

## **Enzymatisk hydrolyse av kollagenproteiner i fiskebein – hvordan skape verdier av problemavfall**

Sissel Albrektsen og Tone Aspevik





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sundalsøra:**

Sjølseng  
NO-6600 Sunndalsøra

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835**

# Rapport

	ISBN: 978-82-8296-375-5 (trykt) ISBN: 978-82-8296-376-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> <b>Enzymatisk hydrolyse av kollagenproteiner i fiskebein – hvordan skape verdier av problemavfall</b>	<i>Rapportnr.:</i> 17/2016
	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Sissel Albrektsen og Tone Aspevik	<i>Dato:</i> 7. april 2016
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 13
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900558
<i>Stikkord:</i> Fiskeavskjær, fiskebein, sild, enzymatisk hydrolyse, kollagenprotein	<i>Prosjektnr.:</i> 11556
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Det er stor interesse for anvendelse av kollagenproteiner innenfor kosmetisk industri, i kosttilskudd, til produksjon av gelatin (tekniske formål), og til bruk i legemiddel/medisinsk industri. Kollagen i intakt form består av en trippelhelikskjede av lange peptider som er lite fordøyelig (60%). Det er mulig å øke ernæringsmessig kvalitet av kollagen ved å denaturere peptidkjedene (varmebehandling) eller ved å bryte ned proteinkjedene til mindre peptider (enzymbehandling). Målet med dette prosjektet var å vurdere egnethet av to ulike enzymer for produksjon av hydrolysert kollagen fra fiskebein.</p> <p>Dette prosjektet brukte fiskebein fra sild, framstilt i en prosess som inkluderte demineralisering (ved syrehydrolyse), avfetting og vasking, før enzymatisk hydrolyse av kollagenprotein. I laboratorieforsøk (200 g kollagenpulver), ble det testet to ulike enzymer (Promod 144P, Promod 192P) ved to pH nivå (pH=3; pH=5). Basert på N-utbytte, aminosyresammensetting og molekylvektfordeling av peptider, viste forsøket at hydrolyse med Promod144P (pH=5) var mest effektiv for å oppnå høy hydrolysegrad av kollagenproteiner i bein (&gt; 60% N-utbytte). Hydrolyse ved pH=3 ga lavere utbytte for begge enzymer (≈50 %). Bestemmelse av hydrolysegrad ved OPA metoden ga unøyaktige svar og ble vurdert som ikke egnet for bestemmelse av hydrolysegrad for kollagen. Det ble oppskalert til produksjon av 2 kg porsjoner av kollagenprotein basert på Promod144P, pH=5. Beregnet N-utbytte for kollagenprotein var høyt, og indikerte at 75– 80 % av intakt kollagenprotein ble brutt ned til vannløselige proteiner. Spraytørket sluttprodukt inneholdt 80,1 % protein (N x 6,25), og kan ansees som et proteinkonsentrat. Aminosyresammensettingen var karakteristisk for beinkollagen med høyt innhold av Gly (17,1 %), Glut (7,5%), Pro (7,5%), Ala (5,9%), Arg (5,9%) og Asp (4,8%), mens nivået av Hyp var lavt (0,1%), mest sannsynlig av analytiske grunner.</p> <p>Intakt kollagenprotein er lite fordøyelig, og det har vært ønskelig å teste effekter av hydrolyseprosessen på fordøyelighet av kollagenproteiner. Det ble testet 3 kollagen-ingredienser basert på A) Ubehandlet kollagen fra sildebein (restprotein i bein etter syrehydrolyse); B) Varmebehandlet kollagen fra sildebein (120 °C/60min i autoklav); og C) Enzymbehandlet kollagen fra sildebein (Promod 144P, pH=5). Resultatene viste at enzymatisk behandling effektivt brøt ned store peptider i intakt kollagen til mindre peptider og frie aminosyrer (&lt; 10.000 Da). Effekter på fordøyelighet av protein lot seg ikke gjennomføre fordi forsøksdyrene (mink) fikk diare. Mulige årsaker til dette må undersøkes.</p> <p><b>Hovedkonklusjonen</b> er at prosessen for enzymbehandling av sildebein kan gjennomføres med høyt N utbytte, og at det er mulig å produsere et proteinkonsentrat fra fiskebeinråstoffet som gjenstår etter demineralisering med en sterk syre. Det er behov for å evaluere effekter av ulike enzymer med hensyn til utbytte og kostnadseffektivitet, samt for å kartlegge bioaktivitet av peptider i proteinkonsentratet. Prosjektaktiviteten vil bli videreført i RFFVest prosjekt 256952 (2016–2018), «Verdiskaping av næringsstoffer i laksebein».</p>	

