intakte proteiner. Det ble også vist at graksen inneholder tropomyosin og ikke minst, degraderingsprodukter av proteinet, som kryssreagerte med antistoff rettet mot reke-tropomyosin. Flere hydrolyser med ulike enzymer frigjorde mer fett og protein fra graksen. Dette viser at det er mulighet for en bedre enzymatisk prosessering, som kan resultere i et bedre utbytte av olje og hydrolyserte proteiner i en industriell prosess. Mer omfattende enzymatisk hydrolyse vil imidlertid kunne gi et proteinhydrolysat med endrede sensoriske egenskaper.

Summary

A search for alternative sources of oils rich in long-chain polyunsaturated omega-3 fatty acids (n-3 LC-PUFA) has led to exploitation of the zooplankton *Calanus finmarchicus*, which is abundant in the Norwegian sea. It is harvested by surface trawling during the most lipid-rich stages in the spring and summer months. Most of the lipids are wax esters with a high content of the omega-3 fatty acid; stearidonic acid (18:4n-3), EPA (20:5n-3), and DHA (22:6n-3). The company Calanus AS extracts oil (Calanus Oil[®]) from *C. finmarchicus* and several publications have indicated positive health effects that could also come from other components than EPA and DHA alone. During the production of the oil two other products are obtained; a protein hydrolysate and a press cake.

The aim of this master thesis is to investigate the properties of two components in the press cake; proteins and chitin. Such knowledge may contribute to commercial utilization. The press cake contains about equal parts of fat, chitin and protein. By comparison, the fat content in fish meal is lower than in the press cake. The opposite applies for the proteins. Therefore, the press cake is not regarded as a good source of protein, but the high fat content may be a positive trait. The percentage of chitin in the press cake was 23.5 on a dry matter basis, while the chitin content in shrimp meal is a little lower (18%). Despite this, it is questionable whether it is profitable to extract chitin from the press cake, given that red feed contains low amounts of chitin. In addition, the chitin extracted from the press cake still contained small amounts of ash and protein. A more comprehensive method must be used, which is costly. The size distribution of proteins in the press cake varied, both intact and partially intact proteins were found. It was also shown that the press cake contains tropomyosin and degradation products of the protein which cross-reacted with a shrimp-tropomyosin antibody. Enzymatic hydrolysis conducted on the press cake resulted in improved lipid and protein recovery. This shows that it is possible to improve the enzymatic processing which can result in a better yield of the oil and protein hydrolysate in an industrial process. However, more comprehensive enzymatic hydrolysis might produce a protein hydrolysate with altered sensory properties.

Forkortelser

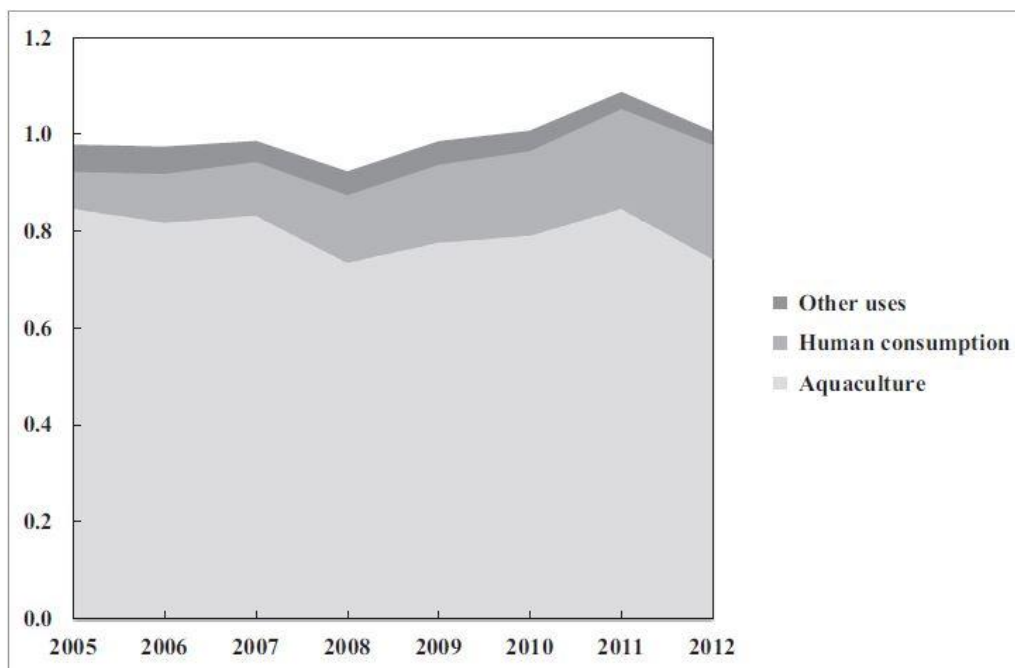
ALA	α -linolensyre
ARA	Arakidonsyre
BSA	Bovint serumalbumin
C1-C6	Kopepodittstadier 1-6
DHA	Dokosaheksaensyre
EPA	Eikosapentaensyre
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FHI	Folkehelseinstituttet
FPH	Fiskeproteinhydrolysat
IgE	Immunglobulin E
LA	Linolensyre
N1-N6	Naupliistadier 1-6
SDA	Stearidonsyre
TCA	Trikloreddiksyre (Trichloroacetic acid)
TAG	Triacylglyserol
TS	Tørrstoff

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Summary.....	III
Forkortelser.....	IV
1 Innledning.....	1
2 Bakgrunn.....	6
2.1 <i>Calanus finmarchicus</i> (raudåte).....	6
2.2 Lipidinnhold i raudåte.....	7
2.2.1 Allergi og allergener.....	8
2.3 Anvendelse av marint restråstoff.....	9
2.3.1 Hydrolyse av peptidbindinger.....	10
3 Materialer og Metoder.....	13
3.1 Materialer.....	13
3.2 Metoder.....	13
3.2.1 Vann- og askeinnhold.....	13
3.2.2 Kitininnhold.....	13
3.2.3 Fettinnhold i grakse.....	13
3.2.4 Proteinkonsentrasjon.....	14
3.2.5 SDS-PAGE og Western Blotting.....	15
3.2.6 pH i grakse.....	16
3.2.7 Enzymatisk hydrolyse.....	17
4 Resultater.....	19
4.1 Sammensetning av grakse.....	19
4.2 Renhet til kitin.....	19
4.3 SDS-PAGE og Western blotting.....	19
4.4 Enzymatisk hydrolyse av grakse.....	21
4.4.1 Protein i supernatant etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse.....	21
4.4.2 Fett i pelleten etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse.....	25
5 Diskusjon.....	27
6 Referanser.....	33

1 Innledning

Etter undersøkelser som omhandlet alvorlige sykdommer hos eskimoer på Grønland, økte interessen for inntaket av marint fett. Det viste seg at dødeligheten av hjerteinfarkt var kun 10 % hos eskimoer på Grønland sammenlignet med skandinavere generelt og eskimoer i Danmark. Omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) utgjorde en svært stor del av fettene i dietten til eskimoene på Grønland (Bang & Dyerberg, 1980). Undersøkelser av positive helseeffekter av marine langkjedete omega-3 fettsyrer har senere bekreftet at det ikke bare er hjerte- og karsykdommer som blir redusert, men at fettsyrene også er viktig for å redusere andre sykdommer, for normal utvikling av foster under svangerskap og for senere kognitiv utvikling (Se oversiktsartikler: Jensen, 2006; Lunn & Theobald, 2006; Psota, Gebauer, & Kris-Etherton, 2006; Tocher, 2015). Fiskeoljer er derfor svært ettertraktet og den globale etterspørselen er voksende. Fra 2005 til 2012 har en voksende andel av fiskeolje gått til human konsum, mens andelen brukt innen akvakultur har sunket noe (Figur 1). Dette kan bli utfordrende i fremtiden, da ressursene for utvinning av omega-3 fettsyrer er begrenset. Det er derfor nødvendig å finne andre alternativer enn fisk for å kunne dekke behovet fremover (Se oversiktsartikkel: Sheperd & Bachis, 2014).



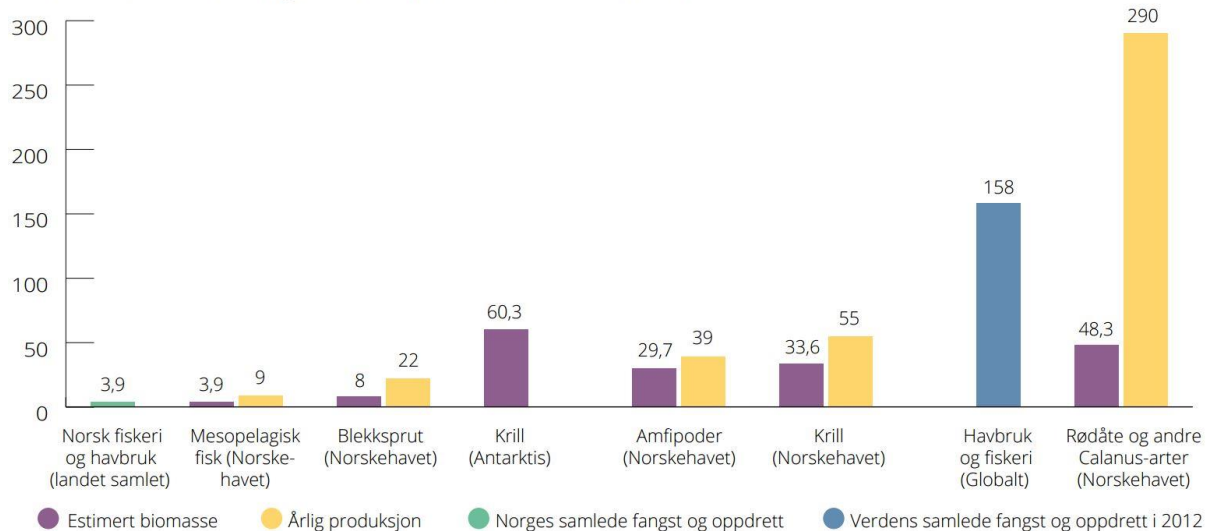
Figur 1 Bruk av fiskeoljer i akvakulturen og andre sektorer fra 2005-2012 i volum (millioner tonn). (Se oversiktsartikkel: Tocher, 2015)

Dyre- og planteplankton på lavere trofisk nivå kan være et godt alternativ til fiskeolje. Det er generelt akseptert at kun 10-15 % av energien fra et trofisk nivå blir inkorporert i biomassen til det neste. Størst andel av biomasse finner man derfor nederst i næringskjeden, og utnyttelse av

ressurser som dyreplankton kan derfor være bioøkonomisk effektivt (Bernasconi *et al.*, 2007; Gorreta *et al.*, 2002).

Raudåte og andre grupper dyreplankton er utbredt i Nord-Atlanteren (Aksnes & Blindheim, 1996). I Norskehavet er den årlige produksjonen av *Calanus* arter estimert til nesten 300 millioner tonn, og *Calanus finmarchicus* er den dominerende arten (Aksnes & Blindheim, 1996). Sammenlignet med verdens samlede fangst og oppdrett av fisk og skalldyr i 2012 (Figur 2), som var på 158 millioner tonn, representerer *Calanus* artene over 100 millioner tonn mer i årlig produksjon. Den årlige produksjonen av krill er også lavere enn *Calanus* artene, kun på 55 millioner tonn (Nærings-og fiskeridepartementet, 2016).

Biomasse for utvalgte arter (tall i millioner tonn)



Figur 2 Oversikt over biomasseestimer for utvalgte arter/områder (Nærings- og Fiskeridepartementet, 2016).

Dyreplankton inneholder også andre komponenter enn langkjede omega-3 fettsyrer, som man tror er helsemessig gunstige, blant annet vitaminer og pigmenter. Karotenoider har vist seg å kunne bidra til flere positive effekter i ulike helsetilstander som hjerte- og karsykdommer, diabetes, Alzheimers og benskjørhet. Det er da ikke karotenoidene alene som gir denne effekten, men en del i et sammensatt system i et variert kosthold (Se oversiktsartikkel: Johnson, 2002).

