

2018:00475 - Unrestricted

Sluttrapport

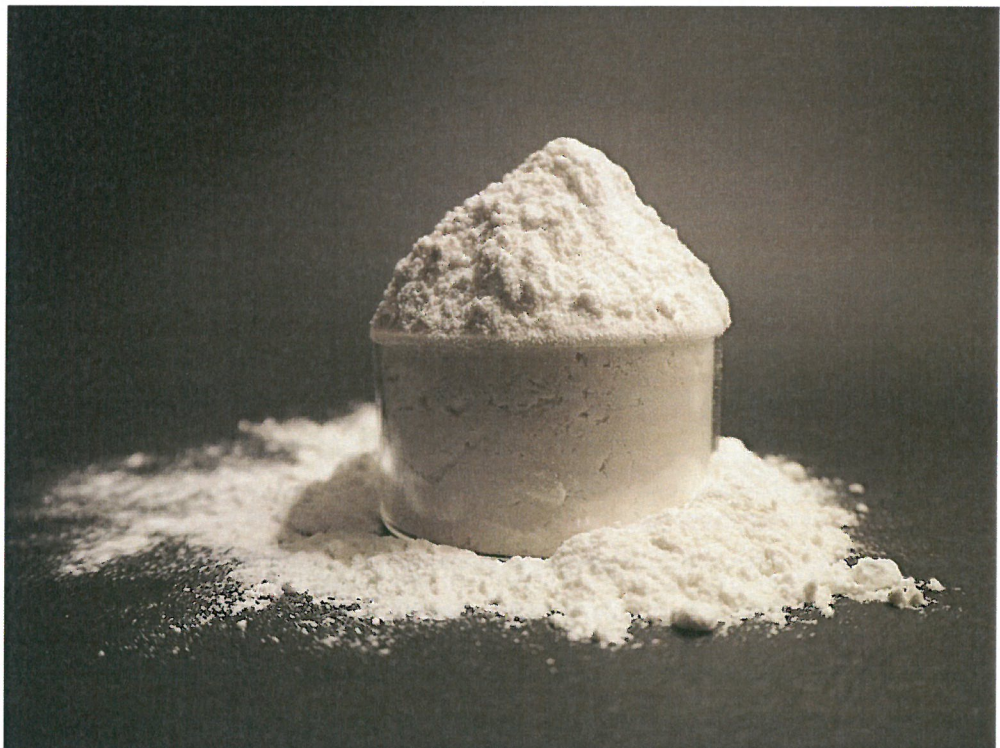
HEADS UP I

Alternativ anvendelse av torskehoder

Forfattere

Jannicke Fugledal Remme

Ana Karina Carvajal, Erlend Indergård, Bendik Toldnes, Rasa Slizyte, Leif Grimsmo,
Andreas Austens (Fjordlaks)



Rapport

HEADS UP I

Alternativ anvendelse av torskehoder

RAPPORTNR
2018:00475

VERSJON
1

DATO
2018-04-25

EMNEORD:

torsk; torskehoder;
hydrolyse; kontainer;
pilotforsøk;
konservering

FORFATTER(E)

Jannicke Fugledal Remme
Ana Karina Carvajal, Erlend Indergård, Bendik Toldnes, Rasa Slizyte, Leif Grimsmo
Andreas Austens (Fjordlaks)

OPPDRAKSGIVER(E)

FHF v. Lorena Jornet

OPPDRAKSGIVERS REF.
FHF 901308

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:
27

GRADERING
Unrestricted

ISBN
978-82-14-06892-4

SAMMENDRAG

Marine proteiner hydrolysert fra torskehoder har et proteininnhold og en kvalitet som overgår tradisjonelt fiskemel og gjør de godt egnet som matingrediens. Proteinene kan også ha en god framtid som helsekost og sportsernæring. Markedet krever proteiner som har god smak, høy næringsverdi, tilstrekkelig holdbarhet og konkurransedyktig pris. Dette kan protein fra torskehoder levere. Tradisjonelt har torskehoder blitt hengt, tørket og eksportert til Nigeria/Asia. Dette er en ressurskrevende produksjon mtp. tidsbruk og personell, og uforutsigbarhet i markedet har i perioder ført til store tap. Hydrolyse er en lovende teknologi for produksjon av marine proteiner med høy kvalitet. Prosjektet HEADS UP har identifisert gode produksjonsbetingelser for hydrolyse av torskehoder, der utbyttet er på rundt 10 %. Proteininnholdet er over 80 %. Produktet er vannløselig og uten en bitter ettersmak, og er aktuelt som ingrediens i ulike matvarer.

UTARBEIDET AV

Jannicke Fugledal Remme

Jannicke F. Remme

KONTROLLERT AV

Erlend Indergård

Erlend Indergård

GODKJENT AV

Hanne Digre

Hanne Digre

Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBEKRIVELSE
01	2018-04-25	Første versjon av rapport

Innholdsfortegnelse

1	INTRODUKSJON	5
1.1	Teknologi for utnyttelse av restråstoff.....	5
1.1.1	Ensilasje.....	6
1.1.2	Termisk ekstraksjon	6
1.1.3	Enzymatisk hydrolyse.....	6
2	MATERIALER OG METODER	8
2.1	Råstoff	8
2.1.1	Hydrolysebetingelser for torskehoder	8
2.1.2	Pilotforsøk ved Tufjordbruket.....	8
2.2	Hydrolysebetingelser for torskehoder	8
2.3	Pilotforsøk ved Tufjordbruket	9
2.4	Stabilisering	9
2.5	Kjemisk sammensetning.....	10
2.5.1	Vanninnhold og tørrstoff	10
2.5.2	Aske	10
2.5.3	Fettinnhold.....	10
2.5.4	Proteininnhold	10
2.5.5	Hydrolysegrad	10
2.5.6	Molekylvektfordeling.....	10
3	RESULTATER	11
3.1	Råstoff	11
3.2	Hydrolyse av torskehoder	11
3.2.1	Tørrstoff	11
3.2.2	Tørket hydrolysat	12
3.3	Stabilitet	15
3.4	Pilotforsøk ved Tufjordbruket	17
3.4.1	Tørket hydrolysat	18
3.5	Kvalitetskriterier for humant konsum marked.....	21
3.6	Konseptutvikling fullskala hydrolysefabrikk	22
3.6.1	Driftstekniske konklusjoner	22
4	DISKUSJON	23
5	KONKLUSJON	25
6	REFERANSER	26

FIGURER

<i>Figur 1: Det første bildet viser tradisjonell tørking av hvitfiskhoder (bildet er tatt i Lofoten). Det andre bildet viser de tomme hjeller ved Tuffjordbruket, til Fjordlaks, på Rolvsøy i Finnmark. (Foto: ©Jannicke Remme, SINTEF Ocean).</i>	5
<i>Figur 2: Skjematisk oversikt over ulike prosesseringsmetoder for produksjon av fiskemel/olje/hydrolysat fra råstoff og restråstoff. Hydrolyseprosessen er vist i den rosa linjen, og viser produktene, bein, olje, grakse og hydrolysat. Ensilasjen følger den blå linjen. Her kan produktet være ensilasje, men også ensilasjen kan prosesseres videre til olje- og proteinprodukter. Fiskemel og –oljeproduksjon er vist i grønn linje. Her produseres olje, limvann og mel. I enkelte tilfeller dampes limvannet inn og tilsettes fiskemelet.</i>	6
<i>Figur 3: Tørket proteinhydrolysat fra (A) torskehoder og fra (B) torskehoder med innmat</i>	7
<i>Figur 4: Figuren viser kjemisk sammensetning i frosne torskehoder som ble brukt til labforsøk og ferske hoder som ble brukt til pilotforsøk. Det er liten forskjell i kjemisk sammensetning.</i>	11
<i>Figur 5: Naturligvis økende tørrstoffmengde med redusert mengde vann, men legg også merke til at tørrstoffmengden øker med tiden for alle enzymer. Økningen er mindre for endogene enzymer enn for de andre enzymene.</i>	12
<i>Figur 6: Kjemisk sammensetning av frysetørkede hydrolysater.</i>	13
<i>Figur 7: Utbytte av teoretisk tilgjengelig protein.</i>	13
<i>Figur 8: Figuren viser hydrolysegraden etter hydrolyse med ulike enzymer og ulik vannmengde.</i>	14
<i>Figur 9: I løpet av inntil åtte dagers lagring av hydrolysat ved 4 °C og 20 °C ble det ikke funnet spor av gjær, mugg, enterobakterier, sulfittbakterier eller anaerobe bakterier.</i>	15
<i>Figur 10: Bakterievekst ved 4 °C og 20 °C i flytende hydrolysat med ulik konservering.</i>	16
<i>Figur 11: Fullt trykk ved Tuffjordbruket. Anlegget har en mottakskapasitet på 300 tonn rund fisk, noe som gir rund 60 tonn hoder</i>	17
<i>Figur 12: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torskehoder og tørrstoffinnholdet i nyprodusert hydrolysat fra hver batch ($r^2 = 0,96$).</i>	17
<i>Figur 13: Frysetørket hydrolysat. Sentrifugering av hydrolysat før tørking påvirker i stor grad fargen og opplevelsen av hydrolysatet. De lyse hydrolysatene har høyere proteininnhold, lavere fettinnhold, framstår tørrere og av høyere kvalitet. (Foto: Jannicke Fugledal Remme, SINTEF Ocean)</i>	18
<i>Figur 14: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torskehoder og proteininnholdet i frysetørket hydrolysat</i>	18
<i>Figur 15: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torskehoder og hydrolysegrad ($r^2 = 0,98$).</i>	19
<i>Figur 16: Figuren viser fettinnhold i hvert hydrolysat, samt gjennomsnittlig fettinnhold i hydrolysatene i februar, mars og mai.</i>	20
<i>Figur 17: Molekylvektsfordeling i originalt (med oppgitt hydrolysegrad i grå tekst) og sentrifugert hydrolysat etter 60 minutters hydrolyse.</i>	20
<i>Figur 18: Hydrolyse av 500 kg torskehoder vil gi rundt 50 kg tørket proteinpulver, som tilsvarer et utbytte på rundt 10 %.</i>	21
<i>Figur 19: Alternativ prosessmetode.</i>	22

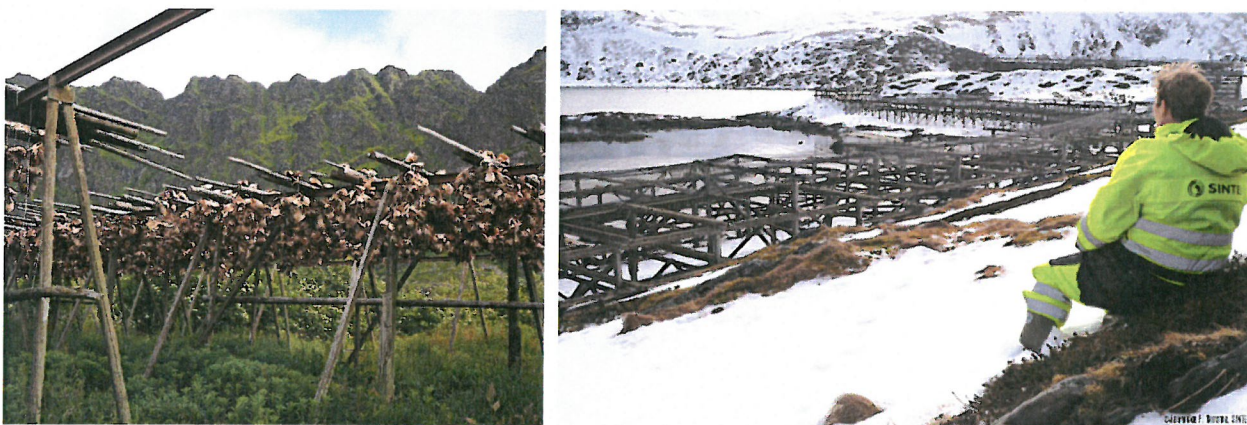
TABELLER

<i>Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over de forsøk (n=2) som er kjørt for å finne best mulig hydrolysebetingelser for torskehoder. Forsøksnavnet som er oppgitt i den første kolonnen brukes videre i figurene</i>	8
<i>Tabell 2: Betingelser for hydrolyseforsøkene som ble gjennomført ved Tuffjordbruket.</i>	9
<i>Tabell 3: Tabellen viser hvor mye konserveringsmiddel som ble tilsatt hydrolysatet.</i>	9

1 INTRODUKSJON

Befolkningsvekst og økt behov for fôr til oppdrett vil bidra til en betydelig etterspørsel etter proteiner. Markedet krever proteiner som har god smak, høy næringsverdi, tilstrekkelig holdbarhet og konkurransedyktig pris. Alt dette er innen rekkevidde for protein fra torskehoder. Produksjon av høykvalitets marine proteiner fra torskehoder kan gi økt verdiskaping og stabile marked å forholde seg til.

I Norge har vi tradisjonelt tørket og eksportert hoder fra hvitfisk. Hodene eksporteres hovedsakelig til Nigeria og delvis Asia. I 2013 eksporterte Norge 18.058 tonn sjømat verdt 370 millioner kroner til Nigeria, noe som er et kraftig fall fra 2012 da det ble eksportert 45.192 tonn, verdt 577 millioner kroner. Blant annet inkluderte eksporten 5.138 tonn tørkede fiskehoder [1]. Uro i Nigeria har ført til en kraftig reduksjon av eksporten av tørkede hode, nærmest en halvering av markedet. Samtidig har hodene også hatt et prisfall, i fjor helt ned mot 15 kr/kg (mot ca. 30 kr/kg i årene før). Tørking av hoder er en ressurskrevende produksjon mhp. tidsbruk og personell, og uforutsigbarheten i markedet har i perioder ført til store tap (Figur 1). Eksporten og lønnsomheten har tilnærmet stoppet de siste årene. Dette har bidratt til at næringen ønsker å vurdere annen utnyttelse av hodene.

