



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016

30 studiepoeng

Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Fra restmaterialer til verdifulle proteinprodukter

From rest materials to valuable protein products

Paul Farstad

Siv.ing- Kjemi og Bioteknologi

1. Forord

Denne oppgaven er utført på Nofima Ås.

Først og fremst vil jeg takke Nils Kristian Afseth for den støtten og veiledningen jeg har gitt meg underveis i å lage denne oppgaven. Jeg vil også benytte meg av muligheten til å takke Sileshi Gizachew Wubshet for god veiledning igjennom eksperimentene, Diana Lindberg for innsikten jeg har fått innenfor enzymatisk hydrolyse og praktikanten Marte Ryen Dalsnes som har vist seg for å være en sært god labpartner.

I tillegg vil jeg takke veilederen Dag Ekeberg for veiledning, gode innspill i å lage masteroppgave og hans hyggelige invitasjon til MS-gruppemøter som et samlingssted for både master og doktorgradstudenter for diskusjon av deres materiale.

Jeg vil også benytte muligheten å takke Norges Miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU) for godt læremiljø og verdifull kunnskap, og campus Ås for det sosiale livet jeg har fått i mine 5 år på Ås.

Med vennlig hilsen

Paul Farstad

2. Sammendrag

Det har i de siste få tiårene vært en økende interesse for bioaktive peptider. Bioaktive peptider er kortere proteinkjeder, som har vist seg for å ha noen gunstige egenskaper. De kan utvinnes fra alt av proteinholdige matvarer. Til nå har forskningen først og fremst vært på melk. Det finnes flere metoder for å kunne utvinne disse peptidene på, men denne oppgaven kommer til å omhandle enzymatisk hydrolyse for utvinning av peptider.

I denne oppgaven ble det forsøkt å danne en kalibrering slik at en kan bruke fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for å lage en kalibrering for å dermed finne grunnlaget for potensielle mål på kvalitative og kvantitativ informasjon om peptider. Dette ble gjort med high performance liquid chromatography (HPLC) med størrelseskromatografi (SEC) som referansemetode.

Først ble det utført hydrolyse av tre forskjellige hydrolysator-oppsett. Det er: 1) kyllingfilet i et begerglassoppsett, 2) kyllingfilet og 3) skjærebein av kylling i en ofte brukt hydrolysator. Disse prøvene ble analysert med verktøyene FTIR og HPLC SEC. Videre ble informasjonen fra begge kildene behandlet, validert og satt sammen ved hjelp av partial least square regression analysis (PLS) hvor det ble gjort et forsøk i å finne sammenhengen.

Det viste seg at det er mulig å finne noen former for trender i valideringen og at det kunne være teoretisk mulig finne en sammenheng mellom de gitte kildene til informasjon. PLS-informasjonen endte opp med R^2 på 0.8 og oppover med bruk av parametre for molekylstørrelse og mengde mot informasjon fra FTIR. Likevel er der momenter som tyder på at metoden fortsatt trenger videreutvikling.

3. Abstract

In the past few decades there has been a growing interest for bioactive peptides. Bioactive peptides are shorter chains of proteins which have proven to yield some advantageous properties but the recent research has primarily been on milk.

There are different methods by which peptides are prepared. This thesis is describing enzymatic hydrolysis in preparation of peptides. The intention of this thesis has been an attempt of making a calibration, thus obtaining means for potential qualitative and quantitative information about peptides, using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). As reference measurements High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Size Exclusion Chromatography (SEC) were used.

The experiment framework is performing enzymatic hydrolysis with three different setups. Those setups were 1) using chicken filet in a bottle with beaker, 2) chicken filet in a commonly used hydrolysator and 3) cut chicken bone in a hydrolysator. The samples were analyzed by means of FTIR and HPLC SEC. Then the information from those tools were processed, validated and put together, using the statistical tool known as partial least square regression analysis (PLS), which makes qualified attempts of finding the correlation between data obtained from the different analyzing setups mentioned above.

