

UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

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

Mikrobiell stabilitet og kjemisk sammensetning i hydrolysat fra *Calanus finmarchicus*

—
Torunn Johansen Jørstad

Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2015



Forord

Oppgaven ble utført og skrevet ved Norges fiskerihøgskole (NFH) ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), UiT Norges arktiske universitet, høsten 2014 og våren 2015. Hvor det var et samarbeid med bedriften Calanus AS.

Det er mange som har bidratt til at oppgaven ble ferdig og har vært behjelpelig underveis. Kan starte med å takke veilederne mine professor Klara Stensvåg, professor Ragnar Ludvig Olsen og Hogne Abrahamsen som jobber for Calanus AS. Klara har vært en fantastisk veileder og generelt støttet meg da det var vanskelige tider i løpet av året. Videre har hun gitt meg mange gode Word Office tips. Ragnar har vært tilgjengelig for å spørre om laboratorieutfordring og kommet med gode råd knyttet til oppgaveskriving. Hogne har stilt opp med material og kunnskap. I tillegg fikk jeg gleden av å få jobbe som tekniker hos Calanus AS, noe som har gitt meg laboratorieerfaring. Det var både gøy og lærerik erfaring. Takk, til mine dyktige og vennlige veiledere!

Guro Kristine Edvinsen, Hege Devold, Hans-Matti Blencke, Ida Kristine Hansen, Tor Haug, Runar Gjerp Solstad og Hanne K. Mæhre, takk for hjelp. Takk til Frøydis Strand for å ha laget fin figur til oppgaven.

Inger Kristine Rødum, takk for at du har vært min fantastiske klassevenn. Jeg tror ikke disse to årene hadde vært like bra om jeg ikke hadde hatt noen å dele frustrasjon, sorger og gleder med. Takk, for at du har vært en lyttende og morsom samtalepartner og for å ha gitt meg gode råd knyttet til skolerelaterte tema. Takk til Ole Christian Hagestad, for at du har hjulpet meg med PC-utfordringer og vært en blid og hyggelig kontorkamerat.

Richard Taknes, takk for at du er min fantastiske samboer, bestevenn og støttespiller.

Tromsø, mai 2015

Torunn Jørstad

Abstrakt

Calanus finmarchicus (raudåte) er den mest tallrike av alle marine skalldyrarter, med en stående bestand på cirka 70-80 millioner tonn i det Nordiske hav. Siden ny bærekraftig innhøstingsteknologi er utviklet for arten, er det mulig å utnytte denne ressursen kommersielt. I dag produseres olje fra *C. finmarchicus*, og har flere dokumenterte helseeffekter. Ved produksjon framstilles fire ganger mer protein sammenlignet med olje. Siden det produseres mye av denne fasen er det interessant å kartlegge mikrobiell stabilitet og se på kjemiske egenskaper i proteinfraksjon (hydrolysat).

For å finne egenskapene til hydrolysatet ble det utsatt for ulike lagringsforhold. Tørrstoffinnholdet ble målt etter tørking, mengden av totale og frie aminosyrer ble målt samt innholdet av de ulike aminosyrene ble fastsatt ved hjelp av ionebytter væskechromatografi. Videre ble bioaktivitetstester gjennomført for å se om fastfaseekstrahert materiale hadde egenskaper som kunne hemme bakterier eller være toksisk overfor humane erythrocytter. I alle analysene ble flere ulike produksjoner vurdert for å se om de hadde like egenskaper.

Resultatene viste at hydrolysatet hadde lavt bakterielt innhold og at det ikke ble observert sporbar mengde med sopp og mugg. Lavest bakterievekst ble observert etter oppbevaring under 6°C. Totale aminosyrer ble detektert til å være 536,9 mg/g av tørket materialet, hvor cirka 1/3 av disse var frie aminosyrer. Resultatene fra minimum inhiberende konsentrasjon av fastfaseekstrahert materialet viste at hydrolysatet hemmet vekst av bakteriene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Corynebacterium glutamicum* ved konsentrasjoner mellom 0,16 mg/ml til 1,25 mg/ml. Materialet viste egenskaper som bidro til å stabilisere erythrocytter. Produksjonene viste seg å være reproducerbare. Den største endringen var vanninnholdet ved at de nyeste partiene inneholdt mindre vann.

Produktet er forholdsvis bakterielt stabilt og inneholder flere proteinkomponenter som kan være en god proteinkilde, både til fôrindustri og humant konsum.

Abstract

Calanus finmarchicus is the most abundant of all marine shellfish species, with a standing population of approximately 70-80 million tons in the Nordic Seas. Current harvesting technology, makes it possible to utilize this species sustainably for commercial purposes. Oil produced from *C. finmarchicus* is sold as a nutraceutical, with several documented health effects. As a result of the *C. finmarchicus* body composition, four times more protein (hydrolysate) can be extracted, compared to outcome of oil as a result of an enzymatic process. That's why it is interesting to identify microbial stability and chemical properties of the hydrolysate,

To determine the properties of the hydrolysate it was subjected to different storage conditions, determined the content of solids by drying, determined measured the amount of total and free amino acids, and the content of different amino acids by using ion exchange chromatography. Furthermore, bioactivity testing was performed, to see if solid phase extracted material contained properties, which might inhibit bacterial growths, and if it showed toxic effects against human erythrocytes. Several different production assessed to identify product variation.

The results showed that it had low bacterial content and that there was no detectable amount of fungi or mold. Optimal storage temperature was determined to be below 6 ° C. Total amino acids was detected to be 536.9 mg/g of dried material, which of these was approximately 1/3 of the free amino acids. The results of the minimum inhibitory concentration of the solid phase extracted material showed that the hydrolysate inhibited *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium glutamicum*, at concentrations between 0.16 mg/ml to 1.25 mg/ml. In addition, the hydrolysate showed characteristics that increased erythrocyte stability. Variation between different batches was low, but with water content as the only property that showed most significant variation.

The product is relatively bacterial stable and contains several protein components that can be a good source of protein, both for the feed industry and human consumption.

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielle peptider
ATCC	American Type Culture Collection
CCUG	Culture Collection; University of Goteborg; Sweden
<i>C. finmarchicus</i>	<i>Calanus finmarchicus</i>
CFU	Colony forming unit
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
DHA	Dokosaheksaensyre
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPA	Eikosapentaensyre
FAO	Food and agriculture organization of the United Nations (mat- og agrikulturorganisasjon i FN)
HCl	Saltsyre
LA	Luria agar
MH	Mueller-Hinton medium
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon (minimum inhibitory concentration)
NAMAB	Nasjonalt anlegg for marin bioprosessering (National facility of marine bioprocessing)
N-leu	DL-Norleucine (syntetisk aminosyre)
OD	Optisk tetthet (optical density)
PBS	Fosfat buffer med salt
PCA	Agar for å telle kolonier (plate count agar)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPE	Fastfase ekstraksjon (solid phase extraction)
SSA	5-sulfosalicylic acid
TFA	Trifluoreddiksyre (trifluoro acetic acid)

Innhold

Forord	I
Abstrakt	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1 Innledning.....	1
1.1 <i>Calanus finmarchicus</i> (raudåte) - biologisk fakta	3
1.2 Status for utnyttelse av raudåte.....	4
1.3 Industriell utvinning av peptider fra raudåte og kvalitetssikring.....	5
1.4 Egenskaper til proteinfraksjon fra raudåte og utnyttelsesmuligheter	7
1.5 Mål med oppgaven	9
2 Bakgrunn	10
2.1 Grunnleggende om aminosyrer, peptider og proteiner	10
2.2 Hydrolyse	13
2.3 Hydrolysereaksjoner og optimale betingelser.....	14
2.4 Metodikk.....	15
2.4.1 Kulturmedier og kvantitering av bakterier	15
2.4.2 Isolering og separasjon av proteiner.....	16
2.4.3 Antimikrobiell og hemolytisktesting (bioaktivcreening)	19
3 Material og metoder	21
3.1 Biologiskmaterialet.....	21
3.2 Kjemikalier og reagenser.....	21
3.3 Innhold i dyrkingsmedier og buffere	22
3.4 Bakteriestammer	22
3.5 Kvantifisering av bakterieinnhold i biologisk materiale	22
3.6 Kvantifisering av mugg og sopp i biologisk materiale.....	23
3.6.1 Direkte mikroskopering.....	23
3.6.2 Dyrking på selektivt medie	24
3.7 Måle tørrstoffinnhold med tørking	24
3.8 Analyse av aminosyreinnhold	24
3.8.1 Preparering for analyse av total aminosyresammensetning	24
3.8.2 Preparering for analyse av frie aminosyresammensetning.....	25

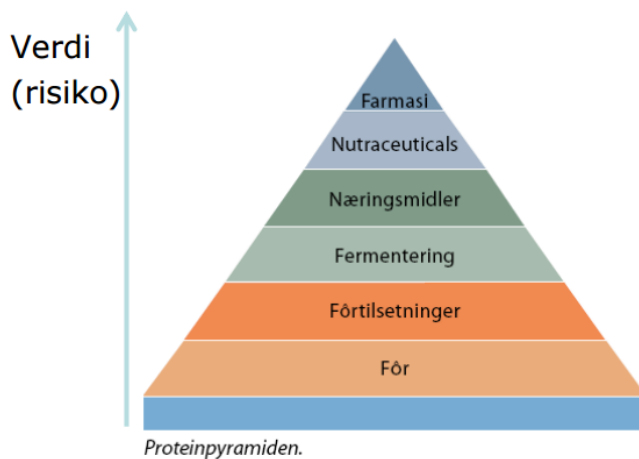
3.8.3	Aminosyreanalyse	25
3.9	Fast-fase ekstraksjon.....	27
3.10	Bioaktivitetstesting	27
3.10.1	Oppdyrking av bakterier.....	28
3.10.2	Antibakteriell test (MIC-test).....	29
3.10.3	Hemolytisk testing.....	30
4	Resultat.....	32
4.1	Bakterieinnhold i hydrolysat	32
4.2	Mugg og soppinnhold i hydrolysat.....	35
4.3	Tørrstoffinnhold.....	37
4.4	Totale og frie aminosyrer	37
4.5	Observasjon etter fast-fase ekstraksjon	40
4.6	Antibakteriell aktivitet.....	41
4.7	Hemolytisk aktivitet	48
5	Diskusjon.....	50
5.1	Mikrobiell stabilitet	50
5.2	Kjemisk sammensetning.....	54
5.3	Bioaktivitet	58
5.3	Videre arbeid	61
5.4	Oppsummering	62
6	Referanser.....	63

1 Innledning

Det er en økende interesse for marine dyreplankton, som krill og kopepoder til dyrefôr og til humant konsum. Andelen biomasse av dyreplankton, som blir spist av marine dyr er cirka 10-15% (Lindeman, 1942). Den resterende andelen er derfor tilgjengelig for å utnyttes til andre formål, som fôrtilsetning til dyr, mattilsetning, kosttilskudd eller som medisiner. Kopepoder er den største ressursen fra havet som sjødyr livnærer seg av, derfor inneholder den også rikelig med næringsstoffer som ernæringsmessig er hensiktsfull å spise for mennesker og dyr. De inneholder rikelig av protein, n-3 fettsyrer, polare lipider, enkelte vitaminer (Vitamin C, Niacin, Vitamin E, karatenoider) og mineraler (fosfat, jod, sink, jern) (Hamre & Harboe, 2008; Hamre et al., 2002; Mæland, Rønnestad, Fyhn, Berg, & Waagbø, 2000; van der Meeren, Olsen, Hamre, & Fyhn, 2008). Siden det er en global etterspørsel etter marine oljer og andre marine komponenter, kan dyreplankton være en tilvekst av oljer og andre ernæringsmessige forbindelser. Det er flere fordeler ved å utnytte olje fra dyreplankton, og en av grunnene er at de som råstoffkilde inneholder lite miljøgifter (Borgå, Gabrielsen, & Skaare, 2001; Hung et al., 2010) fordi livssyklusen er kort. Dette betyr at miljøgifter ikke rekker å akkumulere i slike organismer. Videre har de fleste dyreplankton et relativt høyt innhold av omega-3 fettsyrer, da fortrinnsvis eikosapentaenoiksyre og dekosahexaenoiksyre, som kun finnes i marine dyr (Harris, Kris-Etherton, & Harris, 2008; Kris-Etherton, Harris, & Appel, 2003). De representerer derfor en viktig kilde til disse marine oljene.

Hydrolyserte peptider fra marine miljø har fått økt fokus den senere tiden. Det er blitt viktig å avdekke egenskapene til slike peptider fordi dette er viktig kunnskap som trengs for å kunne utnytte denne ressursen optimalt (se proteinpyramiden i Figur 1). Interessen for raudåte, som på latin heter *Calanus finmarchicus* og som er et dyreplankton, har økt den senere tiden og det er flere grunner til denne interessen. Raudåte som ressurs er interessant fordi den er den mest tallrike av alle marine skalldyrarter (Vang, Pedersen, & Olsen, 2013). Den stående biomassen er på cirka 70-80 million tonn (Aksnes & Blindheim, 1996) i det Nordiske hav og det produseres om lag 200 til 400 millioner tonn hvert år i det samme område. Siden mengden biomasse er stor, kan det potensielt sett bli utnyttet til kommersiell bruk. Nylig har bærekraftig innhøstings teknologi gjort det mulig å bruke denne ressursen kommersielt. Teknologien som er utviklet for dette formålet og som er patentert av bedriften Calanus AS i Tromsø, baserer seg på et finmasket nett som blir dratt etter en båt i svært lav fart (1 knop). Bifangst er ikke et stort problem fordi innhøstingshastigheten i kombinasjonen med mekanisk støy gjør at fisk ikke

blir fanget. Derimot blir det fanget noen maneter i ubetydelige mengder. Det gjør at metoden for innhøsting resulterer både i bærekraftig høsting og relativ stor mengde med biomasse med raudåte. Den blomstrer om våren og går i dvale om vinteren, derfor er det kun mulig å høste den i løpet av sommeren fra april til august.



Figur 1. Proteinpyramiden illustrer ulike verdier av forskjellige produktkategorier som er produsert fra proteiner. Rangeringen går fra fôr som er lavest i verdi til farmasiprodukter som er høyest i verdi. X-aksen illustrerer mengden av materialet fra de ulike produktkategoriene. (Kilde: sluttrapport fra RUBIN.no)

Med bakgrunn i den stående bestanden og tilgjengelig innhøstingsteknologi, er raudåte som ressurs både tilgjengelig og representerer et økt potensial for kommersiell utnyttelse, muligens i større grad sammenlignet med hva som er tilfelle i dag (Kilde: Calanus AS).

Hovedbestanddelene av én *C. finmarchicus* er cirka 72,5% vann, 16,9% protein, 3,9% lipider og 2,0% aske (Pedersen, Vang, & Olsen, 2013). Sammensetningen av raudåte vil variere etter hvor gammel den er og hva den har spist, men stort sett vil innholdet være i nærheten av disse verdiene. Dette betyr at proteinandelen er over fire ganger så høy som oljen. Derfor vil resultatet av effektiv utnyttelse av raudåte gi større mengde proteinfase, sammenlignet med oljefase.

Det er flere bioaktiviteter som er påvist i marine peptider som størrelsesmessig består av tre til tjue aminosyrer, blant annet antioksidantaktivitet (Kim et al., 2001; Kim, Je, & Kim, 2007; Mendis, Rajapakse, & Kim, 2005), antimikrobiell aktivitet (Galiniere et al., 2009; Hancock & Sahl, 2006; Li, Haug, Moe, Styrvold, & Stensvag, 2010; Smith, Fernandes, Kemp, & Hauton, 2008; Subramanian, Ross, & MacKinnon, 2008; Zhao et al., 2007) og toksisk aktivitet (lysering/hemming av kreftceller) (Chauhan et al., 2008; Davidson, Allen, Lim, Anderson, & Haygood, 2001; Fenical et al., 2009; Pettit et al., 1982). Med bakgrunn i kunnskap om bioaktiviteter i marine peptider kan det potensielt sett utvikles flere peptider fra marine miljøer til ulike anvendelser. Potensielt kan det også finnes slike bioaktiviteter i dyreplankton. Hensikten med å kartlegge bioaktiviteter til marine peptider er å frambringe ny grunnleggende

kunnskap om dette. Det er ikke mulig å argumentere direkte med økt helseutbytte ved å innta bioaktive peptider oralt, fordi peptider lett ødelegges når de passerer mage/tarm kanalen og brytes ned til svært små peptider og aminosyrer. Derimot kan de ha en positiv effekt. Ulike fordøyelsesforsøk må i så fall dokumentere hvordan de ulike enzymene i kroppen spalter dem og som enten kan resultere i økt (Clare & Swaisgood, 2000) eller ødelagt bioaktivitet. Økt bioaktivitet har blant annet vist seg gjeldende i melk og soya (Clare & Swaisgood, 2000; Gibbs, Zougman, Masse, & Mulligan, 2004) blant annet. Dermed vil økt kunnskap om raudåte som ressurs sette fokus på deres antatte positive helsebringende effekt ved inntak og også at de er trygge å spise (Udenigwe & Aluko, 2012).

Dyreplankton kan bidra til å berike utvalget av matvarer eller andre produkter, enten ved å bli omsatt som et eget produkt eller bli tilsatt i andre produkter. Det er videre viktig at utnyttelse av ressurser som dyreplankton gjøres på en optimal og bærekraftig måte.

1.1 *Calanus finmarchicus* (raudåte) - biologisk fakta

Vitenskapelig klassifisering av *C. finmarchicus*:

Rekke:	Arthropoda- leddyr
Underrekke:	Chelicereta
Klasse:	<i>Maxillipoda</i>
Underklasse:	<i>Copepoda</i> - hoppekreps
Orden:	Calanoida
Art:	<i>Calanus finmarchicus</i>



Figur 2 Mikroskopbilde av *Calanus finmarchicus*. Muntlig bekreftet av Knut Sivertsen, UiT. (Foto: Richard Taknes)

Raudåte, *C. finmarchicus* (Figur 2) er et dyreplankton og er en art under Klassen Maxillipoda (latinsk; maxilla=kjeve. Kjevebein + gresk; podos = fot) Underklasse Copepoda- hoppekreps

(gresk; Kope = åre, håndtak, gresk; podos = fot) og videre inndelt under underklassen Copepoda og orden Calanoida. (Frank Emil Moen & Svensen, 2008) Utbredelsesområdet til raudåte er fra den nordamerikanske kysten i vest til Polhavet i nordøst (Aksnes & Blindheim, 1996; Diel & Tande, 1992; Lee, Hagen, & Kattner, 2006; Tande, 1991) Den er et haloplankton, noe som betyr at den har begrenset evne til å forflytte seg og driver i de store vannmassene, ved hjelp av bevegelser og strømmer i havet. (Bjørn Gulliksen & Svensen, 2004; Frank Emil Moen & Svensen, 2008)

Livssyklusen til Raudåte er på ett år og i løpet av det året gjennomgår ulike neuplier- og copepodittstadier (fra stadiet I-V) (Tande, 1991, Aksnes og Blindheim, 1996, Lee et al., 2006) Karakteristisk for raudåte er at den har lange, rette antenner, gjerne over 17 ledd (maks 25 ledd) og har en torpedoformet forkropp (prosom), her har den også et nauplius øye. Bak forkroppen kommer halekroppen (urosom) som er cirka 4 ledd langt. *C. finmarchicus* er et relativt stort zooplankton og blir ca. 3-4 mm lang. Den livnærer seg av å spise encellede alger. (Frank Emil Moen & Svensen, 2008; Hågvar, 2010)

1.2 Status for utnyttelse av raudåte

Ved fabrikken «Nasjonalt Anlegg for Marin Bioprosessering» (NAMAB) i Kaldtfjorden like utenfor Tromsø, blir biomasse av krepsdyret prosessert i stor skala. Under prosessen blir krepsdyret prosessert til tre ulike faser kalt grakse (uløselig protein/skallfragmenter), olje og hydrolysat (proteinfraksjon). Prosessen vil bli forklart mer utdypende i punkt 1.3.

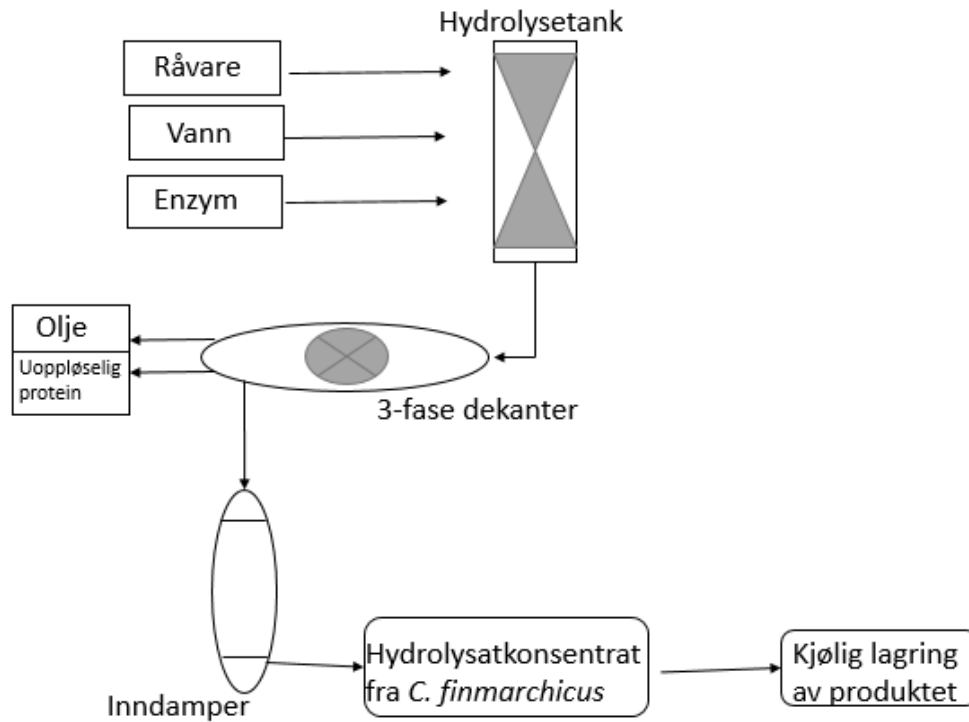
Oljen har ved museforsøk vist flere helsebringende egenskaper som redusert vektøkning, redusert magefett, lavere grad av vevsinflammasjon, redusert opphopning av fett i leveren og bedre glukoseintoleranse (Höper et al., 2013; Höper et al., 2014; Pedersen, Salma, Höper, Larsen, & Olsen, 2014). Den blir solgt som et kosttilskudd (Figur 3), i form av gelatinkapsler, med de nevnte dokumenterte helseeffektene.



Figur 3. Bilde av pakningen til det kommersielle produktet, kaldt Calanus Oil, fra bedriften Calanus AS. (Foto: Calanus.no)

1.3 Industriell utvinning av peptider fra raudåte og kvalitetssikring

Deretter blir de transportert til NAMAB, som er designet for å prosessere marint materialet til ulike anvendelser. Etter ankomst males (knuses) materialet, før det blir transportert til hydrolysetanken hvor hydrolysen finner sted (hydrolyse forklart punkt 2.2). Tanken inneholder en stor rotor med robotarmer helt ut til kanten av tanken, slik at materialet som blir tilsatt blir homogenisert godt. Deretter blir tanken oppvarmet til 50°C og enzymet alkalase og vann tilsatt, der forholdet mellom vann og materialet er 1:1. Videre blir materialet, enzym og vann inkubert med omrøring i to timer. Alkalasen blir deretter denaturert ved 90°C i 20 minutt for å stanse hydrolysen. Materialet blir så filtrert og sentrifugert for å fjerne skall og olje. Til slutt dampes proteinfasen, slik at materialet oppnår ønsket tørrstoffmengde. Resultatet av prosesseringen blir en brun tykk masse som vist i Figur 5. Grunnen til at det kalles «hydrolysat» er for å belyse at materialet har vært gjennom en hydrolyseprosess (forklart i punkt 2.2.). NAMAB er godkjent og registrert av Mattilsynet som produsent av næringsmidler, fôr og fôrvarer. De følger derfor lovkrav som er angitt i nasjonal og europeisk lovgivning.



Figur 4 Prosesstrinnene bak produksjon av hydrolysat fra *C. finmarchicus* (råvare). Illustrasjonen indikerer hva som blir tilsatt og fjernet under prosessen ved NAMAB: Nasjonalt anlegg for marin bioprosessering av hydrolysatet fra *C. finmarchicus*. (Kilde: Bilde modifisert fra Rubin sluttrapport www.rubin.no)



Figur 5 Bilde av hydrolysatprodukt(proteinfraksjon) fra *C. finmarchicus* etter prosessering, hvor hydrolysatet er det brune materialet.