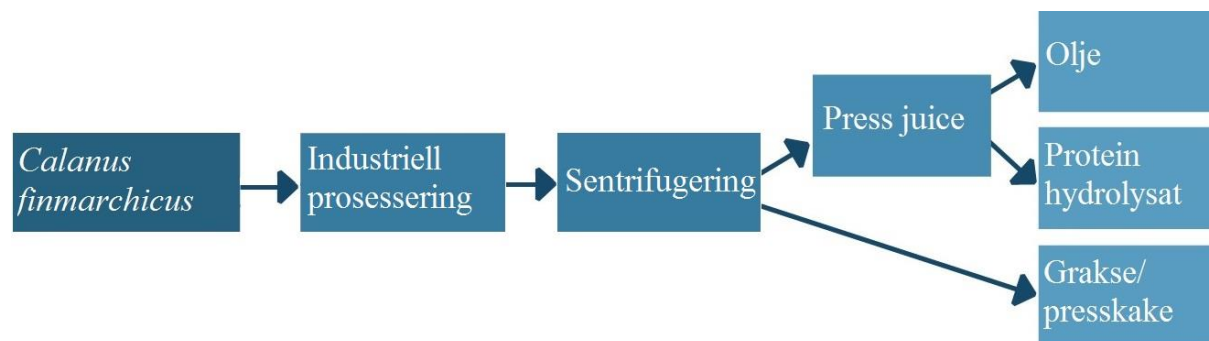
Tidligere har det ikke vært mulig å utnytte raudåte på grunn av manglende teknologi for innhøstning, men ny teknologi har gjort dette mulig. Firmaet Calanus AS ekstraherer i dag olje fra raudåte, som blir et kosttilskudd kalt Calanus[®] Oil (Figur 3). Fiskebåter høster raudåte ved bruk av en finmasket tråler i overflaten (Grimaldo *et al.*, 2011). Rett etter innhøsting blir raudåta fryst ned på båten. Den frosne fangsten blir fraktet til land og holdes fryst inntil prosesseringen

skal skje. Studier har vist at olje kan utvinnes fra *C. finmarchicus* ved å anvende enzymer (Vang, Pedersen, & Olsen, 2013b)



Figur 3 Innpakningen til Calanus® Oil i kapsler fra selskapet Calanus AS, slik det selges i dag (Foto: www.calanus.no)

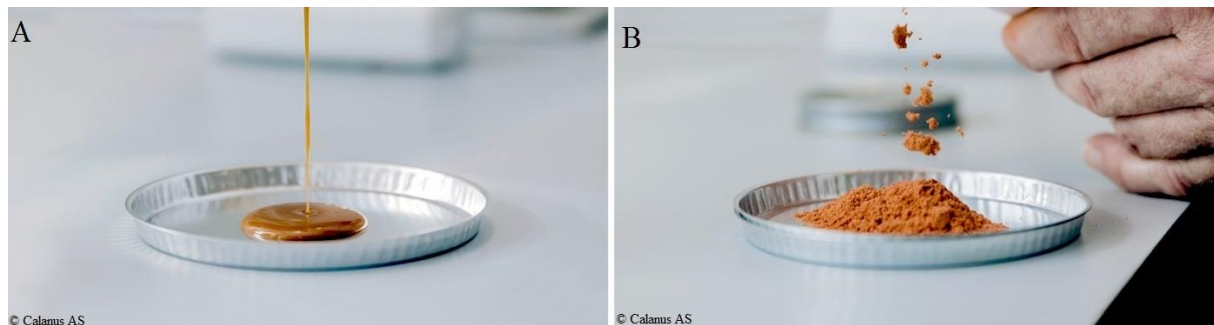
Tradisjonelt sett har fiskeoljer blitt ekstrahert ved å koke råmaterialet og deretter sentrifugere, mens planteoljer ofte blir ekstrahert ved bruk av organiske løsemidler (Gunstone, 2004). Organiske løsemidler har vist seg å være en effektiv metode for å ekstrahere ut olje fra Antarktisk krill (Gigliotti *et al.*, 2011). Men å bruke organiske løsemidler i en storskala industriproduksjon har flere ulemper, som utslipp av flyktige organiske forbindelser, resirkulering og sikkerhetshensyn (Se oversiktsartikkel: Rosenthal, Pyle, & Niranjana, 1996). Hydrolyseprosesser med enzymer er mer miljøvennlig og en sikrere metode for å ekstrahere olje. Etter utvinning av olje fra *C. finmarchicus* i fabrikken dannes to andre produkter, en hydrolysert proteinfase og en grakse/presskake (Figur 4).



Figur 4 Flytskjema som illustrerer den industrielle lipidekstraksjonen fra *C. finmarchicus* (Vang, 2015)

Proteinfasen er et proteinhydrolysat (Calanus® Hydrolysat, Figur 5A). Hydrolysatet har blitt gjort undersøkelser på og har mange egenskaper som gjør at det egner seg i fôr, gjerne til akvatiske dyr og kjæledyr. Det blir per dags dato brukt som smaksforsterker i hundefôr

(www.calanus.no). Graksen, også kalt presskake, blir tørket og solgt som pulver (Calanus® Powder, Figur 5B).



Figur 5 Calanus® Hydrolysate (A) og Calanus® Powder (B)

Ekstraksjon av olje fra planter eller animalske kilder kan resultere i at proteiner og peptider kommer med i oljen. Studier har påvist proteiner i olje fra peanøtter, soyabønner, solsikkefrø og nøtteoljer (Errahali *et al.*, 2002; Ramazzotti *et al.*, 2008). Tradisjonelle steg i raffinering av olje kan redusere mengden protein tilstede betraktelig. Oljer ekstrahert lavt i næringskjeden, for eksempel fra raudåte og Antarktisk krill, blir vanligvis ikke raffinert på grunn av lavt innhold av organiske miljøgifter. I tillegg vil andre ønskelige stoffer som fosfolipider og karotenoider forbli i oljeproduktet (Gunstone, 2004).

I skalldyr er det mest kjente allergenet tropomyosin. Tropomyosin er et coiled-coiled sekundært strukturprotein som spiller en viktig funksjonell rolle i mekanismen for kontraksjoner i muskelceller. (Shanti *et al.*, 1993). I fisk ble det første allergenet identifisert fra Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) og ble kalt Gad c 1. Allergenet tilhører en proteinfamilie kalt parvalbuminer (Bugajska-Schretter *et al.*, 2000). Mengden parvalbumin varierer i både ulike typer av fisk og fiskemuskel. Hvit fiskemuskel inneholder generelt mer parvalbumin enn mørk muskel (Kobayashi *et al.*, 2006).

C. finmarchicus inneholder også, i likhet med mange skalldyr, kitin. Kitin er et naturlig polysakkarid og beslektet med cellulose. Egenskaper som stor styrke og motstandsevne gjør kitin til et materiale som har et bredt brukspotensial, både innen forskning og industri (Se oversiktsartikkel: Pillai, Paul, & Sharma, 2009). I naturen er kitin en del av eksoskjellet til artropoder eller i celleveggen til sopp og gjær. I tillegg produseres kitin av organismer i lavere plante- og dyreriker. I industrien er krabbe og rekeskall hovedkilden til kitin. Under ekstraksjon av kitin, vil det kunne bli omdannet til kitosan når graden av deacylering blir høy nok (Se oversiktsartikkel: Rinaudo, 2006).

Under produksjonen av oljen fra *C. finmarchicus* får man også et tredje produkt, en presskake eller grakse. Dette råstoffet har man lite kunnskap om, med tanke på innhold og

egenskaper. Med mer kunnskap om produktet vil markedsmulighetene kunne bli bedre. I denne masteroppgaven vil det derfor være som mål å undersøke to bestanddeler i graksen: protein og kitin. Det overordnede målet er å få kunnskap som kan være med å bidra til kommersialisering av grakse-produktet. Konkrete delmål er:

1. Å undersøke om skalldyrallergenet tropomyosin og fiskeallergenet parvalbumin er tilstede i graksen
2. Studere om kitin kan utvinnes fra graksen ved bruk av kjemiske metoder
3. Undersøke om enzymatisk hydrolyse med kommersielle enzymer kan frigjøre mer protein og fett fra graksen

2 Bakgrunn

2.1 *Calanus finmarchicus* (raudåte)

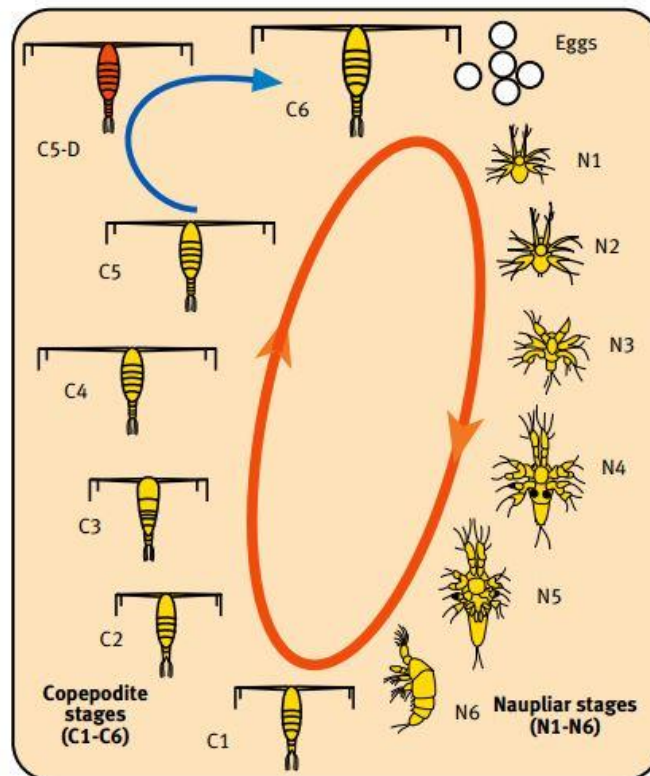
Raudåte er et dyreplankton som tilhører kopepoder, kalt hoppekreps på norsk, som har stor utbredelse i Nord-Atlanteren. I Norskehavet har den en nøkkelrolle i økosystemet, hvor den utgjør hoveddelen av dyreplanktonet (Aksnes & Blindheim, 1996). Det finnes fire ulike arter av *Calanus* i norske farvann; *C. finmarchicus*, *C. helgolandicus*, *C. glacialis* og *C. hyperboreus*. Det er *Calanus finmarchicus* (Figur 6), også kjent som raudåte, som har størst biomasse og er den dominerende arten i Norskehavet (Fiskeridirektoratet, 2016). De verdifulle omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA, 20:5 n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6 n-3) blir produsert av planteplankton i det marine næringsnett (Uttaro, 2006). Organismer på høyere trofisk nivå får i seg planteplankton ved å innta dyreplankton, som er den viktige linken mellom organismene på ulike trofiske nivå (Utne *et al.*, 2012). Dyreplanktonet kan derfor være en potensiell kilde til disse fettsyrene.



Figur 6 *Calanus finmarchicus*

Raudåten gjennomgår 12 ulike utviklingsstadier fra egg til et voksent individ. De første seks stadiene er naupliistadier (N1-N6), deretter går den igjennom seks kopepodittstadier (C1-C6) (Figur 7). Det siste stadiet, C6, regnes som det voksne stadiet og man kan på dette tidspunkt skille mellom hunner og hanner. I stadiet C5 er raudåta på sitt mest lipidrike stadium, da er fettlagrene på sitt største og blir utnyttet under overvintring i dypere hav. Ved overvintring går de inn i en hviletilstand til det er senvinter eller vår. De kommer da opp igjen for å gyte og har fullført sin ettårige livssyklus, og vil da kunne produsere en ny generasjon med raudåte (Fiskeridirektoratet, 2016; FRS, 2004). Raudåta har en varierende sammensetning av lipid,

mellom 5 og 8 % avhengig av årstid. I tillegg er det rundt 80-82 % vann, 10-11 % protein og 2 % mineraler (Vang *et al.*, 2013b).



Figur 7 Livssyklusen til *C. finmarchicus*. Egget blir klekket til en nauplii som utvikles i seks stadier (N1-N6), og deretter videre i fem ulike copepodittstadier (C1-C5). I det siste stadiet, C6, når individet det voksne stadiet. Fisheries Reachers Services (FRS, 2004)

2.2 Lipidinnhold i raudåte

Raudåta lever av planteplankton, som kan gjenspeiles i sammensetningen av fettsyrene i dyret. Forskjellen mellom fett i raudåta og andre marine dyr er hvordan fettsyrene er lagret. I fisk og sjøpattedyr er hovedsakelig de marine fettsyrene bundet som triacylglyseroler (TAG), men i raudåta er mesteparten av fettsyrene bundet som voksester. Voksesterinnholdet er mellom 80-90 % av det totale lipidinnholdet mellom mars og juni (Falk-Petersen, Sargent, & Tande, 1987). Voksester er bygd opp av langkjedete primære alkoholer og langkjedede fettsyrer (estere). Raudåta lagrer fett som voksester og dette brukes til energilagring gjennom overvintring, og i tillegg regulerer det oppdriften (Se oversiktsartikkel: Falk-Petersen *et al.*, 2009). Andre typer fett er også tilstede, som TAG, fosfolipider, steroler og frie fettsyrer, men bare i små mengder. Det totale innholdet av lipid og voksester avhenger av hvor langt nord raudåta lever, arktiske og antarktiske arter har vist seg å ha høyst innhold. Dette er på grunn av den lave temperaturen i havet og at primærproduksjonen skjer over kort tid og dermed med høy intensitet (Se oversiktsartikkel: Lee, Hagen, & Kattner, 2006). Voksesterne har et høyt innhold

av omega-3 fettsyrene EPA og DHA, men også stearidonsyre (SDA, 18:4n-3) (Kattner, 1989; Lee, Nevenzel, & Paffenhöfer, 1971). Fettalkoholene er hovedsakelig enumettede (Dalsgaard *et al.*, 2003; Graeve, Albers, & Kattner, 2005).

For dyr, inkludert fisk og mennesker, er det to essensielle fettsyrer: linolensyre (LA 18:2n-6) og α -linolensyre (ALA 18:3n-3) (Se oversiktsartikkel: Burdge & Calder, 2007). Det er ikke disse som er de viktigste i seg selv, men hva de syntetiseres videre som, nemlig arakidonsyre (ARA 20:4n-6) og EPA (20:5n-3) /DHA (22:6n-3). Dyr og fisk har imidlertid ikke en spesiell effektiv evne til å syntetisere EPA og DHA fra ALA (Se oversiktsartikkel: Burdge & Calder, 2007). Planter inneholder generelt mye mer LA enn ALA, slik at det dannes mer av ARA enn de to langkjedede omega-3 fettsyrene EPA og DHA (Se oversiktsartikkel: Calder, 2015). Da den marine næringskjeden har sin basis i marine encellede alger, vil den eneste reelle måten å få i seg de langkjedete omega-3 fettsyrene være ved å spise sjømat, som fisk og skalldyr (Se oversiktsartikkel: Arterburn, Hall, & Oken, 2006).