## **Innhold**

<b>1</b>	<b>Bakgrunn og mål .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Prosjektorganisering .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Material og metoder .....</b>	<b>3</b>
3.1	Behandling av sildebein.....	3
3.2	Laboratorieforsøk - enzymbehandling .....	3
3.3	Pilotforsøk – oppskalering og analyse .....	3
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>4</b>
4.1	Laboratorieforsøk (200 g kollagenprotein) – protein (N) utbytte .....	4
4.2	Analyse av aminosyrer, størrelsesfordeling av peptider og hydrolysegrad .....	5
4.3	Pilotforsøk - oppskalering (2000 g kollagenprotein) og analyse .....	7
4.4	Proteinfordøyelighet i mink.....	10
<b>5</b>	<b>Diskusjon og konklusjon .....</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>12</b>

# 1 Bakgrunn og mål

Hode- og ryggavskjær fra sild inneholder mye bein, anslagsvis 15 – 20 % som til dels har vært betraktet som problemavfall. Sildebein består av viktige næringsstoffer, som proteiner (35-40 %), mineraler (28-30 %), og fett (28-34 %). Nofima har utviklet en prosess for å frigjøre fosfor (P) i bein fra kolmule (Albrektsen et al., 2010, 2013; Nygård et al., 2010) og sild (Albrektsen et al., 2014a) basert på hydrolyse i en sterk syre. Det er vist at det er mulig å frigjøre, utnytte og resirkulere P i fiskebein og det er produsert nye P-rike ingredienser (Albrektsen et al., 2014a). Fosfor i de nye ingrediensene blir effektivt tatt opp og utnyttet i laks på ulike livsstadier (Albrektsen et al., 2013, 2016; Ytteborg et al., 2016).

Etter demineralisering og avfetting av fiskebein sitter man igjen med store mengder kollagenproteiner. Kollagen er det viktigste proteinet i bindevevet hos mennesker og dyr. Ved oralt inntak brytes kollagenprotein ned til mindre peptider og aminosyrer som absorberes og brukes til å opprettholde brusk, bindevev og beinvev. Kliniske undersøkelser har rapportert om positive virkninger av hydrolysert kollagen som et middel for å redusere/forebygge aktivitetsrelaterte leddsmerter, og for å øke beintetthet (Mohammad et al., 2014). Ulike kollagenprodukter brukes i dag innenfor kosmetisk industri og som kosttilskudd for å stimulere kollagenproduksjon og redusere rynker («anti-aging»). Vitenskapelig dokumentasjon som kan underbygge slike virkninger er mangelfull. Kollagenprotein hentes som oftest fra dyr, fisk eller kylling, og utvinnes enten i hel form (udenaturert) eller i nedbrutt form ved hjelp av en hydrolyseprosess. Hydrolysert kollagenprotein kan være lettere fordøyelig og ha bedre funksjonelle egenskaper enn intakt kollagenprotein.

Kollagenproteiner har en ubalansert sammensetting av essensielle aminosyrer, bl.a er Trp ikke tilstede, og lav proteinfordøyelighet (≈60%). Kollagenproteiner inneholder høye nivåer av flere ikke-essensielle aminosyrer, som Gly, Pro, Hyp, Glut, Arg og Ala. Noen av disse aminosyrene synes å påvirke vekst og muskelkvalitet i laks (Aksnes et al., 2008; Albrektsen et al., 2010, 2014b; Larsson et al., 2014), til tross for at de ikke er essensielle. Funksjonelle egenskaper og betydning av ikke-essensielle aminosyrer i kommersielle planteproteinrike fôr til laks er et fagfelt som er lite studert.

Det er ønskelig å vurdere nye produktmuligheter fra kollagen i fiskebein. Det er allerede gjennomført forsøk med varmebehandling der sammenhenger mellom tid, temperatur og frigjøring av kollagenprotein fra fiskebein er undersøkt (Nygård, 2009). Varmebehandling av kollagenproteiner i fiskebein har økt proteinfordøyeligheten fra 51 til 95% i mink (Aksnes, 2002). I FHF prosjekt #900558 ble det gjennomført et innledende arbeid med å utvikle en prosess for enzymbehandling av demineralisert kollagen fra sildebein. Målet var å hydrolysere kollagenprotein, lage nye ingredienser og dokumentere effekt av hydrolyseprosessen på proteinfordøyelighet i biologiske forsøk med mink.

## Hovedmål

Utvikle en prosess for effektiv hydrolyse og frigjøring av protein-N i sildebein

## Delmål

- M1: Laboratorieforsøk for å utvikle optimale hydrolysebetingelser for frigjøring av N
- M2: Oppskalere og beregne produksjonsutbytte av protein-N
- M3: Måle effekt på biologisk protein fordøyelighet (mink)

## **2 Prosjektorganisering**

FHF prosjekt #900558 «Økt utnyttelse av næringsstoffer fra marint restråstoff» er et samarbeidsprosjekt mellom Nofima og NIFES, ledet av Nofima.

Delaktivitet på kollagenprotein ble gjennomført av Nofima.