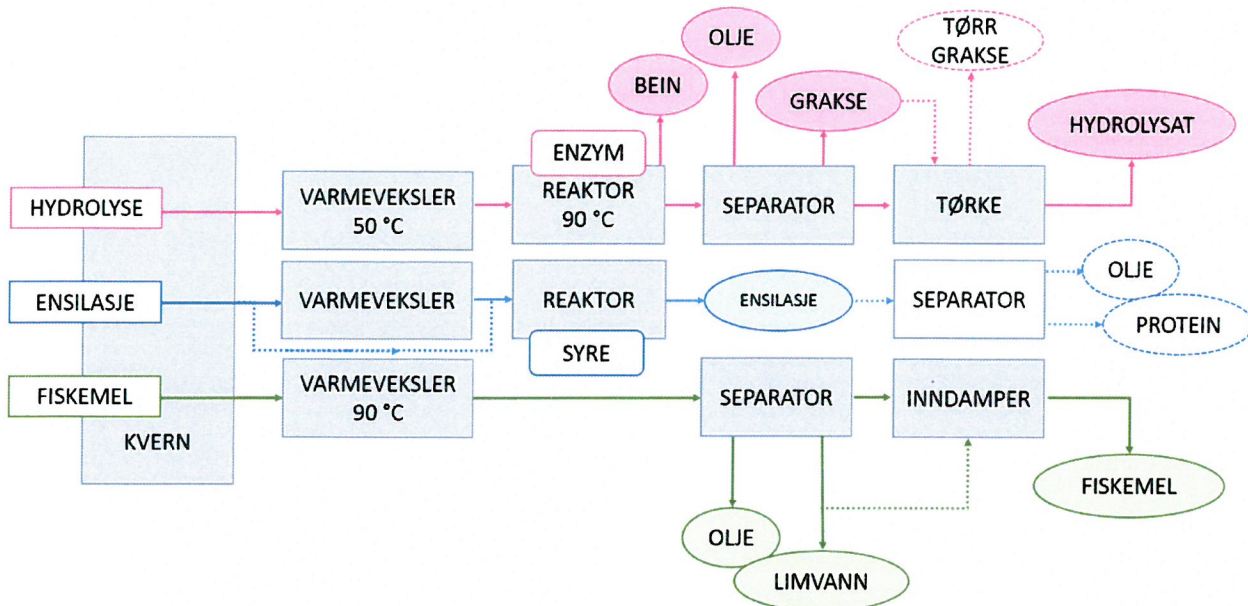


Figur 1: Det første bildet viser tradisjonell tørking av hvitfiskhoder (bildet er tatt i Lofoten). Det andre bildet viser de tomme hjeller ved Tuffjordbruket, til Fjordlaks, på Rolvsøy i Finnmark. (Foto: ©Jannicke Remme, SINTEF Ocean).

På torsken utgjør hodene rundt 20 % av vekten [2,3]. De inneholder rundt 15 % protein, en god del bein og lite fett [3]. Dette tilsvarer et teoretisk proteinutbytte på 15 %. På grunn av at byggesteinene i proteinene, aminosyrene, har ulik preferanse for vann og fett, vil det ikke være mulig å oppnå dette utbyttet. Samtidig må prosessen tilpasses slik at utbyttet blir høyest mulig, i en prosess som gir god lønnsomhet. Proteinutbytte i hydrolysatet, som er hovedproduktet fra proteinhydrolyse beskriver hvor effektiv hydrolyseprosessen er [4]. Både tilstand- og sammensetning av råstoff påvirker hydrolysen. Det er kjent at inaktivering av endogene enzymer før hydrolyse og tilsats av kommersielle enzymer gir en mer kontrollert prosess. Samtidig denaturerer proteiner ved inaktivering og er vanskeligere å hydrolysere [5,6,7].

1.1 Teknologi for utnyttelse av restråstoff

Restråstoff fra hvitfisk, som ikke selges som konsumprodukter, kan prosesseres. Prosesseringen kan være relativt enkel og rimelig, som for eksempel ensilering, eller ganske teknisk komplisert og relativt kostbar som enzymatisk hydrolyse (Figur 2). Sortering, oppmaling, tilsetning av prosesshjelpstoffer (for eksempel syre, base eller enzymer), tilsetning av vann, fraksjonering og fjerning av vann (mekanisk, inndamping, filtrering eller inndamping) inngår i prosessene. I dette prosjektet ble hydrolyse valgt som teknologi, da dette er den teknologien som er nærmest å kunne produsere proteiner som kan brukes i eller som mat.



Figur 2: Skjematisk oversikt over ulike prosesseringsmetoder for produksjon av fiskemel/olje/hydrolysat fra råstoff og restråstoff. Hydrolyseprosessen er vist i den rosa linjen, og viser produktene, bein, olje, grakse og hydrolysat. Ensilasjen følger den blå linjen. Her kan produktet være ensilasje, men også ensilasjen kan prosesseres videre til olje- og proteinprodukter. Fiskemel og –oljeproduksjon er vist i grønn linje. Her produseres olje, limvann og mel. I enkelte tilfeller dampes limvannet inn og tilsettes fiskemelet.

1.1.1 Ensilasje

Ensileringsprosessen er en enkel og billig prosess hvor restråstoff blandes med syre og massen brytes ned ved hjelp av lav pH (3,5 – 4,5), endogene enzymer og temperatur over 5 °C. Maursyre benyttes som oftest under ensilering, noe som gjør at produkter produsert ved ensilasje kun kan benyttes til fôrproduksjon. Bruk av hver enkelt syre må derfor optimaliseres med hensyn til lagringsstabilitet og mikrobiologisk kvalitet på produktet [8]. Ved bruk av eddiksyre til ensilering av restråstoff vil produktene kunne benyttes til humant konsum. Ensilasje kan videre foredles til olje og proteinprodukter.

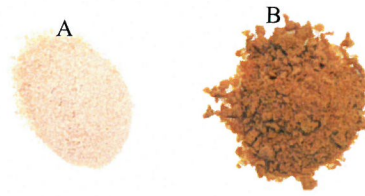
1.1.2 Termisk ekstraksjon

Tradisjonell termisk ekstraksjon har blitt brukt til produksjon av fiskemel og fiskeolje. Her varmes restråstoffet opp til rundt 90 °C, før det separeres i de tre fasene; olje, grakse og limvann. Flere havgående trålere har denne type fabrikk om bord, samt at det finnes flere landanlegg. Landanleggene har stort sett hatt fokus på pelagisk råstoff, mens på båtene er det i det siste mye hvitfisk som prosesseres. På land har limvannet ofte blitt dampet inn og tilført melet, noe som har medført høyere proteininnhold i mel fra landbedriftene. På båtene har limvannet stort sett gått rett tilbake i havet, men nyere forskning har vist at det kan inneholde bioaktive komponenter. Det er derfor også et ønske å inkludere det i melet på de havgående fartøyene.

1.1.3 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse med bruk av kommersielle enzymer er en mer avansert prosess som kan styres ved type og mengde tilsatt enzym, hydrolysetid og hydrolysetemperatur, samt mengde av tilsatt vann. Fiskeproteinhydrolysat (FPH, vannløselige komponenter), sediment (uløselige proteiner, lipider evt. bein) og fiskolje er hovedfraksjoner etter enzymatisk hydrolyse. Valg av prosess parametere og enzymer kan gjøres basert på: (1) sammensetning og kvalitet av restråstoffet og (2) krav til sluttprodukt. Selv om torsk og annen hvitfisk er magert kan en del av restråstoffet inneholde høy andel lipider. Ryggbein fra torsk har bare 0,3 % olje [9], men innmat kan inneholde 21-32 % olje [6,10]. Den store variasjon i mengde olje i restråstoffet viser at riktig teknologisk løsning må velges basert på kjemisk sammensetning og krav til sluttproduktet.

I prosjektet "Prøveproduksjon av marine proteiner fra restråstoff fra torsk", finansiert av Fjordlaks og VRI Møre og Romsdal, ble det gjennomført to prøveproduksjoner, hydrolyse av (a) torskehoder og (b) hydrolyse av torskehoder og innmat. Hydrolyse av torskehoder ga her et tørket proteinpulver med hele 81 % protein, og kun 4,5 % fett og 10,4 % aske. Bilder av proteinpulveret som ble produsert fra hode og fra hode med innmat er vist i Figur 3. Det lyse pulveret er fra torskehoder, mens det med mørkere



Figur 3: Tørket proteinhydrolysat fra (A) torskehoder og fra (B) torskehoder med innmat

farge er fra hoder med innmat. Hydrolysatet fra torskehoder hadde en lys farge og hadde en tilnærmet nøytral lukt og smak. Prosjektet konkluderer med at torskehoder er et godt råstoff for produksjon av marine proteiner tiltenkt det humane markedet. Torskehoder med innmat ga også spennende resultater, men her var proteininnholdet 60 %, fettinnholdet 20 % og askeinnholdet 10 %. Dette råstoffet vil kreve mer arbeid for å tilfredsstille krav til nøytral lukt og smak på marked for humant konsum.

Selv om det er en rekke publikasjoner på hydrolyse av fisk og restråstoff fra fisk er det ikke mange som i dag produserer fiskeproteinhydrolysat til humant konsum [11]. For vellykket industrialisering av produksjon av fiskeproteinhydrolysat må prosessen være (1) lønnsom og (2) produktet må tilfredsstille regelverk og markedskrav [12].

Fiskeproteinhydrolysat er kjent for å ha gode funksjonelle egenskaper [13, 14] og høy næringsverdi [15,16]. I tillegg til en balansert aminosyresammensetning har FPH en rekke bioaktive egenskaper som antioksidanter, senkning av blodtrykk - og immunmodulatoraktivitet. Videre er det vist at FPH kan gi lavere blodkolesterol, bedre nyrefunksjon, samt er gunstig mht. fedmerelaterte sykdommer i forhold til hjerte/karsykdommer og galleblæresykdom [17]. Det betyr at fiskeprotein ikke bare er en næringsrik og gunstig proteinkilde, men også kan ha en helsefremmende effekt.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Råstoff

2.1.1 Hydrolysebetingelser for torskehoder

Torskehoder ble sendt fra Tufjord, via Tromsø, til Trondheim i frossen tilstand i perioden 13-19.12.16. Hodene ble oppbevart på fryseler. Før hydrolyseforsøkene ble de tint på kjølerom over natt (10 timer). Hodene ble grovkuttet med kniv og kjøttøks før de ble kvernet (hullskive 10 mm). Det ble tatt ut nye prøver for hver dag hydrolyseforsøk. Alle hodene hadde tunge.

2.1.2 Pilotforsøk ved Tufjordbruket

Hydrolyseforsøkene ved Tufjordbruket ble gjennomført med 400 kg ferske torskehoder, fra torsk som var fisket og prosessert samme dag. Pga uværmeldinger ble det i et tilfelle (T3) tatt ut hoder, som ble lagret til dagen etter (ca 10 timer) før de ble hydrolysert. Alle forsøkene som ble gjennomført første og siste turen, samt forsøk T4 på turen i mars, ble gjennomført på hoder med tunge.

2.2 Hydrolysebetingelser for torskehoder

Kvernet råstoff ble blandet med vann og hydrolysereaktoren ble satt i vannbadet for valgt hydrolysetemperatur. Blandingen røres slik at hele massen beveger seg, men uten å "vispe" den opp. Når råstoffet har oppnådd hydrolysetemperaturen, tas det ut en prøve (0 min), før enzym tilsettes. Enzymene som ble undersøkt var Protamex (Pr), Papain (Pa), Bromelain (Br), Alcalase (Al), Flavorzyme (Fl) og endogene (E). Etter tilsetning av enzym fortsetter hydrolysereaksjonen i 60 minutter, med uttak av prøve også etter 30 minutter. Prøvene inaktiveres ved å raskt øke temperaturen til 90 °C i mikrobølgeovn og deretter holdes den over 90 °C i 10 minutter. Prøvene ble deretter avkjølt til under 45 °C før de ble sentrifugert ved 3000 rpm i 10 min. Hydrolysat og sediment ble separert, veid og analysert. Det ble kjørt to paralleller av hvert forsøk. En oversikt over forsøkene er vist i Tabell 1.

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over de forsøk (n=2) som er kjørt for å finne best mulig hydrolysebetingelser for torskehoder. Forsøksnavnet som er oppgitt i den første kolonnen brukes videre i figurene.