Raudåta har også et høyt innhold av astaxanthin, det er målt til å være 1600 ppm i ekstraherte lipider (Bergvik *et al.*, 2012). Monoestere og diestere av astaxanthin er de vanligste karotenoidene i raudåta, opptil 90 % (Foss, Renstrom, & Liaaen Jensen, 1987). Funksjonen av astaxanthin har vært diskutert, og noen mener at en av de sentrale funksjonene er å forbedre beskyttelsen av lagrede lipider mot oksidasjon. I tillegg tror man at i kopepoder at astaxanthin er en del av lipid metabolismen og fungerer som både fotoprotein og i kamuflasje (Se oversiktsartikkel: Pedersen, Vang, & Olsen, 2014). Ekstraksjon av olje fra raudåte resulterer i en akkumulasjon av astaxanthin i oljen, som gir den karakteristiske røde fargen.

2.2.1 Allergi og allergener

Allergi er en sykdom hvor immunresponsen forårsaker inflammasjon, som skader kroppen selv (Widmaier, Hershel, & Strang, 2011). Antigenene som forårsaker reaksjonen er kalt allergener. Ofte er disse harmløse i seg selv, men immunresponsen de skaper er skadelig for kroppen. Matallergi forårsakes av proteiner i mat, og dette gir vanligvis en rask reaksjon. Reaksjonen trigges av at epitoper (allergene seter) bindes til et antistoff, som ved matallergi vanligvis er immunglobulin E (IgE) (Se oversiktsartikkel: Crevel, Kerkhoff, & Koning, 2000). Denne typen antistoff kan føre til flere forskjellige responser, som gir ulike symptomer. Symptomene kan variere fra utslett, luftveisproblemer og problemer med fordøyelsen, til mer alvorlige som astma og anafylaktisk sjokk, hvor sistnevnte kan være dødelig (FHI, 2015).

Fisk og sjømat representerer en av de viktigste årsakene til IgE-mediert allergi, spesielt i land hvor majoriteten av befolkningen lever av fiske, og fisk er en stor del av kostholdet (Se

oversiktsartikkel: Samartin, Marcos, & Chandra, 2001) Tropomyosin er det mest kjente skalldyrsallergenet. Allergenet består av 281 aminosyrer og har en molekylærvekt mellom 38-41 kDa (Shanti *et al.*, 1993) og blir kalt et pan-allergen da det er en høy grad av homologi, opptil 98 %, mellom tropomyosin i ulike skalldyr (Se oversiktsartikkel: Prester, 2016). Tropomyosin i skalldyr deler også stor homologi med tropomyosin i støvmidd og kakerlakker. Grunnen til at det er større konsentrasjon av tropomyosin enn andre skalldyrsallergener, er funksjonen i muskler som tropomyosin har. Tropomyosin brukes ofte som biomarkør for påvisning av skalldyrsallergener (Kamath *et al.*, 2013).

I torsk er det mest kjente allergenet kalt Gad c 1. Allergenet er bygd opp av 113 aminosyrer med en molekylær vekt på omtrent 12-13 kDa. Proteinet er en del av en familie kalt parvalbuminer (Elsayed & Apold, 1983). Parvalbumin kan bli delt i to ulike grupper: α og β . I fisk er normalt parvalbuminet fra gruppen β (Van *et al.*, 1999). Det har også blitt identifisert flere isoformer av parvalbumin i fisk, som i karpe og sild. En høy strukturell homologi mellom 64-89 % har også blitt vist mellom ulike arter fisker fra saltvann og ferskvann (Se oversiktsartikkel: Prester, 2016). Disse proteinene er vannløselige med høy affinitet for kalsium og transporterer kalsiumioner til sarkoplasmatiske retikulum (Bugajska-Schretter *et al.*, 2000).

Ulike måter å prosessere på kan påvirke hvor allergene proteiner er, for eksempel varmebehandling, enzymatisk hydrolyse og fysisk prosessering som kan gi økt eller redusert allergenisitet (Nowak-Wegrzyn & Fiocchi, 2009; Thomas *et al.*, 2007). Tropomyosin er et varmemestabil protein og kan derfor motstå varmebehandling og andre typiske matprosessmetoder (Kamath *et al.*, 2013; Pedrosa *et al.*, 2015; Shanti *et al.*, 1993). Parvalbumin har vist seg å være svært varmemestabil og resistent mot denaturering og proteolytisk nedbrytning (Arif & Hasnain, 2010; Leung *et al.*, 2014).

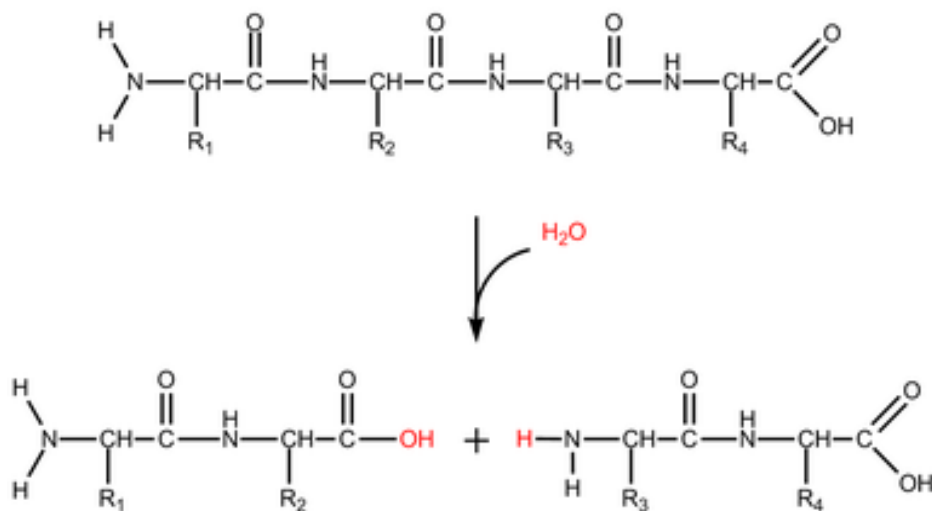
2.3 Anvendelse av marint restråstoff

Innenfor marin sektor var det i 2015 omtrent 890 000 tonn restråstoff fra en råstoffbase på 3,44 millioner tonn fisk og skalldyr. Omtrent 76 % av restråstoffet anvendes som ingredienser inn i fôr til fisk, husdyr, pelsdyr og kjæledyr eller som produkter til humant konsum. Til tross for dette er det et stort potensial å øke graden av utnyttelse, samt å øke verdien på råstoffet (Richardsen & Nystøyl, 2016). Marint restråstoff blir i all hovedsak utnyttet som ingrediens i fôrmarkedet, eller som konsumprodukter (lever, rogn, buklist, smakstilsetninger). Det er foreløpig ikke mye av restråstoffet i Norge som går inn i markeder med høyverdiprodukter som kosttilskudd-, kosmetikk- eller farmasimarkedet (Richardsen & Nystøyl, 2016).

Det aller meste av restråstoffet gjennomgår en eller annen form for prosessering. Den klart største prosessanvendelsen er ensilasjebasert foredling, 41 % av restråstoffet gikk i 2014 til denne anvendelsen og økte i 2015 til 45 %, ifølge SINTEF. Marine oljer utgjør naturligvis en av de viktigste produktgruppene fra restråstoff. Andre produktgrupper er functional food, kosmetikk, kosttilskudd og farmasiprodukter, men disse produktene er svært små i volum i forhold til bulkproduktene. Til gjengjeld oppnår de derimot en høyere pris på markedet enn volumproduktene (Richardsen & Nystøyl, 2016). Selv om det har vært et stort fokus på de gode helseeffektene fra oljeproduktene fra sjømatindustrien, er det nå vokst frem større interesse for proteinene og andre bioaktive forbindelser som er relevante for å bedre helsen i mennesker ved ulike mekanismer. Fisk og sjømat er en utmerket kilde for gode kvalitetsproteiner som ved inntak kan være kilder til bioaktive peptider (Jensen *et al.*, 2013; Undeland *et al.*, 2009).

2.3.1 Hydrolyse av peptidbindinger

Hydrolyse beskriver en prosess hvor substrat, katalysator og vann inngår. Reaksjonen skjer ved at katalysatoren kløyver en peptidbinding i et protein og et vannmolekyl bli tatt opp (Figur 8).



Figur 8 Hydrolysereaksjon hvor en peptidbinding blir spaltet og et vannmolekyl tas opp og blir delt mellom det spaltede molekylet (www.biotechacadamy.dk)

I et proteinhydrolysat vil proteiner være brutt ned i ulike størrelser. Ved å prosessere restråstoff, som for eksempel fra fisk, gjennom en slik hydrolyseprosess kan man få et fiskeproteinhydrolysat (FPH) (Se oversiktsartikkel: Kristinsson & Rasco, 2000). Hydrolyse av proteiner kan bli utført kjemisk eller enzymatisk. Enzymatisk hydrolyse bruker enzymer, og involverer en mildere prosess og man unngår de ekstreme forholdene som må til under en kjemisk hydrolyse. Enzymer er biologiske katalysatorer som får reaksjoner til å gå mye raskere ved å senke aktiveringsenergien, og uten tilstedeværelsen av enzymet vil reaksjonen ta lang tid

å fullføre eller kanskje ikke skje i det hele tatt (Se oversiktsartikkel: Kristinsson & Rasco, 2000). Under en hydrolyseprosess er det flere faktorer som må tas hensyn til, som sammensetning av restråstoff, enzymtype, vanntilsetning, inaktivering av endogene enzymer og forhold som pH, temperatur og tid. Alle disse faktorene kan endres på, slik at prosessen blir så optimal som mulig og utbytte av nedbrutte proteiner blir høyest mulig (Se oversiktsartikler: Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017; Kristinsson & Rasco, 2000).

I en hydrolyseprosess med enzymer blir det 3 ulike faser: Supernatant, fettfase og fast fase. Supernatant inneholder peptider, aminosyrer og andre vannløselige forbindelser. Fra dette kan man videre inndampe til konsentrater og eventuelt isolere forbindelser. Fettfasen inneholder fettløselige forbindelser og oljer, og den faste fasen består av faste stoffer, som for eksempel bein og skall (Nofima, 2016).

Det har vært fokusert mest på langkjedete omega-3 fettsyrer i sammenheng med sjømat, men fisk og sjømat er også svært gode kilder til høy-kvalitets proteiner, som i fordøyelsen kan være kilder for bioaktive peptider med dokumenterte fysiologiske effekter. Disse effektene kan være antioksidativ, antihypertensiv eller andre (Undeland *et al.*, 2009). Det er så langt for det meste dokumentasjon fra *in vitro* studier, men det er økende andel av prekliniske og kliniske studier som utføres (Bordenave *et al.*, 2002; Fahmi *et al.*, 2004; Hai-Lun *et al.*, 2006; Jensen & Mæhre, 2016; Picot *et al.*, 2006; Sathivel *et al.*, 2003). Et eksempel på menneskestudier er effekten av marine proteiner på oksidativt stress og antioksidativ status av Parra *et al.* (2007). Oksidativt stress kan forårsakes av radikaler og skade molekyler. Radikaler er reaktive molekyler med uparede elektroner og dannes ved oksidasjonsreaksjoner under normal metabolisme. Oksidativt stress skjer når produksjonen av reaktive oksygen forbindelser og reaktive nitrogen forbindelser (ROS/NOS) overgår antioksidantforsvaret i kroppen. Noen aminosyrer fungerer som antioksidanter og dermed hindrer oksidativt stress. Studiet viste at oksidasjonsprodukter var signifikant redusert i de som hadde spist torskbasert diett og antioksidant-kapasiteten var økt betraktelig (Parra *et al.*, 2007).

I en rapport fra RUBIN (2010) undersøkte de muligheter for marine proteiningredienser i det amerikanske helse- og ernæringsmarkedet. Prosjektet antydte et stort potensial for høyverdige fiskeproteiner inn mot det amerikanske helse- og ernæringsmarkedet, rundt 45-60 millioner US dollar i 2010. Proteiningredienser benyttes både på grunn av funksjonelle egenskaper i næringsmidler og på grunn av ernæringsmessig verdi. Det er i hovedsak protein fra myse og soya som brukes i helse- og ernæringsprodukter. De viktigste applikasjonene for proteinbasert helse- og ernæringsprodukter er smakstilsatt pulver for utblanding i vann eller melk, RTD (ready to drink) drikker og barer. Potensialet for marine peptider er stort, men har

noen utfordringer. Den største utfordringen er utvikling av produkter uten smak eller lukt av fisk eller harsk fiskeolje, det er derfor viktig med høy kvalitet i proteinproduktene slik at stabiliteten til det endelige produktet er akseptabel (Se oversiktsartikkel: Thorkelsson *et al.*, 2009). Det er derfor en skepsis til marine ingredienser. I tillegg er det nødvendig med kunnskap om utviklingen av slike proteiner/peptider og prosesseringen.

3 Materialer og Metoder

3.1 Materialer

Grakse, proteinhydrolysat og hel, frossen raudåte ble levert av Calanus AS (Tromsø, Norge). Grakse ble levert 16 august 2016 (LOT: CG-16-3301) og 12 september 2016 (LOT: CR-4A-434) og lagret ved henholdsvis -50 °C og -20 °C. Proteinhydrolysatet (45,2 % tørrstoff) ble produsert i mai 2014 (LOT: CLH-14-4501) og oppbevart ved -20 °C. Torsk ble fisket i 2016 i Lofoten. Torskemuskelen ble så homogenisert og lagret ved -50 °C. Reker ble kjøpt i matvarebutikk og oppbevart ved -50 °C. Dersom ikke annet nevnes, er alle kjemikalier benyttet av p.a. kvalitet fra Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland).