1.4 Egenskaper til proteinfraksjon fra raudåte og utnyttelsesmuligheter

Proteinfraksjonen (hydrolysat) fra raudåte blir hovedsak solgt som dyrefôr, uten dokumenterte egenskaper. Hvis dokumentasjon viser at proteinfraksjonen har unike egenskaper, kan potensielt sett proteinfasen bli solgt til høyere pris til blant annet, dyrefôr eller for humant konsum til ulike anvendelser (Figur 1). Det er hensiktsmessig å bli bedre kjent med hydrolysatet, for å tilrettelegge en markeds plass for produktet, slik at det kan utvikles i henhold til egenskapene og behov i markedet.

Det har blitt gjort noe forskning rundt helsefordeler av inntak av blant annet hydrolysert fiskeprotein i mus og kanin, der det har blitt dokumentert at det kan redusere kolesterolnivå i plasma (Wergedahl et al., 2004; Zhang & Beynen, 1993). Det meste av forskning om anvendelse av hydrolysert marint materiale, er derimot utført på fisk. Som fôrtilskudd i blant annet fiskeoppdrett, kan dyreplankton være et godt tilskudd som fôrtilsetning. Flere studier har blant annet vist at dersom oppdrettstorsk (*Gadus morhua* L.) får dyreplankton i kosten sin, vokser de dobbelt så fort, sammenlignet med hva de gjør om de får rotatorier (*Brachionus* sp.) som er et hjuldyr (Busch, Peruzzi, Tonning, & FALK - PETERSEN, 2011; Busch, Falk - Petersen, Peruzzi, Rist, & Hamre, 2010). Den høye voksraten ved inntak av dyreplankton har gjort at fokus rundt lipidprofil har vært sentral, selv om aminosyresammensetningen er vel så viktig å kartlegge (Aragão, Conceição, Dinis, & Fyhn, 2004). Dette fordi aminosyresammensetningen i kosten hos fisk er essensiell å ha kjennskap til, både for å optimalisere voksraten hos fisk og også få optimal fôrutnyttelse, i form av riktig ernæring. Slik at fisk i størst mulig grad skal oppnå god fysiologisk utvikling. I karpe (*Cyprinus carpio*) og havabbor (*Dicentrarchus labrax*) larver, har utviklingen av fiskene vist at dersom noe av proteinene ble substituert med hydrolyserte proteiner, ble ernæringsopptaket hos larvene bedre og det resulterte i raskere vekst hos fiskene (Cahu, Infante, Quazuguel, & Le Gall, 1999; Carvalho, Sá, Oliva-Teles, & Bergot, 2004).

CODE-prosjektet (COD DEdevelopment = torskeutvikling) utført av NIFES (Nasjonalt institutt for ernæring og sjømatforskning), blir avsluttet mai dette året. Resultater viser blant annet at torskelarver trenger forholdsvis høy konsentrasjon av proteiner og da fortrinnsvis taurin, for å opprettholde gode fysiologiske funksjoner. Prosjektet viste også at hoppekreps (copepoder) hadde høyest konsentrasjon av både protein og taurin, sammenlignet med hjuldyr (rotatorier) og saltkreps (artemia) (van der Meeen, Ørjan Karlsen, Anders Mangor-Jensen, Ivar

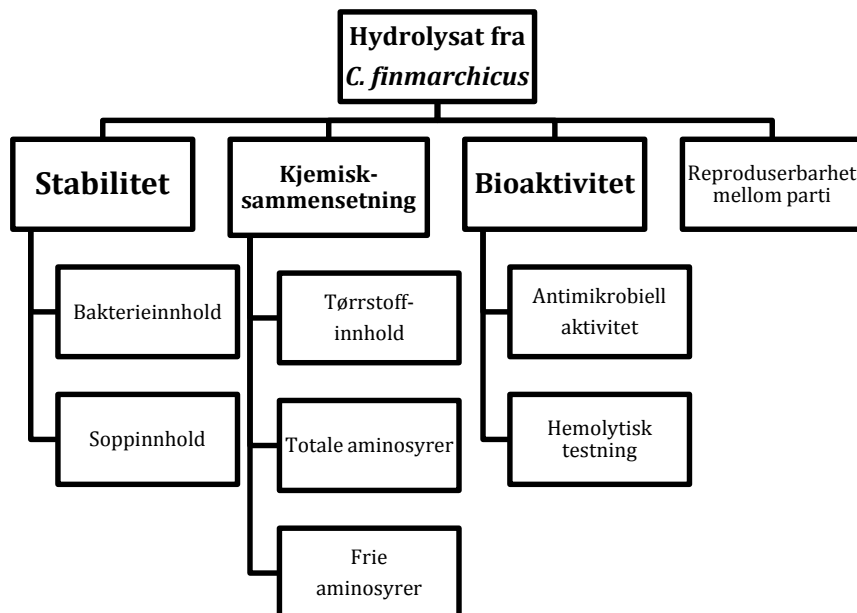
Rønnestad, & Hamre, 2015) Taurin har dessuten også vist seg å være et essensielt næringsstoff hos katter og hos primater (Bouckennooghe, Remacle, & Reusens, 2006; Sturman, 1993).

1.5 Mål med oppgaven

Hovedmål med oppgaven er å øke kjennskap til egenskaper hos hydrolysat (spaltet proteiner) fra *C. finmarchicus*. I denne oppgaven ble det lagt vekt på å se nærmere på stabilitet i form av mikrobiell vekst, kjemisk sammensetning, og bioaktivitet Figur 6.

Delmål

1. Analysere stabilitet til flere produksjoner av hydrolysater ved å se på mikrobielt innhold
 - a. kvantitere oppvekst av bakterier fra ulike batcher av hydrolysat lagret ved ulike betingelser
 - b. analysere soppinnhold i hydrolysat fra ulike batcher av hydrolysat lagret ved ulike betingelser
2. Analysere kjemisk sammensetning
 - a. tørrstoffinnhold
 - b. aminosyresammensetning i form av frie og totale aminosyrer.
3. Dokumentere bioaktivitet i hydrolysatet
 - a. antibakteriell aktivitet
 - b. toksisk aktivitet



Figur 6 Hovedpunktene i masteroppgaven for hva som skal bli utført og gi kjennskap om hydrolysat fra *C. finmarchicus*

2 Bakgrunn

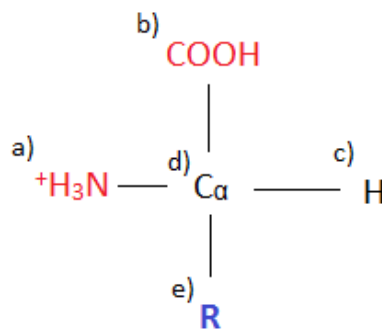
2.1 Grunnleggende om aminosyrer, peptider og proteiner

Proteinfraksjonen blir videre i oppgaven omtalt som hydrolysat, og det fordi proteiner som har gjennomgått en hydrolyseprosess blir omtalt som hydrolysat for å bemerke at materialet har gjennomgått en hydrolyseprosess.

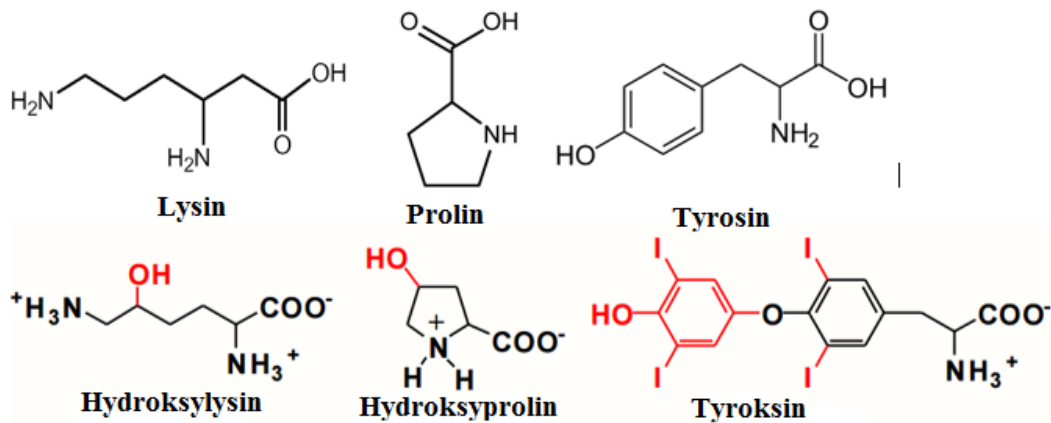
Tradisjonelt er proteiner benyttet som en kilde til energi og essensielle aminosyrer, som er nødvendig for mennesker og dyr for å kunne vokse og opprettholde fysiologiske funksjoner (Alberts et al., 2013; Harvey & Ferrier, 2010).

Proteiner er betegnelsen for flere aminosyrer, hvor aminosyrene er bundet til hverandre med ulike kjemiske bindinger. Det finnes 20 generelle aminosyrer, der cirka 10 er essensielle for mennesker og dermed må bli tilført gjennom kosten. Det finnes mange varianter av disse 20 aminosyrene og det har blitt beskrevet mer enn 300 ulike modifiserte typer av disse. Se Figur 8 for eksempler på generelle og modifiserte aminosyrer og hvordan de ser ut.

Hovedstrukturen til de fleste aminosyrer er at de har en karboksylgruppe, en primær aminogruppe og en karakteristisk side gruppe som kalles R-gruppe og som er bundet til et α -karbon atom (Figur 7). (Alberts et al., 2013; Harvey & Ferrier, 2010)

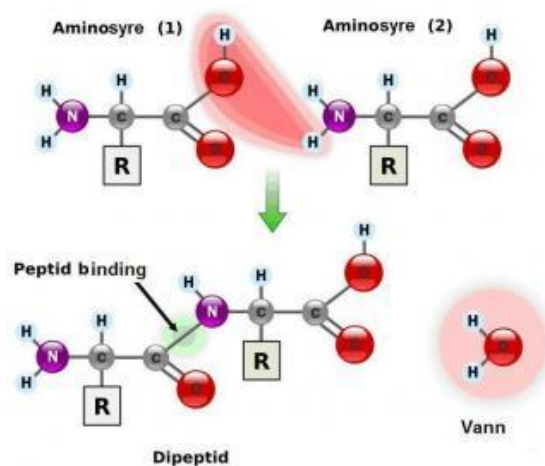


Figur 7 Viser en kjemisk hovedstruktur av aminosyrer hvor følgende er vist a) er en aminogruppe b) karboksylgruppe c) et hydrogen d) α -karbon og e) en sidegruppe (R-gruppe)



Figur 8 Illustrerer seks aminosyrer, hvor de øverste, henholdsvis lysin, prolin og tyrosin representerer de generelle aminosyrer og de tre nederste representerer modifikasjoner av disse. De modifiserte delene er vist i rødt(ekstra gruppe). Samtlige finnes i menneskekroppen, hvor lysin er essensiell og må derfor bli tilført gjennom kosten.

I proteiner er aminosyrer bundet med kovalente peptidbindinger, som er et amidbånd mellom karboksylgruppen til én aminosyre som bindes til amingruppen til en annen aminosyre. Bindingene resulterer i en rigid binding, som ikke blir påvirket av denaturering (forklart i punkt 2.1.1.1) og kalles peptid. Når to aminosyrer bindes sammen med en peptidbinding, blir vann dannet (kondensert) (Figur 9).

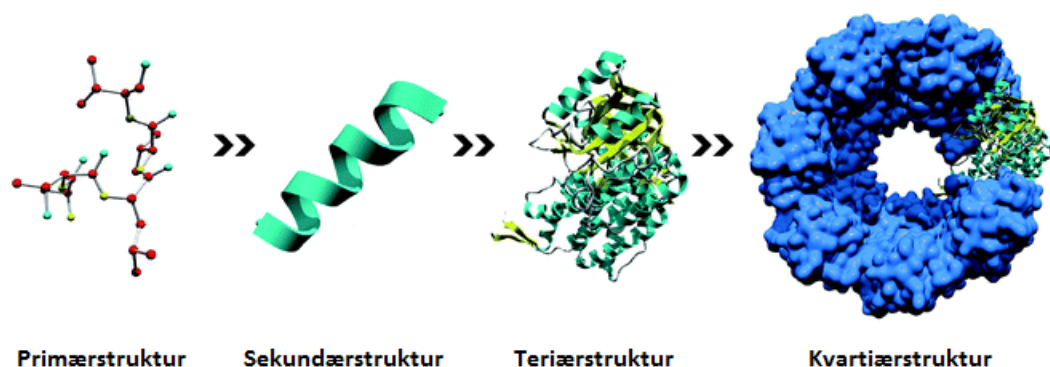


Figur 9. Danning av peptidbindinger og kondensering av vann. Illustrasjonen angir hvor på aminosyrene en peptidbinding oppstår og at vann også blir et produkt av reaksjonen. Illustrasjon av YssaineMrabet

Dermed vil også massen av et peptid som vokser med en aminosyre redusert tilsvarende ett vannmolekyl ved en kondenseringsreaksjon. Dette tilsvarer en økning på cirka 18 g/mol for hver gang en peptidbinding etableres. Vanligvis blir skille mellom hva som er et protein og et peptid skilt ved enten molekylvekt eller antall aminosyrer. Proteiner blir oftest betegnet for å ha en masse over 10 000 Da eller bestå av mer enn 100 aminosyrer. Massen av et peptid vil jamfør det som ble sagt ovenfor være mindre i enten vekt eller antall bundede aminosyrer.

2.1.1 Struktur og strukturnivå av proteiner

Den komplekse strukturen til et protein blir ofte delt inn i flere nivå (Figur 10) og, uttrykker oppbygning, konfigurasjon, funksjon og er basis for kunnskap om et protein. De følgende inndelingene er primærstruktur, som består av rekkefølgen av aminosyrene (gjenspeiles av DNA-sekvensen med kodon) med peptidbindinger mellom, men også kjemisk struktur på atomnivå. Sekundærstruktur består av foldinger av motiver inngår, med tilhørende bindinger mellom aminosyrene. Hoved sekundærstrukturer deles inn i α -helix og β -sheet. Teriærstrukturen er hele foldingen av et proteinmolekyl med motiver, bindinger Hoved sekundærstrukturer og eventuelle prostetiske grupper som for eksempel metaller som er nødvendig for aktivitet og funksjon til proteinet. Strukturen kan bestå av motiver som er sammensatt av flere α -helix og β -sheet (sekundærstrukturer), men som inneholder all informasjon om strukturen og elementene for at peptidet/proteinet ser aktivt. Kvartiærstruktur omfatter flere polypeptidkjeder assosiert sammen til et og består av flere proteiner med tertierstrukturer bundet sammen til et proteinkompleks og omfatter alt som inngår i komplekset(Harvey & Ferrier, 2010).



Figur 10 Fire hierarki av proteinstruktur (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b813273a>)

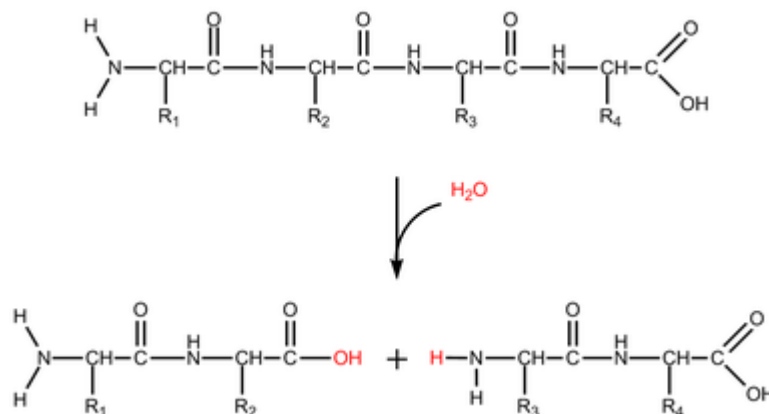
Peptidkjeder under 50-100 aminosyrer kalles peptider, mens de over denne størrelsen kalles for proteiner. Videre er det ofte at peptider ikke har enkelte kjemiske bindinger, som disulfidbindinger og hydrogenbindinger eller prostetiske grupper som gjerne er metaller (eks, jern og magnesium), som ofte finnes i proteiner (Harvey & Ferrier, 2010).

2.1.1.1 Denaturering av proteiner

Denaturering er når et protein blir utsatt for ytre faktorer som påvirker stabiliteten og strukturen til proteinet, det kan bidra til at tertiær og også sekundærstrukturen brytes og resulterer i tap av proteinfunksjon. Det er flere elementer som kan fremme denaturering og eksempler er varme, enzym, løsemidler (upolare løsninger), mekanisk blanding, sterk syre eller base, detergent (komponent med såpeegenskaper) og ioner med tungmetaller som bly og kvikksølv (Harvey & Ferrier, 2010). Hydrolyse er en metode som kan bryte peptidbindingen, slik at kortere kjeder og frie aminosyrer oppstår.

2.2 Hydrolyse

Hydrolyse er betegnelsen på en prosess hvor et substrat, vann og en katalysator inngår. Selve hydrolysereaksjonen foregår ved at katalysatoren spalter et molekyl og dermed vil produktet ha tatt opp et vannmolekyl (Figur 11). Derav navnet «hydro» som betyr vann og «lysis» som betyr å spalte.



Figur 11. Illustrasjon av en hydrolysereaksjon hvor et peptid blir spaltet til to peptider og hvor et vannmolekyl blir delt og bundet til de to nye produktene(peptidene). (kilde: <http://www.biotechacademy.dk>)

Hydrolyse kan forårsake at fett, karbohydrater eller protein blir spaltet til mindre komponenter. Eksempler på katalysatorer er enzym, syre eller base (Kristinsson & Rasco, 2000) og det finnes mange ulike enzymer som kan benyttes.

2.3 Hydrolysereaksjoner og optimale betingelser

Enzymer sin hensikt er å få en reaksjon til å gå raskere og det trengs mindre energi for at slike reaksjoner skal reagere og er derfor effektiv. Det finnes seks hovedkategorier av enzymer og de deles inn i følgende (1)oxidoreductase, (2)transferaser, (3)lyaser, (4)isomeraser, (5)ligaser og (6)hydrolaser. Hydrolaser er den gruppen enzymer som benyttes til hydrolyse. I denne gruppen finnes ulike enzymer, blant annet lipaser som spalter fett, karbohydraser som spalter karbohydrater og proteaser som spalter proteiner og peptider (Aehle, 2006).

Enzymatisk hydrolyse av proteiner resulterer i peptider eller frie aminosyrer. Eksempler på proteaser som er populære å bruke til hydrolyse av næringsmidler er alcalase®, flavourzyme®, neutrase® og protamex™ (se Tabell 1 for optimale betingelser). Som samtlige er brukbare for hydrolyse av råstoff fra blant annet marint materialet. De har ulike optimalforhold knyttet til omgivelser og hvordan material som skal bli spaltet. Optimale betingelser bidrar også til at denaturering unngås og det er viktig å skreddersy forholdene til enzymene, slik at nytten av enzymene blir optimal. Dermed er ikke nødvendigvis de optimale betingelsene optimal for et gitt produkt, selv om de som er oppgitt i Tabell 1 er veiledende og utprøvd, basert på ulike utgangspunkt.

Tabell 1 Enzymer som kan benyttes til marint materialet og hvor de er effektive for å hydrolysere proteiner (proteaser) (Benjakul & Morrissey, 1997; Chalamaiyah, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012; Cumby, Zhong, Naczka, & Shahidi, 2008; Liaset, Nortvedt, Lied, & Espe, 2002; Peña-Ramos & Xiong, 2002; Yust et al., 2007)

Enzym	Opphav		Optimale betingelser ved hydrolyse		
	Type mikrobe	Art	pH	Temperatur (°C)	Tid (min)
Alcalase®	Bakterie	<i>Bacillus liceniformis</i>	4-10	50-85	10-60
Flavourzyme®	Sopp	<i>Aspergillus Oryzae</i>	5-7	50	10-120
Neutrase®	Bakterie	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7-9,5	55-60	60
Protamex™	Bakterie	<i>Bacillus spp.</i>	6,5-7,6	50-56	120

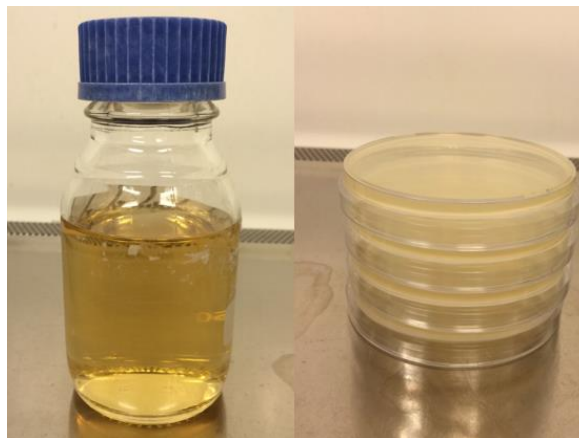
Det finnes ulike enzymer som kan spalte et substrat (material) på ulik måte. Valg av enzym avhenger av type materialet, hva som er ønskelig å spalte og hva som er ønskelig å få i resultat. Vanligvis blir ulike enzymer utprøvd for å se hva som gir nærmest ønsket resultat.

Videre er det andre hensyn som er avgjørende for hvilke enzym som blir valgt og eksempler på det er hvor lang tid det er ønskelig å bruke på selve hydrolysen, tilgjengelig fasiliteter, pris på enzym og volum av materialet som skal bli hydrolysert.

2.4 Metodikk

2.4.1 Kulturmedier og kvantitering av bakterier

Dersom en ønsker å analysere innhold av mikrober i et materiale eller en prøve, er den tradisjonelle metoden som benyttes å overføre noe av materialet til et dyrkingsmedium eller kulturmedium. Dette er næringspreparater som blir laget for å fremme vekst hos mikroorganismer. Mediet kan være flytende, eller være tilført agar og overført til dyrkingsplater (se som vist i Figur 12).



Figur 12. Bilde av kulturmedier, både i flytende og fast form. Flasken til venstre er et eksempel på et flytende kulturmedie, som gjør at mikrober vokser i løsning. Skålene til høyre representerer agarskåler, som inneholder kulturmedie med agarose, som gjør at materialet blir geleaktig. Det gjør at mikrober vokser i overflaten av mediet. Disse to typer medier har hvert sitt bruksfelt etter hvordan det er ønskelig å dyrke mikroorganismer. (Fotograf: Torunn Jørstad)

Det finnes mange ulike typer kulturmedier. Generelle medium er best egnet til å bestemme innhold av flest mulig bakterietyper, mens selektive medium er laget for å oppnå vekst av en spesiell type bakterier. Bakterier har ulike vekstkrav og noen vokser på mange forskjellige

kulturmedier, mens andre er vanskelig eller umulig å få til å vokse. Derfor er det viktig å være bevisst i valg av kulturmedium. Det er ulike faktorer som bidrar til vekst hos ulike mikrober, som for eksempler sammensetning og mengde av næringskomponenter, fuktighet, pH, oksygennivå og inkuberingstemperatur og -tid. Det er essensielt at kulturmediet er sterilt før dyrking, slik at annen vekst ikke påvirker resultatene. Det kan gjøres ved autoklaving, hvor mediet og annet utstyr blir utsatt for trykk-koking, slik at koketemperaturene oppnår 120 °C og bidrar til å eliminere både mikrober og sporer fra disse (Funke, Tortora, & Case, 2004).

Når kulturen er ferdig, sås en bestemt del av kulturen ut på agarskåler for at bakteriene skal kunne vokse til kolonier som kan telles. Hver koloni kalles for en «kolonidannende enhet» (CFU). Avlesningen av antall kolonier som blir dannet etter inkuberingen, kan indikere hvor mye bakterier materialet inneholder. Forutsetningen er at antall kolonier på én agarskål skal være over 30 kolonier. (Funke et al., 2004). Metoden er utarbeidet med *E. coli* som referansebakterie, hvor da CFU er linær dersom agaren med materialet inneholder mellom 30 til 300 bakteriekolonier (Breed & Dotterer, 1916). Bakterier som vokser i kjeder og klaser lar seg vanskelig kvantitere helt korrekt med denne metoden. Det er bakgrunnen for at benevnelsen enhet (unit) er brukt i stedet for antall når CFU angis (Funke et al., 2004). Kjennskapet til biologien til udyrkbare bakterier er lite kjent, dermed kan det være at dersom riktig teknologi og kunnskap blir etablert blir det mulig å dyrke bakterier som til nå ikke har latt seg dyrke (Bomar, Maltz, Colston, & Graf, 2011; Stewart, 2012).