Forsøksnavn	Råstoff (kg)	Vann (kg/råstoff)	Enzymtype	Hydrolyse temperatur [°C]
E-1	1,0	1,0	E	50
P-1	1,0	1,0	Pr	50
PB-1	1,0	1,0	PaBr	50
AF-1	1,0	1,0	AlFl	50
E-0,75	1,0	0,75	E	50
P-0,75	1,0	0,75	Pr	50
PB-0,75	1,0	0,75	PaBr	50
AF-0,75	1,0	0,75	AlFl	50
E-0,5	1,0	0,5	E	50
P-0,5	1,0	0,5	Pr	50
PB-0,5	1,0	0,5	PaBr	50
AF-0,5	1,0	0,5	AlFl	50
P-0,5-46	1,0	0,5	Pr	46
P-0,5-42	1,0	0,5	Pr	42
PB-0,5-46	1,0	0,5	PaBr	46
PB-0,5-42	1,0	0,5	PaBr	42

2.3 Pilotforsøk ved Tuffjordbruket

Hydrolysetanken i Mobile Sealab ble tilsatt vann, før ferske hoder ble kvernet og pumpet inn i tanken (Tabell 2). Råstoffet og vannet ble tilført hydrolysetanken gjennom en varmeveksler (50 °C). Temperaturen i tanken var 50 °C. Under hydrolyseprosessen ble det tatt ut prøve etter 30 min og 60 minutter. Etter 60 min hydrolyse ble temperaturen økt for å inaktivere enzymene på tanken. Hydrolysat, grakse og beinfraksjonen ble veid etter hvert for forsøk.

Tabell 2: Betingelser for hydrolyseforsøkene som ble gjennomført ved Tuffjordbruket.

Forsøksnavn	Råstoff (kg)	Vann (kg/råstoff)	Enzymtype	Hydrolyse temperatur [°C]
T1	400	400	PaBr	50
T2	400	300	PaBr	50
T3	400	300	Pr	50
T4	400	300	PaBr	50
T5	400	200	PaBr	50
T6	400	100	PaBr	50
T7	400	200	Pr	50
T8	400	300	Pr	50
T9	400	200	PaBr	50
T10	400	300	PaBr	50
T11	400	300	PaBr+Natriumsulfitt	50
T12	400	300	PaBr	50
T13	400	300	PaBr + sitronsyre	50

2.4 Stabilisering

Hydrolysatet, T2, produsert ved Tuffjordbruket ble benyttet som utgangspunkt for forsøkene. Hydrolysatet ble fordelt i 2 x 8 beholdere (Tabell 3). En beholder ble brukt som kontroll, og ble ikke tilsatt noe. I seks av beholderne ble det tilsatt ulike konserveringsmidler og hydrolysatet i den siste beholderen ble inndampet, uten tilsatt konserveringsmiddel.

Vekst av mikroorganismer ble undersøkt ved to temperaturer, 4 °C og 20 °C. Det ble tatt ut prøver ved start og etter dag 1, 2, 3, 4 og 7 eller 8.

Tabell 3: Tabellen viser hvor mye konserveringsmiddel som ble tilsatt hydrolysatet.

Konservering	Prøveinnhold
Kontroll	Hydrolysat
Kaliumbenzoat	0,05%
Kaliumsorbit	0,05%
Natriumsulfitt	0,05%
Eddiksyre	10 ml kons. eddiksyre til 400g hydrolysat
Astaxantin	0,05%
Inndamping	1200 g til 330 g, temp -85-90°C, trykk 200 mbar; tid 6 timer
Sitronsyre	4 g til 400 g hydrolysat

2.5 Kjemisk sammensetning

2.5.1 Vanninnhold og tørrstoff

Vanninnholdet i prøvene ble bestemt ved å tørke homogenisert råstoff i varmeskap ved 105 °C over natten. Vann-/tørrstoffinnholdet ble beregnet som massetap etter tørking og presentert i prosent vann/tørrstoff i prøven. Resultater er presentert som gjennomsnittlige verdier fra tre eller fire paralleller med standardavvik.

2.5.2 Aske

Aske i prøvene ble bestemt ved å sette tørket prøve i varmeovn ved 600 °C i 12 timer. Aske ble beregnet som massetap og presentert i prosent aske i prøve. Resultater er presentert som gjennomsnittlige verdier fra tre-fire paralleller med standardavvik.

2.5.3 Fettinnhold

Totalt lipidinnhold ble bestemt med Bligh and Dyer-metoden [18]. Resultater er presentert som gjennomsnittlige verdier fra to paralleller med standardavvik.

2.5.4 Proteininnhold

Bestemmelse av proteininnhold ble gjort ved å benytte en CN- elementanalysator (Elemental Combustion System 4010, CHNS-O) for i første omgang å bestemme prøvens nitrogeninnhold (N). Proteinmengden i ulike konsentrater ble beregnet fra nitrogeninnholdet, der et forhold mellom mengde nitrogen og mengde protein på 6,25 ble brukt. Resultater er presentert som gjennomsnittlige verdier fra seks paralleller med standardavvik.

2.5.5 Hydrolysegrad

Hydrolysegrad refererer forholdet (%) av α -amino nitrogen i forhold til totalt nitrogen i prøven. Hydrolysegraden er analysert med formol-titrering. Analyseres med tre paralleller

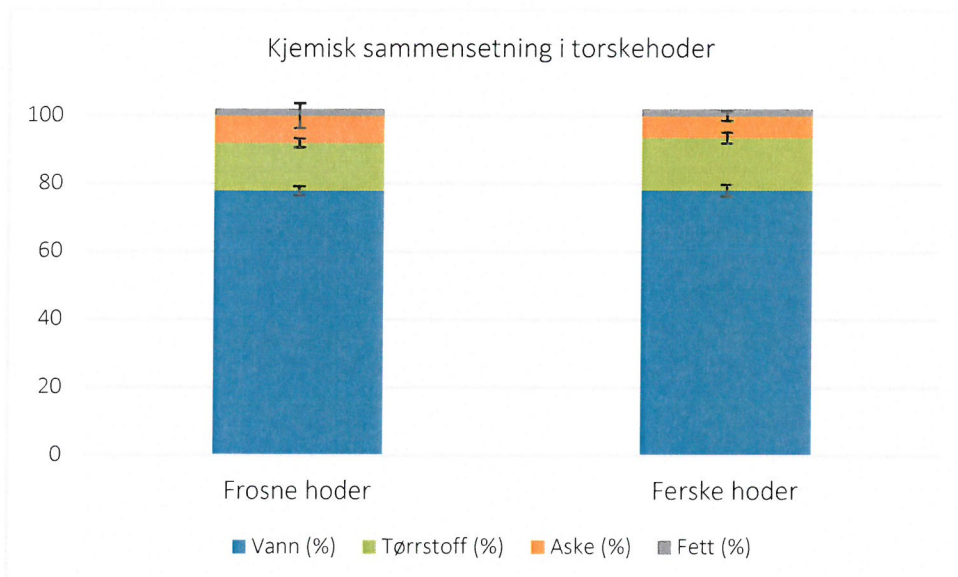
2.5.6 Molekylvektfordeling

Prøvene ble løst i vann til en konsentrasjon på ca 10 mg/ml, før de ble fortynnet til en endelig konsentrasjon på 1 mg/ml i vann. Prøvene ble analysert med en Hitachi HPLC med UV detector ved 220 nm, med en Superdex peptide 10/300 kolonne. Analysen kjøres i romtemperatur og isokratisk med 30 % acetonitril, 0.1 % TFA i vann, ved 0.3 ml/min. Prøvevolum var 50 μ l. Cytochrome C (12327 Da), aprotinin (6512 Da), insulin A (2531 Da), leucine enkepaline (555.6 Da), Val-Tyr-Val (379.5 Da) og Gly-Tyr (23822 Da) ble benyttet som standard. Regresjonslinjen for standardene var $r^2=0.960$. Kromatogrammene ble manuelt integrert. Integreringen er gjort på bakgrunn av retensjonstid.

3 RESULTATER

3.1 Råstoff

Råstoff fra frosne hoder har blitt analysert i syv uttak, mens råstoff fra ferske hoder har blitt analysert for 10 forsøk. Resultatene er oppsummert i Figur 4, og viser at den kjemiske sammensetningen i torskeshoder er svært stabil og har liten variasjon.

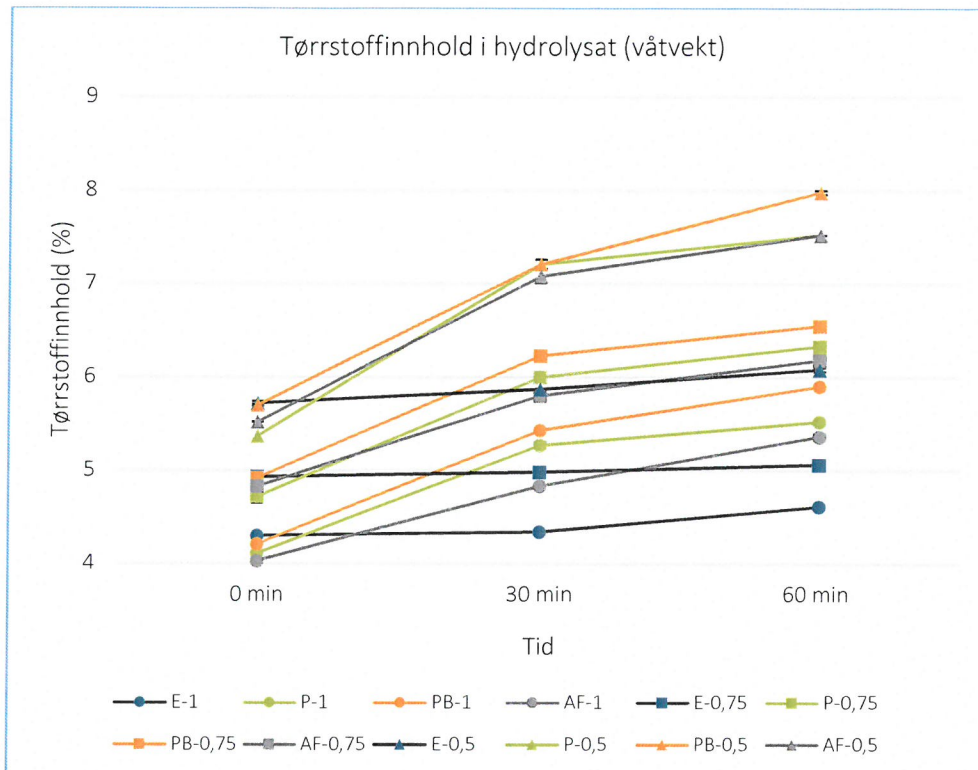


Figur 4: Figuren viser kjemisk sammensetning i frosne torskeshoder som ble brukt til labforsøk og ferske hoder som ble brukt til pilotforsøk. Det er liten forskjell i kjemisk sammensetning.

3.2 Hydrolyse av torskeshoder

3.2.1 Tørrstoff

Hydrolysatfraksjonene (våtvekt) som ble tatt ut ved separasjon av fraksjonene etter sentrifugering ble funnet og består av 92-96 % vann og 4-8 % tørrstoff (Figur 5). Fra figur 5 kan en tydelig se hvordan innholdet av tørrstoff i hydrolysatfraksjonen øker ved tilsetning av enzym. Den samme tendensen er tilstede ved tilsats av 1 kg vann, 0,75 kg vann og 0,5 kg vann til hydrolysen. Hydrolysen med kun endogene enzymer og nullprøvene holder seg på det samme nivået. Videre viser resultatene også en tydelig tendens til økende mengde av tørrstoff i hydrolysatfraksjonen for de hydrolysene hvor det ble tilsatt en redusert vannmengde.



Figur 5: Naturligvis økende tørrstoffmengde med redusert mengde vann, men legg også merke til at tørrstoffmengden øker med tiden for alle enzymer. Økningen er mindre for endogene enzymer enn for de andre enzymene.

3.2.2 Tørket hydrolysat

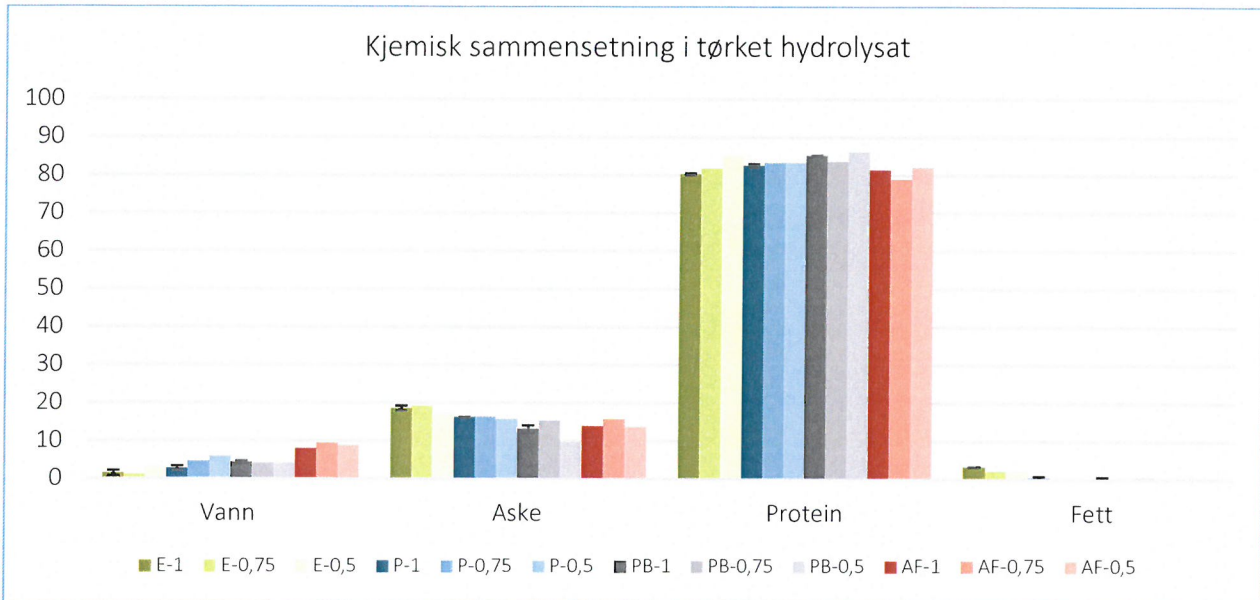
Proteininnholdet ble analysert i frysetørket hydrolysat, og ble funnet å ligge over 80 %, med få unntak. Endogene enzymer gir liten endring i proteininnholdet som funksjon av tid, og hydrolysatene som blir tatt ut ved 0, 30 og 60 minutter gir så å si det samme proteininnholdet ved hver av hydrolysene. Hydrolyse med endogene enzymer ga et proteininnhold mellom 80,2 % - 85,3 % (snitt 82,4 %). Proteininnholdet er tydelig relatert til mengde vann tilsatt under hydrolysen; jo mindre vann jo mer protein. Her bør det nevnes at det høye innholdet av proteiner i hydrolysatet ved tilsetning av 0,5 kg vann ikke kan forsvares drift teknisk, da det ble dannet en "lim" fraksjon, noe som medfører at dette ikke bør kjøres i pilotskala. Enzymene Protamex og Alcalase + Flavorzyme ga et proteininnhold på henholdsvis 79,6 % - 83,2 % (snitt 81,9 %) og 78,9-84,3 % (snitt 82,3). Enzymkombinasjonen Papain + Bromelain ga et proteininnhold mellom 80,1 % - 86,1 % (snitt 83,9), som var det hydrolysatet med høyest proteininnhold.