3.2 Metoder

3.2.1 Vann- og askeinnhold

Tre paralleller ble analysert for hver prøve (10 g). Graksen ble tørket i tørkeskap på 105 °C i 2 døgn og veid på nytt. Differansen mellom våt og tørket prøve ble så brukt for å beregne vanninnhold prosentvis.

$$\text{Vanninnhold: } \frac{\text{vekt g (før tørking)} - \text{vekt g (etter tørking)}}{\text{vekt g (før tørking)}} \times 100 \%$$

De tørkede prøvene ble så brukt videre for å bestemme askeinnholdet. Tørkede prøver ble forbrent ved 540 °C i 16 timer og veid.

$$\text{Askeinnhold (TS): } \frac{\text{vekt g (etter tørking og forbrenning)}}{\text{vekt g (etter tørking)}} \times 100 \%$$

3.2.2 Kitininnhold

Kitininnhold i graksen ble bestemt ved å bruke metoden beskrevet av Spinelli, Lehman, og Wieg (1974) med noen modifikasjoner. For å fjerne proteiner ble grakse (5 g) tilsatt 400 ml 2 % NaOH og kokt i vannbad på 100 °C i en time. Deretter ble blandingen vakuumfiltrert og det faste stoffet ble tilsatt 5 % HCl for å fjerne kalk (aske), og satt til å stå i romtemperatur med røring over natten. Det isolerte kitinet ble vasket med varmt vann og filtrert, dette steget ble gjentatt to ganger. Til slutt ble kitinet tørket i tørkeskap på 110 °C og veid for å regne utbytte.

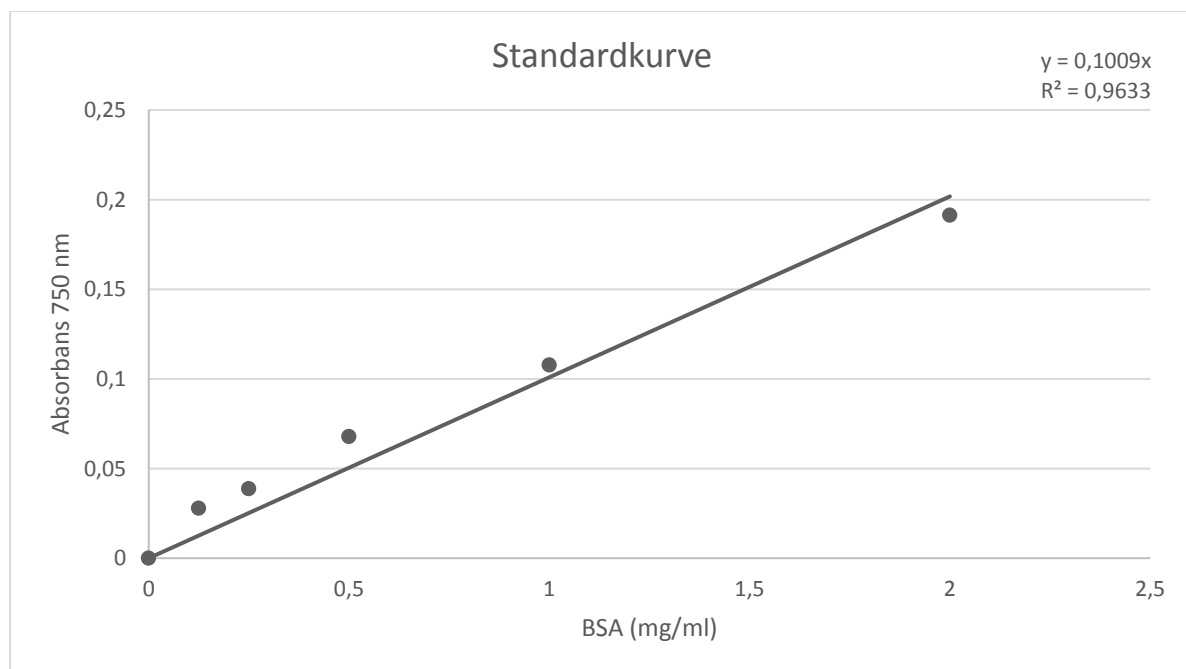
3.2.3 Fettinnhold i grakse

For å måle totalt fettinnhold i graksen ble Folchs metode brukt (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957), med noen modifikasjoner. Det ble veid ut cirka 3 gram grakse og tilsatt 35 ml diklormetan:metanol (DCM:MeOH, 2:1) og satt til risting (200 rpm) i 30 min (IKA® VIBRAX VXR basic, Tyskland) ved romtemperatur. Blandingen ble filtrert gjennom et foldefilter dypnet

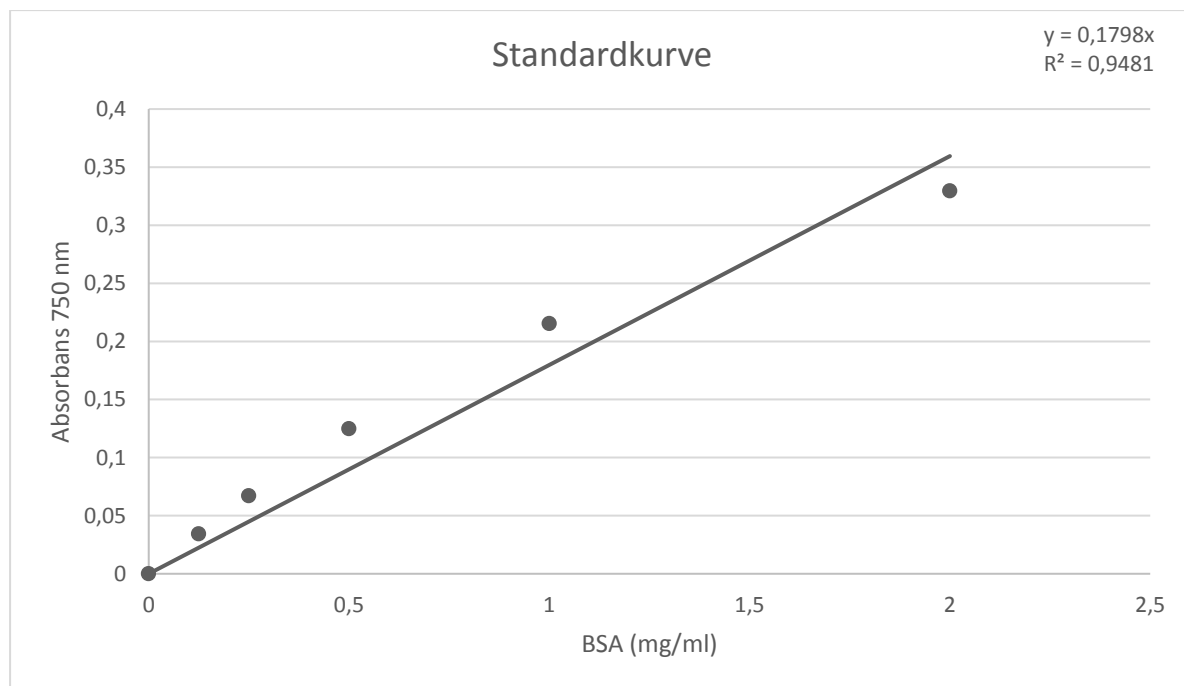
i DCM:MeOH (2:1). Filtratet ble tilsatt 12 ml 0,9 % natriumklorid og sentrifugert på 2000 g (Heraeus Multifuge 1 S-R sentrifuge, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) i 10 min ved 20 °C. To faser, en vannfase øverst og en fettfase nederst, ble skilt og fettfasen dampet tørr med nitrogengass. Fettet ble veid for å regne ut fettinnhold.

3.2.4 Proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjon ble bestemt ved bruk av DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) og metoden ble utført etter produsents protokoll. En standardkurve ble laget med bovint serumalbumin (BSA) løst i 10 % SDS for de biologiske ekstraktene (Figur 9). For prøver fra supernatant etter enzymatiske hydrolyser, ble BSA løst i vann og en standardkurve ble laget (Figur 10). Absorbans ble avlest ved 750 nm på en SpectraMax i3, Molecular Devices (Wals, Østerrike)



Figur 9 Standardkurve laget med bovint serumalbumin løst i 10 % SDS. En lineær trendlinje ble funnet.



Figur 10 Standardkurve laget med bovint serum albumin løst i vann. En lineær trendlinje ble funnet.

Ut i fra plottet ble en trendlinje funnet med førstegradsfunksjonen $y=ax + b$. Dette ble brukt for å regne ut mengden protein i de biologiske ekstraktene laget fra *C. finmarchicus*, torskemuskel, rekemuskel, proteinhydrolysat og grakse (Figur 9). Trendlinjen fra Figur 10 ble brukt for å regne ut mengden protein i supernatant etter enzymatisk hydrolyse.

3.2.5 SDS-PAGE og Western Blotting

Frossen *C. finmarchicus* og grakse ble blandet med metanol for å fjerne fett. Til 0,2 g *C. finmarchicus* og 0,5 g grakse ble det tilsatt 1,8 ml metanol. Dette ble ristet raskt tre ganger i løpet av 30 min. Metanolen (supernatanten) ble fjernet etter sentrifugering av blandingen på 20 000 g (Eppendorf centrifuge 5417R, Hamburg, Tyskland) i 10 min. Pelleten ble løst opp i 1,5 ml 10 % SDS. Proteinhydrolysat, most muskel fra torsk og reke ble tilsatt 10 deler 10 % SDS. Alle prøvene ble kokt i vannbad i 30 min for å løse opp proteinene. Deretter ble det sentrifugert på 4500 g (Multifuge 1 S-R sentrifuge, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) i 10 min.

En del supernatant ble tilsatt lik del SDS elektroforesebuffer (25 % glyserol, 2 % SDS, 0,1 % bromfenolblå, 14,4 mmol 2-mercaptoetanol, 60 med mer Tris/HCl, pH 6,8) og varmet i 10 min ved 90 °C og spunnet raskt ned før applisering på SDS-PAGE. SDS-PAGE ble utført ved å bruke 4-12% NuPAGE® Novex® BIS-Tris polyacrylamid gel i en XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) med MES-buffer, 200 V i 45 min ved

romtemperatur. Som molekylær vektmarkør ble SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Thermo Fisher Scientific). Gelen ble vasket i MilliQ vann 3x5 min, så farget med Coomassie blue (SimplyBlue[™] Safe-Stain, Novex[™], Carlsbad, CA, USA) i 1 time i romtemperatur og avfarget i 1 time i MilliQ vann.

En SDS-PAGE ble utført som over (uten vasking og farging) og brukt videre i Western blot. Western blotting (PVDF-membran) ble utført som beskrevet av produsent, XCell II[™] Blot Module (Invitrogen[™]) ved bruk av NuPAGE[®] Transfer Buffer (20X) (katalognummer: NP0006, Novex[™]). Etter blotting ble membranen vasket 2x5 min i TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl) og blokket med TBS som inneholdt 0,05 % Tween og 5 % lett-melk i 2 timer (blokkebuffer). Membranen ble så klippet i to. En del ble inkubert med primært antistoff, polyklonalt reke-tropomyosin antistoff (katalognummer: orb11347) produsert i mus (Biorbyt Limited Cambridge, UK), fortynnet 1:12 000 i blokkebuffer. Den andre delen av membranen ble inkubert med parvalbumin beta antistoff (katalognummer: orb240655) produsert i kanin (Biorbyt), fortynnet 1:15 000. Begge delene av membranen ble inkubert med hvert sitt primære antistoff ved 4 °C over natten Etter inkubasjonen ble membrandelene vasket 3x5 min i TBS som inneholdt 0,05 % Tween (TTBS) og deretter inkubert med sekundært antistoff. Membrandelen inkubert med tropomyosin som primært antistoff ble inkubert med horseradish peroxidase (goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), fortynnet 1:10 000 i TTBS. Membrandelen inkubert med parvalbumin ble tilsatt horseradish peroxidase (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc.) som sekundært antistoff, fortynnet 1:10 000 i TTBS. Deretter ble begge membrandelene vasket 3x5 min i TTBS, så 5 min i MilliQ vann og inkubert med 0,8 ml Supersignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Til slutt ble membrandelene eksponert med Kodak Molecular Imaging (Carestream Health, Onex Corp., Toronto, Canada).

3.2.6 pH i grakse

En del grakse ble blandet med lik del 0,15M KCl før måling av pH (744 pH meter, Metrohm, Sveits).