The overall, integrated result shows that it is possible to find trends in the validation process, and that it is theoretically possible to link information between the given information sources. The use of FTIR to monitor the hydrolysis process was proven to be possible with a R^2 value on 0.8 and upwards. However, from the information obtained from the experiment, it were shown that the hydrolysis process most likely needs further development.

Innholdsliste

1	Forord	1
2	Sammendrag	2
3	Abstract	3
4	Introduksjon	6
4.1	Bakgrunn	6
4.2	Mål med oppgaven	7
5	Teori	8
5.1	Proteiner	8
5.1.1	Hydrolysat og deres potensiale	9
5.1.2	Enzymer	9
5.2	Metoder for mål av hydrolysegrad	10
5.3	Vibrasjonspektroskopi	11
5.3.1	IR-spektroskopi	12
5.3.2	FTIR og dets virkemåte	12
5.3.3	FTIR og applikasjoner på mat	14
5.4	HPLC	15
5.4.1	Oppsettet til et HPLC-instrument	15
5.4.2	HPLC SEC	16
5.5	Databehandling	16
5.5.1	Savitsky-Golay-algoritmen	16
5.5.2	Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC)	16
5.5.3	Principal Component Analysis (PCA)	17
5.5.4	Partial Least Square regression analysis (PLS)	17
6	Materialer og metoder	18
6.1	Oversikt over det som ble gjort	18
6.1.1	Hydrolysemetoder	19
6.2	Innsamling av prøvene	20
6.2.1	Veiing	20
6.2.2	Prøvetaking og plassering i varmebadet	20
6.2.3	Applisering på mikroplate og Brix prøvetaking	21
6.3	Kromatografi (HPLC SEC)	22
6.4	Kjemometri	23

7 Resultater og diskusjon	25
7.1 FTIR	25
7.1.1 Råspektere	25
7.1.2 PCA-plot og deres tilhørende loading plot.	28
7.1.3 Sammenligning mellom begerglass og hydrolysatoroppsett	30
7.2 HPLC kromatogrammer	31
7.3 Et representativt modell av Brix og areal	34
7.4 PLS-figurer og sammenstilling av informasjonen	35
7.5 Oppsummerende diskusjon	38
Referanser	40
APPENDICES	41
A Vedlegg	42

4. Introduksjon

4.1 Bakgrunn

I de siste tider har samfunnet fått en mer miljøvennlig fokus som blant annet omhandler fornybar energi og det å minske mengde avfall. Denne oppgaven omhandler det sistnevnte.

Prosessering av dyrekjøtt eller marint kjøtt ender opp med store mengder restmaterialer og tradisjonelt har dette vært brukt til olje, mat, gjødsel og biodrivstoff. I takt med samfunnets utvikling øker interessen for å øke nytteverdien til ressursene inkludert proteiner. Dette har ført til forskning på nye proteinkilder og maksimering av proteinmassenes potensiale. Mulighet er enzymatisk hydrolyse da dette medfører at lengre peptidkjeder blir brutt ned til kortere proteinkjeder. Her har de kortere proteinkjedene et spekter av applikasjonsmuligheter. [11]

Når industriell enzymatisk hydrolyse foregår, er det hovedsakelig to parametere som blir målt. Det er proteinstørrelse og mengde protein fra reaksjonen. Bruken av parametere som grad av hydrolyse (degree of hydrolysis) (DH %), gjennomsnittelig protein størrelse, så kan en slik reaksjon bli stoppet når den mest ønskede tilstanden er oppnådd. Denne kontrollen er ekstremt viktig da dette er avgjørende faktor, da dette hjelper industrien med å minimalisere produksjonskostnadene[16].

Et stort antall studier av hydrolyserte proteiner har demonstrert at en rekke restmateriale har potensiale når det kommer til alternativ bruk.

Produktene som en kan få ut av dette kan være proteiner med gelaktige egenskaper og godt fungerende emulgatorer. Antimikrobielle og antioksidanter er også observert. Dette er eksempler på bioaktive egenskaper, noe som igjen viser at god kontroll på enzymatisk hydrolyse er veldig avgjørende[23]. Det viser seg at vi kaster en tredjedel av maten som produseres [3], og dermed vil dette prosjektet omhandle mer om det å kunne gjenbruke maten som produseres.