Askeinnholdet i frysetørkede hydrolysater ligger mellom 9,6 % og 20,1 %. Askeinnholdet varierer mellom 17,2 %- 19,6 % (snitt 18,7 %) ved bruk av endogene enzymer, 15,7 % - 20,1 % (snitt 17,6 %) ved bruk av Protamex, 9,6 % - 19,6 % (snitt 15,3 %) ved bruk av Papain + Bromelain og 13,7 % - 19,9 % (snitt 16,1 %) ved bruk av Alcalase + Flavorzyme. Av de ulike enzymkombinasjonene er det Papain + Bromelain gir det lavest askeinnhold. Resultatene tyder på at hydrolysetiden i kombinasjon med enzymkombinasjonen påvirker askeinnholdet. Prøvene før hydrolyse har et askeinnhold mellom 16,7 % - 20,1 % (snitt 18,9 %). Etter 30 minutters hydrolyse er askeinnholdet 13,8 % - 19,3 % (snitt 16,5 %) og etter 60 minutter er askeinnholdet redusert til 9,6 % - 19,1 % (snitt 15,4%).

Fettinnholdet i råstoffet var lavt, ca. 1 %. Det er også grunn til å tro at det meste av dette fett er i form av fosfolipider. Teoretisk forventes det at fosfolipider ender i sedimentfasen etter hydrolyse. Hydrolyseprosessen påvirker fettinnholdet. Fettinnholdet i tørket hydrolysat varierer fra 0,2 % til 3,2 %. For prøver som er hydrolyserte, med kommersielle enzymer, er variasjonen fra 0,2 % til 0,6 %. Hydrolyse med endogene enzymer har ikke den samme gunstige effekten på fettinnholdet som kommersielle enzymer har. Hydrolysater fra endogene enzymer har et fettinnhold på 2,1 % - 3,2 % fett etter 60 minutters hydrolyse. Alle prøvene som er kjørt med kommersielle enzymer hadde lavt fettinnhold (ca 0,2-0,6 % fett), noe som er

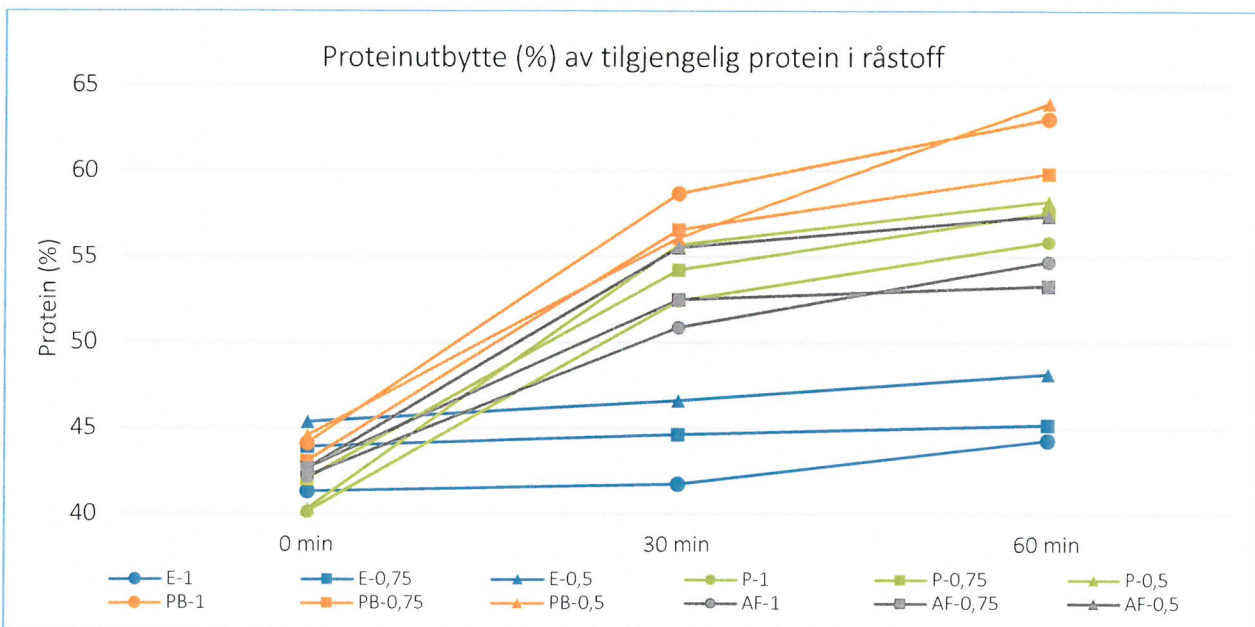
svært ønskelig med hensyn på å unngå oksidasjon av hydrolysatene. Her kan det også nevnes at det for å hindre oksidasjon av hydrolysater under lagring er anbefalt å ikke ha fettinnhold over 0,5% i hydrolysater.

Den kjemiske sammensetningen (Figur 6) av frysetørkede hydrolysater viser at hovedbestanddelen er protein, etterfulgt av aske. Innholdet av vann er lavt, men varierer med enzymene som er brukt. Fettinnholdet er klart høyere i hydrolysater fra endogene enzymer sammenlignet med de laget med kommersielle enzymer.



Figur 6: Kjemisk sammensetning av frysetørkede hydrolysater.

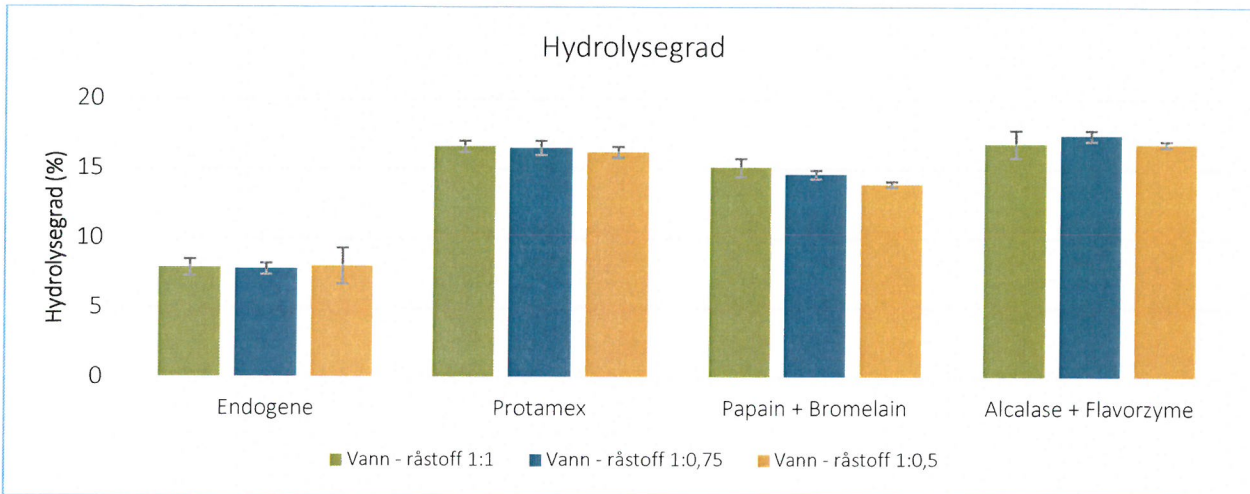
Utbytte av teoretisk tilgjengelig protein. Under hydrolyseprosessen er høyt utbytte av protein et av målene. Tørrestoffinnholdet i hydrolysatet var i stor grad påvirket av tilsatt mengde vann. Figuren under viser utbytte av protein basert på teoretisk tilgjengelig protein (Figur 7).



Figur 7: Utbytte av teoretisk tilgjengelig protein.

Hydrolysegraden er oppsummert i Figur 8. De endogene enzymene ble funnet å gi hydrolysater med lavest enzymatisk aktivitet og gav kun en liten økning i hydrolysegrad. De kommersielle enzymene har god

aktivitet, der Alcalase + Flavorzyme og Protamex gav høy og forholdsvis lik hydrolysegrad for alle uttak. Papain + Bromelain gav noe lavere hydrolysegrad.



Figur 8: Figuren viser hydrolysegraden etter hydrolyse med ulike enzymer og ulike vannmengde.

Det ble funnet å være en forholdsvis liten forskjell i hydrolysegraden basert på tilsatt vannmengde. Protamex og Papain + Bromelain gav en liten økning i hydrolysegrad med økende vannmengde, og for Alcalase + Flavorzyme var det en liten økning i hydrolysegrad for prøven med 0,75 kg vann.

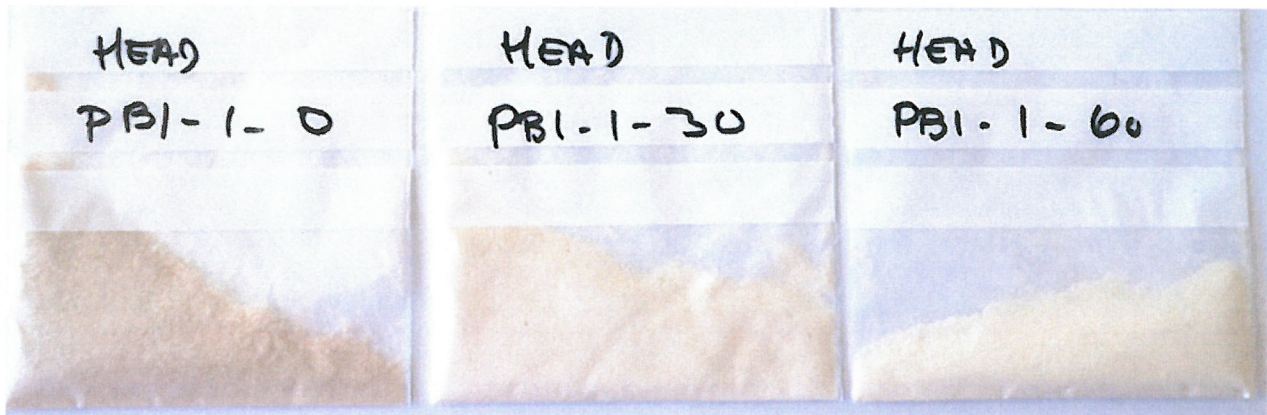
Molekylvektfordelingen viser fordeling av ulike protein og peptidfragmenter og resultatene er oppsummert i Tabell 5. Lav hydrolyseaktivitet vil gi en fordeling som viser stor andel over 20 000 Dalton. Svært effektiv hydrolyse vil vise høy andel ved lave molekylvekter (under 500 Da). Bitre peptider, som kan være en utfordring for marine proteinhydrolysater, har ofte en molekylvekt på 200-500 Dalton. Smaken påvirkes ikke kun av størrelsen, men også sammensetningen av aminosyrene i peptidene. Dette sier molekylvektfordelingen ingenting om.