### 3 Material og metoder

#### 3.1 Behandling av sildebein

Kollagenråstoffet som ble brukt til hydrolyseforsøk var restmateriale etter syrehydrolyse av sildebein gjennomført i FHF prosjekt #900558. Beinråstoffet var hydrolysert i 5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og vasket 2 ganger med kaldt vann for å vaske ut mest mulig av vannløselige mineraler. Prosessen medførte delvis avfetting av sildebein. Råstoffet ble oppbevart frosset ved -20 °C, før uttak til tekniske forsøk på laboratoriet. Råstoffet fremstod som en rein hvit masse av homogent materiale. 12 kg råstoff ble formalt på Comitrol grov sikt, og ga et utbytte på ca. 10 kg. Forsøkene ble gjennomført i september 2013.

#### 3.2 Laboratorieforsøk - enzymbehandling

Porsjoner på 200 g av oppmalt kollagenpulver ble blandet 1:2 (v/v) med vann, og pH ble justert til henholdsvis pH=3, og pH=5 med 33 % KOH løsning. Blandingene ble hydrolysert med ulike enzymer (2 % v/v) i en 250 ml glassreaktor under kontinuerlig omrøring (50 rpm). Enzym hydrolysen ble gjennomført ved 50 °C i 1 t og pH ble justert manuelt. Etter hydrolyse ble enzymaktivitet terminert ved rask oppvarming til 100 °C, 5 min, i en mikrobølgeovn. Mengde av bunnfall og væske ble kvantifisert. Væskefase ble ultrasentrifugert (9000 rpm), i 10 min, ved 20 °C, for å felle ut ikke-oppløst tørrstoff, herunder rester av proteiner (gråbrun masse), og noe CaSO<sub>4</sub> rester (kritthvitt lag av utfelte salter).

Enzymene som ble brukt var Promod 144P (papain; miks av fem ulike endo- og exopeptidaser) og Promod 192P (aspergillopepsin). Enzymene ble gitt av Biocatalysts, UK.

##### Behandlinger

T1: Promod 144P, pH=3

T2: Promod 144P, pH=5

T3: Promod 192P pH=3

T4: Promod 192P, pH=5

#### 3.3 Pilotforsøk – oppskalering og analyse

Samme type kollagenråstoff ble brukt ved oppskalering til forsøk med 2 x 2 kg råstoff. Formålet med forsøket var å lage tørket kollagenpulver til biologiske forsøk med mink for å se om enzymatisk hydrolyse kunne gi økt proteinfordøyelighet. Ut fra produksjonsutbytte oppnådd i laboratorieskala, ble det valgt å hydrolysere kollagenproteinet med Promod 144P, pH=5 (Behandling T5 og T6).

##### Kjemiske analyser

Total P	ISO 5983
Tørrstoff	ISO 6496-1983
Aske	ISO 5984
Nitrogen, Kjeldahl	ISO 5983
Fett	Folch syrehydrolyse (SSF report: A-102, 1978)
Aminosyrer	Cohen og Michaud (1993)
Molekylvektfordeling	Wang-Andersen og Haugsgjerd (2011)
OPA	Nielsen et al. (2001)

## 4 Resultater

### 4.1 Laboratorieforsøk (200 g kollagenprotein) – protein (N) utbytte

Det ble testet 2 ulike enzymer (Promod 144P, Promod 192P) ved ulike pH nivå (pH=3; pH=5). Råstoffet etter syrehydrolyse var surt (pH=2,6), og ble justert til henholdsvis 3 og 5 med 33 % KOH løsningsmiddel. Utfelt tørrstoff samt væskefraksjon ble samlet opp og veid. Det ble tatt prøver til analyse av kjemisk sammensetning, aminosyrer og molekyl-vektfordeling (Mwt). Protein-N ble brukt til beregning av N-utbyttet.

Forsøksbetingelsene er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1 Forsøksbetingelser under enzymatisk hydrolyse i laboratorieskala

Prøve	Kollagen	Vann (g)	pH	Enzym (2 %)	Enzymeffekt pH endring	Temp/ tid	pH/v slutt	In-Aktiv.	Utfelt <sup>2</sup> ts, g	Væske <sup>3</sup> g
T1	200	400	3	4 g	3,2	50 °C/1t	3.3	100 °C	160,6	420,0
T2 <sup>4</sup>	200	400	5	4 g	4,8	50 °C/1t	4.7	100 °C	119,9	459,8
T3 <sup>5</sup>	200	400	3	4 g	3,3	50 °C/1t	3.4	100 °C	155,0	430,3
T4 <sup>6</sup>	200	400	5*	4 g	4,8	50 °C/1t	4.8	100 °C	158,7	432,5
T5	2000	4000	5	40 g	-	50 °C/1t	-	100 °C	829,1	4915,1
T6	2000	4000	5	40 g	-	50 °C/1t	4.6	100 °C	923,0	4731,0

<sup>1</sup> Prøven ble overtitrert til pH 6,8 fordi elektroden ikke reagerte. Justerte til pH = 5 ved å tilsette 6 N HCl. Dette ga litt mer væske i T4.