2.4.2 Isolering og separasjon av proteiner

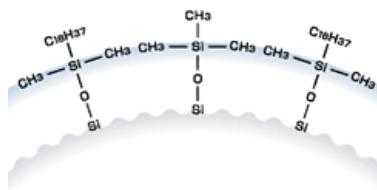
Det er flere måter å utvinne proteiner fra et materiale og det finnes flere teknikker og steg som kan benyttes for å separere komponenter i et materialet. Dersom materialet består av celler, hvor celleveggen er intakt, er det viktig å ødelegge celleveggen først, for å få tilgang til proteinene inne i cellen. Teknikker som kan benyttes er; høyfrekvent lyd, en mild detergent, presse materialet gjennom et lite hull slik at cellen sprekker («french press»), eller bruke en moser som kan ødelegge cellen. I mange sammenhenger fortsetter en da med en ekstrahering. Dernest kan det benyttes sentrifugering, differensial sentrifugering (flere trinn med økende hastighet), hastighetssedimentering eller likevekts sedimentering. Videre kan materialet bli separert/skilt ved ulike teknikker som kan separere etter kjemiske egenskaper som størrelse, form, ladning, hydrofobisitet eller affinitetsegenskaper til andre molekyler (Alberts et al., 2013).

2.4.2.1 Seperasjonsteknikker; kromatografisk væskeseperasjon

Ved kromatografiske seperasjonsteknikker menes en teknikk hvor et materiale blir skilt etter spesifikke egenskaper. Eksempler på slike egenskaper er størrelse, form, polaritet, ladning og affinitetsegenskaper.

2.4.2.2 Fast-fase ekstraksjon

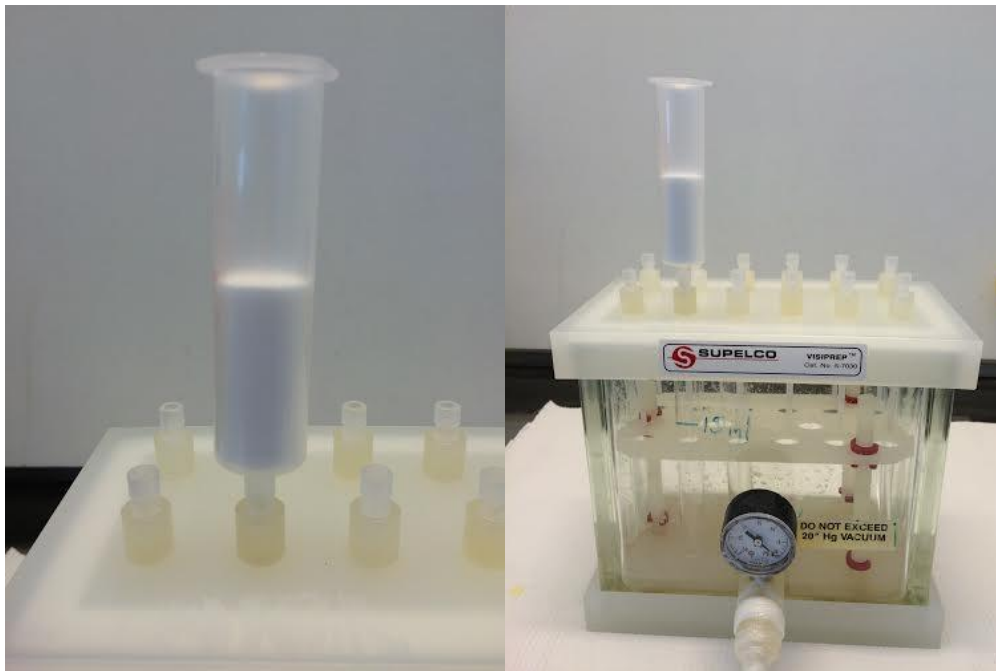
Fast-fase ekstraksjon (SPE) er en kromatografisk teknikk, som skiller materialet i en løsning etter fysiske og kjemiske egenskaper. Prinsippet bak metoden er at en kolonne med en stasjonær fase (Figur 14) blir tilført et prøvemateriale og deretter en mobil væskefase med en jevn hastighet. Dette bidrar til å skille komponenter i materiale etter egenskaper på komponentene. Videre kan teknikken bidra til å fjerne blant annet salt fra en løsning fordi salt ikke fester seg til kolonnen men går rett gjennom. Det finnes mange ulike typer kolonnemateriale å velge mellom og valget av kolonnematerialet, velges etter hvordan kjemisk separasjon som er ønskelig å oppnå. Materialet som skal bli separert, har som oftest blitt ekstrahert i forkant, noe som betyr at det har blitt skilt ut fra vannløselige og fettløselige egenskaper. Måten det blir gjort på er å benytte et polart løsemiddel, som er blandet med vann, noe som resulterer i at polare forbindelser homogeniserer seg med løsemiddelet og de upolare forbindelsene homogeniserer seg med vann. Det resulterer i to faser, polar og upolare komponenter, som er separert.



Figur 13. Viser overflaten til en revers fase kolonne med silica og C₁₈ komponenter, som binder upolare forbindelser. (Bilde: http://hplc.shiseido.co.jp/e/column/html/sp_index.htm)

Det finnes flere fast-fase kolonner som kan skiller materialet etter polaritet, og et eksempel er revers fase ekstraksjon. Det består av silica og gjerne C₈ eller C₁₈-molekyler. Silica består av silisium som er bundet til to oksygenmolekyler og C₁₈-molekyler består av 18 karbon som er bundet til silisium (Figur 13). Som består av middels til lav polaritet, på bakgrunn av den hydrofobiske C₁₈ molekylet. Det resulterer i at etter komponenter har bundet seg, kan komponentene bli eluert ut, ved hjelp av et upolart løsemiddel med ulik gradient, som vil eluere

komponenter med lik polaritetsgrad. De bunnede komponenter vil slippe tak når løsnings med lik polaritet kommer i kontakt med komponentene. Det som kommer ut fra kolonnen kan samles i fraksjoner (se til høyre i Figur 14) og det resulterer i at det inneholder vannløselige komponenter (dersom det var startløsningen) med kjent polaritetsgrad ut fra hvordan polaritetsgrad som bidro til å skille komponentene ut fra kolonnen (Hennion, 1999).

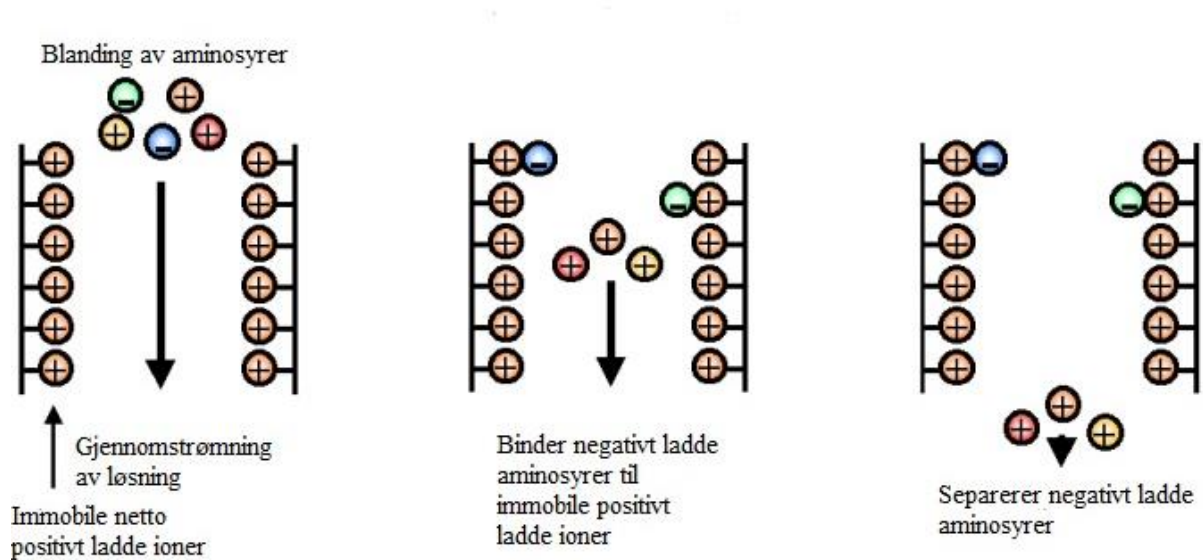


Figur 14. Viser bilde av en SPE-kolonne (venstre) og hvordan avsugget ser ut og at det er konstruert på den måten at det kan samle opp materialet fra kolonnen i reagensglass (høyre)

2.4.2.3 Ionebytte væskekromatografi

Ionebyttet væske kromatografi er en teknikk som skiller komponenter i en løsning ved hjelp av deres ladning. Prinsippet er at stasjonærfasen i kolonnen består av materiale med enten positiv eller negativ ladning (Alberts et al., 2013) og at dette ladde materialet vil holde igjen komponenter med motsatt ladning Figur 15. Eksempelvis vil netto negativ ladde komponenter bli holdt igjen, dersom kolonneoverflaten på innsiden er dekt med netto positiv ladde molekyler. Etter komponentene har festet seg i kolonnen, kan ulik løsning med basiske eller syre-egenskaper bli tilført, for å oppta plassen til materialet. Det resulterer i at materialet med lik netto ladning blir skilt ut av kolonnen til lik tid etter ionestyrken. Videre kan mengden

kvantifisere ved hjelp av lysabsorpsjon. Standarder benyttes for å sammenligne retensjonstid og absorbering av et kjent stoff med kjent konsentrasjon, slik at resultatene kan sammenlignes opp mot en kjent enhet.

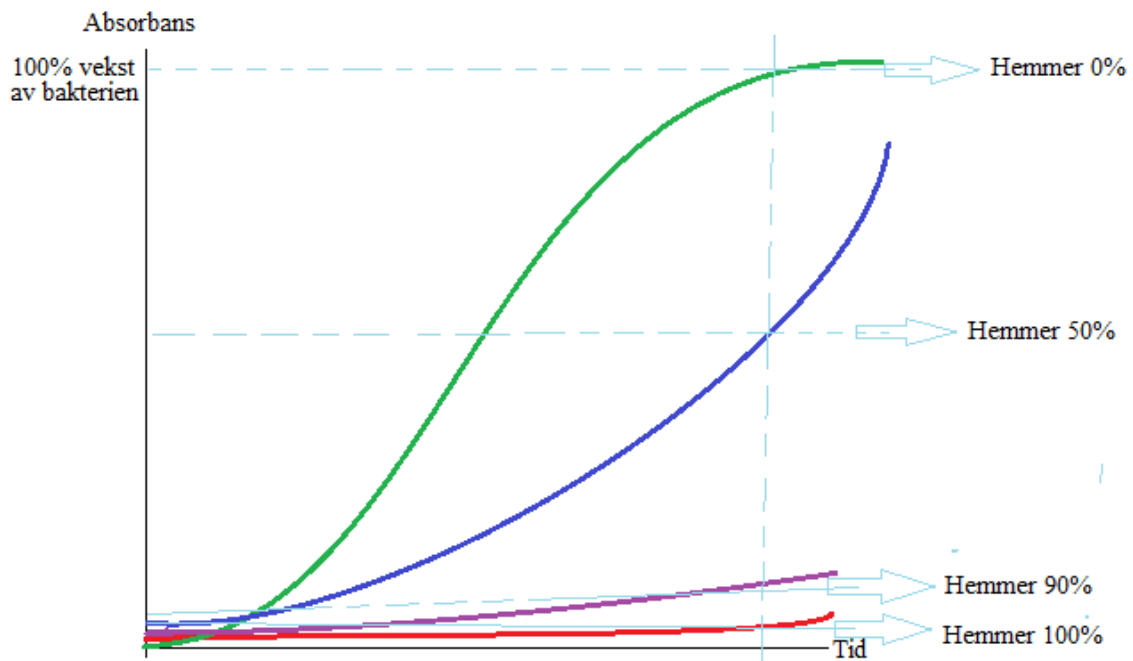


Figur 15 Illustrerer prinsippet til ionebyttet væskrokromatografi, hvor ione styrken til aminosyrene gjør at separasjonene skjer, med bakgrunn i ionene som er festet på overflaten inne i kolonnen, bidrar til å binde aminosyrer i ulik grad etter hvordan ladning de har. (Bilde tatt fra <http://chemwiki.ucdavis.edu>)

Aminosyrer kan skilles fra hverandre ved hjelp av netto ladning fordi aminosyrer har ulike netto ladninger. Sidegruppen (R-gruppen) til en aminosyre er den delen av molekylet som ofte avgjør ladningen. Aminosyrene kan ha ulike netto ladning, etter hvordan pH som er i miljøet de befinner seg i (Sjøberg, 2008).

2.4.3 Antimikrobiell og hemolytisktesting (bioaktivcreening)

Hensikten med bioaktiv screening, er for å få kjennskap til bioaktive egenskaper i et materiale. Ved antimikrobiell testing, er hensikten å se om et materiale innehar egenskaper som kan redusere bakterievekst. Det ved å eksponere et materiale for bakterier og se hvor bakteriene vokser, ved tilstedeværelse av de komponentene som ønskes å testes for aktivitet. Ved å observere veksten hos bakteriene over tid, kan det indikere om materialet bidrar til vekst av bakteriene eller om det hemmer vekst. Et eksempel er fotometrisk måling over tid, og danne vekstkurve, som kan gi innsikt hvordan bakteriene vokser. Eksempel er vist i Figur 16.



Figur 16 Vekstkurveoversikt, hvordan hemming av materialet defineres utfra grafene som blir dannet.

Prinsippet er likt for hemolytisk testing også, ved å eksponere materialet for erythrocytter, for å se om cellene sprekker ved nærvær av materialet. Det gjøres ved å måle fotometrisk, hvor mye hemoglobin som har blitt frigjort etter å ha blitt inkubert ved varme (ca 37°C) i cirka i én time. Det gjør at mengden frigjort hemoglobin, kan være en måleparameter for hvor mye hemolyse som har oppstått.

3 Material og metoder

3.1 Biologiskmaterialet

Tre ulike parti med produksjoner av hydrolysat fra *C. finmarchicus*, produsert ved NAMAB ble mottatt for analyse i oppgaven, henholdsvis produksjonsdato 04.04.14, 05.09.14 og 31.10.14. De tre hydrolysatene fra *C. finmarchicus* ble oppbevart ved frysetemperaturer (-20°C) og romtemperatur (ca.20°C) umiddelbart etter mottakelse, og datoen for når de ble mottatt er oppgitt i Tabell 2. Ensillasje fra Atlantisk laks fra Hordafôr ble mottatt 22.01.15 og umiddelbart oppbevart ved -20°C etter ankomst. Det var produsert ved Austevoll på Vestlandet i Norge.

Tabell 2. Oversikt over biologiskmaterialet, henholdsvis hydrolysat fra raudåte og ensillasje fra laks.

Materialet	Produsent	Produksjonsdato	Mottakelses dato (NFH,UiT):	LOT nummer
Hydrolysat 1 fra <i>C.finnmarchicus</i>	Calanus AS	04.04.14	09.05.14	CLH-14-1501
Hydrolysat 2 fra <i>C.finnmarchicus</i>	Calanus AS	05.09.14	08.09.14	CLH-14-3701
Hydrolysat 3 fra <i>C.finnmarchicus</i>	Calanus AS	31.10.14	22.01.15	CLH-14-4501
Kontroll				
Ensillasje fra <i>Salmar Salar</i>	Hordafôr	i.d ^a	22.01.15	i.d ^a

^a i.d: ingen data

3.2 Kjemikalier og reagenser

Tabell 3 Oversiktstabell over kjemikalier som ble benyttet til laboratoriearbeid til oppgaven og produsenten av kjemikaliene.

Kjemikal/reagens	Produsent/identifikasjon
Acetonitril	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
Trifluoreddiksyre	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
Saltsyre (HCL)	VWR BDH LOT:10L06026
Lithium citrat Loading buffer, pH 2,2,	BioChrom LTD, Cambridge, England
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
DL-Norleucine (N-leu)	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
Sabouraud glukose agar med chloramphenicol	FLUKA analytical, India
Muller hinton broth	DiFCO, Becton Dickinson, Sparks, USA
NaCl	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
NaH ₂ PO ₄ *12 H ₂ O	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
5-sulfosalicylic acid dihydrate (SSA)	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland

3.3 Innhold i dyrkingsmedier og buffere

Tabell 4 Viser oversikt over innholdet i ulike medier og buffere som ble benyttet til det forskjellige laboratoriearbeidet til oppgaven. Produsenten av kjemikaliene som ble benyttet, står oppgitt i Tabell 3

Navn på medier/reagens:	Innhold
Luria agar (LA)	Pepton 1%, gjær 0,5%, NaCl 1%, 1 M NaOH (for å få optimal pH 7) og agarose 1,5% og destillert vann
Plate Count Agar (PCA) med 10% NaCl	pepton 0,5%, gjærekstrakt 0,25%, glukose 0,1%, 10% NaCl, agar 1,5% og destillert vann
Sabouraud glukose agar med chloramphenicol	Mediet ble kjøpt kommersielt fra produsenten FLUKA analytical. Hvor de oppgitte innholdet var 5 g/l casein peptone, 5 g/l peptisk fordøyd animalskt vev, 40 g/l dextrose, 0,05 g/l chloramphenicol, 15 g/l agar og pH $5,6 \pm 0,2$ (ved 25°C)
Mueller Hinton (MH) –agar	2,1 % Mueller Hinton, 2 % agarose og destillert vann
Mueller Hinton (MH)-medie	2,1% Mueller Hinton og destillert vann
Fosfat buffer med salt (PBS)	0,218% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,063% NaH_2PO_4 og 0,9 % NaCl, hvor produsenten var FLUKA analytical og destillert vann
Fortynningsmiddel 0,9% NaCl	0,9% NaCl, hvor resterende materialet var destillert og autoklavert vann.

3.4 Bakteriestammer

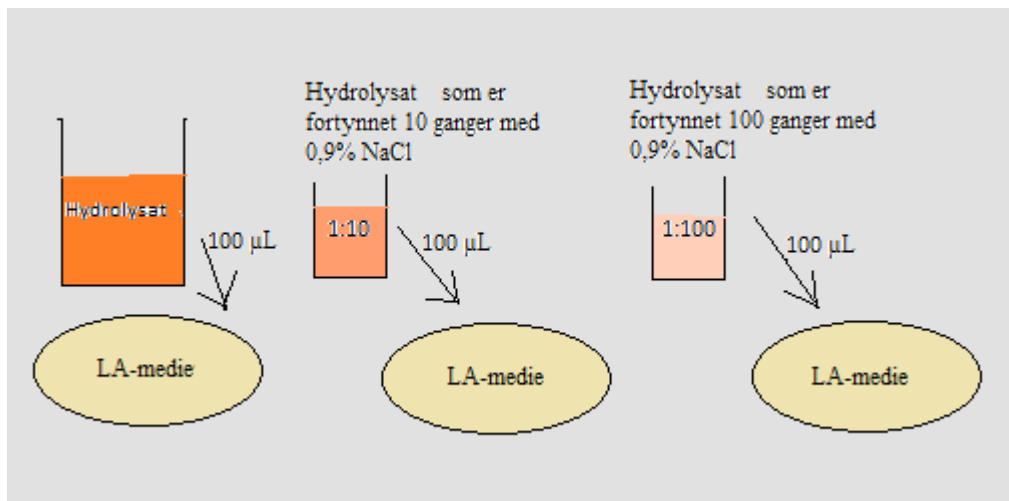
Tabell 5 Bakteriestammene som ble benyttet til antibakteriell testing (MIC-test).

Gram merking	Species	Stamme
Gram-positiv	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	CCUG 27702
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144
Gram-negativ	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

3.5 Kvantifisering av bakterieinnhold i biologisk materiale

En andel av hydrolysat 1 og 2 ble oppbevart ved ulike temperaturer (35°C, cirka 22°C og ved 6-8°C) og i ulik tid for å analysere for bakteriell vekst i etterkant.

Videre ble hydrolysatene, som hadde blitt oppbevart ved ulike forhold, påført LA-plate, hvor 100 µl av uforynnet og materialet fortynt 1:10 og 1:100 ble benyttet. Fysiologisk saltløsning (0,9% NaCl) ble benyttet som fortynningsmiddel. Oppsett er illustrert i Figur 17.



Figur 17. Figuren viser oppsett til metode for kvantitering av bakterieinnhold i hydrolysat fra *C. finmarchicus*

Deretter ble LA-mediet med påført materialet av hydrolysat 1 og 2 med fortynninger, inkubert ved 4°C i 10 dager, cirka 22°C i 72 timer og 34°C i 24 timer.

3.6 Kvantifisering av mugg og sopp i biologisk materiale

To metoder ble benyttet for å påvise mugg og sopp i hydrolysat 1 og 2, og for å avdekke eventuelt for å indikere hvilke mikrober som var tilstede. Metodene var henholdsvis direkte mikroskopering og selektivt medie. Hydrolysat 1 hadde vært oppbevart ved frysetemperaturer (-20°C) i fem måneder og hydrolysat 2 hadde vært oppbevart ved romtemperatur (cirka 20°C) i én uke før analysering.

3.6.1 Direkte mikroskopering

Biologisk materialet ble dyrket på medium før det ble mikroskopert, for å se hvilke mikrober som vokste og om det var mugg eller sopp. Kort beskrevet, 100 µl med ufortynnet hydrolysat 1 og 2, påført LA-medie. Hydrolysatene ble inkubert på to ulike måter, 1) inkubering ved 22°C i 7 dager og 2) inkubering ved 35°C i 24 timer, for deretter å bli inkubert videre ved 22°C i 6 dager. Totallengde på inkuberingene ble 7 dager for begge metodene.

Etter inkuberingen ble koloniene som hadde vokst opp mikroskopert (LEITZ LABORLUX S med 40x og 100x forstørrelse) for å se om det var mugg eller sopp som hadde dannet koloniene.

3.6.2 Dyrking på selektivt medie

Hydrolysat 1 og 2 ble testet ved å bli dyrket på et selektivt medie kaldt Sabouraud glukose agar med chloramphenicol. Det ble påført 100 µl med materialet på selektivt medie og deretter inkubert ved romtemperatur i 7 dager før avlesning. Avlesningen bestod i å se etter kolonivekst på agarskålen.

3.7 Måle tørrstoffinnhold med tørking

Tørrstoff ble bestemt for hydrolysat 1, 2 og 3, samt Hordafôr. En aluminiums skål ble veid før, cirka 10 g med hydrolysat ble tilsatt og alt ble veid igjen for å kunne beregne nøyaktig tilsatt mengde hydrolysat. Fire paralleller ble utført for hver prøve. Deretter ble skålen med materialet inkubert i et varmeskap (Termaks (Heigar)) ved 105°C i syv dager. Siste avlesning av vekt var etter syv dager. Differansen fra første til siste måling indikerte hvor mye vann som hadde fordampet.

Formel 1: Beregning av andelen tørrstoff i materialet

$$\text{Tørrstoff (\%)} = 100\% - \left(\frac{(Ma - Mb) \cdot 100\%}{Mc} \right)$$

Ma er vekt av innveid prøve inkludert skål, *Mb* er vekt etter tørking, inkludert skål og *Mc* er innveid prøvemengde.

3.8 Analyse av aminosyreinnhold

Hydrolysat 1 og 2, samt Hordafôr ble analysert for å kartlegge aminosyreprofil. Fire parallelle analyser ble foretatt.

3.8.1 Preparering for analyse av total aminosyresammensetning

Det ble veid ut 200 mg med materiale og dette ble tilsatt 0,5 ml destillert H₂O og 0,5 ml 20 mM N-leu som internstandard. Videre ble dette homogenisert med 1,2 ml med konsentrert saltsyre (HCl) 37%, blandet godt og sprayet med N₂-gass (Nitrogengass) i 10-15 sekunder for å hindre oksidasjon. Prøvene ble så satt i varmeskap (110°C), hvor de ble inkubert i 22-24 timer for å sette i gang syrehydrolysen (Moore & Stein, 1963). Etter inkuberingen ble prøvene avkjølt før

100 µl av prøvematerialet ble pipettert over til et analyserør, hvor de deretter ble dampet inn til tørrhet med N₂-gass. Etter tørkingen ble 1 ml med loadingbuffer (spesifisert under materialet punkt 3.2) tilsatt og prøvene ble tilslutt analysert på aminosyreanalysatoren, se punkt 3.8.3

3.8.2 Preparering for analyse av frie aminosyresammensetning

Det ble veid ut 1 g materialet som ble blandet med 1 ml n-Leu (20 mM) og 9 ml destillert H₂O. Deretter ble materialet homogenisert på en homogenisator. Videre ble 1 ml med 35% SSA (5-sufosalicylic acid) tilsatt for å fjerne proteiner og store peptider. Prøvene ble så sentrifugert ved 4000 G i 10 minutter (4°C). Tilslutt ble 200 µl av supernatanten pipettert av og blandet med 800 µl loading buffer (spesifisert under materialet punkt 3.2) Deretter ble preparert materialet analysert på aminosyreanalysatoren, se punkt 3.8.3.