Tabell 5: Molekylvektfordeling i frysetørkede hydrolysater

Område (Da)	E-1	E-0,75	E-0,5	P-1	P-0,75	P-0,5	PB-1	PB-0,75	PB-0,5	AF-1	AF-0,75	AF-0,5
>20 000	56,0 ± 6,9	60,8 ± 0,7	59,8 ± 3,5	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
15000-20000	11,2 ± 0,6	10,9 ± 0,8	11,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
10000-15000	9,8 ± 0,6	9,3 ± 0,3	9,4 ± 0,1	9,2 ± 0,0	8,3 ± 0,1	9,0 ± 0,0	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,3	11,0 ± 1,2	8,5 ± 0,0	9,6 ± 1,1
5000-10000	5,0 ± 1,3	3,9 ± 0,8	3,7 ± 0,6	23,2 ± 0,5	23,4 ± 0,9	24,1 ± 0,4	20,5 ± 0,4	19,5 ± 1,1	19,3 ± 1,3	25,5 ± 1,2	25,2 ± 0,1	25,5 ± 0,4
2000-5000	1,9 ± 1,8	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	24,4 ± 0,1	25,6 ± 0,1	24,8 ± 0,1	38,5 ± 0,9	39,0 ± 0,1	39,2 ± 0,3	25,7 ± 0,8	27,4 ± 0,1	27,6 ± 0,6
1000-2000	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,4	14,1 ± 0,2	14,7 ± 0,4	14,4 ± 0,1	19,1 ± 0,4	19,7 ± 0,5	20,0 ± 1,1	13,3 ± 0,6	14,1 ± 0,4	13,5 ± 0,4
500-1000	0,8 ± 0,9	1,0 ± 0,5	0,9 ± 0,2	10,1 ± 0,1	10,2 ± 0,1	9,6 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,4 ± 0,3	8,6 ± 0,4	6,8 ± 0,5	7,4 ± 0,1	6,6 ± 0,2
200-500	6,1 ± 1,3	5,5 ± 1,3	5,1 ± 0,8	8,5 ± 0,1	8,0 ± 0,4	8,2 ± 0,4	5,7 ± 0,3	6,2 ± 0,6	6,1 ± 0,4	7,15 ± 0,5	7,7 ± 0,4	7,5 ± 0,1
<200	9,1 ± 3,0	7,8 ± 0,9	8,1 ± 2,1	8,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2	8,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,3 ± 0,4	5,2 ± 0,0	8,25 ± 0,4	8,4 ± 0,2	8,3 ± 0,4

Forsøket viser at enzymkombinasjonen påvirker molekylvektfordelingen i mye større grad enn vanninnholdet under hydrolysen. Vannmengden har i seg selv liten påvirkning på molekylvektfordelingen. Det er forventet at ulike enzymer gir ulike enzymer, noe som bekreftes i dette forsøket. Samtidig kan mye tyde på at Protamex og Alcalase + Flavorzyme kombinasjonen gir forholdsvis lik fordeling. Hydrolyse med endogene enzymer er lite effektivt. Papain + Bromelain kombinasjonen har brutt ned alle proteiner, og har ingen fragmenter/proteiner over 15 000 dalton. Denne kombinasjonen gir også lavest andel små peptider. Vannmengden påvirker i større grad den fysiske egenskapen; viskositet.

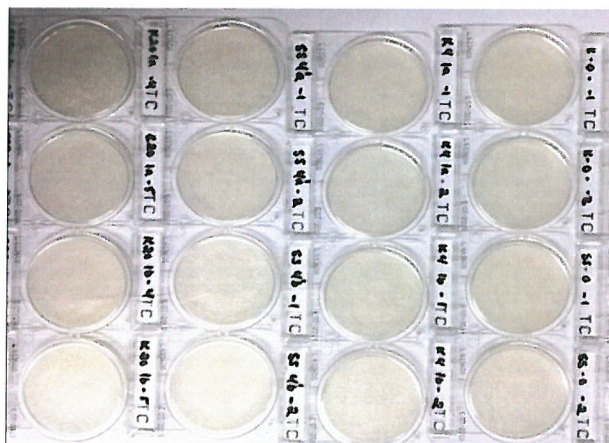
Farge. Proteiner som skal benyttes inn i markedet for humant konsum bør være lyst, i tillegg til at det bør ha en nøytral lukt og smak. Figuren under viser alle hydrolysaterne etter 60 minutters hydrolyse, i forhold til enzymkombinasjon og forholdet mellom råstoff og vann. Det er store forskjeller på farge, med en klar tendens til at proteinpulveret blir lysere med hydrolysetiden.



Løselighet i vann er en parameter som er viktig for bruksområdene til proteinhydrolysatene. Det er ikke gjort noen forsøk på dette. Noen observasjoner som ble gjort under analyse av molekylvektfordelingen er likevel verdt å nevne. Før prøvene kan analyseres løses de i 1 mg/ml vann. Alle prøver som er hydrolysert med kommersielle enzymer løste seg raskt og lett i vann. Hydrolysater basert på endogene enzymer var vanskeligere å løse, og for noen prøver ga det uklare (blakket) løsning.

3.3 Stabilitet

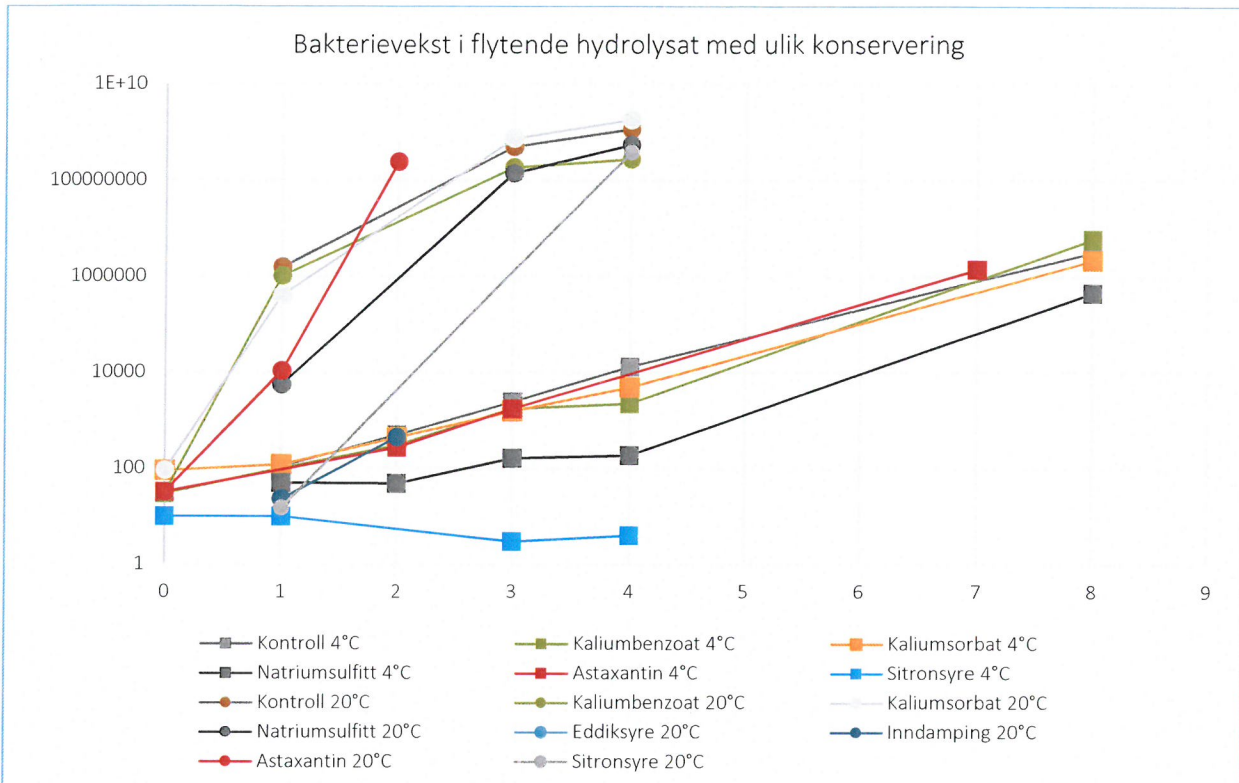
I løpet av inntil åtte dagers lagring av hydrolysat ved 4 °C og 20 °C ble det ikke funnet spor av gjær, mugg, enterobakterier, sulfittbakterier eller anaerobe bakterier (Figur 9). Det er ikke forventet at disse skal vokse i nyproduisert hydrolysat, men det er viktig også å avklare at de ikke er tilstede. Dette er bekreftet i dette studiet.



Figur 9: I løpet av inntil åtte dagers lagring av hydrolysat ved 4 °C og 20 °C ble det ikke funnet spor av gjær, mugg, enterobakterier, sulfittbakterier eller anaerobe bakterier.

I tillegg til disse ble totalkim undersøkt. Veksten av totalkim er vist i Figur 10. Inndamping og konservering ved bruk av eddiksyre ga det aller beste resultatet, og hemmet all bakterievekst, både ved 4 °C og 20 °C. Inndamping er en svært godt kjent konserveringsmetode, og benyttes både i produksjon av fiskemel og proteinhydrolysat. Det er vanlig å tørke hydrolysatene videre. Av tørketeknologier som er kjent for tørking av hydrolysat er spraytørking og mølletørking den mest brukte, men dette er et område der forskning pågår. Konservering med eddiksyre har også en svært god effekt, både ved 4 °C og 20 °C. Eddiksyre (E260) er et konserveringsmiddel som senker pH og dermed hemmer bakterievekst. Tilførsel av eddiksyre gir en pH reduksjon til under 4. Konserveringsmiddelet er ufarlig utblandet og brukes i en rekke matvarer. Det er tillatt brukt i Norge og EU. Bakdelen ved bruk av eddiksyre er nettopp at produktet blir surt, noe som ikke alle kunder ønsker. I tillegg tilføres produktet lukten av eddik.

Sitronsyre (E330) er et naturlig konserveringsmiddel som har samme virkemåte som eddiksyre. Det virker surhetsregulerende og hemmer bakterievekst ved at miljøet blir surt. Sitronsyre har også en antioksidierende og antiklumpende effekt. Sitronsyre er svært mye brukt til konservering. Ved 4 °C gir også sitronsyre en sterkt hemmet bakterievekst. Den hemmer dårligere ved 20 °C.



Figur 10: Bakterievekst ved 4 °C og 20 °C i flytende hydrolysat med ulik konservering.

Natriumsulfitt (E221) er et konserveringsmiddel som benyttes mye i EU. I tillegg til kjøling, inndamping og forsuring, har natriumsulfitt en veksthemmende effekt. Denne er tydeligst ved 4 °C. Astaxantin (E161j) er en antioksidant og et fargestoff, som har redusert aktivitet som konservering når det gjelder bakterievekst. Den tilfører også hydrolysatet rødfarge. De andre saltene som har blitt studert, kaliumsorbatt (E202) og kaliumbenzoat (E212) har liten til ingen effekt som konserveringsmiddel for flytende hydrolysat.

Den beste konserveringen oppnås med andre ord ved kjølig lagring, inndamping og tilsetning av eddiksyre. Tilsetning av sitronsyre har god effekt. Tilsetning av natriumsulfitt har noe effekt. Tilsatt konserveringsmiddel, som ikke er flyktig, vil kunne påvirke proteininnholdet i sluttproduktet. Når målet er et proteinpulver med over 90 % protein, er tilsetning av konserveringsmidler en dårlig strategi. Den beste strategien vil da være å tørke produktet.

Av de tre konserveringsmetodene som har blitt undersøkt (1) tilsetning av konserveringsmiddel i flytende hydrolysat, (2) inndamping og (3) tørking, er det helt klart ferdig tørket produkt som gir den høyeste markedsverdien. Inndamping virker godt som konservering, og kan brukes på hydrolysater som skal sendes videre til tørking et annet sted, eller selges til en lavere pris (fiskemel, lavere proteininnhold) enn tørket produkt, som halvfabrikat. Å kun basere seg på flytende hydrolysat tilsatt konserveringsmidler, anses som en dårlig strategi, som sannsynligvis vil være dårlig betalt.

3.4 Pilotforsøk ved Tufjordbruket

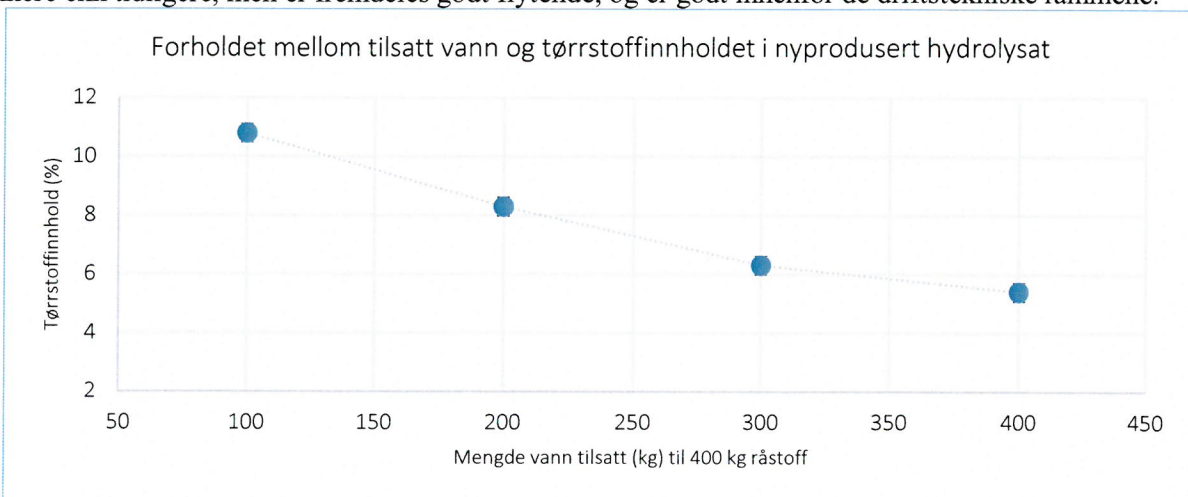
Fjordlaks ønsker å skape størst mulig verdi for virksomheten, gjennom å øke utnyttelsesgraden av restråstoff. I Fjordlaks konsernet produseres det ca. 10-14.000 tonn restråstoff (hode, innmat og rygg) fra frossen og fersk hvitfisk pr. år. Fjordlaks driver blant annet Tufjordbruket (Figur 11), lokalisert på Rolvsøya, på Finnmarkskysten. Mottaket har en kapasitet på 300 tonn rund fisk om dagen. Dette tilsvarer 60 tonn hoder om dagen når anlegget har full kapasitet.