<sup>2</sup> Bunnfallet (utfelt tørrstoff, ts) inneholdt mye væske og ble ultrasentrifugert ved 9000 rpm/10 min/ 20 °C for å skille fra væsken.

<sup>3</sup> Vannekstraktet var uklart, og ble filtrert først gjennom 0,45 µm millipore, deretter 0,2 µm millipore filter med vacuum og vannsug.

<sup>4</sup> T2 måtte ultrasentrifugeres i tillegg fordi uklar væske og utfellinger ved henstand kjøleskap over natt, løste seg noe opp ved oppvarming på benk til 20 °C.

<sup>5</sup> T3 geler litt, kjøres gjennom et glassfilter for å fjerne suspendert ts. før filtrering i millipore filter.

<sup>6</sup> T4 geler ikke, men samme prosedyre ble fulgt, dvs gjennom glassfilter før filtrering i millipore filter.



Tabell 2 Analyser og beregning av N-utbytte i væskefase etter enzymatisk hydrolyse

Prøve	Prøver	Mengde (g)	Prot-N (%)	Aske <sup>1</sup> (%)	Prot-N (g)	Tørke-Faktor	Sum aa, (%)	N utbytte, (%)
Start	Kollagen	200,0	6,72	41,2	5,07	0,3773	39,08	
T1	Utfelt ts	160,6	4,13	52,8	2,35	0,3542	24,31	46
T2	Utfelt ts	119,9	3,87	54,9	2,03	0,4383	21,48	40
T3	Utfelt ts	155,0	4,59	51,8	2,57	0,3608	26,71	51
T4	Utfelt ts	158,7	4,82	50,7	2,75	0,3601	28,31	54
T1	Hydrolysat	420,0	0,58	-	2,4		3,4	48
T2	Hydrolysat	459,8	0,72	-	3,3		4,19	65
T3	Hydrolysat	430,3	0,64	-	2,8		3,75	54
T4	Hydrolysat	432,5	0,56	-	2,4		3,4	48

<sup>1</sup> Analyse av mineraler viser mineralinnhold: P = 1,01 %; Ca = 10,3 % i kollagen råstoffet.

<sup>2</sup> Analyse av mineraler viser mineralinnhold: P = 0,67-0,87 %; Ca = 10,7-12,8 % i utfelt tørrstoff.

Frigjøring av Nitrogen (N) fra beinråstoffet ble analysert for å se hvor stor andel av protein-N som gikk over i vannløselig fase (Tabell 2). Summen av protein-N i hydrolysat og utfelt tørrstoff varierte fra 95 % til 105 %, i gjennomsnitt 102 %. Det ble konkludert med at mesteparten av protein-N i kollagenprøven ved start ble gjenfunnet i de to fraksjonene.

#### Utbytte beregnet for protein-N i hydrolysat

pH=3: Promod 144P er litt mindre effektiv enn Promod 192P, gir henholdsvis 48 % og 54 % utbytte.

pH=5: Promod 144P er klart mer effektiv enn Promod 192P, gir henholdsvis 65 % og 48 % utbytte.

#### Utbytte beregnet ved differanse for protein-N utfelt

pH=3: Promod 144P er litt mer effektiv enn Promod 192P, gir henholdsvis 54 % og 49 % utbytte.

pH=5: Promod 144P er klart mer effektiv enn Promod 192P, gir henholdsvis 60 % og 46 % utbytte.

Resultatene tyder på at Promod 144P er mest effektiv ved pH=5, mens den hydrolytiske aktiviteten av enzymene er noe lavere for begge enzymer ved pH = 3. Beregningsmetoden har litt å si for protein-N utbyttet, og er kanskje mest sikker ved beregning basert på differanse, ettersom vi har med tørkefaktor i utfelt materiale. Det oppstod noe produksjonstap underveis (< 5 %), noe som innebærer at man ikke kan forvente 100 % gjenvinning av protein-N i de to fraksjonene.

Fettnivået i kollagenprotein var 5,2 %, og varierte fra 4,2 til 5,1 i utfelt tørrstoff.

## 4.2 Analyse av aminosyrer, størrelsesfordeling av peptider og hydrolysegrad

Basert på analyse av aminosyrer (aa) i kollagen ved start, i bunnfall og hydrolysat (Tabell 3), så viste også disse resultatene at behandling T2 er mest effektiv, med lavest innhold av aa i utfelt tørrstoff, og med høyest innhold av aa i hydrolysatet.

Molekylvektfordeling (Mwt) av de ulike peptidene viste det samme (Tabell 4), og resultatene tyder på at nedbrytning av proteinet er mest effektiv ved pH=5 for begge enzymer. Omtrent 85 % av proteinet ble gjenfunnet som lavmolekylære forbindelser med peptidstørrelser < 4.000 Da ved pH=5. Ved pH=3, indikerer Mwt fordeling at Promod 144P gir en litt mer effektiv hydrolyse.