3.8.3 Aminosyreanalyse

Preparerte analysematerialer ble analysert ved en kromatografisk separasjon med en ionebyttet kolonne. Det ble benyttet lithium citrat buffer, med ulik pH og ionestyrke, noe som gjorde at aminosyrene ble skilt ut etter lik ionestyrke. Det bidrar til at de samme aminosyrene ble retentert til lik tid. Deretter blir de utsatt for et forhåndsbestemt varmeprogram, for å fremme en reaksjon med ninhydrin. Det for å kvantifisere mengden aminosyrer. Grunnen til reaksjonen er for at ninhydrin og en aminosyre, absorberer lys ved 570 nm (blå-rød spekter) Bortsett prolin og hydroksyprolin som detekteres med ninhydrin ved 440 nm (gul spekter) Prinsippet er basert på Spackman, Stein, and Moore (1958).

Analysen ble gjennomført ved bruk av en Biochrom 30 aminosyre analysator (Biochrom Co, Cambridge, UK) og UV-absorbansen ble målt med Chromeleon software (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) Resultatene ble kvantifisert ut fra standardkurve. Standardene som ble benyttet var A6407 og A6282 henholdsvis netto negativt ladde aminosyrer og netto positivt ladde aminosyrer. I tillegg ble det benyttet standardkurver for glutamin og N-leucine.

Formel 2: Beregning av andelen av en aminosyre materiale, ved hjelp av resultatene fra væskekromatografen

$$mengde\ AA\ (\mu mol/g) = \frac{\frac{Mengde\ AA}{Mengde\ N-leu} \times (Tilsatt\ mengde\ N-leu(ml) \times konsentrasjon\ N-leu(\mu mol/ml))}{mengde\ pr\o ve\ (g)}$$

Formelbenevningenes betydning:

Mengde AA:	Mengde aminosyre som har blitt detektert ut fra standardkurven ved hjelp av absorbans
Mengde N-leu:	Mengden N-leucine som har blitt detektert ut fra standardkurven, ved hjelp av absorbans
Tilsatt mengde N-leu (ml):	Mengden tilsatt internstandard, som ble tilsatt ved klargjøringen av analysen
Konsentrasjon N-leu (μmol/ml):	Konsentrasjonen på internstandard som ble tilsatt
Mengde prøve (g):	Mengden utveid materialet, som ble benyttet til analysen

Beregning som vist ovenfor resulterte i verdier av aminosyrene angitt i konsentrasjon (μmol/ml). For å få verdien angitt med benevning mg/g, måtte resultatene multipliseres med molekylvekten av aminosyren, for så å bli dividert med tusen, for å få mg/g.

Formel 3: Omregning av benevning fra μmol/g til mg/g prøve

$$\frac{mengde\ AA\ (\mu mol/g) \times Mw\ AA}{1000} = mg\ AA/g\ pr\o ve$$

Denne beregningen (formel 2 og 3) benyttes for både totale og frie aminosyrer, med de samme standardkurvene.

3.9 Fast-fase ekstraksjon

En fast-fase kolonne av typen Sep-PAK[®] Vac 20cc (5g) ble benyttet. Det betyr at tørrstoffmengden i materialet bør være under 5 g. Dermed ble 15 ml med hydrolysat 1 tilsatt i 35 ml 0,05% trifluoracid (TFA) og 7,5 ml med hydrolysat 2 ble tilsatt i 42,5 ml 0,05% TFA. Det for å ikke overskride kapasiteten til kolonnen som var 5 g tørrstoff og tørrstoffmengden var kjent etter å ha tørket materialet som er oppgitt i punkt 4.3. Lakseensilasje fra Hordafôr ble preparert på samme måte som hydrolysat 1 og 2 fra *C. finmarchicus*.

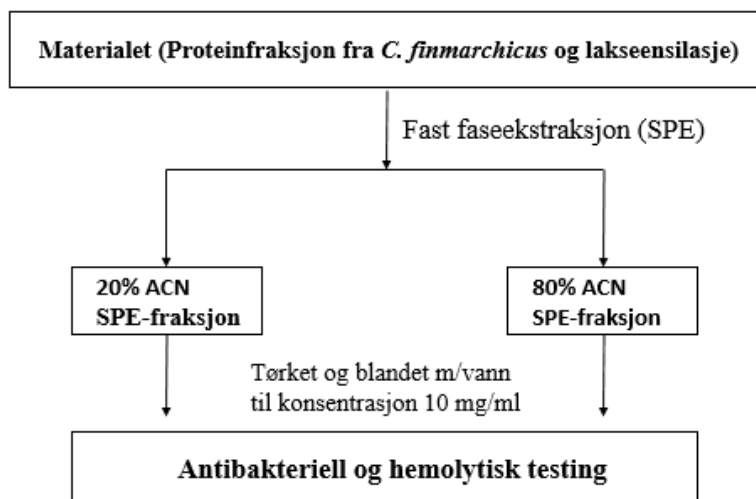
Kolonnen ble klargjort ved først å bli koblet på et vannavsug som er avbildet til høyre i Figur 14. Avsuget gjorde det mulig å fjerne væsken som ble tilført til kolonnen. Først ble kolonnen kondisjonert med 30 ml Acetonitrile (ACN) for deretter å bli ekvilibrert med 30 ml 0,05% TFA (Cirka 1 dråpe i sekundet). Etter klargjøringen ble prøve tilsatt kolonnen, for så å bli vasket med 50 ml 0,05% TFA, for å fjerne blant annet salt. Det ble videre tilført 15 ml med 20 % ACN til kolonnen og materialet som rant ut ved 20 % ACN, ble samlet inn i et rør. Samme fremgangsmåte ble benyttet ved 80 % ACN. Dermed resulterte metoden i to ulike løsningen, én med 20 % ACN og én med 80 % ACN-eluat, både fra hydrolysat 1, hydrolysat 2 og Hordafôr. Videre ble 6 stk. 50 ml rør veid, for så å bli tilsatt det filtrerte materialet med henholdsvis 20% og 80% ACN fra hydrolysat 1, 2 og Hordafôr.

Prøvene ble videre vakuumsentrifugert over natten for å tørke prøvene (ca 18 timer). Etter tørkingen var det fortsatt væske i rørene til hydrolysat 1 og 2 og det resulterte i at prøvene ble igjen vakuumsentrifugert med isopropanol som løsemiddel. Det ble tilsatt cirka 1 ml til eluatene og ble deretter sentrifugert ved to timer, det resulterte i at de ble tørrere, sammenlignet med hva ACN alene gjorde. Etter veiingen av vakuumsentrifugert og tørket materialet, ble vann tilsatt slik at konsentrasjonen av tørrstoff i å prøvene ble 10 mg/ml.

PH ble målt i fraksjonene. Instrumentet som ble benyttet til å lese av pH het WTW pH 7110 Inolab og kalibrert ved 20,1 °C.

3.10 Bioaktivitetstesting

Metodene som ble valgt for å teste bioaktive egenskaper i hydrolysatet, vart å se nærmere på antibakteriell aktivitet og innhold av aktive toksiske forbindelser. Til disse metodene ble det benyttet materiale som var fastfaseekstrahert, før testene ble gjennomført.



Figur 18 Flytskjema over hvordan forbehandlingen av materialet ble preparert før antibakteriell og hemolytisk testing.

Flytskjema i Figur 18, viser forbehandlingen av materialet som ble gjennomført før antibakteriell og hemolytisk testing. Materialet som ble benyttet til bioaktivitetstesting var hydrolysat 1 og 2, samt lakseensilasje fra Hordafôr.

3.10.1 Oppdyrking av bakterier

Fryste bakteriestammer (arbeidsløsning), som anvist i Tabell 5, hadde vært oppbevart ved -80°C i sterile NUNC® Cryo Tubes (1,8 ml) med 80% glycerol og MH-kultur (20%). Disse ble tint og dyrket ved å bli podet med en steril podenål i sterilbenk, ved at podeøsen berørte glycerolmediet med fryste bakteriestammer, for så å bli sådd direkte ut på MH-agarskåler. Deretter ble de inkubert ved romtemperatur mellom 2 - 4 dager, til synlige kolonier oppsto. MH-agarskålene med bakteriestammene ble maks lagret i tre uker ved 4°C før nye bakterier ble tint. Fra rendyrkede bakteriekolonier fra MH-mediet ble det inokulert én koloni til 5 ml MH flytende medie og inkubert over natt ved risting i romtemperatur. Neste morgen ble 20 μl bakteriekultur overført til nytt flytende MH-mediet og deretter ble ristet i ca 2 timer, for å få bakteriene i eksponentiell fase. Tettheten (OD) ble målt av bakteriesuspensjonen ved 600 nm med fotometer (Bio nate 3, Thermo electron corporation), for å se på veksten av bakteriene og hvor mange celler med bakterier som mediet inneholdt. For å få en suspensjon med en kjent mengde med bakterier, ble et estimat utfra tidligere forsøk benyttet. Det ved at OD er lineær

med konsentrasjonen av bakteriene. Oversikten over tidligere målte sammenhenger mellom konsentrasjon og OD er vist i Tabell 6.

Tabell 6 Tabellen viser volumet med bakterier i MH-suspensjon, som trenger å bli tilsatt til 10 ml MH-mediet, for å få $2.5-5.0 \times 10^4$ per ml med bakterieceller. Det for å kunne vite cirka hvor mange celler som blir tilsatt til hver brønn til en mikrotiterplate ved MIC-analysen, som blir cirka 1250-1500 stykker med bakterieceller i hver brønn.

OD ₆₀₀	Volum
0,003-0,010	20 µl
0,010-0,030	10 µl
0,030-0,075	5 µl
0,075-0,100	4 µl
0,100-0,150	3 µl

Utfra konsentrasjonen på løsningen, ble et volum pipettert ut som tilsvarte en bakterietettheten på cirka $2,5 \times 10^4$ ml⁻¹.

3.10.2 Antibakteriell test (MIC-test)

MIC er en forkortelse for Minimum Inhiberende Konsentrasjon, noe som betyr at testen angir lavest mulig konsentrasjon som inhiberer vekst av for eksempel bakterier. Metoden går kort ut på at en del av fraksjonene blir inkubert med bakterier som er i aktiv vekstfase, for så å måle fotometrisk vekst over tid. Vekstkurver for bakterievekst angir om peptidene har hemmende effekt eller en sammensetning som gir økt vekst hos bakterier.

Metoden ble gjennomført to ganger, hvor første gang ble fastfase ekstrahert materialet fra hydrolysat 1 og 2 testet og ved gjentakelsen ble fast-fase ekstrahert materiale fra hydrolysat 1 og 2, samt fastfase ekstrahert materialet fra Hordafôr analysert. Måten definering av hemming ble satt er vist i Figur 16.

Det ble tilsatt 50 µL med SPE-eluat og disse ble fortynnet til en 1:2 fortynningsrekke med sterilt vann i en mikrotiterplate (Nunc™ No. 269787, Nunc Int., Roskilde, Danmark) hvor to paralleller for hver fraksjon ble analysert .

Deretter ble 50 µL teststamme tilsatt i hver brønn, totalt 48 brønner av følgende bakteriestamme, henholdsvis *E. coli* ATCC 25922, *C. glutamicum* CCUG 27702, *S. aureus* ATCC 9144. Negativ kontroll ble også satt opp, som bestod kun av bakterie og destillert og

autoklavert vann, henholdsvis 50µl av hver. Slik at det ble mulig å se hvordan bakterien vokste uten tilsetning og dermed kunne sammenligne vekstkurven for bakteriene med de brønnene hvor det hadde blitt tilsatt fortynnede eluater.

Platene med materialet ble inkubert ved 35°C og analysert på en plateleser (EnVision, Perkin Elmer, 2103 Multilabel reader, var plassert i et Bindervarmeskap). Betingelsene som ble brukt var risting av mikrotiterplaten én gang i timen og så leser av absorbansen ved 600nm for hver brønn i totalt 48 timer. Sammenhengen mellom absorbans og tid ble grafisk fremstilt.

Minimal inhiberende konsentrasjon ble fastsatt som den konsentrasjonen som hemmet veksten av bakteriene 100- eller 50% ved å sammenligne absorbans (A_{600}) etter 25 timer.

3.10.3 Hemolytisk testing

Hydrolysat og ensilasje fra Hordafôr ble analysert for hemolytisk aktivitet overfor røde blodlegemer. Først ble celledensiteten laget, som bestod av røde blodlegemer. Det ble tappet 4 ml blod fra en frisk person, dirket i vakuumsrør (DB Vautainer ® LH 3410, ref 368494 (Lithium Heparin)) som inneholdt antikoagulant. Blodet ble sentrifugert ved 450 G i 10 minutter og deretter ble plasma fjernet. For å vaske de røde blodcellene, ble pellet blandet med PBS-buffer for så å bli sentrifugert ved 450 G i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og vaskingen gjentatt totalt tre ganger. Etter vaskingen ble de røde cellene blandet i PBS-buffer til cellene utgjorde 10% av det totale volumet. Testmaterialet (50µl) som var 20% og 80% ACN-eluat fra hydrolysat 1 og 2, samt 20% og 80% ACN eluater fra Hordafôr ensilasje. Eluatene ble fortynnet med destillert og autoklavert H₂O i mikrotiterbrønner (Nunc™ No. 163320, Nalgel Nunc Int., Roskilde, Danmark) med en fortynningsrekke 1:2. Hvor startkonsentrasjonen var 10mg/ml og siste fortynning var 0,02 mg/ml. Den negative kontrollen bestod av 25 µl PBS-buffer og 25 µl destillert og autoklavert H₂O og den positive kontrollen var 50 µl med 5 % Triton X-100 som ble fortynnet i H₂O. Etter testmaterialet og alle fortynningene, samt positiv og negativ kontroll var tilsatt til brønnene, ble 40 µl med PBS-buffer, samt 10 µl med 10 % røde blodcelle suspensjonene tilført til samtlige brønner. Deretter ble mikrotiterplatenene med materialet satt på risting ved 37°C i én time. Etter inkuberingen ble platene sentrifugert ved 200 G i fem minutter og supernatanten ble deretter av pipettert (60 µl) til nye mikrotiterplater (Nunc™ No. 269620, Nalgel Nunc Int., Roskilde, Danmark) Absorbansen ble så avlest ved 550 nm, med maskinen Synergy H1, hybrid reader. Deretter ble hemolysen beregnet ut fra negativ kontroll, som var satt til 0% hemolyse og positiv kontroll, som ble bestemt å være 100%

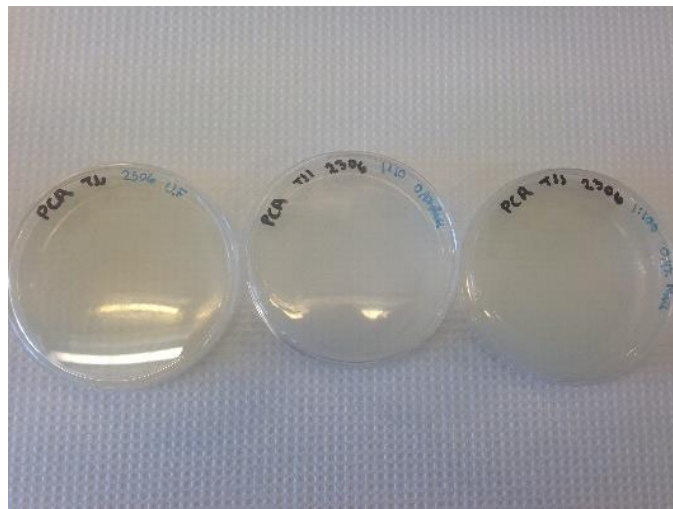
hemolyse. Det for å angi prosentvis andel av erytrocyttene som ble hemolysert ved kontakt med testmaterialet, ved hjelp av lysabsorbans.

Det resulterte i at absorbansen for negativkontroll ble trukket ifra alle resultatene, inkludert positiv kontroll for å fjerne støy. Videre ble positiv kontroll som hadde fått subtrahert negativ kontroll, satt til 100%. Derfra ble resten av resultatene beregnet ut fra positiv kontroll, hvor samtlige prøver hadde fått trekket ifra støy (negativ kontroll).

4 Resultat

4.1 Bakterieinnhold i hydrolysat

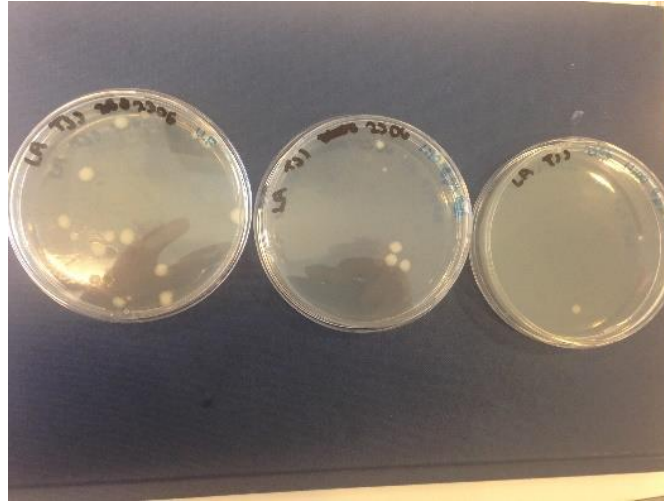
For å finne stabiliteten til hydrolysatet i form av bakterievekst, ble hydrolysatet fra *C. finmarchicus* utsatt for forskjellig lagring ved ulike temperaturer og lengde på lagringen. To ulike produksjoner, henholdsvis hydrolysat 1 og 2, ble benyttet i studiet og ulike medier ble benyttet for å se hva for sammensetning i mediet som ville gi til høyst mengde med bakteriekolonier. Mediene som ble benyttet var Luria Agar (LA) og Plate Count Agar (PCA) hvor sistnevnte inneholdt 10% NaCl. Hensikten med et salt medium var for å etterligne forholdene i hydrolysatet. Calanus AS som er produsenten bak hydrolysatet, har oppgitt saltinnhold på 7-9 % i deres varedeklarasjon. Derfor ble et salt medium (PCA med 10% NaCl) benyttet for å se om bakterier med høy salttoleranse var tilstede i hydrolysatet. Resultatene viste ingen kolonier på skålene (Figur 19)



Figur 19 Bilde av tre skåler hvor 100µl hydrolysat 1 fra *C. finmarchicus* ble påført på samtlige skåler. Materialet hadde i forkant vært lagret ved romtemperatur side produksjonen (Tabell 2). Hydrolysatet ble uforynnet og forynnet 1:10 og 1:100 med 0,9% NaCl før påføring på agaren (PCA m/ 10% NaCl). Platene ble inkubert ved romtemperatur (cirka 22°C) og avlest etter 48 timer.

PCA med 10% NaCl resulterte i at det ble ingen kolonier dannet på medieskålene, derfor ble et annet medie kaldt LA-medie utprøvd, som hadde et saltinnhold på 1% NaCl. Resultatet er vist i Figur 20. Ved LA-mediet, ble flere kolonier dannet og det virker som at dette mediet var et mer optimalt næringsmedie for de bakteriene som var tilstede i hydrolysatet. Det ble derfor

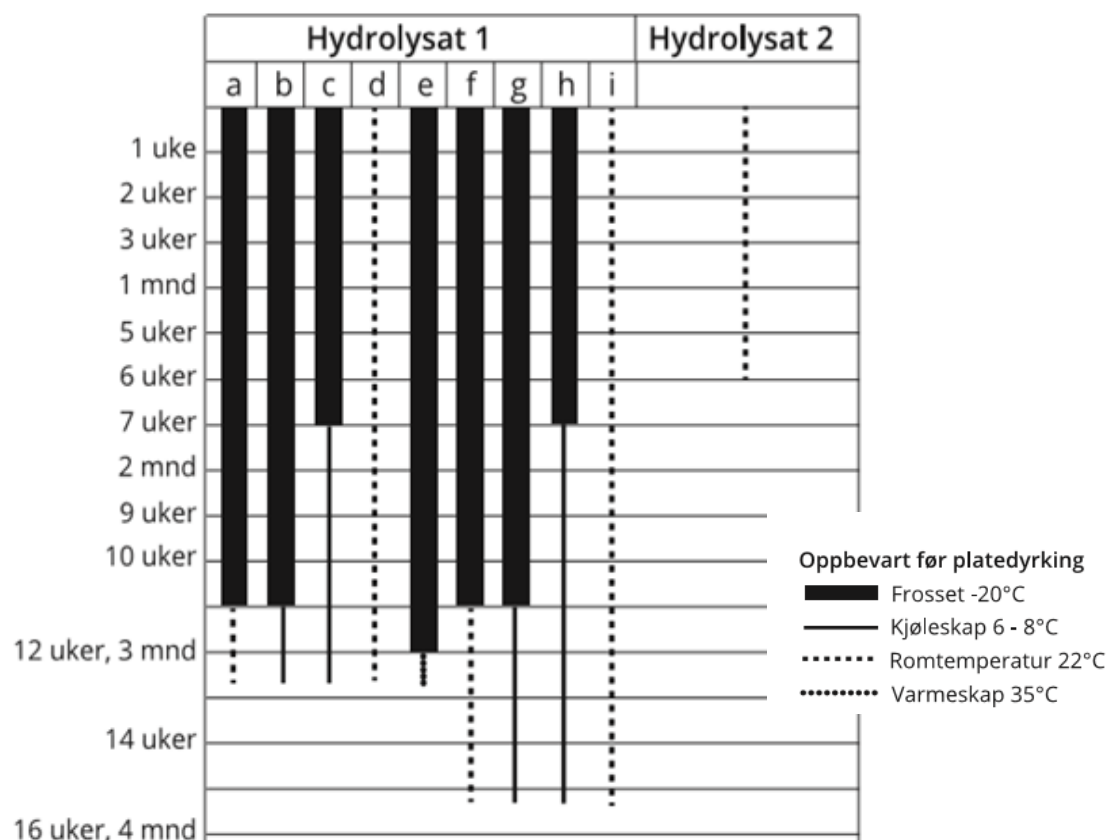
konkludert med at LA-mediet skulle bli benyttet for å detektere bakterieinnhold i materialet. Hvor ulik oppbevaring av hydrolysat skulle gjennomføres og resultatene, samt lagringsforholdene som ble utprøvd er vist i Figur 21.



Figur 20 Bilde av tre skåler hvor 100µl av hydrolysat 1 fra *C. finmarcicus* ble påført på samtlige skåler. Materialet var hadde i forkant vært lagret ved romtemperatur siden produksjonen (se Tabell 2) Hydrolysatet ble påført på agaren ufortynnet og fortynnet 1:10 og 1:100. Agaren var av type LA-medie og hvor materialet ble fortynnet med 0,9% NaCl. Platene ble inkubert ved romtemperatur (cirka 22°C) og avlest etter 48 timer

Det er forholdsvis lav vekst av bakterier på skålene noe som indikerer lavt innhold av bakterier etter samtlige lagringsforhold. Antall kolonier som ble detektert er under CFU grensen som er på minimum 30 kolonier.

Hydrolysat lagret ved romtemperatur over lengre tid har flest kolonier på agarskålen (hydrolysat 1 d og i). Avlesningen viser at etter 12,5 og 15,5 uker i romtemperatur, er koloniantallet på henholdsvis 22 og 15 i hydrolysat 1 d og i, hvor LA-mediet har vært inkubert ved cirka 22°C i 48 timer. Hydrolysat 1 b derimot, som var oppbevart i 11 uker ved -20°C for så å bli oppbevart ved 6 - 8°C i en og en halv uke viser et resultatet på fem kolonier på skålene etter å ha bli inkubert på samme type skåler i like lang tid. Det indikerer at lagring av hydrolysat i romtemperaturer er ugunstig og bidrar til å fremme vekst av bakterier til en viss grad. Selv om forholdsvis lang lagring ved romtemperatur fortsatt gjør at koloniantallet under grensen som kreves for å bestemme nøyaktig den kolonidannede enhet i materialet. Hydrolysat 2 ga ingen kolonivekst på LA-mediet etter å ha vært oppbevart ved romtemperatur (cirka 22°C) i cirka seks uker.