Figur 11: Fullt trykk ved Tufjordbruket. Anlegget har en mottakskapasitet på 300 tonn rund fisk, noe som gir rund 60 tonn hoder

Tørrstoff ble målt i nyprodusert hydrolysat underveis i separasjonsprosessen, og er oppsummert i Figur 12. Det er forventet at tørrstoffinnholdet øker ved redusert vannmengde under hydrolysen, og dette stemmer også med de oppnådde resultatene. Tørrstoffet er lavest ved hydrolysen av 400 kg råstoff og 400 kg vann, der kun 5,4 % tørrstoff ble målt. Dette hydrolysatet opplevdes mer som vann under forsøket. Ved tilsetning av 300 kg vann til 400 kg råstoff er tørrstoffet $6,3 \pm 0,3$ %. Disse forsøkene er gjennomført med både Protamex og blandingen Papain + Bromelain, men det er ingen klare forskjeller i tørrstoffinnholdet basert på enzymtype. Dette hydrolysatet er også tyntflytende.

Ved tilsetning av 200 kg vann til 400 kg råstoff øker tørrstoffet til $8,3 \pm 0,2$ %. Limvannet som ble benyttet i forsøk T9 bidrar ikke til høyere tørrstoff, sammenlignet med de andre forsøkene med 200 kg vann. Forsøket med kun 100 kg tilsatt vann hadde klart det høyeste tørrstoffinnholdet (10,8 %). Dette hydrolysatet oppleves tykkere enn tidligere, men er fremdeles godt flytende, og er godt innenfor de driftstekniske rammene.



Figur 12: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torsk hoder og tørrstoffinnholdet i nyprodusert hydrolysat fra hver batch ($r^2 = 0,96$).

Tørrestoffinnholdet i hydrolysatet påvirkes i all hovedsak av vannmengden som er tilsatt under hydrolysen, og i mindre grad av enzymtype (gjelder Protamex og Papain + Bromelain) og komponenter i limvann.

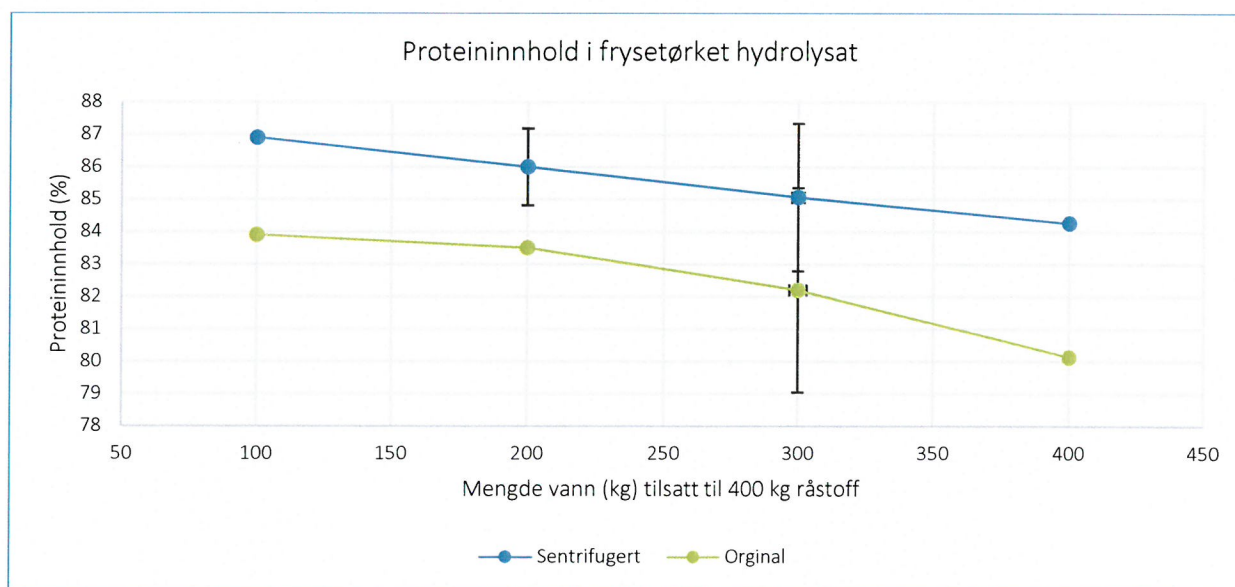
3.4.1 Tørket hydrolysat

Når hydrolysatet blir stående en stund feller vannløselige fosfolipider ut. Det anbefales at disse tas ut gjennom bedre separasjon eller et nytt trinn i en fullskala fabrikk. Ved analyse av hydrolysatene har disse forblitt i prøven (original) eller blitt sentrifugert av (sentrifugert) (Figur 13). Det er en klar fargeforskjell mellom originale og sentrifugerte tørkede hydrolysater. Sentrifugeringen fører til økt protein innhold og redusert fettinnhold.



Figur 13: Frysetørket hydrolysat. Sentrifugering av hydrolysat før tørking påvirker i stor grad fargen og opplevelsen av hydrolysatet. De lyse hydrolysatene har høyere proteininnhold, lavere fettinnhold, framstår tørrere og av høyere kvalitet. (Foto: Jannicke Fugledal Remme, SINTEF Ocean)

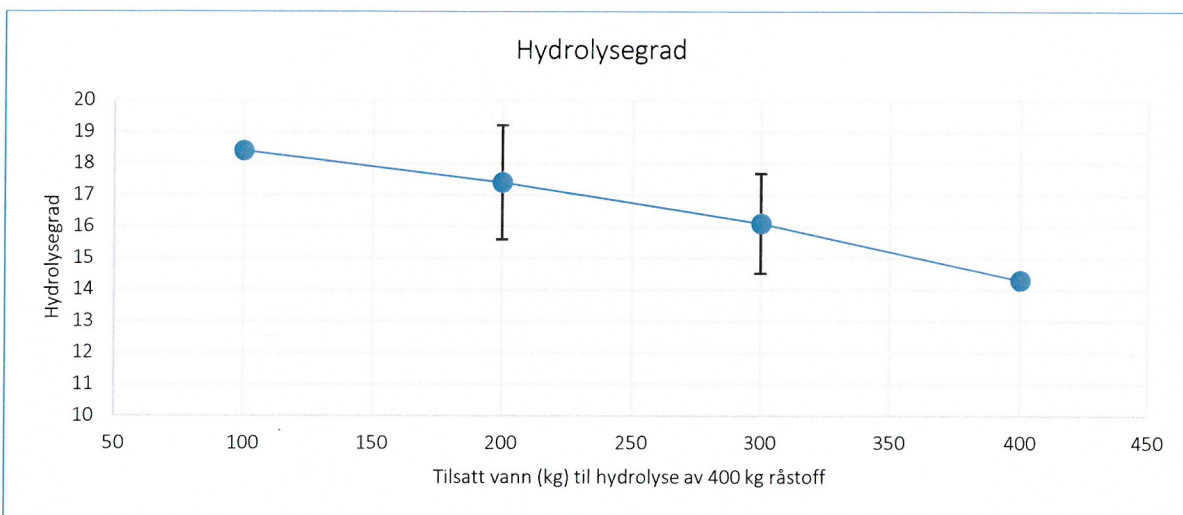
Proteininnholdet er viktig for prisen, og jo høyere innhold av protein, jo høyere pris. Proteininnholdet i frysetørkede hydrolysater er oppsummert i figur 3. Proteininnholdet varierer fra 83-86 % i de sentrifugerte prøvene (snitt $85,4 \pm 1,8$ %) og 78-86 % i originale prøver (snitt $82,5 \pm 2,6$ %) med unntak av T9 forsøket (limvann). Der er proteininnholdet 80 % i den sentrifugerte prøven og kun 71 % i den originale prøven. Resultatene fra limvannsforsøket (T9) skiller seg i stor grad fra de andre, at det er tatt ut i Figur 12. Proteininnholdet i hydrolysat er i liten grad påvirket av de typene enzym som er testet i pilotskala. Papain + Bromelain gir et proteininnhold på $84,7 \pm 3,0$ (n=6), mens Protamex gir et gjennomsnitt på $85 \pm 1,6$ % (n=3). Det er en klar tendens til at proteininnholdet øker når hydrolyseprosessen kjøres med lavere vannmengde, selv om forskjellene er små. Sammenhengen er lineær med en trendlinje med $r^2 = 0,999$ for sentrifugerte hydrolysater og $r^2 = 0,919$ for originale hydrolysater. Proteininnholdet i sentrifugerte prøver er 86,9 %, 86,0 $\pm 1,2$ %, 85,1 $\pm 2,3$ % og 84,3 % i forsøk med henholdsvis 100 kg, 200, kg, 300 kg og 400 kg vann i forhold til 400 kg råstoff.



Figur 14: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torskeshoder og proteininnholdet i frysetørket hydrolysat

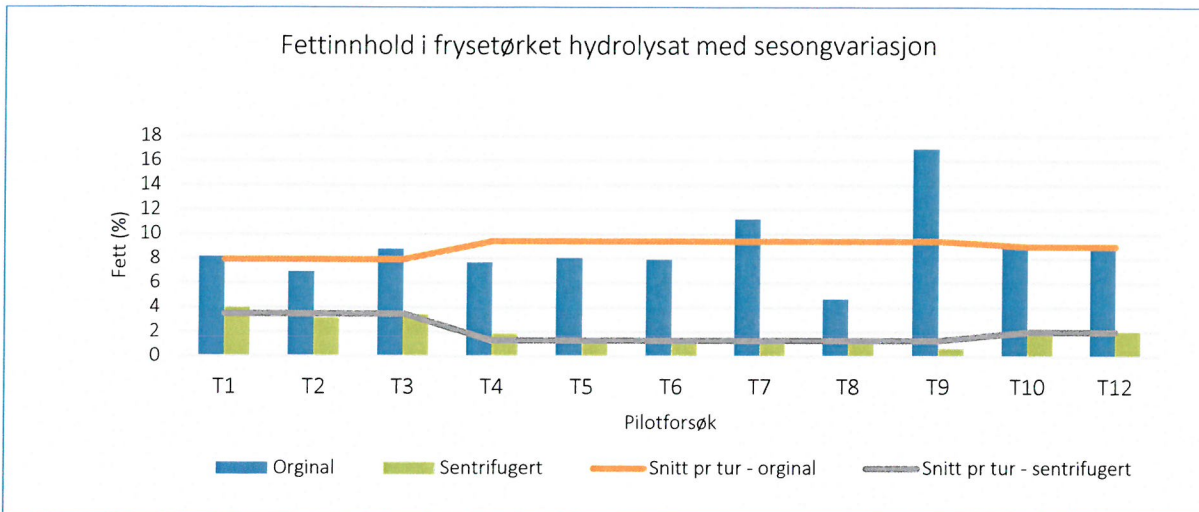
Hydrolysegraden ligger mellom 14 og 20 %, og er oppsummert i fFigur 15. Hydrolysegraden er generelt litt høyere for hydrolyse med Protamex (16,6 %, 18,7 % og 18,1 %), der 16,6 % er hydrolysegraden i forsøket som ble gjennomført med redusert enzymkonsentrasjon (0,05 % enzym pr kg råstoff). I det første forsøket med ferdig kvernedede hoder fra Tufjordbruket ble hydrolysetanken matet for raskt. Massen ble liggende i bunnen av hydrolysetanken, utilgjengelig for enzymer. Trykkluft ble tilført i bunnen av tanken, og med det løste massen seg opp.

Hydrolyseforsøkene som er gjennomført med Papain og Bromelain (hydrolysegrad; 14,3 %, 15,1 %, 14,6 %, 16,0 %, 18,4 % og 19,5 %) har lavere hydrolysegrad enn Protamex. Forsøket T9 (limvann) har høy hydrolysegrad (19,5). Det er mulig at det er proteinene i limvannet som bidrar til økt hydrolysegrad. Hydrolysegraden til selve limvannet er over 40 %. Det er en klar tendens til at hydrolysegraden også øker når hydrolyseprosessen kjøres med lavere vannmengde ($r^2 = 0,98$).



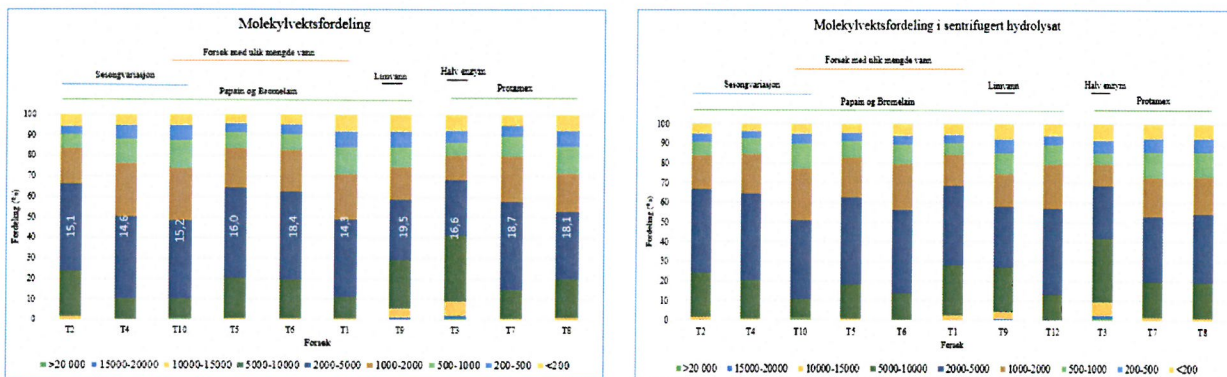
Figur 15: Figuren viser sammenhengen mellom tilsatt mengde vann under hydrolyse av 400 kg torskehoder og hydrolysegrad ($r^2 = 0,98$).