Analyse av hydrolysegrad ved OPA-metoden ga unøyaktig analyseresultater for kollagenhydrolysat (Tabell 4). Dette kan skyldes at de to enzymene kan ha ulik spesifisitet overfor enkelte frie aminosyrer på endepetidet, eksempelvis Pro som det er mye av i kollagenprotein. OPA-reagenset reagerer ikke med Pro og Hyp og høyt antall av disse aa på N-terminal side av peptidene vil ikke bli detektert (Rutherford 2010). Dette betyr at OPA-metoden underestimerer hydrolysegraden og derfor er lite egnet for kollagenhydrolysater.

Tabell 3 **Aminosyrer** i kollagen, utfelt tørrstoff og væskefase (proteinhydrolysat) etter enzymatisk hydrolyse

	Utfelt tørrstoff					Proteinhydrolysat			
	Kollagen	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
<i>Protein, g 100 g<sup>-1</sup></i>						3,6	4,5	4,0	3,5
<i>Total aminosyrer, g100g<sup>-1</sup></i>									
Asp	2,58	1,74	1,52	1,89	1,93	0,21	0,25	0,23	0,22
Glut	4,11	2,66	2,58	2,92	3,0	0,33	0,42	0,36	0,34
Hyp	2,71	1,46	1,27	1,67	1,89	0,25	0,30	0,27	0,23
Ser	2,02	1,31	1,14	1,44	1,500	0,16	0,21	0,18	0,17
Gly	8,21	4,59	4,11	5,23	5,83	0,8	0,96	0,85	0,72
His	1,48	0,79	0,64	0,85	0,94	0,1	0,11	0,10	0,10
Arg	2,94	1,75	1,61	1,94	2,14	0,27	0,32	0,30	0,26
Thr	1,09	0,73	0,59	0,79	0,76	0,1	0,13	0,11	0,10
Ala	2,9	1,72	1,53	1,91	2,09	0,28	0,34	0,31	0,27
Pro	3,7	2,1	1,86	2,36	2,61	0,36	0,43	0,38	0,33
Tyr	0,5	1,49	0,38	0,49	0,46	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Val	1,17	0,87	0,71	0,91	0,89	0,1	0,12	0,10	0,10
Met	1	0,69	0,61	0,74	0,77	0,1	0,10	0,10	0,10
Iso	0,65	0,54	0,43	0,55	0,51	<0,10	0,10	0,10	0,10
Leu	1,41	1,03	0,86	1,09	1,04	0,11	0,14	0,12	0,12
Phe	1,06	0,76	0,69	0,82	0,84	0,10	0,10	0,1	0,10
Lys	1,55	1,08	0,95	1,11	1,11	0,13	0,16	0,14	0,14
Sum aa	39,08	24,31	21,48	26,71	28,31	3,40	4,19	3,75	3,40
Sum essensielle aa	9,41	6,49	5,48	6,86	6,86	0,74	0,96	0,87	0,86

Tabell 4 **Molekylvektfordeling** i proteinhydrolysat etter enzymatisk hydrolyse

	Proteinhydrolysat			
	T1	T2	T3	T4
Enzym	Promod 144P		Promod 192P	
pH	3	5	3	5
Mwt ,				
> 20.000 Da	25,1	0,1	21,3	0,6
20. -10.000 Da	9,6	1,1	18,3	3,9
10. - 4.000 Da	15,4	13,9	26,0	10,6
4. - 1.000 Da	30,1	47	16,2	32,5
< 1.000 Da	19,8	38	18,3	52,4
OPA, %	3,3	6,1	6,5	20,0

### 4.3 Pilotforsøk - oppskalering (2000 g kollagenprotein) og analyse

Basert på resultatene fra laboratorieforsøk ble det valgt å bruke Promod 144P/pH=5 (T2) i en oppskalert hydrolyse av 2 kg-batcher av demineralisert beinråstoff. Tabell 5 angir forsøksbetingelsene som ble benyttet under oppskalering, mens tabell 6 viser analyseresultater og beregning av N-utbytte i hydrolysatene etter hydrolysen.

Tabell 5 *Forsøksbetingelser under enzymatisk hydrolyse i pilot skala*

Prøve	Kollagen	Vann (g)	pH <sup>1</sup>	Enzym (2 %)	Enzymeffekt pH endring	Temp/ tid	pH/v slutt	In- akt, <sup>2</sup>	Utfelt <sup>34</sup> ts, g	Væske <sup>35</sup> g
T5	2000	4000	5	40 g	-	50 °C/1 t	-	90 °C	829	4915
T6	2000	4000	5	40 g	-	50 °C/1 t	4,6	90 °C	923	4731

<sup>1</sup> pH justert fra pH=2,6 til pH=5 med 33 % KOH (50-54 g)

<sup>2</sup> Alt materiale tas over i glassbeger og varmes raskt til 90 °C i mikrobølgeovn for å inaktivere enzymet, (6 kg). Dette var tidkrevende, 3 x 30 sec for å nå 85 – 90°C (n=7 beger), dvs enzymene virker > 1t

<sup>3</sup> Hydrolysat inkludert bunnfall ble ultrasentrifugert ved 9000 rpm/15 min/20°C for å skille fra væsken.