3.2.7 Enzymatisk hydrolyse

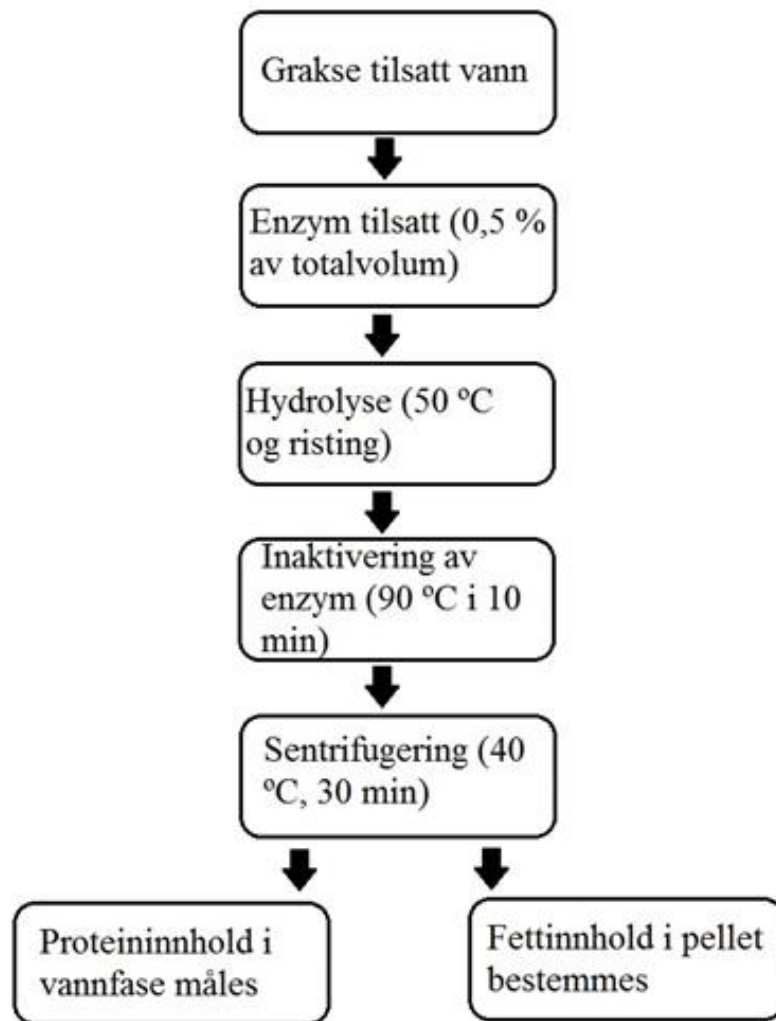
For å undersøke om det var mulig å utvinne mer fett og protein fra graksen ble enzymatisk hydrolyse gjennomført med ulike enzymer (Figur 11). Alle enzymer ble tilsatt til 0,5 % av totalvolumet. Hydrolyseprosessen ble utført på to ulike måter:

1. Enzymatisk hydrolyse utført i vannbad

Graksen ble først blandet med vann, til 1 del grakse ble det tilsatt 3 deler destillert vann. Det ble så tilsatt enzym og satt i vannbad ved 50 °C. For Alcalase® (Novozymes AS, Danmark) ble det forsøkt å hydrolysere i 2 timer og 20 timer. For enzymene Performase® (Enzybel International S.A., Belgia) og Protamex® (Novozymes AS) ble det hydrolysert i 1 time og 2 timer. Etter endt hydrolyse, ble den hydrolyserte graksen og tilhørende kontroller varmet opp til 90-95 °C i 10 minutter. Dette ble sentrifugert ved 40 °C i 30 minutter på 3688 g (Multifuge 1 S-R sentrifuge).

2. Enzymatisk hydrolyse utført i inkubator

Alle hydrolysene ble utført på 50 °C i 1 time, med risting (150 rpm) i en Innova™ 4300 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, USA). Til graksen ble det tilsatt 3 deler vann for første hydrolyse med Alcalase®. Dette ble gjentatt for Alcalase®, og enzymene Performase®, Protamex®, Neutrase® (Novozymes AS) og Bromelain (Enzybel International S.A.), men da ble det tilsatt 5 deler vann til 1 del grakse. Etter hydrolyse ble graksen plassert i et vannbad, og varmet opp til 90 °C i 10 minutter. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 40 °C i 30 minutter på 3688 g (Multifuge 1 S-R sentrifuge).



Figur 11 Oversikt over stegene i enzymatisk hydrolyse. Selve hydrolysen ble utført i vannbad eller inkubator og mengde vann tilsatt var enten 3 deler eller 5 deler til 1 del grakse.

4 Resultater

4.1 Sammensetning av grakse

Tørrstoff i graksen ble funnet å være 30 % mens askeinnholdet var 9,9 % på tørrstoffbasis. Kitin, fett og proteininnhold ble funnet å være henholdsvis 23,5, 25,2 og 21,3 % på tørrstoffbasis (Tabell 1)

Tabell 1 Tørrstoff (%) og aske-, kitin-, fett- og proteininnhold (% TS) i grakse (TS: tørrstoff, n=3)

Komponent	Prosentinnhold
Tørrstoff (%)	30 ± 0,2
Aske (% TS)	9,9 ± 0,04
Kitin (% TS)	23,5 ± 1,6
Fett (% TS)	25,2 ± 0,7
Protein (% TS)	21,3 ± 0,3

Graksen inneholdt 7,5 % fett, 3 % aske, 7 % kitin og 6,1 % protein på våtvektbasis.

4.2 Renhet til kitin

Kitin i graksen ble rensed med å vaske med lut og syre som beskrevet og deretter tørket ved 105 °C i 1 døgn. Renheten til det ekstraherte kitinet ble så undersøkt ved å måle protein- og askeinnhold (Tabell 2). Kitinet inneholdt 0,22 % aske og 2,6 % protein.

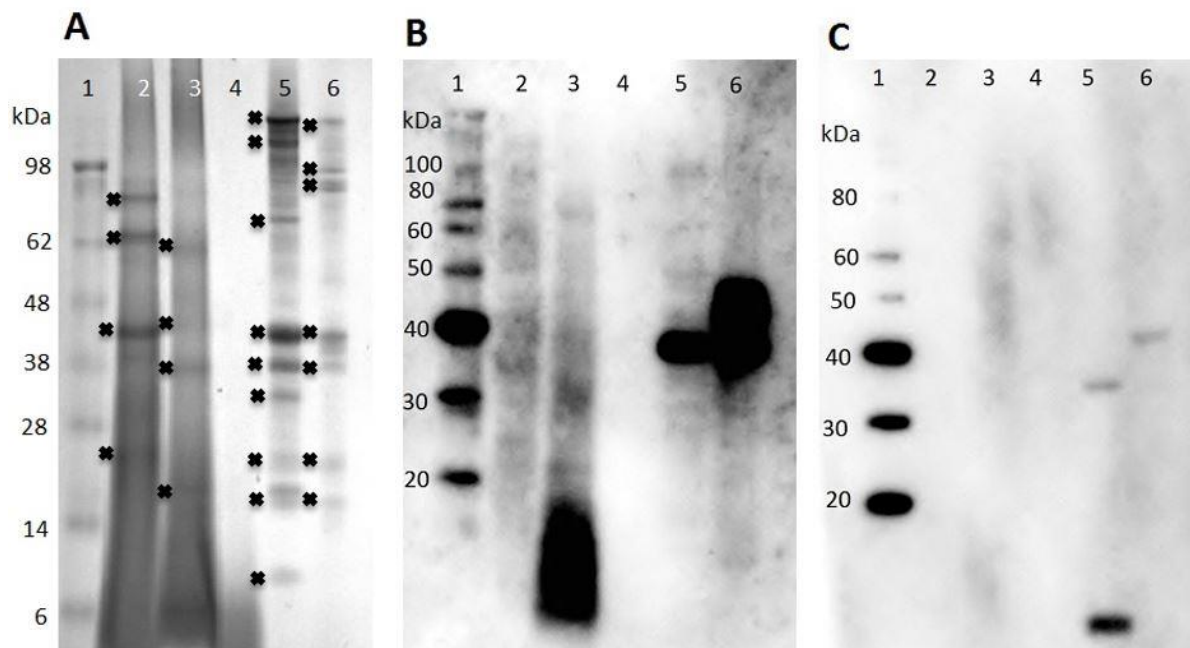
Tabell 2 Kitin ble ekstrahert fra grakse og renheten undersøkt (aske- og proteininnhold) og her sammenlignet med aske- og proteininnhold i grakse (TS: Tørrstoffbasis, n=3)

Komponent	Askeinnhold (% TS)	Proteinkonsentrasjon (% TS)
Ekstrahert kitin	0,22 ± 0,01	2,6 ± 0,1
Grakse	9,9 ± 0,04	21,3 ± 0,3

4.3 SDS-PAGE og Western blotting

For å finne ut størrelsesfordelingen av protein i graksen og om den inneholdt noen allergener (tropomyosin og parvalbumin), ble SDS-PAGE og Western Blot utført på ekstrahert protein fra *C. finmarchicus*, grakse, proteinhydrolysat, torskemuskel og rekemuskel (Figur 12). Anti-reketropomyosin og anti-fiskemuskelparvalbumin ble benyttet som primært antistoff i Western blottingen.

Resultatene fra SDS-PAGE (Figur 12A) viste flere proteinbånd i prøvene ekstrahert fra *C. finmarchicus* (spor 2), grakse (spor 3), torskemuskel (spor 5) og rekemuskel (spor 6). Ekstraksjonen av proteiner fra *C. finmarchicus* (spor 2) har flere tydelige bånd. Et bånd er på størrelsen ved omtrent 80 kDa, det neste er 64 kDa. Et annet bånd vises tydelig ved cirka 40 kDa. Lenger ned i gelen blir det mer utydelig, men et bånd kan tydes ved omtrent 25 kDa. I spor 3 er proteiner ekstrahert fra grakse. Det er 4 proteinbånd som vises, de ligger ved omtrent 62 kDa, 40 kDa, 38 kDa og 20 kDa. Det er ingen proteinbånd i neste spor (spor 4), hvor det er proteiner ekstrahert fra proteinhydrolysatet. Man kan kun se en mørk, utydelig farge nederst i sporet. I spor 5 er det proteiner ekstrahert fra torskemuskel. Veldig mange bånd er tydelige, øverst i sporet er et protein ved omtrent 198 kDa, deretter er det bånd ved omtrent 120, 70, 40, 38, 35, 20, 17 og 12 kDa. Det siste sporet, spor 6, er proteiner ekstrahert fra rekemuskel og viser også en god del proteinbånd. Øverst i sporet er et protein på omtrent 120 kDa, deretter 98, 88, 40, 38, 20 og 17 kDa.



Figur 12 SDS-PAGE (A) og Western Blot med anti-tropomyosin (B) og anti-parvalbumin (C) som primære antistoffer. Proteiner ekstrahert fra: Spor 2; fryselaget *C. finmarchicus* (294,8 µg). Spor 3; grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil (395,9 µg). Spor 4; proteinhydrolysat fra produksjon av Calanus[®] Oil (619,5 µg). Spor 5 torskemuskel (8,8 µg). Spor 6 rekemuskel (A og C: 13,22 µg, B: 5,3 µg). Spor 1; SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Protein Standard (A) og MagicMarker[™]XP Western Protein Standard (B og C) ble brukt som molekylærvekt markører.

Western Blot av de samme ekstraktene med det primære antistoffet for reketropomyosin (Figur 12B) viste at det primære antistoffet mot reke-tropomyosin reagerte med proteiner fra *C. finmarchicus*, graksen, torskemuskel og rekemuskel. I spor 2 er det ingen kraftige

reaksjonsbånd mot proteiner. Svake bånd kan imidlertid sees ved molekylvekt 60 kDa, 40 kDa og 25 kDa. Tilsvarende for proteiner fra graksen (spor 3) med svake bånd ved molekylvekt 80 kDa og 35 kDa. Kraftig reaksjon ser man imidlertid i molekylvektsområdet 5-15 kDa. Det er ingen reaksjon mellom antistoffet og proteiner ekstrahert fra proteinhydrolysate (spor 4). I spor 5 er det en sterk reaksjon mellom proteiner ekstrahert fra torskemuskel og antistoffet ved omtrent 40 kDa. Det samme gjelder i spor 6, der proteiner ekstrahert fra rekemuskel har en svært sterk reaksjon rundt 40 kDa.

Western Blot for allergenet parvalbumin (Figur 12C) viser at det er ingen reaksjon mellom proteiner ekstrahert fra *C. finmarchicus* (spor 2), grakse (spor 3) eller proteinhydrolysate (spor 4) og anti-parvalbumin. I spor 5 er proteiner ekstrahert fra torskemuskel, og man kan se det er et sterkt bånd ved omtrent 10-15 kDa. Det er også antydning til bånd ved cirka 35 kDa. Proteiner ekstrahert fra rekemuskel (spor 6) har også en svak antydning til bånd, ved omtrent 40 kDa.

4.4 Enzymatisk hydrolyse av grakse

4.4.1 Protein i supernatant etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse

For å undersøke om det var mulig å frigjøre mer fett og protein fra graksen ble flere ulike hydrolyser utført med ulike enzymer (Tabell 3 og 4), totalt fem ulike enzymer. Før hydrolyse ble pH målt til 6,56.

I Tabell 3 er resultatene fra måling av protein i supernatant etter enzymatisk hydrolyse og påfølgende sentrifugering. Hydrolysene ble utført i vannbad. Proteinmengden i supernatant etter behandling med enzym i 20 timer var 24,6 mg/ml. Tilsvarende kontroll inneholdt 5,5 mg/ml protein. For graksen behandlet med Alcalase® i 2 timer var mengden protein i supernatant 21,7 mg/ml protein, og tilsvarende kontroll var 5,7 mg/ml protein.

Grakse behandlet med enzymet Protamex® i 2 timer inneholdt 18,7 mg/ml protein, mens kontrollen inneholdt 4,7 mg/ml. Proteinmengden i supernatant for samme enzym med 1 times hydrolyse var 17,9 mg/ml, og kontrollen var 8 mg/ml.

I supernatant for grakse behandlet 2 timer med Performase® var mengden protein 10 mg/ml, mens kontrollen inneholdt 5,6 mg/ml protein. Graksen behandlet 1 time med Performase® inneholdt 13,6 mg/ml og kontrollen for denne hydrolysen inneholdt 7,6 mg/ml protein.

Tabell 3 Mengden protein i supernatant etter enzymatisk hydrolyse av grakse. Graksen ble i alle forsøk tilsatt 3 deler vann (n=3).