Fettinnholdet i originale hydrolysater er varierer fra 4,7 % – 11,2 % (gjennomsnittlig 8,1 %) (Figur 16). Ved å sentrifugere hydrolysaten før tørking har fettinnholdet blitt redusert til 1,2 - 3,9 % (gjennomsnittlig 2,2 %). Det antas at det er primært vannløselige fosfolipider som sentrifugeres ut. Sentrifugeringen gir ca. 6 % redusert fettinnhold. Dette vises igjen på hydrolysatet, i farge og konsistens. De sentrifugerte prøvene er ikke bare lysere, men de framstår som tørrere pulver. I forsøket med limvann fra Tufjordbruket var fettinnholdet i originalt hydrolysat hele 17 %, noe som tyder på at fett ble tilført med limvannet. Dette viste også forsøket, da det var det eneste forsøket som ga noen antydning til olje. Sentrifugering reduserer fettinnholdet til 3-4 % for prøvene i februar og 1-2 % for prøvene i mars. Fettinnholdet er dermed høyere i originale prøver i mars i forhold til februar, men det skiller lettere ut ved sentrifugering, slik at fettinnholdet i sentrifugert hydrolysat er lavere i mars enn i februar.



Figur 16: Figuren viser fettinnhold i hvert hydrolysat, samt gjennomsnittlig fettinnhold i hydrolysatene i februar, mars og mai.

Molekylvektfordelingen viser fordeling av ulike protein og peptidfragmenter. Molekylvektfordeling er analysert både i sentrifugert og originalt hydrolysat og er oppsummert i Figur 17. Lav hydrolyseaktivitet vil gi en fordeling som viser stor andel av stoffer som er over 20 000 Dalton i størrelse. Svært effektiv hydrolyse vil vise høy andel av stoffer med lavere molekylvekter (under 2000 Dalton). Bitre peptider, som kan være en utfordring for marine proteinhydrolysater, har ofte en molekylvekt på 200-500 Dalton. Molekylvektfordelingen påvirker også til en viss grad fysikalske egenskaper. Blant annet er med nedbrutte proteiner lettere å løse i vann, en viktig faktor ved videre bruk i mat og ernæring. Det er liten forskjell i molekylvektfordeling for sentrifugerte og originale hydrolysater.



Figur 17: Molekylvektfordeling i originalt (med oppgitt hydrolysegrad i grå tekst) og sentrifugert hydrolysat etter 60 minutters hydrolyse.

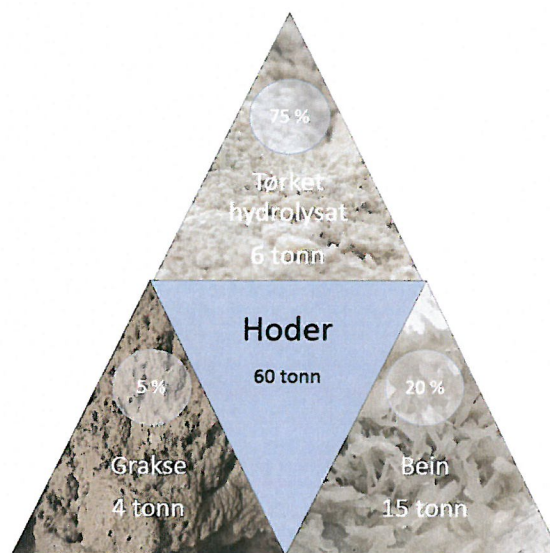
Utbytte er vist i Figur 18. Tufjordbruket har en kapasitet på 300 tonn torsk i døgnet, noe som daglig gir rundt 60 tonn hoder.

Legges betingelsene fra forsøket med lavest tilsetning av vann til grunn, med et tørrstoffinnhold på 10,8 % i hydrolysatet, vil en dagsproduksjon fra 60 tonn hoder generere rundt 4 tonn grakse og hele 15 tonn beinmasse. 56 tonn hydrolysat reduseres til rundt 6 tonn ved tørking.

Hydrolysatet er hovedproduktet og kvaliteten til dette bør prioriteres under produksjon. I tillegg vil graksen kunne tørkes og vurderes som et produkt inn i førmarkedet. Alternativt kan ekstraksjon av fosfolipider fra graksen vurderes.

Beinfraksjonen inneholder kalsium, og andre interessante mineraler. Det finnes beinmelsprodukter på markedet.

Beinfraksjonen fra hydrolyseforsøk undersøkes også som økologisk gjødsel, gjennom et samarbeid med NORSØK.



Figur 18: Hydrolyse av 500 kg torskeshoder vil gi rundt 50 kg tørket proteinpulver, som tilsvarer et utbytte på rundt 10 %.

3.5 Kvalitetskriterier for humant konsum marked

Marint råstoff kjennetegnes med å være ernæringsmessig gunstig. Forskning på EPA/DHA har pågått gjennom flere tiår og de positive effekter på menneskers helse innenfor områder som mental helse og kognitiv funksjon, hjerte/kar funksjon, håndtering av betennelses tilstander i kroppen (mage, ledd hjerne etc.), overvekt, metabolsk syndrom, allergier m.fl har blitt dokumentert i flere tusen artikler. Basert på denne forskningen har Det Europeiske Matsikkerhetsorganet (EFSA) etter strenge kriterier tillatt 5 helsepåstander knyttet til bruken av EPA/DHA. Forskning på marine proteiner og peptider bare i startfasen, og det meste av forskning har vært utført på animalske [19] og vegetabiliske [20] kilder. Marint råstoff er imidlertid en proteinkilde som har stort potensial og som også har vist seg å ha like gode eller bedre egenskaper enn andre proteinkilder [21,22]. Studier har også vist lovende effekter av marint protein og peptider på blodtryksregulering, antioksidant-effekter og beskyttende effekter på hjerte [23], i tillegg til forebyggende effekter innen diabetes, overvekt og kreft [24]. Inntak av protein har også vist å påvirke metthetsfølelse og kan være en bidragsyter til vektreduksjon [25,26]. Ulike proteinkilder kan motvirke livsstilssykdommer som høyt blodtrykk, og kan forbedre insulinresponsen og redusere triglyserider etter et fettrikt måltid [27,28]. Kvantitet og kvalitet av proteinene i maten er av betydning for deres metabolske effekter. Dette kan være relatert til strukturen og aminosyresammensetningen til proteinene. Ved å spalte proteiner ved enzymatisk hydrolyse kan mer potente metabolske forbindelser bli dannet. Økt fokus på marine proteiner har medført en økning av marine proteiner i helsekostmarkedet, da hovedsakelig produkter basert på marint kollagen.

Seagarden har et torskepulver på markedet, som selges som helsekost. Dette produktet er laget av torsk som er kokt, tørket og oppmalt. Den kjemiske sammensetningen i dette produktet (87 % protein, 9% aske/salt, 4 % fett) er svært lik den som er oppnådd i HEADS UP. Selskapet har også produkter som er smakssatt med jordbær, rabarbra og kokos. Smakstoffer som maskerer den opprinnelige smaken er også mye brukt for myse og soyaproteiner inn mot helsekostmarkedet. Her har også Firmenich et hydrolysert produkt fra torsk som er tilsatt sitron, som de senest serverte kronprinsparet under et besøk i Ålesund.

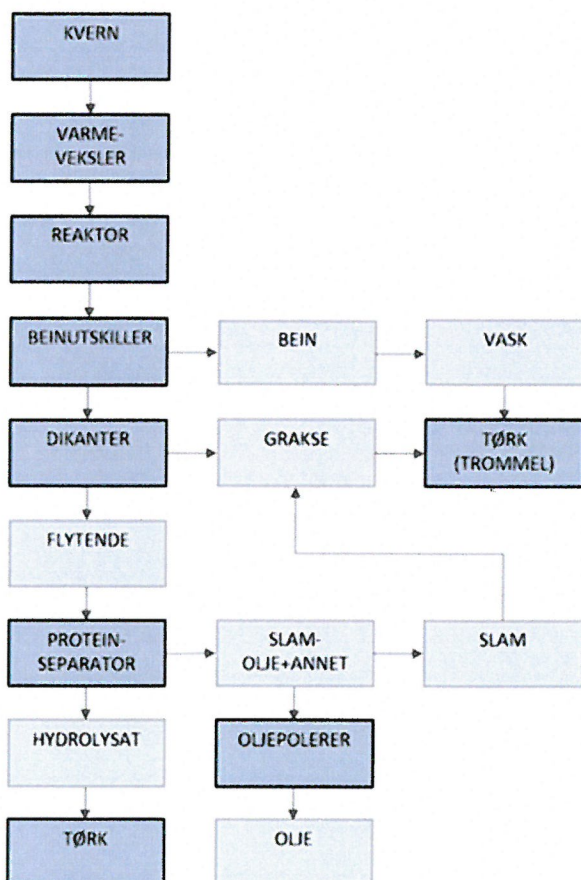
Gjennom HEADS UP prosjektet har Fjordlaks selv identifisert to utfordringer for innpass i markedet; (1) et ønske om å øke proteininnholdet til over 90 % og (2) stabilitet i over ett år. Andre ønsker og krav som har framkommet i prosjektet er at produksjonsmetoden må være godkjent, produktet er sikkert (bakteriefritt), har høy næringsverdi og er vannløselig. Vannløseligheten påvirkes av hydrolysegraden, men alle hydrolysater i HEADS UP (som er hydrolysert i 60 min med kommersielle enzymer) er vannløselige.

3.6 Konseptutvikling fullskala hydrolysefabrikk

Pilotforsøkene gjennomført ved Tufjordbruket gav et godt innblikk i muligheter og utfordringer rundt hydrolyse av torskehoder. Resultatene fra pilotforsøkene ga lovende resultater og grunn til å tro at hydrolyse kan være en aktuell prosess å oppskalere til full skala.

3.6.1 Driftstekniske konklusjoner

Den største utfordringen ved hydrolyse av torskehoder var kverning av hodene. Torskehodene har en beinmasse som kan være tøff å kverne. Den er mer solid enn hos arter som laks og pelagisk fisk. Fjordlaks har selv løst utfordringer rundt kverning og pumping av råstoff. I Mobile Sealab ble det også benyttet trikanter til separasjon. Men der er lite olje i hodene, og fra 400 kg hoder ble det ikke produsert noe olje. Ved en oppskalering kan det være at det vil bli produsert nok olje til at den bør tas med i beregningen. Et alternativ er da å vurdere dikanter med påfølgende proteinseparator (Figur 19).



Figur 19: Alternativ prosessmetode

4 DISKUSJON

I HEADS UP prosjektet ble hydrolyse valgt som produksjonsmetode for å oppnå best mulig kvalitet på proteinpulveret. Hydrolyse bryter opprinnelige proteiner ned i mindre deler, slik at utbyttet av vannløslige proteiner øker. Prosessen kan ivareta de fysikalsk-kjemiske, funksjonelle, sensoriske og ernæringsmessige egenskapene til det opprinnelige proteinet. Det ble gjennomført hydrolyseforsøk med både kommersielle og endogene enzymer. Torskehodene inneholder antagelig lite egne nedbrytningsenzymer, og forsøk med endogene enzymer fra torskehodene ga dårligere utbytte enn de kommersielle enzymene. Forsøkene viser også at bruk av kommersielle enzymer gir god kontroll over prosessen og enzymene styrer i stor grad egenskapene til produktene som dannes.

Mengde av tilsatt vann er en faktor som spiller en viktig rolle for både hydrolyseprosessen og egenskapene til sluttproduktet. Mindre vann krever mindre energi til oppvarming, inaktivering og vannfjerning, men viskositeten på hydrolysatet må være på et nivå som sikrer at enzymer kan fordeles jevnt i råstoffet, samt at blandingen er homogen og pumpbar både før og etter hydrolyse. [6,7]. For lite vann kan også redusere utbytte av hydrolysat da andelen av små peptider øker og kan bremse reaksjonshastighet [5]. Effekten av tilsatt vann vil også variere med den kjemiske sammensetningen til råstoffet. Torskehodene "slapp" raskt en del vann selv, og det er derfor av økende interesse å studere hvor lite vann som kan tilsettes ved hydrolyse av hodene.

Farge og smak er viktig når FPH brukes som ingredienser i mat, helsekost og farmasøytiske produkter, som er de markedene HEADS UP prosjektet har hatt mål om å nå. Smak og tilstrekkelig holdbarhet er en utfordring. FPH har ofte bitter smak [29] og uønsket fiskelukt og –smak [30,31]. Prosjektet har vist at råstoffets sammensetning [29], ferskhetsgrad, samt prosessbetingelser påvirker de sensoriske egenskapene, men at det antagelig er de kommersielle enzymene som i størst grad påvirker de sensoriske egenskapene til hydrolysatene. I HEADS UP oppleves hydrolysatet hydrolysert med enzymkombinasjonen papain + bromelain som mildere på smak og uten den klassiske bitre ettersmaken. I tillegg til smak er de funksjonelle egenskapene til fiskeproteinhydrolysatene viktige, om de skal brukes som ingredienser i næringsmidler eller i sport- og helsekost. Viktige funksjonelle egenskaper er; løselighet, vannbindingsevne samt evne til å stabilisere skum og emulsjoner. Alle hydrolysatene basert på kommersielle enzymer, var vannløselige.