<sup>4</sup> Utfelt bunnfall ble veid, homogenisert og frysetørket før analyse

<sup>5</sup> Væskefasen ble skilt fra og ultrasentrifugert nok en gang før oppsamling (8,2°Brix) og frysing (9,5 kg). Vannekstraktet ble seinere oppkonsentrert på rotavapor til 15°Brix. Det ble samlet opp ca 5 kg konsentrat til spraytørking.

Tabell 6 *Analyser og beregning av N-utbytte i væskefase etter enzymatisk hydrolyse*

Prøve	Prøver	Mengde (g)	Prot-N (%)	Aske <sup>1</sup> %	Prot-N g	Tørke-Faktor	Sum aa, (%)	N utbytte, (%)
Start	Kollagen	2000,0	6,72	41,2	50,7	0,3773	39,08	
T5	Utfelt ts	829	2,416	61,3	10,6	0,5302	13,29	20,9
T6	Utfelt ts	923	2,80	59,6	12,8	0,4955	15,04	25,3
T5	Hydrolysat	4915	1,152	-	56,6			111,7
T6	Hydrolysat	4800	0,976	-	46,8			92,4
			Prot-N (%)	Protein (%)	Aske <sup>1</sup> %	Fett %	Vannløs, Prot., %	Vann %
			12,82	80,1	9,0	0,5	98,8	5,5

<sup>1</sup> Analyse av mineraler viser mineralinnhold: P = 0,65-0,68, og Ca = 10,7-12,5 % i utfelt tørrstoff.

Spraytørket protein konsentrat (protein ingrediens) inneholdt 80.1 % protein ( $N \times 6.25$ ). Omtrent 83 % av proteinet ble kvantifisert som aminosyrer, og andel av essensielle aminosyrer var likt i kollagen og spraytørket konsentrat (24%). Sammensetting av aminosyrer (Tabell 7) viste en typisk kollagenprotein profil med høyt innhold av Gly (17,1 %) og Pro (7,5 %) i forhold til et vanlig fiskemel, mens nivået av Hyp var uventet lavt (0,1 %). Det er rapportert at sildebein inneholder 5.6 % Hyp (Toppe et al., 2007). Analysemetoden for bestemmelse av total aa kan være lite følsom for Hyp (Wang-Andersen, pers comm, Biolab). I noen tilfeller krever sikker kvantifisering av Hyp en separat prøveopparbeiding. Innholdet av essensielle aminosyrer i sildebein er omtrent 30 % lavere enn et typisk fiskemel.

Det ble brukt protein-N for beregning av P utbytte, for å unngå å bruke  $N \times 6,25$  for beregning av proteinmengde i prøven. Kollagenprotein har en utypisk aa sammensetting, og det blir som regel brukt en annen proteinfaktor ( $N \times 8,25$ ) for denne type protein. Forsøkene viste at det ble utfelt 20 – 25 % protein, noe som betyr at 75 – 80 % av kollagenproteinet ble hydrolysert. Beregnet total N-utbytte var i gjennomsnitt 102 % for de to hydrolysatene. Ettersom det mangler tørkefaktor for de to hydrolysatene, kan N-utbyttet være overestimert.

Innholdet av ikke protein-N kan være høyt i vannløselige proteinekstrakt. Nivået av frie aminosyrer, creatine, taurin, carnosin i tørket sluttprodukt var imidlertid lavt (< 0,5 %). Andre vannløselige ikke protein N- forbindelser som nukleotider, choline, TMAO, TMA, TVN ble ikke analysert.

Molekylvekten til intakt fiskegelatin er > 140 kDa (Haug et al. 2004). Molekylvektfordeling (Mwt, %) av spraytørket proteinkonsentrat (Tabell 8) viste at > 90 % av det vannløselige proteinet ble gjenfunnet som lavmolekylære forbindelser med peptidstørrelser < 4.000 Da. Dette viser klart at den enzymatiske hydrolysen har brutt ned det intakte proteinet til mindre peptider og frie aminosyrer. Peptidfordelingen i hydrolysat og konsentrat var nokså like, selv om det ble gjort anmerkninger om problemer med analyse av de to hydrolysatene.