Peptider kan dannes fra alt av proteinholdige matvarer og kan dannes ved hjelp av hydrolyse, fermentering og speking. Der er svært mange eksempler på at bioaktive peptider har helsefremmende egenskaper. I de siste 20-årene har det vært stor interesse for bioaktive peptider hvor mesteparten av forskningen har vært på melk[11]. De mest karakteristiske peptidene identifisert fra matkilder har vist seg å kunne redusere høyt blodtrykk. Det finnes allerede kommersielle peptider på markedet i dag; Calpis er et surmelkprodukt fra Japan som inneholder de blodtrykksreduserende peptidene VPP og IPP (fra kasein)[11]. Evolus er et finsk produkt som påstås å redusere blodtrykket. Det finnes også andre melkeprotein hydrolysater som påstås å inneholde bioaktive peptider, for eksempel det kasein-baserte produktet C12 fra DMV International. Det finnes flere

rapporter om bioaktive peptider fremstilt fra storfe og grise proteiner. Det er blant annet vist at hydrolysat fra griseblod kan redusere høyt blodtrykk[11]. En av utfordringene med bioaktive peptider er imidlertid at selv om det er påvist bioaktivitet in vitro har det vist seg å være vanskelig å dokumentere en in vivo effekt.

FTIR er en metode som har vært brukt i de siste årene for å studere konformasjonsforandringer i proteinløsninger. Faktumet at signalet fra karbonylgrupper i peptidbindingen av proteiner er veldig sensitiv mot konformasjonsforandringer gjør at FTIR blir en god kandidat til dette. Nofima har tatt i bruk metoder fra Ruckebush [2] som viser at enzymatisk hydrolyse hemoglobin kan bli overvåket med bruk av tørrfilm FTIR. Metodene har vært utvidet for å overvåke andre produkter som kylling og laks. De har og vist en generell formel på at grunnstrukturen til proteinet blir kuttet ned under enzymatisk behandling.[1]

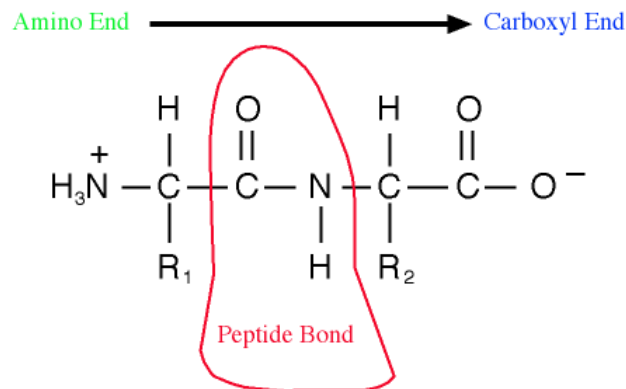
4.2 Mål med oppgaven

Bioaktive peptider blir stadig mer etterspurt. Samtidig er det et økt fokus på å utvinne verdifulle produkter fra restrarstoffer fra animalsk, marin og vegetabilsk industri. For å danne peptider og proteinprodukter trengs imidlertid god kontroll på råvarene, prosessene og produktene. Det finnes mange kjemiske metoder for å gjøre dette, men disse er som regel ikke egnet til bruk i industrien. Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR) har vist seg som en potensiell metode for rask og enkel karakterisering av enzymatisk proteinhydrolyse.[16] Målet for denne oppgaven er å finne ut om FTIR kan brukes for kvantitativt å måle hydrolysegrad ved enzymatisk proteinhydrolyse av restrarstoffer fra kyllingindustrien. Dette har blitt gjort ved å sammenstille FTIR spektra med en referansemetode basert på Size Exclusion Chromatography (SEC). Ved denne referansemetoden kan man beregne gjennomsnittelig molekylvekt, som i sin tur kan benyttes som et mål for hydrolysegrad.