Fiskemel eller andre proteinprodukter av fisk inneholder en viss mengde lipider (fettstoffer), og er utsatt for oksidasjon (harskning), noe som kan føre til kvalitetsforringelse i form av lite attraktiv smak. Lipidoksidasjon gir oftest smakskomponenter med sterk karakteristisk smak og oppfattes negativt av forbruker. Dersom produktene skal benyttes i applikasjoner for direkte humant konsum, må fettinnholdet reduseres til et minimum. Ved å hydrolysere råstoffet kan man oppnå en større grad av separasjon av lipider fra proteinfasen. Dette vil følgelig gi produkter som er mindre utsatt for oksidasjon, og dermed kunne gi en bedre sensorisk forbrukeropplevelse. Det er ikke bare oksiderte lipider som gir dårlig smak til produktene. Smaksreseptorer i munnhulen påvirkes også av aminosyrene i maten. For å unngå peptider (kortere kjeder av aminosyrer) som gir bitter smak er det viktig å kontrollere hydrolysegraden og å velge rett type enzymer. I tillegg har utvikling av dårlig lukt og smak sammenheng med dannelse av andre kjemiske forbindelser, blant annet trimetylamin (TMA).

Ytterligere prosessstrinn etter hydrolyse som filtrering, fraksjonering, bleking, avfetting og behandling med trekull øker de totale prosesskostnadene og prisen på sluttproduktet. Det er viktig å vurdere hvilke prosessstrinn som er nødvendig med hensyn til pris, kvalitet og produktegenskaper. Stabilisering av FPH er imidlertid et prosessstrinn som må utføres for å sikre produktstabilitet ved lagring og videre bruk. Dette kan gjøres ved oppkonsentrering av hydrolysatet, pH-reduksjon (ved tilsetning av syrer) eller tørking. Fjerning av vann i hydrolysatet utføres på forskjellige måter og de mest vanlige er: mekanisk separasjon (sentrifugering), molekylær separasjon (filtrering), inndamping og tørking. For hver av disse teknologiene fins det flere forskjellige løsninger. Med hensyn til energieffektivitet og investeringsbehov er det som regel en kombinasjon av ulike avvanningsteknologier som vil være det optimale. Ved hydrolyse av fiskeprotein tilsettes vann. For at hydrolysatet skal stabiliseres må vann fjernes og hydrolysatet oppkonsentreres til 40-

60 % tørrstoff eller tørkes. Dette er energikrevende prosesser som krever investeringer i riktig og optimalisert prosessutstyr. Valg av riktig totalløsning avhenger også av hydrolysatets sammensetning slik som fettinnhold, nivå av emulsjon, hydrolysegrad etc. Det er også utviklet en ny teknologi for produksjon av smaksnøytrale proteiner fra marint restråstoff [30,31].

Spraytørring er den vanligste tørkemethoden som brukes industriell for tørring av FPH konsentrat [12,32], mens vakuum frysetørring blir benyttet ved hydrolyseforsøk i lab skala [10,11,33]. Det er vist at tørkemethoden påvirker de fysiske-kjemiske og funksjonelle egenskaper, samt oksidasjon av lipider i hydrolysat [34]. Dette arbeidet viste at vakuumfrysetørket FPH hadde de beste fettabsorberende egenskapene, mens spraytørket FPH ga best skummeegenskaper. Spraytørring ga FPH pulver med mindre oksidert olje sammenlignet med vakuumfrysetørket FPH. Nye tørketeknologier for FPH bør videre studeres, og bør inkludere post combustion tørring og tørring med overhettete damp og med modifisert atmosfære.

Den uoppløselige fraksjonen (sedimentfraksjonen) etter hydrolyse av torskeshoder er en næringsrik fraksjon rik på essensielle aminosyrer [16] og på marine fosfolipider [6,35,36]. Ved hydrolyse av torskeshoder er denne fraksjonen relativt liten, men i løpet av en sesong vil det produseres store volum. Fraksjonen kan tørkes, f. eks i trommel, og benyttes inn mot fiskefôr/dyrefôr markedet.

Det spesielle ved hydrolyse av torskeshoder er også den store beinfraksjonen som dannes etter hydrolysen. Rundt 25 % av sluttproduktet er bein, en betydelig mengde i løpet av en sesong. Gjennom prosjektet HEADS UP er det knyttet kontakt til NORSØK (norsk senter for økologisk landbruk) i forbindelse med utnyttelse av beinfraksjonen. Møre og Romsdal Fylkeskommune finansierer et stipendiat (RESTORE) der beinmassen etter hydrolyse av torskeshoder skal uttestes som innsatsfaktor i økologisk gjødsel.

5 KONKLUSJON

Marine proteiner hydrolysert fra torskehoder har et proteininnhold og en kvalitet som gjør de godt egnet som matingrediens. Proteinene kan også ha en god framtid som helsekost og sportsernæring. Markedet krever proteiner som har god smak, høy næringsverdi, tilstrekkelig holdbarhet og konkurransedyktig pris. Dette kan protein fra torskehoder levere. Tradisjonelt har torskehoder blitt hengt, tørket og eksportert til Nigeria/Asia. Dette er en ressurskrevende produksjon mtp. tidsbruk og personell, og uforutsigbarhet i markedet har i perioder ført til store tap. Hydrolyse er en lovende teknologi for produksjon av marine proteiner med høy kvalitet. Proteinhydrolysater fra torskehoder har et proteininnhold og en kvalitet som overgår tradisjonelle fiskemel, og som derfor har større aktualitet inn mot humant konsum markeder. Prosjektet HEADS UP har studert alternativt bruk av torskehoder, med fokus på produksjon av kvalitetsprotein.

I prosjektet HEADS UP har det blitt gjennomført 32 hydrolyseforsøk for å finne de beste **hydrolysebetingelsene for torskehoder** og for å undersøke hvordan ulike prosessparametere som enzym, tid, temperatur og mengde tilsatt vann påvirker utbytte og kvalitet av marine proteiner. Av produksjonsbetingelser er det enzymtype som har størst påvirkning på utbytte, lukt og smak, mens vannmengden tilsatt i liten grad påvirker utbytte og kjemisk sammensetning. Enzymkombinasjonen Papain og Bromelain ga høyest utbytte, høyest proteininnhold (84-86 %), hvitest hydrolysat og mildest smak. Hydrolysater konserveres best ved tørking, alternativt ved inndamping. Stabilisering av hydrolysater ved tilsetning av antioksidanter bør vurderes grundig, da ikke flyktige antioksidanter vil kunne bidra til å redusere proteininnholdet i sluttproduktet.

Pilotproduksjon ved Tuffjordbruket ga en god innføring i fordeler og ulemper ved hydrolyse av torskehoder. Førsteklasses råstoff, rett fra noen av Norges beste fiskefelt, ble hydrolysert, fordelt på tre perioder i torskesesongen. Forsøkene viste at sesongvariasjon har liten påvirkning på kjemisk sammensetning av hydrolysater. I pilotskala var det også Papain + Bromelain som ga de beste hydrolysater. Forsøk med redusert mengde vann, i forhold til råstoff, viste at dette, noe overraskende, ga økt proteinutbytte. I prosjektet ble det gjennomført et hydrolyseforsøk der vann ble erstattet med limvann fra oljefabrikken, i lys av bærekraft og mål om økt utnyttelse og utbytte. Hydrolysatet fra dette forsøket ble derimot ikke bra, og det konkluderes med at limvann fra oljefabrikken bør ikke benyttes i hydrolyseprosessen. Utbytte av proteinpulver fra torskehoder (våt vekt) er på rundt 10 %.

Markedskrav til **marine proteiner for humant konsum** har blitt undersøkt i prosjektet. Utfordringene er hovedsakelig lukt, smak og stabilitet. Framstillingsmåten for proteinene må godkjennes. Utover dette er det ønsket at proteininnholdet er over 90 %, at salt og fettinnholdet er lavest mulig og at produktet er vannløselig og stabilt i minst ett, helst to år. Marine proteiner og peptider har i studier vist lovende effekter på blodtryksregulering, antioksidant-effekter og beskyttende effekter på hjerte, i tillegg til forebyggende effekter innen diabetes, overvekt og kreft. Inntak av protein har også vist å påvirke metthetsfølelse og kan være en bidragsyter til vektreduksjon. Dette har medført at produkter med marine proteiner allerede er introdusert i helsekost og sportsernæringsmarkedet.

De største **driftstekniske utfordringene** ved hydrolyse av torskehoder er (1) kverning av hoder, (2) pumping av kvernet råstoff, (3) beinmasse igjen i tanken etter batch hydrolyse, (4) inaktiveringsreaksjonen og (5) reduksjon av fett/salt og smak i sluttproduktet. De to første problemene har Fjordlaks allerede en løsning på. Kverning og pumping av torskehoder må løses med riktig kapasitet på kvern/rør. Hydrolysetanken bør utformes med tanke på at det produseres en betydelig beinfraksjon. Før tørking bør et separasjonstrinn som øker proteininnhold og reduserer fett og salt vurderes. Prosjektet har vist at vi hydrolyse er en prosess som kan kjøres ved Tuffjordbruket.

6 REFERANSER

1. Kystmagasinet, 10.04.14
2. Cod, <http://www.fao.org>
3. Iren stiknes hoder
4. Mohr, V. (1980). Enzymes technology in the meat and fisheries industries. *Process Biochemistry*, 15 (6), 18-21,32
5. Mohr, V. (1977). Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. Paper presented at the FEBS Federation of European Biochemical Societies 11th Meeting, Copenhagen.
6. Slizyte, R., Rustad, T., & Storro, I. (2005). Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products - Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40(12), 3680-3692.
7. Šližytė, R., Van Nguyen, J., Rustad, T., & Storrø, I. (2004). Hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: influence of initial heat inactivation, concentration and separation conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13 (2), 31-48.
8. RUBIN. (1993). *Håndbok i ensilering*.
9. Gildberg, A., Arnesen, J. A., & Carlehog, M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochemistry*, 38(4), 475-480.
10. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., & Rustad, T. (2005b). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1415-1424.
11. Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000a). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657-666.
12. Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000b). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81.
13. Shahidi, Han & Synowiecki (1995). Production and characterisation of protein hydrolysates from capelin (*mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53 (3), 285-293.
14. Kristinsson, H. G. (2007). Aquatic food protein hydrolysates In F. Shahidi (Ed.), *Maximising the Value of Marine By-Products*: Woodhead Publishing Ltd
15. Shahidi, Wanasundara. (1995) Effect of natural antioxidants on the stability of canola oil. *Developments in Food Science*, 37, 469-479
16. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., & Rustad, T. (2005a). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021-2033.
17. RUBIN. (2008). Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av proteinhydrolysat av laks.
19. Lafarga, T. 2016 "Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: overcoming current challenges." *Food Reviews International*, 9129 (September)
20. Foschia, M. et al. 2017 "Legumes as Functional Ingredients in Gluten-Free Bakery and Pasta Products." *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 75–96.
21. Venkatesan, J. et al. 2017 "Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review." *Marine Drugs*, 15(6), 143
22. Hayes, M. (2013). "Biological Activities of Proteins and Marine-derived Peptides from Byproducts and Seaweeds." In *Marine Proteins and Peptides* (pp. 139–165). John Wiley & Sons, Ltd.
23. Jensen, I. et al. "Preclinical and Clinical Studies on Antioxidative, Antihypertensive and Cardioprotective Effect of Marine Proteins and Peptides-A Review." *Mar. Drugs* 2016, 14, E212.
24. Kim, SK., et al. 2013 "Bioactive Proteins and Peptides from Macroalgae, Fish, Shellfish and Marine Processing Waste." Chapter 2 in *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*.
25. Veldhorst, M. et al. 2008 "Protein-induced satiety; effects and mechanisms of different proteins." *Physiol Behav*, 94 (2), 300-7.

26. Westrerp-Platenga, M.S. et al. "High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans." *Int. J. Obes Relat Metab Disord* , 28 (1), 57-64.
27. Bougle, D. et al. 2017. "Dietary bioactive peptides: Human Studies." *Crit Rev Food Sci Nutr* 57 (2), 335-343.
28. Bohl, M., et al. 2015. "Dairy proteins, dairy lipids, and postprandial lipemia in persons with abdominal obesity (DairyHealth); a 12 wk, randomized, parallel –controlled, double –blinded, diet intervention study." *Am J, Clin. Nutr.* , 101 (4) 870-8.
29. Dauksas, E., Slizyte, R., Rustad, T., & Storro, I. (2004). Bitterness in fish protein hydrolysates and methods for removal. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2), 101-114.
30. Mozuraityte, R., Grimsmo, L., & Storrø, I. (2012). Proteins with neutral taste from salmon backbones (SINTEF rapport A23364): SINTEF
31. Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Nalinanon, S., & Kristinsson, H. G. (2012). Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chemistry*, 132(4), 1781-1788.
32. Gildberg, A. (1993). Enzymatic Processing of Marine Raw-Materials. *Process Biochemistry*, 28(1), 1-15.
33. Jeon, Y. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2000). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.
34. Šližytė, R., Alves-Filho, O., Falch, E., & Rustad, T. (2003, June 25-27th, 2003). The influence of drying processes on functional properties of fish protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) by-products. Paper presented at the 2nd Nordic Drying Conference, Copenhagen, Denmark.
35. Carvajal, A. K., Šližytė, R., Storrø, I., & Aursand, M. (2014). Production of high quality fish oil by thermal treatment and enzymatic hydrolysis from fresh Norwegian spring spawning herring by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology* in press.
36. Dauksas, E., Falch, E., Slizyte, R., & Rustad, T. (2005). Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(8), 2659-2670.