Tabell 7 **Aminosyrer i utfelt tørrstoff og spraytørket proteinkonsentrat etter enzymatisk hydrolyse**

	Utfelt tørrstoff, ts			Spraytørket proteinkonsentrat
	Kollagen	T5	T6	
<i>Protein, g 100 g<sup>-1</sup></i>	42,0	15,1	17,5	80,1
<i>Total aminosyrer, g100g<sup>-1</sup></i>				
Asp	2,58	1,01	1,11	4,75
Glut	4,11	1,53	1,69	7,47
Hyp	2,71	0,78	0,91	0,10
Ser	2,02	0,75	0,84	3,99
Gly	8,21	2,49	2,89	17,09
His	1,48	0,4	0,46	2,05
Arg	2,94	1,09	1,25	5,85
Thr	1,09	0,38	0,41	1,93
Ala	2,9	0,98	0,11	5,89
Pro	3,7	1,21	1,41	7,54
Tyr	0,5	0,31	0,33	0,82
Val	1,17	0,5	0,56	2,16
Met	1,0	0,43	0,48	1,79
Iso	0,65	0,32	0,35	1,10
Leu	1,41	0,60	0,67	2,51
Phe	1,06	0,51	0,57	1,87
Lys	1,55	0,63	0,73	3,10
Sum aa	39,08	13,29	15,04	66,91
Sum essensielle aa	9,41 (24%)	3,77	4,23	16,51 (24.7%)

Tabell 8 **Molekylvektfordeling i hydrolysat og spraytørket proteinkonsentrat etter enzymatisk hydrolyse**

	Hydrolysat*		Spraytørket proteinkonsentrat
	T5	T6	
<i>Mwt peptid, % av vannløselig prot</i>			
> 20.000	0,1	0,1	<0,1
20. -15.000 Da	<0,1	<0,1	<0,1
15. -10.000 Da	<0,1	0,1	0,1
10. - 8.000 Da	0,2	0,2	0,3
8. - 6.000 Da	1,0	1,0	1,5
6. - 4.000 Da	4,5	4,9	5,8
4. - 2.000 Da	17,8	19,4	19,7
2. - 1.000 Da	25,8	25,9	25,7
1. - 500 Da	26,4	25,0	24
500 - 200 Da	19,9	18,2	17,1
< 200 Da	4,2	5,2	5,9

\*Biolab har anmerket at analyseresultat for T5 og T6 ikke kunne godkjennes på grunn av forstyrrelser fra prøvene. Tilsvarende problem ble ikke registrert for spraytørket proteinkonsentrat.

#### 4.4 Proteinfordøyelighet i mink

I prosjektet ble det framstilt 3 kollagen- ingredienser basert på henholdsvis A) Ubehandlet kollagen fra sildebein (restprotein i bein etter syrehydrolyse); B) Varmebehandlet kollagen fra sildebein (120 °C/60min i autoklav); og C) Enzymbehandlet kollagen fra sildebein (Promod 144P). Kjemiske analyser viste at enzymbehandling (T5, T6) brøt ned kollagenprotein til mindre peptider og frie aminosyrer og det ble registrert høyt utbytte av hydrolysert kollagenprotein. Etter varmebehandling i autoklav, ble proteinkonsentrat spraytørket og analysert til å inneholde 96.6 % protein. Nedbrytningsgrad av proteiner ble ikke analysert, og protein-N utbyttet er ikke beregnet.

Det ble framstilt kollageningredienser i tilstrekkelige mengder til å gjennomføre forsøk med mink for å teste effekter på fordøyelighet av proteinet. Mink fôret med samtlige 3 kilder til kollagen fikk diare av ukjente årsaker og forsøk 1 måtte avsluttes i løpet av kort tid. Det ble gjort et nytt forsøk med samme type ingredienser, men dette ga samme resultat i mink. Det er behov for å gå igjennom det metodiske oppsettet og prøve å forstå hva som utløste diare (bakterier, salter, etc.). Resultatene fra dette delforsøket er ikke rapportert.

## 5 Diskusjon og konklusjon

Målet med dette forprosjektet var å vurdere egnethet av to ulike enzymer for hydrolyse av kollagenproteiner i fiskebein, basert på hydrolyseutbytte og kjemisk sammensetting av proteinekstraktene.

Basert på N-utbytte, aminosyresammensetting og molekylvektfordeling av peptider, viste innledende forsøk at hydrolyse med Promod144P (pH=5) var mest effektiv for frigjøring og høy hydrolysegrad av kollagenproteiner i bein. Bestemmelse av hydrolysegrad ved OPA metoden ga unøyaktige svar og er ikke egnet for bestemmelse av hydrolysegrad for kollagenhydrolysater.

Det ble oppskalert til produksjon av 2 kg x 2 porsjoner av kollagenprotein basert på Promod144P. Det ble også valgt å hydrolysere ved pH=5, noe som innebærer at det ble tilført KOH salter til sluttproduktet. Biologiske konsekvenser av dette er ikke utredet, men proteinkonsentratet inneholdt 9 % aske. Nivå av K er ikke kjent, ettersom mineralinnholdet ikke ble analysert.

Beregnet N-utbytte for 2 kg kollagenprotein var høyt, og indikerer at 75–80 % av intakt kollagenprotein ble brutt ned av Promod 144P.