Antall kolonier

Inkubert 4°C (10 dager)

Fortynning	a	b	c	d	e	f	g	h	i	Hydrolysat 2
U:F	—	—	—	—	—	I.T	I.T	I.T	I.T	—

Inkubert, romtemperatur 22°C (72 timer)

U:F	2	5	2	22	2	2	4	1	15	—
1:10	1	2	1	7	3	2	—	1	4	—
1:100	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—

Inkubert, varmeskap 35°C (24 timer)

U:F	6	1	—	13	1	2	1	3	17	—
1:10	2	—	—	2	1	2	—	1	3	—
1:100	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—

Figur 21 Oversikt over mikrobiell vekst fra hydrolysat 1 og 2 (produktspesifisering i punkt 3.1), som har blitt ulikt lagret ved forskjellige temperaturer i ulik tid. En mengde på 100 µl er blitt overført til LA-medie for inkubering, for å fremme vekst av bakterier. Fortynninger er angitt i figuren. Søylene representerer lagringsbetingelse av hele hydrolysatmaterialet og tabellen under representerer resultatene av antall kolonier, etter inkubering på LA-mediet. -: Ingen vekst

Basert på resultatene viset i Figur 21 kan det konkluderes med at hydrolysatene prosessert fra *C. finmarchicus*, har et lavt bakterieinnhold, selv ved langvarig lagring ved romtemperatur.

4.2 Mugg og soppinnhold i hydrolysat

Hydrolysatet (1 og 2) ble undersøkt for innhold av mugg og sopp. Måten det ble utført på er ved å benytte næringsmedie (LA-medie) og et medie som er selektivt for å dyrke sopp og mugg (Sabouraudmedium med chloramphenicol). Materialet som ble benyttet er utdypet i Tabell 2. Dyrking på generelt næringsmedie resulterte i at det ble dannet totalt 13 kolonier ved dyrking av materialet fra hydrolysat 1, hvorav 7 disse ble mikroskopert. Fra hydrolysat 2 ble totalt 4 kolonier dannet og samtlige er mikroskopert. Resultatet av avlesningen er vist i Tabell 7 (hydrolysat 1) og Tabell 8 (hydrolysat 2), og bekrefter at det ikke ble observert kolonier i form av mugg eller sopp som vokste på mediet. Det var synlige kolonier og det så ut til å være bakterier i form av kokker og staver. Enkelte objekt som ble funnet lignet noe annet enn bakterier. Professor Einar Ringø, NFH, slo fast at det ikke var sopp.

Tabell 7 Visuell observasjon ved direkte mikroskopering av materiale fra koloniene som ble dyrket på LA-medium fra hydrolysat 1 er angitt. Samtlige kolonier ble inkubert totalt i 7 dager i romtemperatur (ca 22°C) før avlesning.

Koloni nr	Observasjon	Sopp detektert
1 (VS) ¹	Kolonien gul	Nei
2 (VS)	Koloni: Stor, hvit, forgrenede, Mikro ² : Kokker enkle og i kjeder	Nei
3 (VS)	Morfologien lik koloni nr.2 Mikro: Kokker enkle	Nei
4 (VS)	Koloni: Gul, liten og rund i kantene. Mikro: Kokker enkle	Nei
5 (VS)	Koloni: Stor utflytende med ruglete kant. Mikro: Hårete staver	Nei
6 (VS)	Koloni: Rødrosa med mørk rosa i midten, middels stor. Ujevnt kant. Mikro: Hårete staver	Nei
7 (RT) ³	Mikro: Hårete staver	Nei

¹VS: Inkubert i 24 timer ved varmeskap 35°C for så å bli inkubert ved romtemperatur (totalt 7 dager inkubering)

²Mikro: Observert i mikroskop

³RT: Inkubert ved romtemperatur.

Tabell 8 Visuell observasjon av direkte mikroskopering av materialet fra koloniene som ble dyrket fra hydrolysat 2 er angitt. Samtlige kolonier ble inkubert i totalt i 7 dager før avlesning og mediet som ble benyttet var luria agar.

Koloni nr	Observasjon	Sopp detektert
1 (VS) ¹	Hvit koloni som vokste sammen med koloni nr. 2. Mukoid og seig koloni Mikroskop: Kokker single, kjeder, klaser.	Nei
2 (VS)	Gul koloni, vokste sammen med koloni nr. 1. Rund i kantene. Mikroskop: Kokker, blant annet single kokker	Nei
3 (VS)	Morfologi lik nr. 2. Mikroskop: Kokker, blant annet single og klaser.	Nei
4 (VS)	Morfologi lik nr. 2. Mikroskop: Kokker, klaser og single.	Nei

¹VS: Inkubert i 24 timer ved varmeskap 35°C for så å bli inkubert ved romtemperatur (totalt 7 dager inkubering)

Alle de fire koloniene i Tabell 8, bortsett fra koloni 1, hadde alle en voksaktig konsistens. I hydrolysat 2 ble det heller ikke funnet objekter, som lignet sopp eller muggvekst. Det indikerer at sopp og muggveksten ikke blir fremmet av LA-mediet, eller at det ikke var tilstede i hydrolysat 1 og 2.

Oppvekst av sopp/mugg på selektivt medium

Materialet hydrolysat 1 og 2, ble forsøkt dyrket på selektivt medie for sopp som inneholder næringsstoffer som er optimal for mugg og sopp. Mediet (Sabouraud med chloramphenicol) inneholder antibiotika og hemmer derfor vekst av Gram-positive og Gram-negative bakterier. Fravær av mikrobekolonier vil derfor indikere at det mest sannsynlig ikke er mugg og sopp. Ingen mikrobekolonier vokste opp på skålene som hadde fått påført hydrolysat 1 og hydrolysat 2 på mediet selv etter inkubering ved romtemperatur (22°C) i cirka syv dager. Det generelle kjennetegnet til sopp er at de er lette og dyrke i motsetning til enkelte bakterier. Fravær av vekst indikerer at hydrolysatet ikke inneholdt sopp eller mugg.

4.3 Tørrstoffinnhold

For å få kjennskap til hvor mye vann materialet inneholdt, ble materialet fra samtlige hydrolysat fra *C. finmarchicus* (hydrolysat 1, 2, og 3) og materialet fra Hordafôr tørket. Denne metoden benyttes for å se om produksjonene er reproducerbare og for å kunne omregne aminosyreresultatene til tørrstoff siden materialet til aminosyreanalysen inneholdt vann.

Tabell 9 Tørrstoffinnhold i hydrolysat 1, 2 og 3, samt tørrstoffinnhold i kontrollmaterialet fra Hordafôr

Materialet	LOT:	Tørrstoffmengde %
Hydrolysat 1	CLH-14-1501	36,4
Hydrolysat 2	CLH-14-3701	44
Hydrolysat 3	CLH-14-4501	45,2
Hordafôr	-	53,3

Resultatene (Tabell 9) viser at tørrstoffinnholdet øker fra den første produksjonen i april (hydrolysat 1) til produksjonen som ble framstilt i slutten av september (hydrolysat 3) samme året i 2014. Ved å sammenligne tørrstoff fra hydrolysat 1 med tørrstoff fra hydrolysat 2 ser det ut til at tørrstoffinnholdet har økt med 8,8 %. Videre ser det ut til at den drastiske økningen i tørrstoff har skjedd fra hydrolysat 1 og hydrolysat 2, der tørrstoffinnholdet økte med 7,6%. Hordafôr har høyst andel tørrstoffmengde med 53,3%. Sammenligning av kontrollmaterialet Hordafôr og Calanus AS produktene, viser at det siste partiet fra Calanus AS (hydrolysat 3) er mest likt Hordafôr i tørrstoffmengde, kun 5% unna.

4.4 Totale og frie aminosyrer

Materialet som ble benyttet var tre ulike partier med hydrolysat, hydrolysat 1, 2 og 3 fra *C. finmarchicus*, og lakseensilasje fra Hordafôr, for å få kjennskap til aminosyreprofilen til materialet og for å se hvor mye totale og frie aminosyrer materialet inneholdt. Hordafôr ble benyttet som kontroll og for å ha et materiale å sammenligne aminosyreprofilene til hydrolysatene fra *C. finmarchicus* med.

Tabell 10 Aminosyresammensetning til proteinfraksjon fra *C. finmarchicus*, hydrolysat 1, hydrolysat 2, hydrolysat 3, samt lakseensilasje fra Hordafør. Totale og frie aminosyrer er oppgitt i mg/g tørrvekt av materialet. Analysen er utført på vått materialet og derfor er resultatene oppkonsentrert utfra tørrstoffinnholdverdiene. ¹TAS: Totale aminosyrer, ²FAS: Frie aminosyrer ³AS: Aminosyrer, ⁴EAS: Essensielle aminosyrer. Mal for tabell er modifisert fra artikkelen Mæhre, Hamre, and Elvevoll (2013) I.T: Ikke testet

Aminosyre	Konsentrasjonen er oppgitt fra tørket materialet							
	Hydrolysat 1		Hydrolysat 2		Hydrolysat 3		Hordafør	
	TAS ¹ (mg/g)	FAS ² (mg/g)	TAS (mg/g)	FAS (mg/g)	TAS (mg/g)	FAS (mg/g)	TAS (mg/g)	FAS (mg/g)
Essensielle aminosyrer								
Arginin	39,3±1,4	21,9 ±1,2	56,5 ±0,6	28,4±1,7	42,7±1,1	23,5±1,0	38,1±0,9	9,7±0,2
Histidin	8,2±0,42	0	11,7±0,3	1,1±0,1	8,8±0,3	0	13,6±0,4	2,5±0,0
Isoleucin	21,6±0,6	4,6 ±0,1	26,5±0,3	4,8±0,5	23,2±0,5	5,7±0,2	23,3±0,5	4,8±0,1
Leucin	36,8±1,3	14,9 ±0,5	47,0±0,7	17,2±0,9	39,6±0,9	16,4±0,5	39,5±0,9	13,2±0,2
Lysin	40,9±1,3	13,9 ±0,8	52,6±0,7	14,8±0,8	44,4±1,1	16,6±0,6	41,5±1,0	9,1±0,3
Metonin	12,3± 0,4	3,6 ±0,2	15,4±0,2	4,5±0,2	13,5±0,3	5,3±0,1	15,4±0,4	5,0±0,1
Fenylalanin	17,7±0,7	7,9 ±0,2	22,6±0,3	8,9±0,5	19,4±0,5	8,7±0,3	22,7±0,5	7,5±0,1
Treonin	19,6±0,8	4,3 ±0,2	26,5±0,6	3,7±0,2	23,1±0,6	4,5±0,2	25,8±0,6	6,2±0,1
Tryptofan	I.T	I.T	I.T	I.T	I.T	I.T	I.T	I.T
Valin	27,5 ±0,9	6,5 ±0,4	34,3±0,4	7,0±0,5	29,6±0,6	7,7±0,2	28,8±0,8	5,3±0,2
Betingede essensielle aminosyrer								
Taurin	7,9±0,32	5,4 ±0,3	11,4±0,2	7,2±0,4	10,2±0,2	6,5±0,2	14,4±0,3	6,0±0,1
Prolin	21,6±0,8	3,1 ±0,2	27,9±0,4	3,7±0,2	23,7±0,6	4,0±0,2	32,6±0,8	2,8±0,1
Cystein	2,5±1,5	0	4,4±0,1	0	4,2±0,1	0	3,8±0,1	0,6±0,0
Ikke essensielle og modifiserte aminosyrer								
Alanin	40,7±1,6	10,5±0,6	52,6 ±0,8	12,0 ±0,7	42,6±0,9	11,5±0,4	39,8±1,0	8,7±0,1
Asparagin + asparaginsyre	40,1±1,6	1,9 ±0,1	51,8 ±0,7	1,6±0,1	43,2±0,1	0,8±0,1	43,0±1,0	6,7±0,1
Glutaminsyre + glutamin	56,6±2,3	2,8 ±0,1	73,5±1,1	3,0±0,2	61,8±1,4	3,4±0,1	58,4±1,4	9,8±0,2
Glycin	38,8±1,5	12,9 ±0,7	44,6±0,7	12,2±0,6	39,5±0,8	11,5±0,4	41,4±1,1	6,0±0,1
Serin	17,5±0,7	3,8 ±0,2	24,0±0,5	3,6±0,2	21,5±0,6	4,2±0,1	27,1±0,7	6,0±0,1
Tyrosin	11,0±3,3	9,3 ±0,3	24,2±0,9	10,1±0,4	17,5±0,4	8,7±0,1	17,6±0,4	6,0±0,1
Fosfoferin	0	0	1,2±0,0	0,9±0,1	1,4±0,0	0,8±0,0	0	0,4±0,0
Sarkosin	2,1 ±0,1	1,8 ±0,1	1,1±0,0	1,6±0,1	1,7±0,7	2,5±0,2	0	0
B-alanin	0	0	0	0,9±0,1	0	0,9±0,1	1,3±0,0	1,0±0,0
Homocystein	0	0,5 ±0	0	0,5±0,0	0	0,5±0,0	0	0,3±0,0
Ethanolamin	0,7±0,07	1,0 ±0,1	0	0,9±0,0	0,8±0,1	1,2±0,0	1,3±0,0	0,3±0,0
1-methylhistidin	3,1±0,2	0,0	4,4±0,1	0	2,8±0,2	0,5±0,0	2,8±0,2	0,3±0,1
NH ₃	5,1±0,2	1,0 ±0,1	5,3±0,2	0,6±0,0	5,0±0,1	0,8±0,0	5,1±0,1	0,9±0,0
Sum								
Sum AS ³	471,3	131,5	619,5	149,3	520,0	146,0	537,4	119,1
Sum EAS ⁴	201,9	59,2	269,3	66,6	225,9	66,9	235,6	55,6

Resultatene vist i Tabell 10 for hydrolysatene fra *C. finmarchicus* (hydrolysat 1, 2 og 3) viser at det er en variasjon mellom aminosyreprofilene. Summen av totale aminosyrer er 471,3 mg/g, 619,5 mg/g og 520 mg/g for henholdsvis hydrolysat 1, 2 og 3. Det ser ut som at essensielle aminosyrer representerer anslagsvis halvparten av de detekterte aminosyrene.

Taurininnholdet i hydrolysat 1, 2 og 3 ligger på henholdsvis 1,6-, 1,8- og 1,9%. Det indikerer en liten oppgang på 0,3% fra første til siste produksjon av hydrolysatproduktet selv om oppgangen er forholdsvis liten. Hordafôr viste et taurininnhold på 2,7% og ligger derfor høyest i taurininnhold. Siden det frie aminosyreinnholdet av taurin ligger noe lavere, ble det totale innholdet av taurin benyttet som resultat, fordi taurin kun finnes i fri form.

Glycin konsentrasjonen er på henholdsvis 38,4-, 44,6- og 39,5 mg/g i hydrolysat 1, 2 og 3, mens den i Hordafôr er på 41,4 mg/g. Konsentrasjonen av metionin er på henholdsvis 12,3-, 15,4- og 13,5 mg/g i hydrolysat 1, 2 og 3, mens den for Hordafôr var på 15,4 mg/g. Videre ble ikke tryptofan testet, det fordi aminosyren blir ødelagt av syrehydrolyse og derfor ikke kan bli detektert (Moore & Stein, 1963). Totalt sett viser resultatene at cirka ¼ av de detekterte aminosyrene var frie aminosyrer (Tabell 10)

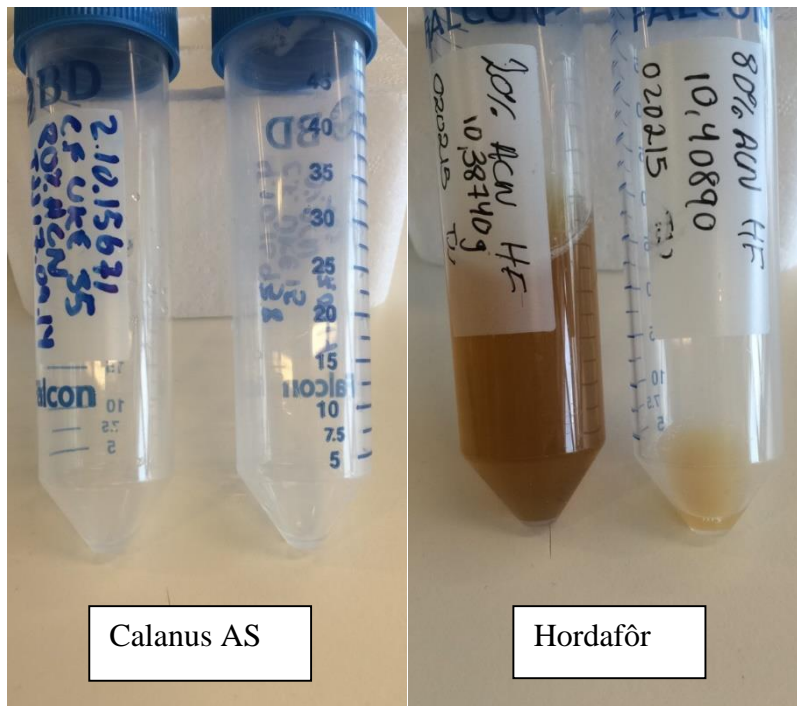
De essensielle aminosyrer som dominerer i materialet fra raudåte, er arginin, isoleusin, leucin, lysin, fenyalanin og treonin. De har et gjennomsnittlig innhold i de ulike produksjonene på henholdsvis 46,2-, 23,7-, 41,1-, 45,9-, 19,9- og 23,1 mg/g. Hydrolysat 3 har en aminosyrekonsentrasjon som ligger nærmest gjennomsnittet for hydrolysatene 1, 2 og 3. Hordafôr inneholder forholdsvis like mengder av de essensielle aminosyrene, sammenlignet med hydrolysat fra *C. finmarchicus*. Hordafôr har en marginal høyere konsentrasjon av histidin på 13,6 mg/g mot en gjennomsnittsverdi på 9,6 mg/g i hydrolysatene fra rauåte.

Sammenlignes hydrolysat fra *C. finmarchicus* med lakseensilasjen fra Hordafôr, ser det ut til at aminosyreprofilene er nokså like. Den største likheten er i totale aminosyrer mens Hordafôr har lavere konsentrasjon av frie aminosyrer.

4.5 Observasjon etter fast-fase ekstraksjon

Materialet fra hydrolast 1 og 2 og lakseensilasje fra Hordafôr, viste innhold med ulik farge etter fastfaseekstraheringen, hvor samtlige fraksjoner er justert til en konsentrasjon på 10 mg/ml tørrstoff.

Hydrolysat 1 og 2 (Figur 22 merket Calanus AS) hadde innhold med lik farge i eluatene, og derfor ble kun to av totalt fire prøver avbildet. Materialet fra hydrolysatet så ut til å være en blank væske som var lett gjennomskinnelig. Fastfaseekstrahert lakseensilasje derimot, gav to fraksjoner med to ulike farger på innhold. Fraksjonen ved 20% ACN (til venstre i bildet) var en mørk brun løsning som var mindre gjennomskinnelig. Fraksjonen til høyre, består av eluert materialet 80% ACN og dette er mer melkeaktig i fargen og enda mindre gjennomskinnelig, enn 20 % ACN fraksjonen.



Figur 22 Hydrolysat og lakseensilasje fra Hordafôr, som er fast-fase ekstrahert. De to beholderne til venstre som er merket med Calanus AS, er fastfase ekstrahert materialet fra hydrolysat fra *C. finmarchicus*. Beholderne til høyere som er merket med Hordafôr er også fast-fase ekstrahert materialet fra lakseensilasje. Hvor den til venstre er eluert med 20% ACN og den til høyere er eluert med 80% ACN for både Calanus AS og Hordafôr- (merket Hordafôr) Samtlige materialet har en konsentrasjon på 10mg/ml. Det betyr at det er 10 mg tørrstoff per milliliter materialet.

Surheten (pH vist i Tabell 11) i eluert materialet fra Hordafôret viste at før det ble eluert hadde lakseensilasjen en pH på 3,7, mens 20- og 80% ACN eluatene viste seg å ha en pH på henholdsvis 2,4 og 2,5, etter fastfaseekstraksjonen. Vannet som hadde fortynnet materialet til lik startkonsentrasjon, viste å ha en pH på 5,3.

Tabell 11 pH verdier i fraksjoner fra Hordafør

Material	Før SPE pH	Etter SPE pH	
		20% ACN	80% ACN
Lakseensilasje fra Hordafør	3,7	2,4	2,5
		2,4	2,5

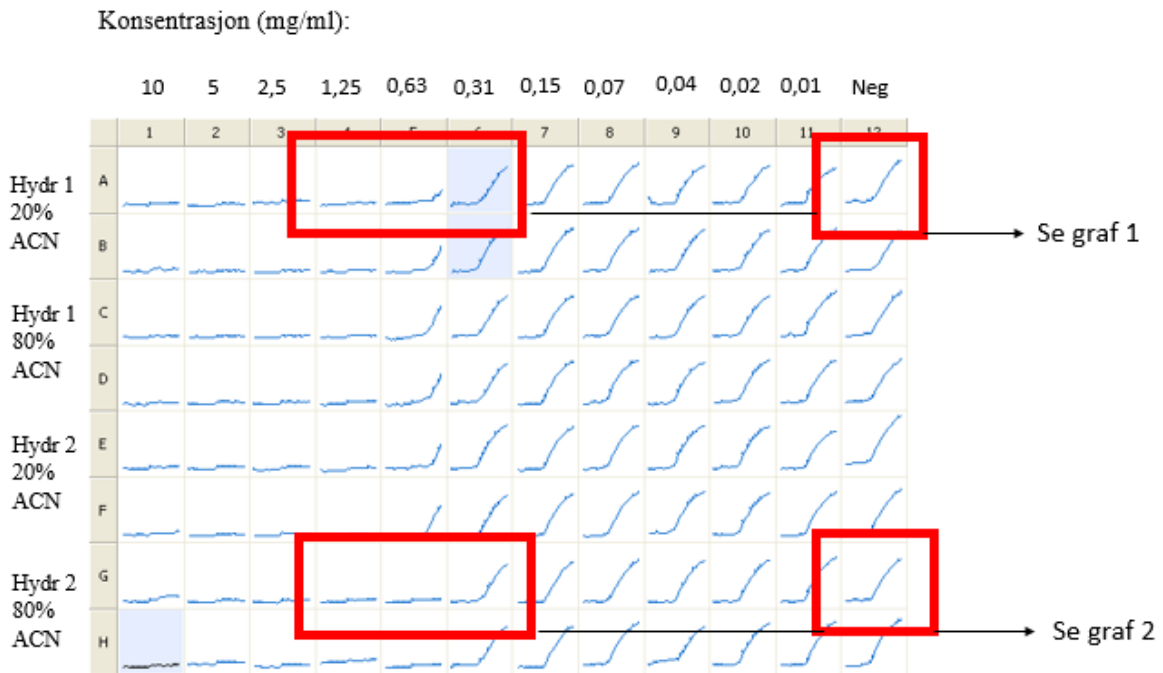
Resultatet av fastfaseekstraksjonen ga visuelt ulikt materialet ved å sammenligne hydrolysat og lakseensilasje med hverandre, fra henholdsvis Calanus AS og Hordafør.

4.6 Antibakteriell aktivitet

Antibakteriell testing ble gjennomført for å se om eluert proteinfraksjon (SPE-eluat) fra *C. finmarchicus* bidro til å hemme vekst av bakterier, henholdsvis bakteriestammene *S. aureus*, *C. glutamicum* og *E.coli*. Forsøket ble gjennomført to ganger, hvor materialet som ble benyttet første gang var hydrolysat 1 og 2, med SPE-fraksjon 20%- og 80% ACN. Resultatene viser at hydrolysat 1 og 2 var aktivt mot samtlige bakterie stammer, hvor MIC-verdiene ble fastsatt til 0,62 mg/ml med 100% hemming av *S. aureus*, 0,62 mg/ml ved 50% hemming av *C. glutamicum* og 0,62 mg/ml ved 100% hemming av *E. coli*. Hvor det viste tendenser til at hydrolysat 2 som ble eluert med 80% ACN var ett titersteg mer aktivt mot bakteriene *C. glutamicum* og *E. coli* (Tabell 12)

Tabell 12 Minimum inhiberende konsentrasjons (MIC)-verdier fra hydrolysat 1 og 2 fra *C. finmarchicus*, som i forkant har blitt fast-fase ekstrahert og eluert med 20 og 80 % ACN. MIC-veridene er oppgitt i mg/ml og er den laveste konsentrasjonen som bidro til å hemme 100% og 50% vekst av de respektive bakteriestammene.