Prøver	mg/ml
Alcalase [®] (20 timer)	24,6 ± 1,1
Alcalase [®] kontroll (20 timer)	5,5 ± 0,6
Alcalase [®] (2 timer)	21,7 ± 3,5
Alcalase [®] kontroll (2 timer)	5,7 ± 0,5
Protamex [®] (2 timer)	18,7 ± 0,7
Protamex [®] kontroll (2 timer)	4,7 ± 0,3
Protamex [®] (1 time)	17,9 ± 0,8
Protamex [®] kontroll (1 time)	8 ± 0,6
Performase [®] (2 timer)	10 ± 1
Performase [®] kontroll (2 timer)	5,6 ± 0,4
Performase [®] (1 time)	13,6 ± 0,7
Performase [®] kontroll (1 time)	7,6 ± 0,2

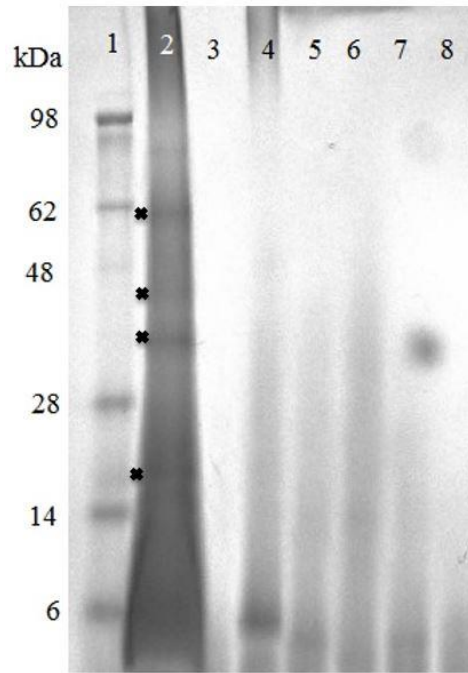
Enzymatisk hydrolyse ble også utført i 1 time med større andel vann tilsatt og i inkubator for enzymene Alcalase[®], Bromelain, Protamex[®], Performase[®] og Neutrase[®]. Mengden protein ble målt i supernatant etter sentrifugering (Tabell 4). Grakse behandlet med Alcalase[®], og som ble tilsatt 3 deler vann, hadde et proteininnhold på 18,6 mg/ml supernatant. Graksen behandlet med samme enzym, men tilsatt 5 deler vann, inneholdt 13,7 mg/ml protein.

For resten av de enzymatiske hydrolysene gjennomført ble det tilsatt 5 deler vann. Grakse behandlet med Bromelain inneholdt 13,3 mg/ml protein i supernatant. Hydrolysen med Protamex[®] ga en supernatant med et proteininnhold på 14,6 mg/ml, mens med enzymet Performase[®] var det 12,3 mg/ml protein i supernatant. Neutrasebehandlet grakse hadde 11,7 mg/ml protein i supernatant. Supernatant til kontrollen (ikke tilsatt enzym) inneholdt 6,5 mg/ml protein.

Tabell 4 Mengden protein i supernatant etter enzymatisk hydrolyse av grakse i 1 time. Om det ikke er spesifisert mengde vann, ble det tilsatt 5 deler vann til 1 del grakse (n=3).

Prøver	mg/ml
Alcalase [®] (3 deler vann)	18,6 ± 1,6
Alcalase [®] kontroll (3 deler vann)	4,5 ± 0,3
Alcalase [®] (5 deler vann)	13,7 ± 0,6
Alcalase [®] kontroll (5 deler vann)	2 ± 0,6
Bromelain	13,3 ± 0,7
Protamex [®]	14,6 ± 0,2
Performase [®]	12,3 ± 0,3
Neutrase [®]	11,7 ± 0,3
Kontroll	6,5 ± 0,04

Etter de enzymatiske hydrolysene ble også en SDS-PAGE utført med proteinene fra supernatant, samt det biologiske ekstraktet av grakse (Figur 13).

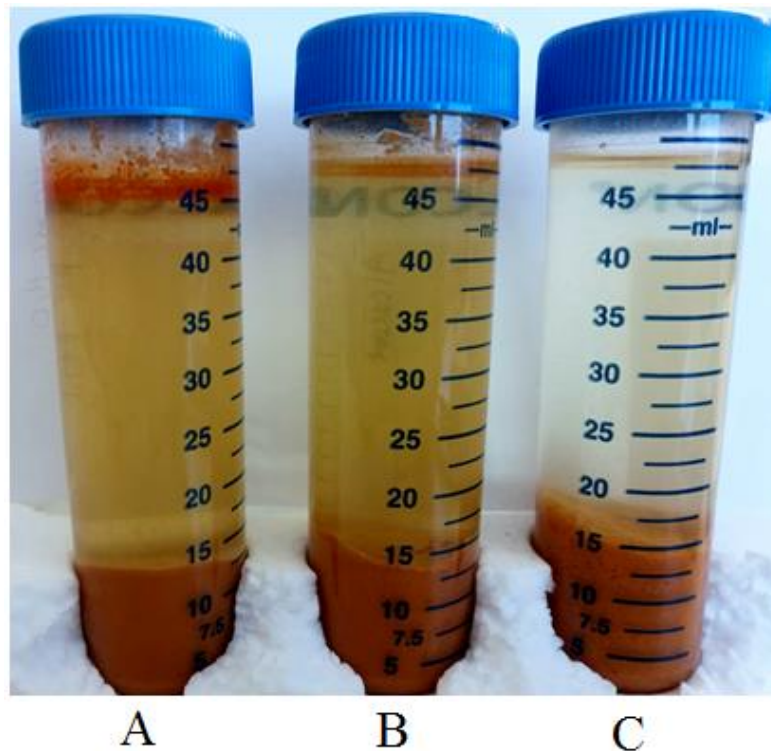


Figur 13 SDS-PAGE med proteiner ekstrahert fra grakse og proteiner i supernatant etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse. Spor 2: Proteiner ekstrahert fra grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil (494,9 µg). Proteiner i supernatant etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse: spor 3; Behandlet med Alcalase[®] (341,3 µg). Spor 4; Behandlet med Bromelain (332,9 µg). Spor 5; Behandlet med Protamex[®] (365,5 µg). Spor 6; Behandlet med Performase[®] (306,5 µg). Spor 7; Behandlet med Neutrase[®] (292,8 µg). Spor 8; Kontroll (162,8 µg). Spor 1: SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Protein Standard ble brukt som molekylærvekt markør.

Resultatene fra SDS-PAGE (Figur 13) viste flere proteinbånd i prøven med ekstraherte proteiner fra graksen, blant annet rundt 62 kDa, rundt 45 kDa, 30 kDa og 17 kDa. Supernatant fra de enzymatiske hydrolysene etter sentrifugering har svært få proteinbånd. Grakse behandlet med Alcalase[®] (spor 3) viste ingen bånd, mens grakse behandlet med Bromelain (spor 4) har et proteinbånd rundt 6 kDa. Grakse behandlet med Protamex[®] (spor 5), Performase[®] (spor 6) og Neutrase[®] (spor 7) har alle en anelse av proteinbånd rundt 6 kDa. Kontrollen (spor 8) har også spor av protein rundt 6 kDa.

4.4.2 Fett i pelleten etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse

Etter enzymatisk behandling av graksen var det synlig at noen enzymer hadde frigjort mer fett enn andre. Enzymene Bromelain og Alcalase[®] ga størst fettfase (Figur 14).



Figur 14 Etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse. A: grakse behandlet med Bromelain, B: grakse behandlet med Alcalase[®] og C: grakse behandlet uten enzym (kontroll). (Foto: Therese Udin)

Det er mest fett som er frigjort i graksen behandlet med enzymet Bromelain (Figur 14A) og Alcalase[®] (Figur 14B). Kontrollprøven (Figur 14C) hadde bare en liten synlig fettfase, i tillegg er supernatant mye blekere i farge sammenlignet med de enzymbehandlede prøvene. Fettinnholdet ble undersøkt i graksen og pelleten som ble dannet etter enzymatisk hydrolyse i prøvene behandlet med Alcalase[®] og Bromelain, samt kontrollprøven uten tilsatt enzym (Tabell 5). Graksen hadde et fettinnhold på 26,3 % på tørrstoffbasis. Pelleten dannet etter sentrifugering av grakse behandlet med Alcalase[®] og Bromelain hadde et fettinnhold på henholdsvis 28,4 og 30,5 % på tørrstoffbasis. Kontrollen (ikke enzymbehandlet) hadde fettinnhold på 29 % (TS).

Tabell 5 Fettinnholdet etter ekstraksjon av fett ved Folchs metode fra ubehandlet grakse og pellet dannet etter sentrifugering av grakse behandlet med enzymene Alcalase[®] og Bromelain og kontrollprøve uten tilsatt enzym

Prøver	Fettinnhold (% TS)
Grakse	26,3 ± 0,9
Pellet etter behandling med Alcalase [®]	28,4 ± 2,4
Pellet etter behandling med Bromelain	30,5 ± 3,6
Pellet etter behandling kun m/vann (Kontroll)	29 ± 1,7

5 Diskusjon

Calanus AS produserer i dag olje fra raudåte. Under den industrielle prosesseringen får man også to andre produkter; et proteinhydrolysat og en presskake. Sistnevnte kalles gjerne grakse og er tilnærmet en fast fase. Dette produktet har man relativt lite kunnskap om, men det selges som et tørket pulver kalt Calanus® Powder.

Graksen som ble analysert i oppgaven var ikke tørket mye fordi vanninnholdet var på 70 %. Til sammenligning inneholder fiskemel omtrent vanligvis mindre enn 10 % vann (Mundheim & Nortvedt, 2001), mens mel produsert av rekeskall inneholder cirka 11 % vann (Olsen & Jacobsen, 1995). På tørrvektbasis ble det funnet at graksen inneholdt henholdsvis 9, 25,2 og 21,3 % aske, fett og protein. Til sammenligning inneholder fiskemel 60-72 % protein og 6-10 % fett. Protein- og fettinnholdet vil variere etter type fisk og hvilke deler av fisken som er brukt for å produsere fiskemelet (Se oversiktsartikkel: Cho & Kim, 2011). Rekeskallmel inneholder 33,5 % protein og kun 2 % fett (Olsen & Jacobsen, 1995). Dette betyr at grakse anses som en mindre god kilde for protein, men det høye fettinnholdet kan imidlertid være en positiv egenskap.

Kitininnholdet i graksen var 23,5 % på tørrvektbasis, mens i rekeskallmel er innholdet nærmere 20 % (Olsen & Jacobsen, 1995). En viktig kilde til kitin er fra restråstoff av skalldyr. Lokalt er det Chitinor som produserer kitin og kitosan, ved fabrikk henholdsvis i Senjahopen og Tromsø. De har benyttet seg av restråstoff fra norsk rekeindustri siden slutten av 1980-tallet (Ragnar L. Olsen, NFH, personlig meddelelse). Det har vært rapportert at kitin og kitosan er produkter med potensielt mange bruksområder, det kan brukes innen farmasøytisk industri, som ingredienser i helsekost og i kosmetikk (Se oversiktsartikkel: Prashanth & Tharanathan, 2007). I følge FAO (2014) er markedet for kitin og kitosan er voksende. Ved utvinning av olje vil kitin fra *C. finmarchicus* havne i graksen, men utbyttetallet av grakse ved industriell utvinning av oljen er imidlertid ikke tilgjengelig. Raudåte består av omtrent 80-82 % vann, 10-11 % protein, 5-8 % lipider og 2 % aske (Vang *et al.*, 2013b). Det betyr at kitininnholdet i dyreplanktonet kan anslåes til 2 %. Dersom det høstes 1000 tonn *C. finmarchicus* vil anslagsvis 20 tonn kitin kunne være tilgjengelig. I Norge ble omtrent 35 000 tonn reker fisket i 2015 og av dette var nesten 12 000 tonn hoder, skall og avfall, altså restråstoff (Richardsen & Nystøyl, 2016). Dette ville kunne gi opp mot 2 500 tonn kitin (Olsen & Jacobsen, 1995). Globalt er avfallet enda større, det er ifølge FAO (2014) mellom 6 og 8 millioner tonn, ikke bare fra reke, men også krabbe og hummer. Sørøst-Asia sto for 1,5 millioner tonn av dette. Industrien har estimert at det globale markedet for kitin og kitosan i 2018 kan ligge på 118 000 tonn (FAO, 2016). Tross for at det

potensielt eksisterer et stort marked for kitin og kitosan, så vil de relativt små mengdene som fins i *C. finmarchicus* kanskje ikke kunne forsvare en slik produksjon. Kvaliteten på kitinet som ble utvunnet var neppe av god nok kvalitet for mange anvendelser fordi det inneholdt små mengder av aske og protein. En mer omfattende metode som fjerner alt protein og aske i kitinet må nok benyttes og dette kan være kostbart.

Det høye fettinnholdet i graksen kan være en positiv egenskap. I fôr til marin oppdrettsfisk var det tidligere fiskeoljer som dominerte fettinnholdet. Det har vært en stor økning i fiskeoppdrett globalt, som har økt etterspørselen etter fiskeoljer betydelig (FAO, 2014). Mye av fiskeoljen har derfor blitt erstattet med planteoljer. Planteoljer inneholder ikke langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer, som EPA (20:5n-3) og DHA (22:5n-3) (Ytrestøyl, Aas, & Åsgard, 2015). Det høye innholdet av fett i graksen kan derfor være en viktig egenskap, om det anvendes som ingrediens i fôr til oppdrettsfisk. Da må det undersøkes hvilket fett som er i graksen, i tillegg må også lagringsforsøk utføres, med tanke på oksidasjon av fettsyrer. Dette ble ikke undersøkt i denne oppgaven. I en tidligere oversiktsartikkel av Pedersen *et al.* (2014) ble det diskutert om lipider fra *C. finmarchicus* er passende ingrediens i fiskefôr. En viss andel av lipidene fra raudåte kan nok erstatte noe av planteoljer i dagens fôr, men det er begrensinger med tanke på kvote og innhøsting. Det ble heller foreslått at oljen kan tilsettes i fôr i mindre mengder, men da også på grunn av annet innhold enn fettsyrer, som for eksempel astaxanthin og andre attraktanter. Astaxanthin er en viktig ingrediens i fôr til laks for å gi den rosa fargen til fiskekjøttet (Se oversiktsartikkel: Guerin, Huntley, & Olaizola, 2003).