Spraytørket sluttprodukt inneholdt 80,1 % protein (N x 6,25), og kan ansees som et proteinkonsentrat. Aminosyresammensetting var karakteristisk for beinkollagen. Resultatene viser at en stor andel av trippelheliksstrukturen i intakt kollagen kan brytes ned til mindre peptider og frie aminosyrer. Analyse av biologisk effekt på fordøyelighet av protein lot seg ikke gjennomføre fordi forsøksdyrene (mink) fikk diare. Mulige årsaker til dette må undersøkes.

**Hovedkonklusjonen** er at prosessen for enzymbehandling av sildebein kan gjennomføres med høyt N utbytte, og at det er mulig å produsere et proteinkonsentrat fra fiskebeinråstoffet som gjenstår etter demineralisering med en sterk syre. Videre arbeid med hydrolyse av kollagenprotein bør inkludere biokjemisk karakterisering av ingrediensen. Analyse av mineraler bør også inkluderes for å vurdere nivå, type og mulige effekter av salter.

## 6 Referanser

- Aksnes, A. (2002, revidert 2007a). Framgangsmåte for å forbedre den biologiske fordøybarheten til et fôr-produkt, samt produkt resulterende derav, samt anvendelse av produktet. Mineraler. Søknadsnr 20045728.
- Aksnes, A., Mundheim H. and Albrektsen, S. (2008). The effect of dietary hydroxyproline supplementation on salmon (*Salmo salar* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 275. 242 – 249.
- Albrektsen, S., Sirnes, E., Aksnes, A. & Hagen, Ø. (2010). Impacts of dietary hydroxyproline on growth, muscle firmness, collagen and PYD cross-links formation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Abstract. XIV International Symposium on fish nutrition and Feeding, Qingdao, China.
- Albrektsen, S., Thorsen, K. & Nygaard, H. (2010). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Poster presentation at the First Marine Ingredients Conference (MIC), Holmenkollen Park Hotel, Oslo, 20-21 September 2010.
- Albrektsen, Sissel; Thorsen, Kaspar Høye; Bæverfjord, Grete; Nygaard, Halvor (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB) Third Meeting; 2013-04-22 - 2013-04-24.
- Albrektsen, S., Lock, E.-J., Bæverfjord, G., Pedersen, M., Takle, H., Ørnsrud, R. Veiseth-Kent, E., Waagbø, R. og Ytteborg, E. (2014a). Økt utnyttelse av næringsstoffer fra marint restråstoff. *Nofima rapport 11/2014*, 15 s.
- Albrektsen, S., Ruyter, B., Pedersen, M., Ytrestøl, T., Ytteborg, E., Østbye, T., (2014b). Dietary impacts of fish bone hydrolysate on astaxanthin digestibility and retention in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Nofima report*, confidential, May 2014.
- Albrektsen, S., Lock, E.-J., Bæverfjord, G., Pedersen, M., Krasnov, A., Takle, H., Veiseth-Kent, E., Ørnsrud, R., Waagbø, R., Ytteborg, E. (2016). Utilization of acid hydrolysed phosphorous from herring by-products in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquaculture Nutrition*. Submitted manuscript.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatization reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography. *Anal Biochem* 211(2), 279-287.
- Haug, I. J, Draget, K. I., Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 18(202-213).
- Hovde, 2013. Validation of a method for analysis of soluble phosphorus by use of alkaline extraction and spectrophotometric determination. *Nofima report 17/2013*, pp.32. ISBN: 978-82-8296-077-9.
- Larsson, T., Koppang, E. O., Espe, M., Terjesen, B. F., Krasnov, A., Moreno, H. M., Rørvik, K.-A., Thomassen, M., og Mørkøre, T. (2014). Fillet quality and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet supplemented with glutamate. *Aquaculture* (426-427). 288-295.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66(5), 642-646.
- Nygaard, H., Thorsen, C. og Albrektsen, S. (2010). Solubilisering av fosfor og nitrogen i fiskebein ved syrebehandling. *Del II. K-rapport 356*. 32 sider.



- Mohammad, A.W., Suhimi, N.M., Aziz, A.G.K.A. and Jahim, J.M. (2014). Process for production of hydrolysed collagen from agriculture resources: Potential for further development. *J. Applied. Sciences.* 14 (12), 1319-1323.
- Rutherford, S. M (2010). Methodology for determining the degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *J AOAC Int.* 93(5) (1515-1522).
- Wang-Andersen, J., Haugsgjerd, B.O. (2011). Forbedret analysemetodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine hydrolysater. *RUBIN-rapport nr. 200*, Trondheim, Norway. ISBN: 978-82-7251-925-3. 30 sider.
- Ytteborg, E., Bæverfjord, G., Lock, E.-J., Pedersen, M., Takle, H., Ørnsrud, R., Waagbø, R., Albrektsen, S. (2016). Utilization of acid hydrolysed phosphorous from herring by-products in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) start-feeding fry. *Aquaculture.* Volume 459, pp173-184. (DOI 10.1016/j.aquaculture, 2016.03.031).