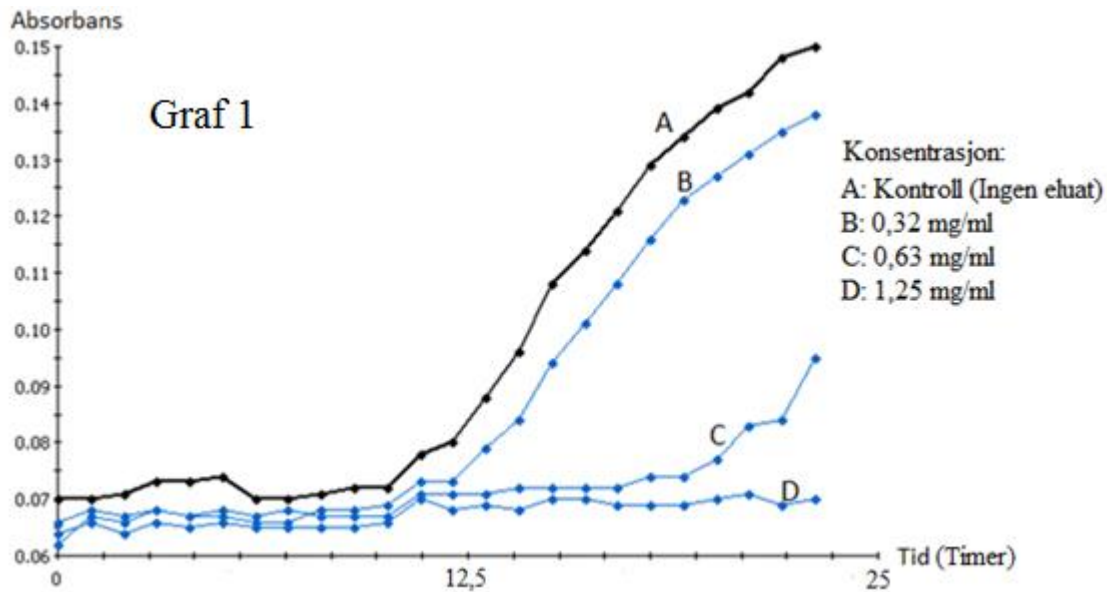
Materialet	Andelen bakterier som blir hemmet	SPE-eluat	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)		
			<i>S.aureus</i> ATCC 9144	<i>C.glutamicum</i> CCUG 27702	<i>E.coli</i> ATCC 25922
Hydrolysat 1	50%	20 % ACN	0,62	0,62	0,62
		80 % ACN	0,62	0,62	0,62
	90-100 %	20 % ACN	0,62	1,25	0,62
		80 % ACN	0,62	1,25	0,62
Hydrolysat 2	50%	20 % ACN	0,62	0,62	0,62
		80 % ACN	0,62	0,62	0,32
	90-100 %	20 % ACN	0,62	1,25	0,62
		80 % ACN	0,62	0,62	0,32



Figur 23 Oversiktsbilde av mikrotiterplate med vekstkurvene til hver enkelt brønn med materiale som ble MIC-testet og inkubert med testbakterien *C. glutamicum* CCUG 27702. Kurvene uthevet i rødt ble sammenslått til to grafer, henholdsvis graf 1 og graf 2 som illustrert i Figur 24 og 25. Materialet i brønnene er vist til venstre i figuren og fortynningene, samt negativ kontroll er vist vertikalt i toppen av bilde. Neg: negativ kontroll som ikke inneholdt tekstmateriale, men kun bakterier

Vekstkurverne til bakteriene ble målt kontinuerlig i brønner i mikrotiterplater og Figur 23 illustrerer hvordan vekst av bakterien *C. glutamicum* CCUG 27702 er ved inkubering med hydrolysat 1 og 2 som hadde i forkant blitt fastfase ekstrahert og eluert med 20- og 80% ACN. Vekst kurvene viser til at bakterien vokser stort sett likt i nærvær av hydrolysat 1 og 2, men at hydrolysat 2 som er eluert ved 80% viser å hemme ett titersteg lavere, dersom 90-100% hemming blir oppnådd.

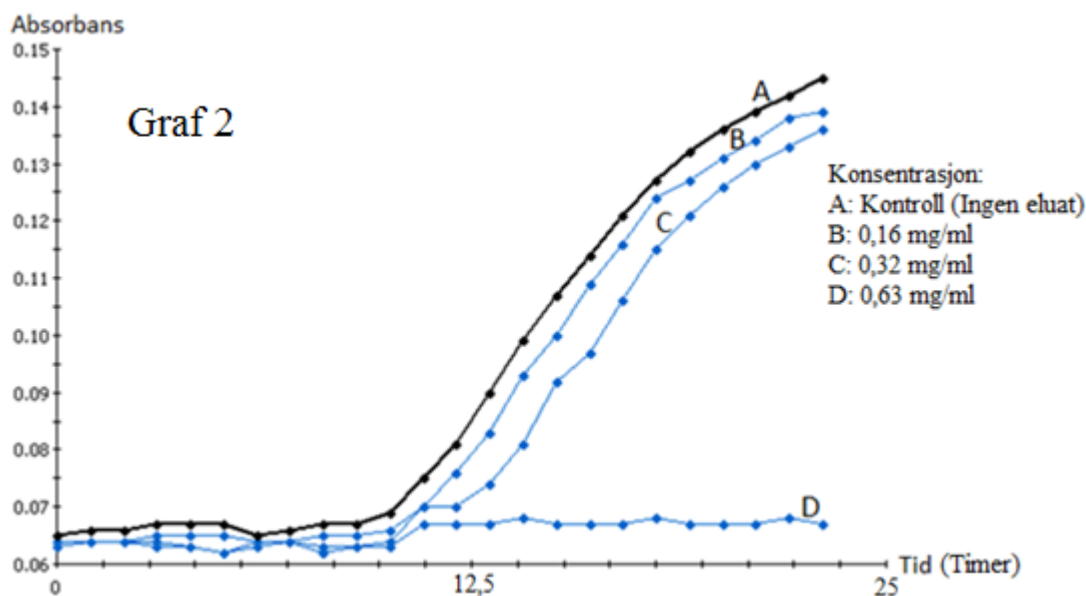
Figur 24 viser sammenligning av vekstkurver av *C. glutamicum* med tilstedeværelse av fastfase ekstrahert eluat med 20% ACN fra hydrolysat 1 i ulike konsentrasjonen, bortsett fra i kontrollen som bare viser vekst av bakterien alene.



Figur 24 Vekstkurver av *C. glutamicum*, med innhold av eluert materialet fra *C. finmarchicus* (Figur 23, graf 1). Figuren viser ulike fortynnet hydrolysat fra *C. finmarchicus*, hvor hydrolysat 1 er eluert med 20 % ACN og inkubert med *C. glutamicum* CCUG 27702. Konsentrasjonen på de ulike grafene er som følger; A: Kontroll (Ingen eluat tilsatt, kun bakteriestamme) B: 0,32 mg/ml C: 0,63 mg/ml D: 1,25 mg/ml

Graf D (Figur 24) viser 90-100% hemming ved en konsentrasjon på 1,25 mg/ml av 20% SPE-eluat. Ved å se på grafen, med ett titertrinn lavere fortynning, i graf C, hvor konsentrasjonen er 0,63 mg/ml, oppnås også hemming av bakterievekst her. Absorbansen i denne brønnen er omtrent halvparten så høy som i den negative kontrollen i graf A ved 24 timer. Det indikerer at også konsentrasjonen på 0,63 mg/ml bidrar til at bakterien blir hemmet, men mindre sammenlignet med vekstkurven D.

Siden hydrolysat 2 eluert med 80% ACN viste å være ett titersteg mer aktivt enn de andre hydrolysate, var det interessant å se sammenligne vekstkurven med ulike konsentrasjoner av dette eluatet. Resultatet sammenstilt i Figur 25 tyder på at materialet er litt mer aktivt sammenlignet med for eksempel hydrolysat 1, eluert med 20% ACN, som er vist i Figur 24.



Figur 25 Vekstkurver av *C. glutamicum* med eluert materialet fra *C. finmarchicus* (Figur 23, graf 2). Kurvene viser ulik fortynnet hydrolysat 2 fra *C. finmarchicus*, som var eluert med 80 % ACN og inkubert med *C. glutamicum* CCUG 27702. Konsentrasjonen med eluert materialet på de ulike kurvene er som følger; A: Kontroll (ingen eluat tilsatt, kun bakteriestamme) B: 0,16 mg/ml C: 0,32 mg/ml D: 0,63 mg/ml

I konsentrasjon på 0,32 mg/ml (graf C i Figur 25) viser kurven at bakteriene ikke blir hemmet, selv om kurven ligger litt lavere enn negativ kontroll (graf A). Med bakgrunn i at MIC er definert som 100% eller 50% hemming, så er konsentrasjonen 0,63 mg/ml MIC verdien for 100% hemming for dette materialet.

For å sikre at resultatene var til å stole på, ble MIC-testen gjort pånytt med det samme materialet som er framstilt i Tabell 12. Målingen ble utført med Envisionmaskinen også denne gangen, men siden feil med apparatet som medførte problemer med å avlese prøvene, ble kun inkuberingsforholdene og rysting av mikrotiterplatene den samme som første gang. Etter 48 timer ble det utført en endepunktsmåling og derfor er det ikke tilgjengelige grafer fra dette forsøket.

Tabell 13 viser oversikt over MIC-verdiene for hemming 90-100% av bakteriene etter manuell avlesning, med inkubering av SPE-eluat med 20- og 80% ACN eluater, fra henholdsvis hydrolysat 1 og 2 fra *C. finmarchicus* og lakseensilasje fra Hordafôr.

Materialet	Andelen bakterier som blir hemmet ved konsentrasjonen	SPE-eluat	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)		
			<i>S.aureus</i> ATCC 9144	<i>C.glutamicum</i> CCUG 27702	<i>E.coli</i> ATCC 25922
Hydrolysat 1	90-100%	20% ACN	0,16	1,25	0,63
		80% ACN	0,16	1,25	0,63
Hydrolysat 2	90-100%	20% ACN	0,16	1,25	0,63
		80% ACN	0,16	1,25	0,63
Hordafôr	90-100%	20% ACN	10	2,5	10
		80% ACN	10	<0,62 - 0,04	10

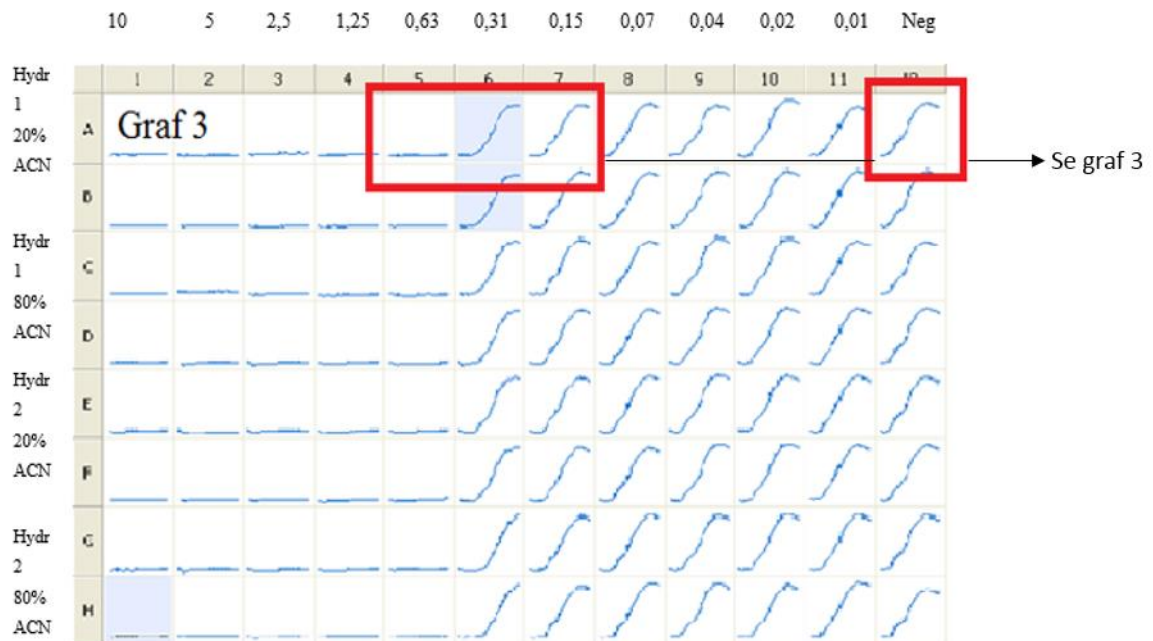
I dette forsøket oppnådde hydrolysat 1 og 2 samme resultater med MIC-verdiene 1,25 mg/ml og 0,63 mg/ml overfor *C. glutamicum* og *E. coli* (Tabell 12 og Tabell 13).

MIC-verdiene til 20% ACN eluatet fra lakseensilasjen fra produsenten Hordafôr, gav høyere verdi sammenlignet med hydrolysatet fra *C. finmarchicus*. Ensilasjen viste MIC-verdier på henholdsvis 10 mg/ml mot *S. aureus*, 2,5 mg/ml mot *C. glutamicum* og 10 mg/ml mot *E. coli*. Hordafôreluatet 20% ACN, viste lavest MIC-verdi mot *C. glutamicum*, men dette var likevel høyere MIC-verdi sammenlignet med hydrolysat 1 og 2, som viste MIC-verdier på 1,25 mg/ml. De antibakterielle egenskaper overfor *C. glutamicum* til 80% ACN-eluatet fra Hordafôr, viser resultater som var noe avvikende fra de resterende resultatene. Det ved at eluatet kun viste bakteriehemmende egenskaper fra og med konsentrasjon 0,62 mg/ml til 0,04 mg/ml, noe som også var den laveste konsentrasjonen som ble testet. Videre hemmet ikke eluatet *C. glutamicum* fra konsentrasjonen 10 mg/ml til og med 1,25 mg/ml. Dermed kan ikke resultatet benevnes som en MIC-verdi. Videre viste 80% ACN-eluatet at det hemmet vekst ved konsentrasjonen 10 mg/ml mot *S. aureus* og *E. coli*. Noe som er høyere konsentrasjoner ved begge bakteriene, sammenlignet med hydrolysat 1 og 2.

MIC-verdien for hydrolysat 1 og 2, ved det gjentatte forsøket (Tabell 13), viste en antibakteriell aktivitet som var litt sterkere da *S. aureus* ble hemmet av eluat som hadde en konsentrasjon som var to titersteg lavere (0,16 mg/ml), enn første gangen (0,63 mg/ml). Vekstkurvene til *S. aureus* første gang testen ble gjennomført, er vist ved vekstkurver i

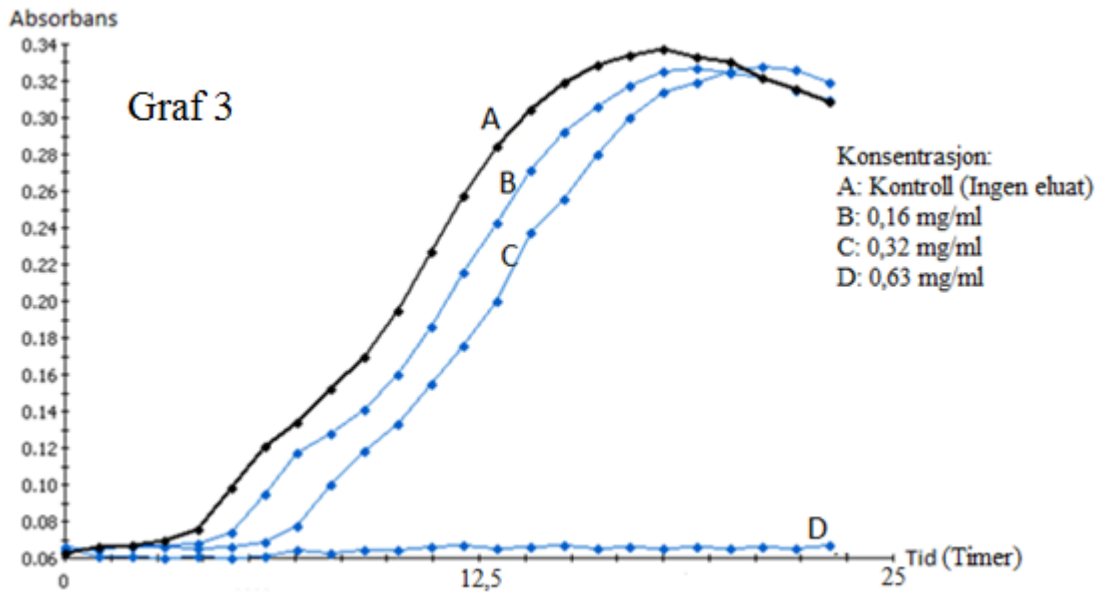
mikrotiterplane (Figur 26) og indikerer at hydrolysat *C. finmarchicus*, hemmer ved lik konsentrasjon med en MIC-verdi på 0,63 mg/ml for samtlige eluater mot bakterien *S. aureus*.

En grafisk fremstilling i Figur 27, viser tydelig at MIC verdien for 20% ACN eluater for raudåte er 0,63 mg/ml overfor *S. aureus*.



Figur 26 Oversiktsbilde over vekstkurvene til hver enkelt brønn som ble MIC-testet på en mikrotiterplate og inkubert med testbakterien *S. aureus* ATCC 9144. Kurvene uthevet i rødt ble sammenslått til én graf, graf 3, som representerer kurvene hvor bakterien har blitt inkubert med hydrolysat 1 SPE-eluert med 20% ACN. Det for å se hvordan grafen ble, dersom kurvene ble slått sammen. Det for å gjøre det mulig å bestemme prosentvis hemming utfra ett type testmaterialet. Grafen som viser de sammenslåtte kurvene er vist i Figur 27, med ulik fortynning. Materialet i brønnene er vist til venstre i figuren og fortynningene, samt negativ kontroll er vist vertikalt i toppen av bilde. Neg: negativ kontroll.

Oversiktsbilde i Figur 26, indikerer at materialet fra *C. finmarchicus*, hemmer ved lik konsentrasjon for samtlige eluater mot bakterien *S. aureus*. Det er gjennomgående like vekstkurver for begge hydrolysatene med en MIC-verdi på 0,63 mg/ml.



Figur 27 Vekstkurver av *S. aureus* med eluert hydrolysat fra *C. finmarchicus* (Figur 26, graf 3). Materialet som ble benyttet var hydrolysat 1 fra *C. finmarchicus*, hvor materialet hadde i forkant blitt SPE-eluert med 20% ACN og deretter inkubert med *S.aureus* ATCC 9144. Konsentrasjonen av hydrolysatet som representerer de ulike grafene er som følger; A: Kontroll (ingen eluat tilsatt, kun bakteriestamme) B: 0,16 mg/ml C: 0,32 mg/ml D: 0,63 mg/ml

En grafisk fremstilling i Figur 27, viser tydelig at MIC verdien for 20% ACN eluatet for raudåte er 0,63 mg/ml overfor *S aureus*.

Ved å identifisere mønsteret til vekstkurven ved ulike fortynninger, ble hydrolysat 1 med 20% ACN-eluat valgt for å se nærmere på hvordan bakterien vokste med nærvær av eluatet. Resultatet viste at MIC-verdien var 0,63mg/ml og at eluatet hemmet lite ved lavere fortynning som var 0,32 mg/ml, kurve C (Figur 27). Ved å se på vekstkurven ved konsentrasjonen på 0,32 mg/ml, viser kurven noe hemming i starten av inkuberingen, sammenlignet med 100% vekstkontroll (graf A, uten inkubering med materialet), men at den ikke hemmer noe i det bakterieveksten går inn i stasjonærfasen. Det viser at *S. aureus* ved første gangs gjennomførelse av forsøket, ikke ble hemmet ved noe lavere konsentrasjon av materialet, sammenlignet med andre gang.

4.7 Hemolytisk aktivitet

Hemolytisk testing ble gjennomført for å se om eluert materialet, fra henholdsvis hydrolysat 1, 2 og lakseensilasje fra Hordafôr, inneholdt toksiske forbindelser som bidro til å hemolysere humane erythrocytter.

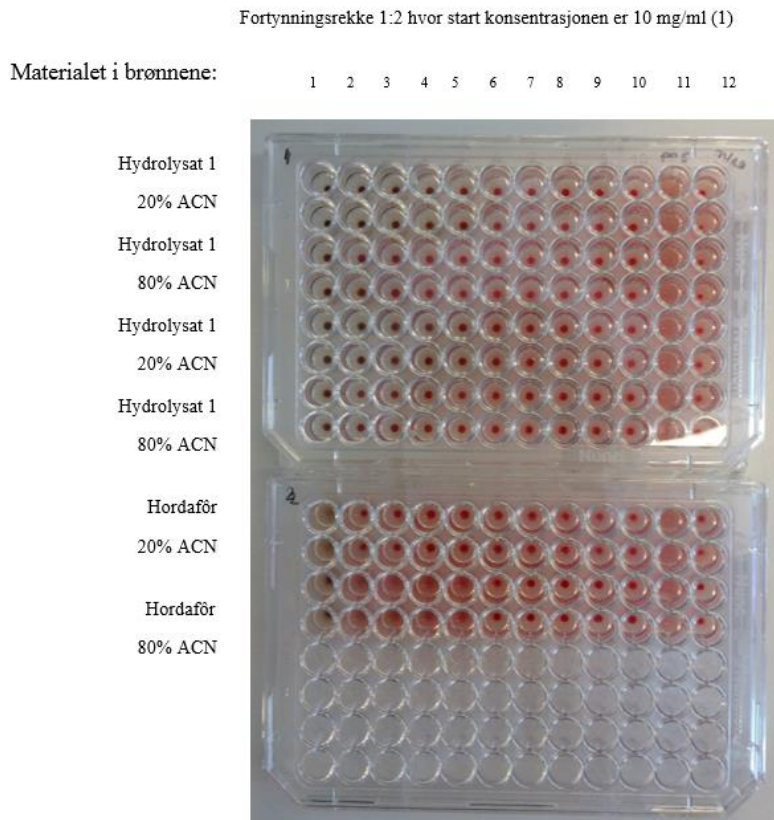
Resultatene fra hemolytisk testing (Tabell 14) viser gjennomgående at hydrolysatet 1 og 2 fra *C. finmarchicus* bidrar til å hemme hemolyse av erythrocytter. Hemolysen i disse brønnene er cirka 20 % mindre sammenlignet med negativ kontroll, hvor erythrocytter ble inkubert med PBS og blodceller. Videre ser det også ut til at fortynningene ikke bidrar til stor endring i prosentvis hemolyse, ved hydrolysat 1 og 2. Hydrolysat 2 som er eluert med 20 % og 80% ACN, ser ut til å stabilisere erythrocyttene mindre, sammenlignet med de andre eluatene og fortynningene, med henholdsvis -13,9% og -18,1%, men denne forskjellen er ubetydelig. Hordafôr viser høy hemolysegrad, ved at fortynningen 5 mg/ml med 80% ACN hemolyserte 149% og 20% ACN ved samme fortynning hemolyserte 51,9%.