At mye fett har havnet i graksen er grunn til å tro at den industrielle prosessen for å utvinne lipider fra *C. finmarchicus* kanskje ikke er bra nok. I en produksjonssammenheng må det imidlertid vurderes hvordan en mer omfattende prosess som gir et større oljeutbytte påvirker egenskaper til for eksempel proteinhydrolysatet. Mesteparten av lipidene i *C. finmarchicus* blir lagret i oljesekker som dekkes av et enkelt lag med epitelceller i hulrom i kroppen (Falk-Petersen *et al.*, 1987). Det har vært vist tidligere at å utvinne olje fra *C. finmarchicus* med vanlig fiskeoljeteknologi hvor råstoffet knuses og kokes før separasjon av olje, ikke fungerer godt (Vang *et al.*, 2013b). Under hydrolyse med enzymer vil celler og andre strukturer bli løst opp av proteaser, slik at lipider blir frigjort fra vev og andre strukturer. Denne prosessen samsvarer med Dumay *et al.* (2006). De fant at ved å tilsette enzymer vil vevstrukturer bli brutt ned slik at mengden lipid som frigjøres økes sammenlignet med klassisk utvinning av olje fra sardiner (*Sardina pilchardus*). En mer optimal enzymatisk prosessering av *C. finmarchicus* vil kunne gi mindre fett i grakseproduktet.

SDS-PAGE med proteinekstrakt fra *C. finmarchicus*, grakse og proteinhydrolysatet viste at de har ulik proteinsammensetning. Proteiner ekstrahert fra *C. finmarchicus* har noen proteinbånd ved høyere molekylvekt, sammenlignet med proteiner fra graksen. Ekstraktet fra proteinhydrolysatet har ingen synlige proteinbånd, til tross for at en svært stor mengde protein ble applisert (619,5 µg). Under produksjon havner frie aminosyrer og mindre peptider i hydrolysatet, mens proteinene som er i graksen er delvis intakte. Den enzymatiske prosessering under produksjon kan også forbedres med tanke på degraderingen av proteiner. Men egenskapene til hydrolysatet er viktige, da spesielt smak og næringsverdien. Et stort problem for mange fiskeproteinhydrolysat (FPH) er den bitre smaken. Denne bitre smaken kommer vanligvis av at et stort antall medium-størrelse peptider med hydrofobe aminosyrer, som dannes under hydrolyse (Se oversiktsartikkel: Thorkelsson *et al.*, 2009). Dette løses vanligvis med å redusere produksjonen av slike peptider, enten ved å utføre en mildere hydrolyse eller med å utføre en hardere hydrolyse for å bryte alle proteiner ned til frie aminosyrer og små peptider. For at Calanus AS skal selge et produkt som har god smak, må det derfor et kompromiss til, med hensyn på proteinhydrolysat og oljeutbytte.

På SDS-PAGE gelen etter farging var den nederste delen av gelen veldig uklar og inneholdt mye farge (Figur 12 og 13). Dette kan tyde på at det er forstyrrelser i proteinprøvene, mest sannsynlig lipider. Det er kjent at lipider forstyrrer i SDS-PAGE, og kan også gjøre proteinbånd litt uklare (Rigby *et al.*, 2011). Det ble derfor forsøkt flere metoder for å fjerne fett fra graksen, før proteiner ble ekstrahert med 10 % SDS. Det ble testet å blande SDS-løsningen med proteiner ekstrahert fra graksen med 1/3 volum med n-butanol. I tillegg ble også forsøkt å behandle grakse og *C. finmarchicus* med DCM-MeOH (2:1), slik som ved fetttekstraksjon. Etter en sentrifugering ble DCM fjernet. Proteinprøver fra alle disse metodene ble applisert og kjørt på en SDS-PAGE, men ga ingen synlige proteinbånd. Det ble også forsøkt å behandle med aceton tilsatt 2-mercaptoetanol (ME). Grakse tilsatt aceton-2-ME ble satt i frys ved -20 °C over natten, deretter sentrifugert. Pelleten ble så løst i 10 % SDS og kokt i vannbad i 20 minutter. Til slutt ble det også forsøkt å behandle grakse med metanol. Metanol og aceton-2-ME behandlingene ga veldig like utslag etter SDS-PAGE, og metanol ble valgt å bruke som forbehandling, også for hel, frossen raudåte.

Ekstraksjonene fra både rekemuskel, *C. finmarchicus*, grakse og torskemuskel viser proteinbånd rundt 38 kDa, som stemmer godt overens med størrelsen til tropomyosin, som ligger mellom 38 og 40 kDa (Nakano, Yoshinuma, & Yamada, 2008). For å bekrefte at båndene rundt 38 kDa var tropomyosin, ble et Western Blot utført (Figur 12B). Om tropomyosin er i graksen, vil dette kunne si noe om degraderingen av proteinene, da tropomyosin er et svært

stabil protein (Kamath *et al.*, 2013; Pedrosa *et al.*, 2015). Både hos ekstraktet fra rekemuskel og torskemuskel er det en sterk reaksjon rett ved 40 kDa. Til tross for at det primære antistoffet var anti-reketropomyosin, ga det en reaksjon med protein fra torskemuskel (spor 5, Figur 12B). Spesifisiteten til antistoffet stilles derfor spørsmål med, det kan tyde på at det ikke er et krepsdyr-spesifikt primært antistoff. Det er kjent at tropomyosin har en aminosyresekvens som er veldig konservert, i hvert fall blant skalldyr som krabbe, hummer og reker. I tillegg har det blitt funnet homologi i tropomyosin i støvmidd og kakerlakker (Ayuso *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2014; Lopata, O'Hehir, & Lehrer, 2010; Reese, Ayuso, & Lehrer, 1999). I denne oppgaven er det vist at antistoffet rettet mot reketropomyosin også kryssreagerer mot det som sannsynligvis er tropomyosin i torskemuskel. Det var ingen sterk reaksjon med noen proteiner i *C. finmarchicus*, men det er spormengder tilstede. Det har blitt vist tidligere at anti-reketropomyosin reagerer med tropomyosin i *C. finmarchicus* (Vang *et al.*, 2013a). Antistoffet kryssreagerte kraftig med molekyler ved størrelse 5-15 kDa fra graksen. Dette kan tyde på at mye delvis degradert tropomyosin er tilstede i graksen. Det vil si at graksen, i motsetning til hydrolysatet, vil kunne være farlig for personer som er allergisk ovenfor skalldyr. Det er også noen svakere reaksjoner ved 40 kDa, som kan tyde på at noe tropomyosin som ikke er degradert er til stede i graksen. I hydrolysatet er det ingen kryssreaksjoner og dette viser at tropomyosin er brutt ned såpass mye at antigene epitoper (aminosyresekvenser) ikke er intakte lengre.

Western Blot ble også utført med antistoff rettet mot fiskeparvalbumin, et kraftig allergen i fisk. Proteiner fra torskemuskel med molekylvekt 10-15 kDa reagerte kraftig med anti-parvalbumin. Dette stemmer godt overens med størrelsen til parvalbumin som er omtrent 12 kDa (Saptarshi *et al.*, 2014). Det er også tegn til reaksjon ved 35 kDa i samme spor. Proteiner fra reke hadde også en svak reaksjon med anti-parvalbuminet ved omtrent 45 kDa. Dette kan være en kryssreaksjon som kan komme av en for dårlig spesifisitet for det primære antistoffet parvalbumin. Det er ingen reaksjoner mellom anti-parvalbuminet og proteiner ekstrahert fra henholdsvis *C. finmarchicus*, graksen eller proteinhydrolysatet.

Å utvikle en industriell enzymatisk prosess i liten skala på laboratoriet når det er mange parametere som kan studeres, er en utfordrende oppgave. Det er det viktig å ta hensyn til reaksjonsparametere som pH, temperatur, tid og mengde enzym. Mange enzymer fra både mikrober, planter og dyr har blitt anvendt i hydrolyse av fiskeproteiner, inkludert papain, Alcalase[®], Bromelain og Protamex[®] (Souissi *et al.*, 2007). Alcalase[®] har tidligere blitt vurdert som en av de mest attraktive enzymene for å hydrolysere fiskeproteiner (Se oversiktsartikkel: Kristinsson & Rasco, 2000). Før hydrolyse ble det målt pH i graksen, den var 6,56. Optimum for Alcalase[®] er mellom pH 6,5 og 8,5. Det var derfor ikke nødvendig å endre pH.

Temperaturoptimum er mellom 50 og 70 grader, men dette er avhengig av type substrat man bruker. Graksen ble tilsatt 3 deler vann og enzym før hydrolysen. Det første forsøket med Alcalase[®] viste at det ikke var nødvendig med en behandlingstid på mer enn 2 timer, da det var liten forskjell i proteininnhold i supernatant sammenlignet med grakse behandlet i 20 timer. Begge kontrollene inneholdt betydelig mindre protein, som betyr at mer protein ble frigjort ved hydrolyse hvor enzymer ble brukt. To andre enzymer ble også anvendt, Protamex[®] og Performase[®] (papain). For Protamex[®] er optimale forhold for pH og temperatur på henholdsvis 5,5-7,5 og 35-60 °C. Enzymet skal også kunne produsere hydrolysat uten bitter smak (Liaset *et al.*, 2002), og brukes ofte for å hydrolysere fiskeproteinene for produksjon av FPH (Se oversiktsartikkel: Chalamaiah *et al.*, 2012). Heller ikke her var det nødvendig å endre pH. Performase[®] ga lavest innhold av protein i supernatant. Det ble videre ble det forsøkt å utføre hydrolyse i en inkubator og med ulik mengde vann. Mengden vann man tilsetter før en hydrolyseprosess kan være viktigere enn type enzym. Dette ble vist av Šližytė *et al.* (2005), som hydrolyserte restråstoff fra torsk. De fant at å tilsette vann før hydrolyse kunne være viktigere enn type enzym brukt, med tanke på utbytte, biokjemiske og funksjonelle egenskaper for FPH. Vanninnholdet ble derfor økt, i tillegg ble hydrolysetiden satt til en time. Protamex[®], Alcalase[®] og Bromelain frigjorde omtrent lik mengde protein fra graksen, mens Performase[®] og Neutrase[®] var de som dårligst ut. For å undersøke om det var mulig å se noen proteiner igjen i supernatant etter hydrolyse, ble en SDS-PAGE utført med prøvene tilsatt 5 deler vann. Supernatant fra hydrolyse med Protamex[®], Performase[®], Neutrase[®] og kontroll hadde alle noe som kan ligne et proteinbånd rundt 6 kDa. Men ellers var det ingen synlige bånd fra noen av supernatant fra hydrolysene. Dette båndet kan derfor være en artifakt. Det tyder på at proteinene som er frigjort, er også degradert til små peptider og frie aminosyrer.

Selv om det ikke var målbart, var det synlig at fett ble frigjort under hydrolyseprosessen, spesielt med bruk av enzymene Alcalase[®] og Bromelain. Kontrollprøven hadde kun en liten synlig fettfase (Figur 14). Produksjonen Calanus AS utfører involverer mange separeringsprosesser, og disse jobbes det kontinuerlig med. Resultatene i denne oppgaven viste at Alcalase[®] ikke var det eneste enzymet som ga frigjøring av fett og proteiner. Tidligere forsøk har vist at en kombinasjon av enzymene Alcalase[®] og Flavourzyme[®] ga en større oljefraksjon enn kun Alcalase[®] alene under utvinning av olje fra raudåte (Vang *et al.*, 2013b). Det kan vurderes om flere ulike enzymer kan prøves ut i ekstraksjon av olje fra raudåte, enten enzymene som i dette prosjektet førte til mest frigjøring av protein, eller en kombinasjon av enzymer med ulike egenskaper. Enzymatisk behandling for å utvinne olje må imidlertid kontrolleres nøye slik

at ikke de positive egenskapene til proteinhydrolysatet forringes, for eksempel ved dannelse av bitre peptider som nevnt tidligere.

Fettinnholdet ble målt i pelleten som var igjen etter sentrifugering av enzymbehandlet grakse. Målingene viste at fettinnholdet var høyest i pellet fra graksen behandlet med Bromelain. Målingene viste at på tørrstoffbasis var fettinnholdet i pelleten fra de enzymbehandlede prøvene og fra kontrollen uten enzymbehandling høyere enn i ubehandlet grakse. En forklaring kan være at det totale tørrstoffinnholdet er mindre i de førstnevnte enn i ubehandlet grakse fordi protein og salter blir løst i supernatanten. Dette er kanskje ikke hele forklaringen fordi mye protein løses i supernatant etter enzymbehandling sammenlignet med kontroll uten enzym. Imidlertid kan det totale fettinnholdet i enzymbehandlede prøver underestimeres fordi fett som frigjøres og blir liggende på toppen av supernatanten ikke inkluderes.

Konklusjoner kan oppsummeres som følgende; Grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil inneholdt omtrent lik deler fett, kitin og protein. Graksen anses ikke som en god kilde for protein, men det høye fettinnholdet kan være en positiv egenskap. Andelen kitin i graksen var 23,5 % på tørrstoffbasis og et spørsmål er om det vil være lønnsomt å utvinne kitin fra grakse. Antakelig er svaret nei når man tar hensyn til det nåværende fangstvolum og kostnadene ved utvinning av høykvalitetskitin og konvertering til kitosan som er mest etterspurt. Metoden anvendt i denne oppgaven for isolering av kitin var ikke optimal fordi små mengder protein og aske var igjen i kitinet. Proteinene ekstrahert fra graksen tyder på å være både intakte og delvis intakte. I tillegg ble det vist at graksen inneholder tropomyosin og degraderingsprodukter som krysstegerte med anti-reketropomyosin. Det ble ikke påvist innhold av fiskeallergenet parvalbumin. Hydrolyse med enzymer viste at både mer protein og fett kan utvinnes fra graksen. Forbedring av enzymatisk prosessering kan resultere i bedre utbytte av olje og proteinhydrolysat i en industriell prosess. Mer omfattende enzymatisk hydrolyse vil imidlertid kunne gi et proteinhydrolysat med endrede sensoriske egenskaper.