Tabell 14 Resultatene fra hemolytisk testing overfor humane erythrocytter, hvor materialet som ble testet var Hydrolysat 1 og 2 fra *C. finmarchicus*, samt Hordafôr. Materialene hadde i forkant blitt fast-fase ekstrahert og eluert med 20- og 80% ACN. Verdiene er oppgitt i prosentvis hemolyse, hvor positiv kontroll var satt til å være 100 % og negativ kontroll var satt til å være 0% hemolyse. I.d: Ingen data (grunnet ukorrekt utførelse av metode)

Hemolytisk aktivitet i prosent (%)											
Materialet	SPE-eluaet	Konsentrasjon av SPE-eluat									
		10 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	1,25 mg/ml	0,63 mg/ml	0,32 mg/ml	0,16 mg/ml	0,08 mg/ml	0,04 mg/ml	0,02 mg/ml
Hydrolysat 1	20% ACN	-20,5	-19,9	-19,3	-21,7	-19,9	-22,3	-23,0	-21,1	-19,9	-21,1
	80% ACN	-22,3	-23,0	-19,9	-19,9	-19,3	-18,7	-18,7	-15,1	-17,5	-19,3
Hydrolysat 2	20% ACN	-13,9	-19,3	-19,3	-23,0	-22,3	-21,1	-21,1	-20,5	-19,9	-20,5
	80% ACN	-18,1	-22,3	-24,2	-23,0	-21,7	-21,7	-20,5	-22,3	-18,1	-20,5
Hordafôr	20% ACN	I. d	51,9	37,8	24,2	-1,5	-18,0	-17,1	-21,4	-23,4	-25,3
	80% ACN	I. d	149,0	131,5	131,0	121,3	52,8	33,9	21,8	0,9	-14,1

Etter inkuberingen i én time, ble mikrotiterplaten avbildet (Figur 28), for å visuelt se hvordan hemolysen så ut i de enkelte brønnene. Ved å se på rekke 11(vertikalt) som representerer positiv kontroll, er det tydelig at ingen pellet med blodceller ligger i brønnen og

at alt er hemolysert. Ved å se på rekke 12 (vertikalt) der alle brønnene er negativ kontroll, kan det se ut til at en rød pellet ligger nederst i brønnene. Ved å sammenlignet rekke 1 (nedover de 8 første brønnene) og rekke 12, kan det se ut til at negativ kontroll har en dus rødfarge i brønnen og i noe større grad, sammenlignet med rekke 1.



Figur 28 Bilde av mikrotiterplate med resultater som ble brukt til hemolytisk aktivitetstest, etter inkubering ved 37°C i én time, med risting. Platene inneholder materialet som er forklart til venstre for platen og erytrocytter, samt PBS-buffer. Rekke 11 og 12 inneholder henholdsvis positiv og negativ kontroll, hvor positiv kontroll består av 5% Triton X-100 og negativ kontroll består av 50% av både PBS buffer og vann. Totalt volum av materialet i brønnene var 100 µL.

Det ser ut til at brønnene med høyest konsentrasjon, inneholder en brun pellet og at brønnene som har en lavere konsentrasjon har en rødaktig pellet. Hordafôr har flere brønner med fullstendig hemolyse, det vises ved å se til venstre i Figur 28. Hordafôr som er SPE-eluert med 20% ACN ser ut til å være helt hemolysert ved konsentrasjonen 10 mg/ml, hvor det ser ut til at SPE-eluatet 80% ACN ikke er like hemolysert ved den samme konsentrasjonen og at de brønnene har en pellet tilstede. Ved å se på lavere fortynning av SPE-eluatet som er eluert med 80% ACN, ser det ut til at hemolyse har oppstått og det fra konsentrasjon 5 mg/ml til og med 0,63mg/ml.

5 Diskusjon

Proteinfraksjon fra raudåte har til nå hatt oppnådd lite fokus, og kunnskap om kjemisk sammensetninga og mikrobiell stabilitet har vært lite kjent. Proteinfraksjonen (hydrolysatet; forklart i punkt 2.2) er et produkt som blir dannet i tillegg til utvinningen av oljen, som er et resultat av en enzymatisk prosess fra *C. finmarchicus*. Siden proteinandelen er opp mot fire ganger så stor i andel, sammenlignet med oljen (Pedersen et al., 2013), er hydrolysatet en ressurs som bør karakteriseres for å kunne utnyttes.

5.1 Mikrobiell stabilitet

Resultatene i oppgaven viste at det var lav bakterielt innhold og ingen påvisbar innhold av mugg eller sopp. Siden prosesseringen av produktet innebærer å varme produktet til 90°C i 20 minutter, bidrar dette prosesstrinnet til at det blir eliminert en del mikrober som ikke tåler 90°C. Derimot kan det inneholde uønskede toksiner fra mikroorganismer, som kan tåle høyere temperaturer. Eksempler er toksiner fra *Staphylococcus aureus* og fra andre *Staphylococcus spp.*, som kan bli tilført under produksjon og gi matforgiftning hos mennesker og dyr (Granum, 2007). Hydrolysatet inneholder forholdsvis høy andel salt og produsenten (Calanus AS) oppgir at produktet inneholder 7-9% NaCl. På den andre side inneholder produktet høy andel vann og ved målinger av tørrstoffinnhold ble vanninnholdet målt opp mot 63,6% (Tabell 9), det kan bidra til at materialet kan være en grobunn for mikrober. Eksempelvis vil fordamping inne i oppbevaringsbeholderen gjøre at miljøet kan øke sjansen for oppvekst av mikrober. (Funke et al., 2004).

To parti ble benyttet for å se hvordan bakterieinnholdet i hydrolysatet var etter to ulike produksjonsdatoer (Tabell 2, hydrolysat 1 og hydrolysat 2) og resultat viste at det var forholdsvis lav bakterievekst i begge. I det første partiet (hydrolysat 1) viste det tendenser til å ha noe flere kolonier, sammenlignet med hydrolysat 2. I hydrolysat 2 ble det ikke funnet noen kolonier ved dyrkning på medium. Årsaken til at hydrolysat 1 hadde høyere andel bakteriekolonier sammenlignet med hydrolysat 2, kan være at hydrolysat 1 hadde et høyere vanninnhold (Tabell 9) og vil derfor også da få et lavere saltinnhold (NaCl). Grunnen er at hvis materialet har mer vann, vil NaCl bli mer fortynnet, det motsatt skjer hvis det er mindre vann, da vil NaCl bli mer konsentrert. Dette kan være faktorer som bidrar til at bakterier lettere kan vokse i et hydrolysat med høy andel vann. Videre kan materialet ha blitt utsatt for påvirkninger

fra omgivelser som ikke har vært sterilt. Eksempel er ved prosesstrinnet hvor materialet blir tappet over i en oppbevaringsbeholder. Produksjonen ved NAMAB følger retningslinjer som bidrar til at produksjonen skal bli kvalitetssikret ved å ha ulike sjekkpunkter underveis. Overvåkning av produksjonen gjennomføres i henhold til de retningslinjene som er satt for produksjonen og som i utgangspunktet skal produsere på en måte som forhindrer mikrobiell kontaminering.

Hvilke lagringsforhold som var mest optimalt for hydrolysatet, var lagring ved kjølige temperaturer, se Figur 21. Test av bakterieinnhold gav lavt bakterieinnhold med noen få kolonier. Stabilitetsforsøk tyder på at lagring ved frysetemperaturer (-20°C) og kjøleskapstemperaturer ($6-8^{\circ}\text{C}$) bidro til lavest bakterievekst. Det betyr at produktet bør bli lagret ved kjølige temperaturer (under 6°C) dersom det skal lagres over lengre tid. På den andre side viste hydrolysat 2 ingen mikrobiell vekst ved lagring i romtemperatur i seks uker.

Konklusjonen for optimal lagring for hydrolysatet blir på tross av resultatene fra hydrolysat 2, at hydrolysatet bør bli lagret kjølig eller fryst (-20°C til 6°C) Begrunnelsen er at produksjonene viser varierende vanninnhold, selv om de nyeste partiene viser et lavere innhold av vann enn de første, og at lavt vanninnhold er gunstig fordi det kan resultere i at det jevnt over vil gi et lavere bakterieinnhold. Imidlertid trenger flere parti å bli testet for å kunne følge kvaliteten på produksjonene og kunne konkludere med hva som er mest optimalt.

Metoden som ble valgt å gjennomføre for å detektere bakterieinnhold var å lagre materiale ved ulike temperaturer over ulike tidsperioder, for så å dyrke materiale på medium. Siden det ikke var kjent hvilke type bakterier som fantes i materiale, ble et utprøvningsprosjekt gjennomført for å se hvilket medium som bidro til flest kolonier. Resultatet viste at av to ulike medium, henholdsvis ett næringsrikt medium med høyt saltinnhold (PCA med 10% NaCl) og et næringsrikt medium med lavt saltinnhold (LA med 1% NaCl), viste resultatene at LA-medium ga høyest andel med kolonivekst. Hvor mediet med 10% NaCl ikke gav noen kolonivekst. Det resulterte i at LA-medium ble benyttet. Grunnene til at flere kolonier vokste på LA mediet kan være flere, men en grunn kan være at bakteriene som var tilstede hadde en lavere toleranse for salt enn hva mediet inneholdt. Hvis dette var tilfelle, kan det indikere at bakteriene som var tilstede i hydrolysatet levde ved terskelgrensen for sin salttoleranse fordi hydrolysatet inneholder ca. 7-9% NaCl (oppgitt i varedeklarasjonen), mens ikke noen bakterier vokste opp på mediet som inneholdt 10% NaCl. Andre ulikheter i innhold mellom de to mediene var at PCA inneholdt 0,1% glukose. Det finnes for øvrig blant annet marine bakterier som har vist å vokse bedre ved glukose tilstede i medier, eksempel er *Vibrio spp.* (Baxter & Sieburth, 1984).

Siden materialet utsettes for varme opp mot 90°C, kan det antas at bakterier som kommer fra marine miljø mest sannsynlig dør, det fordi de vokser optimalt fra de omgivelsene de kommer fra, som er temperaturer rundt 4°C (Sakshaug, Johnsen, & Kovacs, 2009) Det kan også antas utfra hvordan temperaturer koloniene vokste, vist i Figur 21. Koloniene som vokste indikerer at det var bakterier som vokste best ved 22°C og 35°C, det viser til at bakteriene som var tilstede likte varme for å vokse. Det er atypisk for marine bakterier å kunne vokse i varme omgivelser, som regel liker de kjølige temperaturer (8°C) og vokser gjerne sakte (etter syv dager). Resultatene i oppgaven viste at ingen bakterier vokste ved slike inkuberingsforhold. Grovt estimert var resultatene 220 CFU/ml ved inkuberingsforhold ved 22°C og 15 ukers lagring i romtemperatur. Selv om metoden krever minimum 30 kolonier på én agar-skål, for å gi et nøyaktig estimat av mengden bakterier i materialet. Derfor er resultatet ikke helt representativt. Det er videre mulig å benevne bakterieinnholdet på følgende måte <300 CFU/ml. Alternativ metode for å detektere bakterieinnhold kunne ha vært MPN (Funke et al., 2004) (mest sannsynlige tallet), metoden innebærer å dyrke mikrober i vått medie, altså uten agarose. Ved å dyrke materialet i ulike fortyndinger og derfra predikere tallet ut fra hvilke fortynding materialet vokste i og i hvor mange dyrkningsrør ved den gitte fortyndingen. Ut fra hvor mange rør bakteriene vokser ved, er det etablert en tabell med estimat av antatt bakterieinnhold. Fordelen med denne metoden er at bakterier som ikke vokser på fast medium, kanskje kan vokse i et vått medium (forskjellen på mediene er vist i Figur 12) Det er på tross av etablerte metoder, mange bakterier som aldri har latt seg dyrke (Bomar et al., 2011; Funke et al., 2004; Stewart, 2012). Et alternativ ville ha vært å benytte flere medier med ulike næringsinnhold, samt atmosfæreforhold. Eksempelvis dyrking i CO₂ eller ved anarobe forhold (fravær av O₂). For å identifisere bakterier som aldri har latt seg dyrke, kan 16s RNA sekvensering etter PCR gjennomføres ved først å isolere DNA for så å tilsette primere som binder seg til 16s RNA gensekvensen hos bakterier og dermed kunne være i stand til å identifisere bakterien.

Metoden som ble benyttet for å finne soppinnholdet i hydrolysatet var å dyrke hydrolysatet på LA-medium og for så å la det inkubere ved romtemperatur i syv dager. Etter inkuberingen ble det mikroskopert for å identifisere hvordan mikrobene så ut i mikroskop og om det eventuelt var sopp eller mugg organsiner som vokste. I utgangspunktet er mugg og sopp enkle å få til å vokse (Funke et al., 2004) og ofte enklere å dyrke sammenlignet med bakterier. Resultatet av mikroskoperingen viste at koloniene som vokste på LA-mediet var bakterier i form av staver og kokker i klaser og kjeder. Det bekrefter at koloniene som ble telt for

bakterieinnhold metoden var bakterier og ikke andre type mikrober som sopp eller mugg. Objekter som lignet noe annet enn bakterier ble funnet og da ble professor i mikrobiologi Einar Ringø ved NFH kontaktet. Han bekreftet at det ikke var sopp eller mugg. Han antok at det kanskje kunne være vannbobler, men ytterligere analyser ble ikke gjennomført. Selektivt medium som ble benyttet i den hensikt å hemme Gram-positive og Gram-negative bakterier, viste ingen tegn til kolonivekst. Resultatene fra eksternt laboratorium (Toslab AS) bekreftet resultatene i oppgaven, ved at de heller ikke detekterte sopp eller mugg i materialet fra hydrolysat 1 og 2. Derfor ble det konkludert med at hydrolysatet ikke inneholdt sopp eller mugg, det ved å ha testet to partier. Det kan være at andre partier inneholder sopp eller mugg og det kan være at materiale kan bli eksponert for miljøer med sopp sporer i omgivelsene. Ut fra to produksjoner indikerer selve produksjonsprosessen at den ikke kontaminerer partiene i sporbar grad.

I en tidligere publisert artikkel hvor bakterievekst i reker ble analysert, ble det oppgitt et bakterieinnhold på 220 CFU/g etter to dagers inkubering ved 35°C (Ouattara, Sabato, & Lacroix, 2001), Dette er et likt bakterieinnhold som ble estimert ut fra hydrolysatet som hadde blitt lagret lengst, i cirka 13 uker ved romtemperatur (ca 22°C) (Figur 21). Videre i artikkelen sto det beskrevet at det var ferske og kokte reke uten skall som hadde blitt analysert for bakterieinnhold. Mediet som ble benyttet ble kaldt aerobic plate count, som har det samme innholdet som PCA (innhold vist i punkt 3.3) Det tyder på at reker (*Panaeus spp*) har et høyere innhold av mikrober, sammenlignet med hydrolysatet, basert på mengden bakterier etter kort tids lagring. Grunnet til at hydrolysatet har et lavere bakterieinnhold kan bero på at det har et høyt saltinnhold og at det kan ha større mengde av antibakterielle peptider. Mulig det er slik siden det er et konsentrert peptidkonsentrat og resultatene i denne oppgaven antydte at hydrolysatet innehar egenskaper som kan hemme enkelte bakterier fra å vokse.

I produktdeklarasjonen fra Calanus AS, står det oppgitt at bakterieinnholdet i hydrolysatet er under 300 CFU/g, som er den nedre deteksjonsgrensen for metoden og derfor oppgitt på denne måten. Sopp og mugg innholdet er oppgitt til å være under 10 CFU/g, som også muligens er den nedre deteksjonsgrensen for oppgitt verdi. Det indikerer at varedeklarasjonen til Calanus AS er i samsvar med resultatene som er oppgitt denne oppgaven.

5.2 Kjemisk sammensetning

Kjemisk sammensetningsanalysene, ble gjennomført for å få kjennskap til oppbygning, da rettet mot totale og frie aminosyrer, inkludert tørrstoffinnhold. Hvor også potensiell bioaktivitet ble vurdert utfra aminosyreprofil.

Tørrstoffandelen viste en oppgang på 8,8%, fra henholdsvis 36,4% til 45,2% fra hydrolysat 1 til hydrolysat 3. Hordafôr viste å ha et tørrstoffinnhold på 53,3%. Det er i nært samsvar 50% som produsenten. Hensikten med å finne tørrstoffandelen i hydrolysatet fra *C. finmarchicus*, var først og fremst for å se om produksjonene var reproducerbare og fordi Calanus AS ønsker å oppnå et tørrstoffinnhold som er mellom 40-50% av produktet. Det er videre ønskelig å ha et visst vanninnhold, for at kundene ha et håndterlig produkt. Resultatene på hydrolysatene gir uttrykk for at tørrstoffandelen utvikles i ønsket retning, sett fra produsentens ståsted (Calanus AS), ved at de seneste produksjonene er nærmere Calanus AS sitt ønske om andel tørrstoff. Grunnen til økningen av tørrstoff, henger antakelig i sammenheng med prosesseringen av materialet og i hvor stor grad inndampingsprosessen av produktet har vært gjennomført og at produktet blir i større grad tørket ved de seneste partiene.. Videre ser det ut til at den drastiske endringen har skjedd mellom produksjon fra hydrolysat 1 til produksjon av hydrolysat 2, da oppgangen har vært på hele 7,6%, dette indikerer videre at det er i dette tidsrommet produksjonen har vært i størst endring. Det er flere fordeler med mindre andel vann, blant annet gir det større andel NaCl, som kan gjøre produktet mer mikrobielt stabilt, fordi færre bakterier vokser i salte miljøer (Funke et al., 2004). Videre tar lagringen av produktet mindre plass. Ulempen med mindre vanninnhold er at proteinfraksjonen kan være mer viskøst og vanskeligere å transportere i et prosessanlegg.

Aminosyreinnholdet i materialet viste et innhold i hydrolysat 1 på 471,3 mg/g totale og 131mg/g frie, mens hydrolysat 2 inneholdt 619,5 mg/g med totale og 149,3 mg/g frie og til sist at hydrolysat 3 inneholdt 520 mg/g totale og 146,0 mg/g med frie. I materiale fra Hordafôr ble det detektert 537,4 mg/g totale aminosyrer og hvor 142,2 mg/g av disse var frie aminosyrer. Grunnen til at det kan være noe variasjon mellom hydrolysatmaterialene kan være biologisk betinget, ved at de kanskje representerer ulik tid på året for innhøsting, og dermed gir ulik variasjon ved at de er høstet ved ulik kopepodittstadier (Tande, 1991)

Sammenlignes hydrolysatene og Hordafôr opp mot hverandre i andel totale og frie aminosyreinnhold viser resultatene at i gjennomsnitt ble det detektert 536,9 mg/g totale aminosyrer i hydrolysatmaterialet og i Hordafôr ble det detektert 537,4 mg/g. Av de totalt

detekterte aminosyrene besto 142,2 mg/g av frie aminosyrer i hydrolysatene og 119,1 mg/g var frie i Hordafôrmaterialet. Det viser til at andelen totale aminosyrer er forholdsvis lik mellom hydrolysatet fra *C. finmarchicus* og lakseensilasjen fra Hordafôr. Videre ser det ut til at Hordafôr har noe lavere andel frie aminosyrer.

Når en vurderer metodene som ble benyttet til totale og frie aminosyrer kan det virke som spesielt de frie aminosyrene er ukorrekte. Ved å ta utgangspunkt i innholdet av taurin og sammenligne verdiene fra totale og frie aminosyrer i hydrolysatene spesielt, viste disse at konsentrasjonen av taurin fra totale aminosyrer hadde et gjennomsnitt på 9,8 mg/g og fritt taurin på 6,4 mg/g. Ideelt sett burde disse resultatene vært like da taurin kun finnes i fri form og total og fri aminosyrekonsentrasjonen av taurin i teorien er identiske. I Hordafôr viste resultatene at totale aminosyre konsentrasjonen av taurin var 14,4mg/g og frie aminosyrekonsentrasjonen av den samme aminosyren var 6,0 mg/g. Grunnen til at Hordafôr resultatene gir enda mer ukorrekte resultater, sammenlignet med hydrolysatresultatene, er at da prøvene ble analysert, var materialet grumsete og inneholdt klumper som lignet felling. Det kan bidra til at materialet som ble analysert ikke var optimalt preparert og ikke godt nok forbehandlet for akkurat dette spesifikke materialet. Generelt kan grunnen til at frie aminosyreresultatene viste noe ukorrekte resultater være begrunnet i at, dersom ikke alle store proteiner og peptider blir fjernet fra materialet, kan disse interferer i analysen. Dette er en større utfordring i frie aminosyre analysen sammenlignet med totale aminosyre analysen (Moore & Stein, 1963). I den totale aminosyreanalysen gjennomgår materialet nemlig en mer omfattende forbehandling i form av syrehydrolyse, noe som bidrar til at aminosyrene blir tilgjengelige i større grad. Alternativet for en mer optimalt forbehandling av analyse av frie aminosyrer må være å skreddersy en preparering som er mer optimal til de ulike materialene. Det kan innebære at en benytter andre reagenser som kan fjerne blant annet peptider og utfellinger i større grad, eller benytte ytterligere sentrifugering. Dersom taurinresultatene blir mer like de totale og frie aminosyrer, kan det indikere at metoden er utført mer optimalt.

For å estimere et mer korrekt resultat av frie aminosyrer, kunne resultatene til frie aminosyrer ha blitt økt med tilsvarende andel som ikke har blitt «detektert» i de frie aminosyrene, sett opp mot konsentrasjonen av de totale ved hjelp av taurininnholdet. Gjøres dette vil andelen frie aminosyrer utgjøre 1/3 av de totale aminosyrene i hydrolysatene. Måten det ble gjort på er å ta utgangspunkt i forskjellen mellom totalt og fritt taurin, og videre oppjustere den tilsvarende andelen til totalt frie aminosyrer.

Forholdene mellom totale og frie aminosyrer i de ulike hydrolysatene er nokså like. Det indikerer at forholdene mellom totale og frie er stabilt gjennom ulike produksjoner og ved ulik lagring. Dette indikerer at lengre lagring ikke bidrar til ytterligere spalting til frie aminosyrer. Det er kun et estimat og kan være noe ukorrekt. I tillegg indikerer det i at 2/3 av de detekterte aminosyrene er bundet til peptid og mest sannsynlig bidrar til at de oppgitte verdiene av aminosyrene er noe forhøyet, fordi vann blir målt ved analyse (FAO, 2004; Moore & Stein, 1963), det inkluderer ikke frie aminosyrer.

I en tidligere publisert artikkel hvor det ble oppgitt totale aminosyreinnhold fra dyreplankton, ga resultatene $417,1 \pm 35,9$ mg/g, hvor det var analysert fra rund og tørket dyreplankton (Mæhre et al., 2013). Sammenlignes det resultatet med totale aminosyreinnhold som er oppgitt i denne oppgaven (et gjennomsnitt på 536,9 mg/g), kan det konkluderes med at resultatene er nokså like. Analyser utført av Mæhre og medarbeidere (Mæhre et al., 2013) inkluderer blant annet fett i analysen og det gjør at resultatene vil bli noe lavere. Videre var det andre arter enn *C. finmarchicus* som ble analysert, da artene *Eurythemora affinis* og *Microsetella norvegica* ble benyttet noe som kan bidra til å gi andre resultater. På tross av at resultatene i denne artikkelen var basert på andre arter enn kun *C. finmarchicus*, ble resultatene svært like i andelen totale aminosyrer. Det kan indikere at totale aminosyrer ikke er artsbestemt og at det ikke er markant stor variasjon mellom dyreplankton, selv om det ikke var oppgitt andelen av de ulike artene og at en derfor ikke kan konkludere med at totalt aminosyreinnhold er likt på tvers av dyreplanktonarter.

I artikkelen skrevet av van der Meeren et al. (2015) står det nevnt at kopepoder med nauplier som er et dyreplankton, inneholder større mengde protein, sammenlignet med rotatorier og at de er derfor mer hensiktsfull å bruke til yngelfôr hos blant annet torskeoppdrett. Det står oppgitt at proteinandelen fra kopepodene er 600 mg/g målt fra tørrstoff, mens rotatorier inneholdt 370 mg/g fra tørket prøve. Det er noe høyere verdier sammenlignet med resultatene som er framkommet i denne oppgaven og årsaken til dette kan være at de oppgir verdier fra runde dyr. Dette kan inkludere andre komponenter som dyreplankton består av. Grunnen til at det det kan være høyere proteinandel oppgitt i artikkelen kan være at andre kopepodetyper ble testet som for eksempel copepodetyperne *Cyclopoida* og *Harpacticoida*, hvor sistnevnte er lite undersøkt i Norske farvann (Hågvær, 2010). Det kan det være andre grunner til at van der Meeren et al. (2008) oppgir høyere totale aminosyrer og en av dem kan være biologisk variasjon, hvor dyreplankton kan ha ulik proteinandel alt etter når på året den blir høstet fra havet (Tande, 1991). De nevnte artiklene (Mæhre et al., 2013) og (van der Meeren et al., 2008)

viser også til et taurinnhold på henholdsvis 7,7 mg/g og 6,25 mg/g, mens resultatene i oppgaven ga et taurin innhold 9,8 mg/g. Med forbehold om at artiklene oppgir verdier fra rundt dyreplankton, er resultatene forholdsvis like.