6 Referanser

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1119-1132
- Aksnes, D., & Blindheim, J. (1996). Circulation patterns in the North Atlantic and possible impact on population dynamics of *Calanus finmarchicus*. *Ophelia*, 44(1-3), 7-28
- Arif, S. H., & Hasnain, A.-u. (2010). A Major Cross-Reactive Fish Allergen with Exceptional Stability: Parvalbumin. *African Journal of Food Science*, 4(3), 109-114
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(S1467-1476S)
- Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., & Lehrer, S. B. (2002). Molecular Basis of Arthropod Cross-Reactivity: IgE-Binding Cross-Reactive Epitopes of Shrimp, House Dust Mite and Cockroach Tropomyosins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(1), 38-48
- Bang, H. O., & Dyerberg, J. (1980). Lipid Metabolism and Ischemic Heart Disease in Greenland Eskimos. I H. H. Draper (Red.), *Advances in Nutritional Research* (s. 1-22). Boston, MA: Springer US.
- Bergvik, M., Overrein, I., Bantle, M., Evjemo, J. O., & Rustad, T. (2012). Properties of *Calanus finmarchicus* biomass during frozen storage after heat inactivation of autolytic enzymes. *Food Chemistry*, 132(1), 209-215
- Bernasconi, R., Bolzacchini, E., Galliani, G., Gugliersi, F., Rindone, B., Rindone, M., Tacconi, M. T., & Terraneo, A. (2007). Determination of the content of wax esters in some sea foods and their molecular composition. A comparison with ω -3 enriched wax esters. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 569-573
- Bordenave, S., Fruitier, I., Ballandier, I., Sannier, F., Gildberg, A., Batista, I., & Piot, J.-M. (2002). HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ACE-activity. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32(1), 65-77
- Bugajska-Schretter, A., Grote, M., Vangelista, L., Valent, P., Sperr, W. R., Rumpold, H., Pastore, A., Reichelt, R., Valenta, R., & Spitzauer, S. (2000). Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut*, 46(5), 661-669
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2007). Dietary α -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutrition Research Reviews*, 19(1), 26-52
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 469-484
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038
- Cho, J. H., & Kim, I. H. (2011). Fish meal - nutritional value. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95, 685-692

- Crevel, R. W. R., Kerkhoff, M. A. T., & Koning, M. M. G. (2000). Allergenicity of refined vegetable oils. *Food and Chemical Toxicology*, 38(4), 385-393
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., & Hagen, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46, 225-340
- Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., & Bergé, J. P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41(11), 2327-2332
- Elsayed, S., & Apold, J. (1983). Immunochemical Analysis of Cod Fish Allergen M: Locations of the Immunoglobulin Binding Sites as Demonstrated by the Native and Synthetic Peptides. *Allergy*, 38(7), 449-459
- Errahali, Y., Morisset, M., Moneret-Vautrin, D. A., Kanny, G., Metche, M., Nicolas, J. P., & Frémont, S. (2002). Allergen in soy oils. *Allergy*, 57(7), 648-649
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200
- Falk-Petersen, S., Mayzaud, P., Kattner, G., & Sargent, J. (2009). Lipids and life strategy of Arctic *Calanus*. *Marine Biology Research*, 5(1), 18-39
- Falk-Petersen, S., Sargent, J. R., & Tande, K. S. (1987). Lipid composition of zooplankton in relation to the sub-Arctic food web. *Polar Biology* 8(2), 115-120
- FAO. (2014), *The state of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2016), *The state of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FHI. (2015). *Allergi – matallergi, luftveisallergi og hudallergi*. Hentet 12.09.16 fra <https://www.fhi.no/fp/matallergi/allergi---matallergi-luftveisallerg/>
- Fiskeridirektoratet. (2016), *Forvaltningsplan for raudåte* (Hentet fra <http://www.fiskeridir.no/Yrkesfiske/Dokumenter/Rapporter/2016/Forvaltningsplan-for-raudaate>)
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids for animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*(226), 497-509
- Foss, P., Renstrom, B., & Liaaen Jensen, S. (1987). Natural occurrence of enantiomeric and meso astaxanthin 7*-crustaceans including zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 86, 313-314
- FRS. (2004). *Zooplankton and Climate Change - The Calanus Story*. Marine Scotland - Marine and Fisheries-related publications, reports and posters: Fisheries Research Services, Marine Laboratory. Hentet 04.11.2016. Hentet fra <http://www.gov.scot/Uploads/Documents/ME02Zooplankton.pdf>
- Gigliotti, J. C., Davenport, M. P., Vearmor, S. K., Tou, J. C., & Jaczynski, J. (2011). Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphasia superba*). *Food Chemistry*, 125(3), 1028-1036
- Gorreta, F., Bernasconi, R., Galliani, G., Salmona, M., Tacconi, M. T., & Bianchi, R. (2002). Wax esters of n-3 polyunsaturated fatty acids: A new stable formulation as a potential

- food supplement - Digestion and absorption in rats. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 35(5), 458-465
- Graeve, M., Albers, C., & Kattner, G. (2005). Assimilation and biosynthesis of lipids in Arctic *Calanus* species based on feeding experiments with a ¹³C labelled diatom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 317, 109-125
- Grimaldo, E., Leifer, I., Gjørund, S. H., Larsen, R. B., Jeuthe, H., & Basedow, S. (2011). Field demonstration of a novel towed, area bubble-plume zooplankton (*Calanus* sp.) harvester. *Fisheries Research*, 107, 147-158
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210-216
- Gunstone, F. D. (2004). *Extraction, refining and processing. The chemistry of oils and fats - sources, composition, properties and uses*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Hai-Lun, H. E., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., & Bai-Cheng, Z. (2006). Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11), 726-733
- Jensen, C. L. (2006). Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1452-1457
- Jensen, I.-J., Eilertsen, K.-E., Mæhre, H. K., Elvevoll, E. O., & Larsen, R. (2013). Health Effects of Antioxidative and Antihypertensive Peptides from Marine Resources. I S.-K. Kim (Red.), *Marine Proteins and Peptides* (s. 297-322): John Wiley & Sons, Ltd.
- Jensen, I. J., & Mæhre, H. (2016). Preclinical and Clinical Studies on Antioxidative, Antihypertensive and Cardioprotective Effect of Marine Proteins and Peptides—A Review. *Marine Drugs*, 14(11), 211
- Johnson, E. J. (2002). The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in Clinical Care*, 5(2), 56-65
- Kamath, S. D., Abdel Rahman, A. M., Komoda, T., & Lopata, A. L. (2013). Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies. *Food Chemistry*, 141(4), 4031-4039
- Kattner, G. (1989). Lipid composition of *Calanus finmarchicus* from the north sea and the artic. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 94, 185-188
- Kobayashi, A., Tanaka, H., Hamada, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2006). Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*, 61(3), 357-363
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81
- Lee, R. F., Hagen, W., & Kattner, G. (2006). Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 273-306
- Lee, R. F., Nevenzel, J. C., & Paffenhöfer, G. A. (1971). Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: Phytoplankton and copepods. *Marine Biology*, 9, 99-108
- Leung, N. Y. H., Wai, C. Y. Y., Shu, S., Wang, J., Kenny, T. P., Chu, K. H., & Leung, P. S. C. (2014). Current Immunological and Molecular Biological Perspectives on Seafood

- Allergy: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46(3), 180-197
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37(11), 1263-1269
- Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Lehrer, S. B. (2010). Shellfish allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(6), 850-858
- Lunn, J., & Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 31(3), 178-224
- Mundheim, H., & Nortvedt, R. (2001). Fôrproduksjon - Teknologi og fôrtyper. I R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre & Ø. Lie (Red.), *Fiskeernæring* (s. 351-363). Bergen: Kystnæringsens Forlag & Bokklubb AS.
- Nakano, S., Yoshinuma, T., & Yamada, T. (2008). Reactivity of Shrimp Allergy-Related IgE Antibodies to Krill Tropomyosin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 145(3), 175-181
- Nofima. (2016). *Marin Bioteknologi*. Hentet 17.04.17 fra: <https://nofima.no/forskningsomrade/marin-bioteknologi/>
- Nowak-Wegrzyn, A., & Fiocchi, A. (2009). Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(3), 234-237
- Nærings-og fiskeridepartementet. (2016). *Kjente ressurser - uante muligheter, Regjeringens bioøkonomistrategi*.
- Olsen, R. L., & Jacobsen, T. (1995). Characterization of flash-dried shrimp processing waste. *Journal of Marine Biotechnology*, 3, 208-209
- Parra, D., Bandarra, N. M., Kiely, M., Thorsdottir, I., & Martinez, J. A. (2007). Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *European Journal of Nutrition*, 46, 460-467
- Pedersen, A. M., Vang, B., & Olsen, R. L. (2014). Oil from *Calanus finmarchicus* - Composition and Possible Use: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23, 633-646
- Pedrosa, M., Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., & Quirce, S. (2015). Shellfish Allergy: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 49(2), 203-216
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J. P., Guérard, F., Chabeaud, A., & Piot, J. M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41(5), 1217-1222
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678
- Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117-131
- Prester, L. (2016). Seafood Allergy, Toxicity and Intolerance: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(3), 271-283

- Psota, T. L., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology*, 98(4-1), 3-18
- Ramazzotti, M., Mulinacci, N., Pazzagli, L., Moriondo, M., Manao, G., Vincieri, F. F., & Degl'Innocenti, D. (2008). Analytic investigations on protein content in refined seed oils: Implications in food allergy. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 3383-3388
- Reese, G., Ayuso, R., & Lehrer, S. B. (1999). Tropomyosin: An Invertebrate Pan-Allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 119(4), 247-258
- Richardsen, R., & Nystøyl, R. (2016), *Analyse marint restråstoff, 2015* (A27704: SINTEF Fiskeri og havbruk)
- Rigby, N. M., Sancho, A. I., Salt, L. J., Foxall, R., Taylor, S., Raczynski, A., Cochrane, S. A., Crevel, R. W. R., & Mills, E. N. C. (2011). Quantification and Partial Characterization of the Residual Protein in Fully and Partially Refined Commercial Soybean Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1752-1759
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 402-420
- RUBIN. (2010), *Muligheter for marine proteiningredienser i det amerikanske helse- og ernæringsmarkedet* (186: RUBIN)
- Samartin, S., Marcos, A., & Chandra, R. K. (2001). Food hypersensitivity. *Nutrition Research*, 21(3), 473-497
- Saptarshi, S. R., Sharp, M. F., Kamath, S. D., & Lopata, A. L. (2014). Antibody reactivity to the major fish allergen parvalbumin is determined by isoforms and impact of thermal processing. *Food Chemistry*, 148, 321-328
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., & Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(7), 2196-2200
- Shanti, K. N., Martin, B. M., Nagpal, S., Metcalfe, D. D., & Rao, P. V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *Journal of Immunology*, 151(10), 5354-5363
- Sheperd, J., & Bachis, E. (2014). Changing supply and demand for fish oil. *Aquaculture Economics & Management*, 18(4), 395-416
- Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., & Rustad, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021-2033
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187-194
- Spinelli, J., Lehman, L., & Wieg, D. (1974). Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31, 1025-1029
- Thomas, K., Herouet-Guicheney, C., Ladics, G., Bannon, G., Cockburn, A., Crevel, R., Fitzpatrick, J., Mills, C., Privalle, L., & Vieths, S. (2007). Evaluating the effect of food

- processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1116-1122
- Thorkelsson, G., Slizyte, R., Gildberg, A., & Kristinsson, H. G. (2009). Fish proteins and peptide products: processing methods, quality and functional properties. I J. B. Luten (Red.), *Marine Functional Food* (s. 115-133): Wageningen Academic Publishers.
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107
- Undeland, I., Lindquist, H., Chen-Yun, Y., Falch, E., Ramel, A., Cooper, M., Gildberg, A., Luten, J., Even, S., Nielsen, H. H., & Elvevoll, E. O. (2009). Seafood and health: what is the full story? I J. B. Luten (Red.), *Marine Functional Food* (s. 17-88): Wageningen Academic Publishers.
- Utne, K. R., Hjøllø, S. S., Huse, G., & Skogen, M. (2012). Estimating the consumption of *Calanus finmarchicus* by planktivorous fish in the Norwegian Sea using a fully coupled 3D model system. *Marine Biology Research*, 8(5-6), 527-547
- Uttaro, A. D. (2006). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 58(10), 563-571
- Van, D., Hordvik, Endresen, & Elsayed. (1999). Expression and Analysis of Recombinant Salmon Parvalbumin, the Major Allergen in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Scandinavian Journal of Immunology*, 50(6), 619-625
- Vang, B. (2015). *Recovery and properties of oil from the copepod Calanus finmarchicus*. (PhD), Universitet i Tromsø, Norges Arktiske Universitet, Tromsø.
- Vang, B., Maehre, H. K., Jensen, I. J., & Olsen, R. L. (2013a). Detection of tropomyosin and determination of proteins in crustacean oils. *Food Chemistry*, 141, 72-76
- Vang, B., Pedersen, A. M., & Olsen, R. L. (2013b). Oil extraction From the Copepod *Calanus finmarchicus* Using Proteolytic Enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22, 619-628
- Widmaier, E. P., Hershel, R., & Strang, K. T. (2011). The Immune System. I *Vander's Human Physiology, The Mechanisms of Body Function* (12 utg., s. 633-670).
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S., & Åsgard, T. (2015). Utilization of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374