Det har blitt knyttet flere helsefordeler til taurin, blant annet har taurin vist å fremme flere positive effekter hos blant annet torskeyngel, det har blitt vist at aminosyren bidrar til dannelse av galle, deltar i osmoregulering og er interaktiv for funksjoner i mitokondrier (van der Meeen et al., 2015). Tilstedeværelse av taurin i fôr hos torskeyngel ants derfor å være viktig. Det kan også være at den er viktig hos andre primater i ulike utviklingsfaser og kan også ha en liknende eller gunstig effekt hos mennesker (Bouckennooghe et al., 2006; Sturman, 1993)

Taurin, sammen med glycin har vist å være kolesteroldempende og hydrolysat fra blant annet laks har vist å ha denne effekten på gnager (mus og rotter). I tillegg har lavt innhold av metionin vist å bidra til å senke kolesterol (Muramatsu & Sugiyama, 1990; Wergedahl et al., 2004). Siden hydrolysatet og lakseensilasjen har forholdsvis lik aminosyreprofil (Tabell 10), kan det indikere at også hydrolysatet har en slik effekt.

Sammenhengen mellom aminosyreprofil og bioaktivitet har blitt sett å ha en relasjon, i form av at enkelte aminosyrer kan tyde på en bioaktivitet. Eksempler på dette er at ACE-hemming, som betyr at det reduserer blant annet blodtrykk (López-Fandiño, Otte, & van Camp, 2006), har vist seg å være aktivt hvis peptidet har vært bygd opp av tyrosin, fenylalanin, tryptofan, prolin, lysin, isoleucin, valin, leucin og arginin (López-Fandiño et al., 2006; Murray & FitzGerald, 2007). Hydrolysatmaterialet inneholder relativt mye av alle disse aminosyrene (Tabell 10). ACE-hemmende aktivitet har også blitt vist dersom flere ulike peptider er tilstede (López-Fandiño et al., 2006). Tryptofankonsentrasjonen i materialet er ikke kjent fordi aminosyren blir ødelagt av syrehydrolyse (Moore & Stein, 1963) som er en del av forbehandlingen ved analysemetoden. Videre har de hydrofobiske aminosyrene prolin og hydroxyprolin, vist seg å ha en relasjon til å være antioksidantvirkende (Mendis, Rajapakse, Byun, & Kim, 2005; Sarmadi & Ismail, 2010). Hydrolysatproduksjonene viste et gjennomsnitt av prolin på 24,4 mg/g, mens hydroxyprolin ikke ble testet.

Antibakteriell aktivitet har vært sett i sammenheng med netto negativt ladde peptider, som forårsaker at de antibakterielle peptidene kan binde seg til negative cellemembraner til en bakterie (López Expósito & Recio, 2006). Eksempler på netto negativt ladde aminosyrer er glutamat og aspartat (ved pH 7), noe som hydrolysatmaterialet inneholder relativt mye av (henholdsvis 63,9 mg/g og 45,0 mg/g). Sett opp mot de nevnte aminosyrene, kan hydrolysatet potensielt være ACE-hemmende, antioksidantvirkende og antibakterielt.

Det innebærer flere forutsetning enn hva profilen viser. Blant annet kan det være at aminosyrene er færre enn tre i peptidene eller flere enn tjue aminosyrer bundet til hverandre. Det er gunstig med tre til tjue aminosyrer for å inneha potensiell bioaktivitet (Kim & Wijesekara, 2010). Videre er rekkefølgen på aminosyrene essensielle fordi det er dette som bestemmer egenskapene til peptidene og dermed aktiviteten deres. Derfor vil evalueringen av potensiell aktivitet ved hjelp av aminosyreprofil, kun gi en liten ledetråd om hvilken bioaktivitet som kan finnes i materialet.

5.3 Bioaktivitet

Antibakteriell aktivitet ble påvist i samtlige fastfaseekstraherte materialer (SPE-eluat) fra *C. finmarchicus* (Tabell 12 og Tabell 13). Minimum inhiberende konsentrasjon bestmet ved 90%-100% hemming, var mellom 0,16 mg/ml til 1,25 mg/ml mot *S. aureus*, mellom 0,62 mg/ml til 1,25 mg/ml mot *C. glutamicum* og mellom 0,32 mg/ml til 0,62 mg/ml mot *E. coli*.

Forsøket ble gjennomført to ganger, for å se om resultatene var reproducerbare. Resultatene viste seg å være identiske for nesten alle eluatene. Unntaket var hydrolysat 2 eluert med 80% ACN, som hadde vist seg å være ½ dels fortytning mer aktivt mot *C. glutamicum* og *E. coli*, med henholdsvis MIC-verdier på 0,62 mg/ml og 0,32 mg/ml, ikke viste seg å være mer aktiv ved gjentagelse. Det kan være fordi det var en større utfordring å bedømme eventuelle lavere veksthemning enn 90%-100% siden det ikke var mulig å se på vekskurver ved det gjentatte forsøket. Det andre unntaket fra resultatene ved gjentakelsen av MIC-test, var at alle SPE-eluatene fra hydrolysatene viste seg å være aktivt i to titersteg mer fortytning mot *S. aureus*, noe som resulterte i en MIC-verdi på 0,16 mg/g. Sensitiviteten til *S. aureus* stammen kan variere fra oppsett til oppsett. Et titersteg opp eller ned i MIC verdi er også innenfor normal variasjon i denne testen da det er vanskelig å oppnå eksakt samme antall bakterier i testen ved ulike oppdyrking, eller at prøvematerialet er identisk etter lagring. Denne variasjonen er derfor noe en må akseptere. Dersom en kunne sammenligne vekstkurver ved andre gangs testing, kunne kurven kanskje ha gitt en ekstra informasjon. Ideelt sett burde slike forsøk vært gjentatt tre ganger for å bekrefte den faktiske MIC-verdien til hydrolysatene.

Fremgangsmåten for forbehandling før spesifikk bioaktivitetstesting er vist i Figur 18, hvor det illustrerer klargjøring av materialet. Videre grovseparasjon av hydrolysatet fra *C. finmarchicus*, ble tilpasset en metode som passet en proteinfase (hydrolysat). Hydrolysatet ble

renset for salt og ga løsninger med ulike polatitetsegenskaper (SPE) (Haug, Kjuul, Stensvåg, Sandsdalen, & Styrvold, 2002; Haug, Kjuul, Styrvold, et al., 2002). Derimot var kjennskapen til kontrollmaterialet som var lakseensilasje fra Hordafôr, lav. Det ble mottatt uten varedeklarasjon og gjort minimal med informasjonsleting, for å få kjennskap til materialet. Det resulterte i at det ble forbehandlet på samme måte som hydrolysatet.

Ved å undersøke hva materialet inneholdt, viste det å inneholde fett og at det hadde vært hydrolysert med syre (Bækken & Bekkevold, 1993), noe som bidro til at materialet var surt. MIC resultatene for lakseensilasjen til Hordafôr, gav høye verdier, og en minimum inhiberende konsentrasjon (Tabell 13) kunne ikke bestemmes nøyaktig overfor alle teststammene. Siden pH-målinger av materialet viste at det var forholdsvis lav pH 2,4-2,5, indikerer det at bakterieveksten muligvis ble affisert av det sure miljøet i seg selv og ikke av noe fra innholdet i prøven. Det hadde vært hensiktsmessig å ha gjennomført ekstrahering med 60% ACN først, noe som ville resultert i at det oppstår faseskille mellom hydrofile og hydrofobe komponenter og dermed også ville ha skilt vann og fettfase fra hverandre da denne metoden også tidligere har vist seg å være en effektiv metode for å skille fett og vann fase i flere ulike marine materialer (Haug, Kjuul, Stensvåg, et al., 2002; Haug, Kjuul, Styrvold, et al., 2002; Haug, Stensvåg, Olsen, Sandsdalen, & Styrvold, 2004; Tadesse, Gulliksen, Strøm, Styrvold, & Haug, 2008). Etter ekstraheringen kunne det eventuelt blitt gjennomført en pH justering med for eksempel lut (NaOH) før bioaktivitetstesting ble gjennomført. Selv om pH-justering kan endre bioaktivitet til materialet, kan det også endre netto ladning på en aminosyre/peptid (Sjøberg, 2008).

Det har tidligere blitt dokumentert antibakteriell aktivitet i lignende marine skalldyr som i krabbe, hummer, reker og kreps (Amparyup, Kondo, Hirono, Aoki, & Tassanakajon, 2008; Chen, Chuang, Pan, & Kuo, 2005; Haug, Kjuul, Stensvåg, et al., 2002; Rosa, Bandeira, & Barracco, 2007; Smith et al., 2008; Zhang, Li, Wang, & Xiang, 2007). Da har det fortrinnsvis blitt dokumentert fraksjonerte og isolerte proteinkomponenter. Ett eksempel er funn av proteinkomponent en reke (*Panaeus vannamei*) som er dokumentert å ha en antibakteriell aktivitet med MIC- verdier ned mot 0,0006 mg/ml til 0,0025 mg/ml overfor bakterien *M. luteus*, som er en Gram-positiv bakterie. Mot *E. coli* (Gram-negativ) viste komponenten aktivitet ned mot en konsentrasjon på 0,005 mg/ml. Om en hadde isolere spesifikke peptider fra hydrolyse materialet, kunne det totalt sett vist mer aktivitet. Framgangsmåten vill vært å separere peptidene ytterligere, deretter teste og igjen fraksjonere de fraksjonene som viser høyest aktivitet. Deretter, eller også underveis kan peptidene identifiseres. Eksempelet ble gitt for å

belyse at det finnes antibakterielle peptider i skaldyr og at det kan potensielt være flere aktive spesifikke komponenter i hydrolysatet.

Siden hoved hensikten med MIC-analysen var å dokumenter antibakteriell aktivitet, så viser resultatet at hydrolysatet inneholder aktive peptider. Dette kan også ha betydning for de mikrobielle holdbarhetsegenskapene, dette innholdet kan bidra til å hemme vekst av kontaminerte mikrober i form av bakterier.

Hydrolysatene antas å ikke inneholde toksiske forbindelser da hemolysetesten viste at hydrolysateluatene ga mindre hemolyse sammenlignet med negativ kontroll (Tabell 14). Derimot viste lakseensilasjen fra Hordafôr seg å lysere erytrocyttene i større grad enn den positive kontrollen.

Hydrolysat 1 og 2 viste forholdsvis like resultater fra hemolysetesten ved at de stabiliserte cellene med cirka 20% sammenlignet med negativ kontroll. Hydrolysat 2 stabiliserte ved henholdsvis 13,9% og 18,1% ved 20% ACN og 80% ACN ved konsentrasjon på 10 mg/ml. Gjennomgående viste hydrolysatene å hemolysere erytrocyttene cirka 20% mindre, sammenlignet med negativ kontroll.

Tidligere forskning har vist at enkelte spesifikke proteiner har vist å gjøre erytrocyttmembranen mer rigid (Chasis & Schrier, 1989; Chasis, Mohandas, & Shohet, 1985). Derfor kan det være at hydrolysatet inneholder komponenter som binder seg til erytrocyttene og gjør de mer stabile.

Årsaken til at Hordafôr hemolyserte cellene er mest sannsynlig fordi forbehandlingen av materialet ikke var optimal. SPE-materialet fra Hordafôr hadde lav pH (2,4-2,5) og det er ugunstig for erytrocyttene i testen. Dessuten fra fraksjonen lite gjennomskinnelig (Figur 22), noe som interfererer med avlesningen og gir et bidrag som oppfattes som mer enn den faktiske hemolysen. Det bidro mest sannsynlig til den høy hemolyseprosenten for lakseensilasje i testen, og derfor ikke kan benyttes som informasjon om hemolytisk materiale i lakseensilasje. Resultatene fra hemolysetesten viste videre (Figur 28) at brønnene fra mikrotiterplaten hadde ulik fargen på pelleten. Høyere konsentrasjon av materialet bidro til en brunaktig pellet av blodceller nederst i brønnen mens en mer rødlig farge ble synlig ved lavere konsentrasjoner av materiale. Grunnen til dette kan være en form for oksidering av jernet som finnes i hemoglobinet (Alberts et al., 2013). Siden hemolysegraden er lik ved brun og rød pellet, ser det ut til at denatureringen ikke påvirker hemolysegraden og at brunfargen ikke er et resultat av at erytrocytten har sprukket. I metoden stod det beskrevet at det var hensiktsmessig å gjenta

analysen tre ganger, noe som ikke ble gjort, grunnet lite prøvematerialet. Det hadde vært hensiktsmessig for å få et mer korrekt resultat.

5.4 Videre arbeid

Det viktigste for Calanus As nå er å dokumenter at deres produserte hydrolysat er stabilt ved lagring, men også fra produksjon til produksjon. Det vil være interessant å ytterligere dokumentere egenskapene til hydrolysatet. Blant annet fått kartlagt ytterligere bioaktive egenskaper, som antioksidantaktivitet og ACE-hemmende aktivitet. Videre kunne analyser blitt gjort knyttet til kolesteroldempende effekt ved inntak. Kontrollmaterialet burde ha blitt forbehandlet på en mer optimal måte ved bioaktivitetstesting, slik at det hadde vært mulig å sammenligne hydrolysatet med lakseensilasjen på en mer optimal måte. Alternativt kunne hydrolysat fra krill ha blitt benyttet som sammenligningsmaterial.

5.5 Oppsummering

Hydrolystmateriale fra *C. finmarchicus* som produkt er en ernæringsmessig verdig proteinkilde, ved at den inneholder flere essensielle og ikke essensielle aminosyrer. I tillegg er produktet forholdsvis mikrobielt stabilt og derfor egnet som en kilde til marine proteiner selv ved lengre lagring. Resultatene fra analysene knyttet til karakterisering av hydrolysatet kan oppsummeres på følgende måte:

Stabilitet

- De to hydrolysatene som ble analysert, viste lavt bakterielt innhold og ikke detekterbart innhold av sopp eller mugg. Ingen bakterier ble påvist i hydrolysat 2.
- Lagringsforholdene som gav minst bakterievekst var lagring ved frysing eller temperaturer under 6°C.

Kjemisk innhold

- Produksjonene viste seg å være ganske reproducerbar. Den største kjemiske forskjellen var vanninnholdet, hvor den siste produksjonen av de tre viste minst vanninnhold og et tørrstoffinnhold som var 45,2%.
- Mengden totale aminosyrer ble detektert til å være 536,9 mg/g av tørket materialet, hvor av disse var cirka 1/3 frie aminosyrer.

Bioaktive forbindelser

- Materialet viste å inneha antibakterielle egenskaper overfor testorganismer med MIC verdier på grovfraksjonert hydrolysat (SPE eluert) ned mot 0,63 og 0,16 mg/ml tørrstoff.
- Hydrolysatet inneholder mest sannsynlig ikke toksiske forbindelser da det ikke inneholdt material med hemolytisk effekt overfor humane erythrocytter, men tvert imot stabiliserte disse.

6 Referanser

- Aehle, W. (2006). *Enzymes in industry: products and applications*: John Wiley & Sons.
- 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.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2013). *Essential cell biology*: Garland Science.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2008). Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*, 45(4), 1085-1093.
- Aragão, C., Conceição, L. E., Dinis, M. T., & Fyhn, H.-J. (2004). Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234(1), 429-445.
- Baxter, M., & Sieburth, J. (1984). Metabolic and ultrastructural response to glucose of two eurytrophic bacteria isolated from seawater at different enriching concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 47(1), 31-38.
- Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430.
- Bjørn Gulliksen, & Svensen, E. (2004). *Svalbard og dyreliv i polare hav* (1. utgave. utg.): Kom forlag.
- Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., & Graf, J. (2011). Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *MBio*, 2(2), e00012-00011.
- Borgå, K., Gabrielsen, G., & Skaare, J. (2001). Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, 113(2), 187-198.
- Bouckennooghe, T., Remacle, C., & Reusens, B. (2006). Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(6), 728-733.

- Breed, R. S., & Dotterrer, W. (1916). The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *Journal of Bacteriology*, 1(3), 321.
- Busch, K., Peruzzi, S., Tønning, F., & FALK - PETERSEN, I. B. (2011). Effect of prey type and size on the growth, survival and pigmentation of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e595-e603.
- Busch, K. E. T., Falk - Petersen, I. B., Peruzzi, S., Rist, N. A., & Hamre, K. (2010). Natural zooplankton as larval feed in intensive rearing systems for juvenile production of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 41(12), 1727-1740.
- Bækken, & Bekkevold, S. (1993). *Håndbok i ensilering*. Trondheim: RUBIN.
- Cahu, C., Infante, J. Z., Quazuguel, P., & Le Gall, M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1), 109-119.
- Carvalho, A., Sá, R., Oliva-Teles, A., & Bergot, P. (2004). Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture*, 234(1), 319-333.
- Chalamaiah, M., 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.
- Chasis, J., & Schrier, S. (1989). *Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte* (vol. 74).
- Chasis, J. A., Mohandas, N., & Shohet, S. B. (1985). Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A-ligand interaction. Evidence for a ligand-induced association between glycophorin A and skeletal proteins. *Journal of Clinical Investigation*, 75(6), 1919-1926.
- Chauhan, D., Singh, A., Brahmandam, M., Podar, K., Hideshima, T., Richardson, P., et al. (2008). Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 111(3), 1654-1664.
- Chen, J. Y., Chuang, H., Pan, C. Y., & Kuo, C. M. (2005). cDNA sequence encoding an antimicrobial peptide of chelonianin from

- the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 18(2), 179-183.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus1. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144-148.
- Davidson, S., Allen, S., Lim, G., Anderson, C., & Haygood, M. (2001). Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont “*Candidatus Endobugula sertula*” of the Bryozoan *Bugula neritina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4531-4537.
- Diel, S., & Tande, K. (1992). Does the spawning of *Calanus finmarchicus* in high latitudes follow a reproducible pattern? *Marine Biology*, 113(1), 21-31.
- FAO. (2004). *The state of food and agriculture*
Rome, Italy.
- Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., & Potts, B. C. (2009). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(6), 2175-2180.
- Frank Emil Moen, & Svensen, E. (2008). *Dyreliv i havet: Nordeuropeisk marin fauna* (5. utgave utg.).
- Funke, B., Tortora, G., & Case, C. (2004). *Microbiology: an introduction*: San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-7614-3.
- Galinier, R., Roger, E., Sautiere, P. E., Aumelas, A., Banaigs, B., & Mitta, G. (2009). Halocynthin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia papillosa*. *Journal of Peptide Science*, 15(1), 48-55.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123-131.

- Granum. (2007). Matforgiftning–Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner.[Foodborne infections and intoxications]: Kristiansand: Høyskoleforlaget AS–Norwegian Academic Press.
- Hamre, K., & Harboe, T. (2008). Critical levels of essential fatty acids for normal pigmentation in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture*, 277(1), 101-108.
- Hamre, K., Opstad, I., Espe, M., Solbakken, J., HEMRE, G. I., & Pittman, K. (2002). Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquaculture Nutrition*, 8(2), 139-148.
- Hancock, R. E., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M., & Harris, K. A. (2008). Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Current atherosclerosis reports*, 10(6), 503-509.
- Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2010). Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry (International Edition). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry (International Edition)*-9781609139988-27, 00.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E., & Styrvold, O. B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5), 371-385.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø. M., & Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2), 94-102.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø. M., Sandsdalen, E., & Styrvold, O. B. (2004). Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), 112-119.

- Hennion, M.-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1), 3-54.
- Hung, H., Kallenborn, R., Breivik, K., Su, Y., Brorström-Lundén, E., Olafsdottir, K., et al. (2010). Atmospheric monitoring of organic pollutants in the Arctic under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP): 1993–2006. *Science of the Total Environment*, 408(15), 2854-2873.
- Höper, A. C., Salma, W., Khalid, A. M., Hafstad, A. D., Sollie, S. J., Raa, J., et al. (2013). Oil from the marine zooplankton *Calanus finmarchicus* improves the cardiometabolic phenotype of diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, 110(12), 2186-2193.
- Höper, A. C., Salma, W., Sollie, S. J., Hafstad, A. D., Lund, J., Khalid, A. M., et al. (2014). Wax Esters from the Marine Copepod *Calanus finmarchicus* Reduce Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Mice. *The Journal of Nutrition*, 144(2), 164-169.
- Hågvar, E. B. (2010). *Det zoologiske mangfold* (3.utgave. utg.): Universitetsforlaget.
- Kim, S.-K., Kim, Y.-T., Byun, H.-G., Nam, K.-S., Joo, D.-S., & Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1984-1989.
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.
- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belangerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31-38.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2003). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 151-152.

- 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(1), 273-306.
- Li, C., Haug, T., Moe, M. K., Styrvold, O. B., & Stensvag, K. (2010). Centrocins: isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev Comp Immunol*, 34(9), 959-968.
- 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.
- Lindeman, R. L. (1942). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23(4), 399-417.
- López-Fandiño, R., Otte, J., & van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293.
- López Expósito, I., & Recio, I. (2006). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1294-1305.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 581-587.
- Moore, S., & Stein, W. H. (1963). [117] Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in enzymology*, 6, 819-831.

- Muramatsu, K., & Sugiyama, K. (1990). Relationship between amino acid composition of dietary protein and plasma cholesterol level in rats. *Monographs on atherosclerosis*, 16, 97.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773-791.
- Mæhre, H., Hamre, K., & Elvevoll, E. (2013). Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 19(3), 301-311.
- Mæland, A., Rønnestad, I., Fyhn, H., Berg, L., & Waagbø, R. (2000). Water-soluble vitamins in natural plankton (copepods) during two consecutive spring blooms compared to vitamins in *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. *Marine Biology*, 136(5), 765-772.
- Ouattara, B., Sabato, S. F., & Lacroix, M. (2001). Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 1-9.
- Pedersen, A. M., Salma, W., Höper, A. C., Larsen, T. S., & Olsen, R. L. (2014). Lipid profile of mice fed a high-fat diet supplemented with wax ester-rich marine oil 9.
- Pedersen, A. M., Vang, B., & Olsen, R. L. (2013). Oil from *Calanus finmarchicus*. Composition and Possible Use: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 130624075632007.
- Peña - Ramos, E., & Xiong, Y. (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of food science*, 67(8), 2952-2956.
- Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., Arnold, E., & Clardy, J. (1982). Isolation and structure of bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society*, 104(24), 6846-6848.
- Rosa, R. D., Bandeira, P. T., & Barracco, M. A. (2007). Molecular cloning of crustins from the hemocytes of Brazilian penaeid shrimps. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 287-290.
- Sakshaug, E., Johnsen, G. H., & Kovacs, K. M. (2009). *Ecosystem Barents Sea*: Tapir Academic Press.

- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*(10), 1949-1956.
- Sjøberg, N. O. (2008). *Kjemi kort og godt* (Vol. 6). Norway.
- Smith, V. J., Fernandes, J. M., Kemp, G. D., & Hauton, C. (2008). Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, *32*(7), 758-772.
- Spackman, D. H., Stein, W. H., & Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical chemistry*, *30*(7), 1190-1206.
- Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*, *194*(16), 4151-4160.
- Sturman, J. A. (1993). Taurine in development. *Physiological Reviews*, *73*(1), 119-147.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *150*(1), 85-92.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M. B., Styrvold, O. B., & Haug, T. (2008). Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*, *99*(3), 286-293.
- Tande, K. S. (1991). Calanus in North Norwegian fjords and in the Barents Sea. *Polar Research*, *10*(2), 389-408.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, *77*(1), R11-R24.
- van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K., & Fyhn, H. J. (2008). Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, *274*(2), 375-397.
- van der Meeren, Ørjan Karlsen, Anders Mangor-Jensen, Ivar Rønnestad, & Hamre, K. (2015). Effekter av byttedyrtype på vekst hos torskelarver: Naturlig dyreplankton versus hjuldyr og saltkreps. *Nfexpert*, *40*, 43.

- Vang, B., Pedersen, A. M., & Olsen, R. L. (2013). Oil extraction From the Copepod *Calanus finmarchicus* Using Proteolytic Enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(6), 619-628.
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O. A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., et al. (2004). Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *The Journal of nutrition*, 134(6), 1320-1327.
- Yust, M. d. M., Pedroche, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., Mateo, C., et al. (2007). Partial Purification and Immobilization/Stabilization on Highly Activated Glyoxyl-agarose Supports of Different Proteases from Flavourzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6503-6508.
- Zhang, J., Li, F., Wang, Z., & Xiang, J. (2007). Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Biotechnology*, 127(4), 605-614.
- Zhang, X., & Beynen, A. C. (1993). Influence of dietary fish proteins on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *British Journal of Nutrition*, 69(03), 767-777.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Ni, D., Wu, L., Zhu, L., et al. (2007). Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Molecular immunology*, 44(4), 360-368.