5. Teori

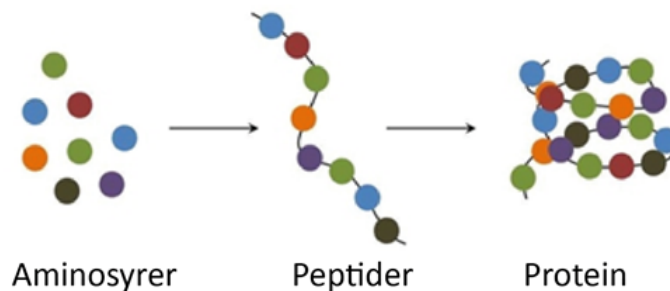
5.1 Proteiner

Proteiner er molekyler bestående av aminosyrer som er bundet sammen ved hjelp av peptidbindinger. De utgjør en familie av biologiske makromolekyler som har en stor variasjon av tredimensjonale strukturer som da er tilpasset for deres funksjoner. Her inkluderes strukturelle proteiner, enzymer, antistoffer, sensorer, transporter og transducer. Alt dette oppnås basert på deres sekvens av aminosyrer som da gir opphav til deres tredimensjonale struktur. [26]



Figur 5.1: Peptidbindingen til proteiner. I dette tilfellet et dipeptid og her viser ringen en peptidbinding [10]

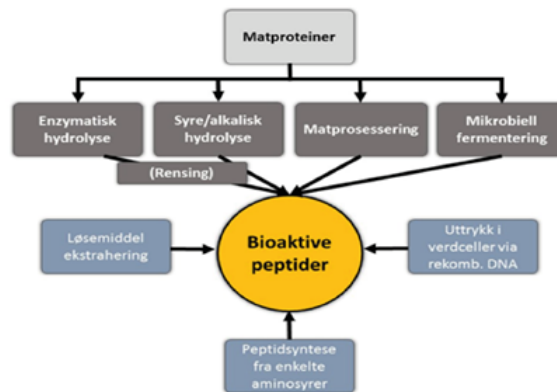
Proteiner fra ulike kilder kan sies å ha en rekke kvaliteter og grunnet dets kompleksitet og mangfold utgjør et spekter av potensiale. Denne oppgaven vil fokusere på restmateriale fra mat og mer spesifikt kylling.



Figur 5.2: Bildet viser en forenklet versjon av proteinets oppbygging[11]

5.1.1 Hydrolysat og deres potensiale

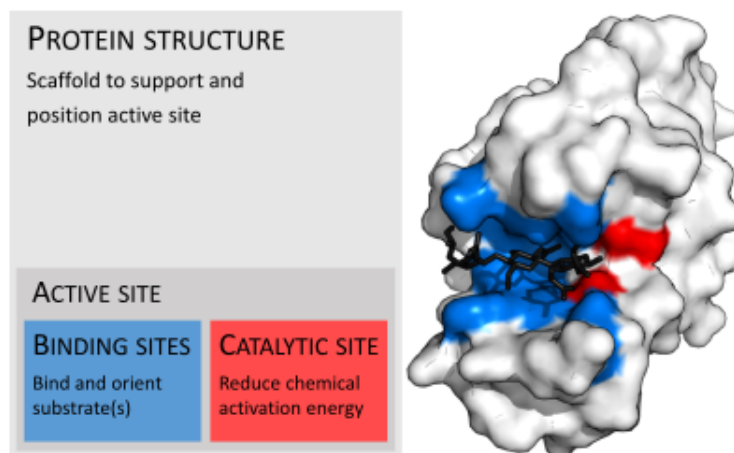
Hydrolyse er en prosess som går ut på å kunne kutte en substans i mindre biter med vann som en av reaktantene. Dette kan utføres ved hjelp av relativt enkle molekyler til mer komplekse makromolekyler. Denne oppgaven dreier seg om enzymer og bruken av enzymer for å kunne isolere mengder av proteinfragmenter. De resulterende proteinfragmentene har i tidligere eksperimenter vist seg å ha anvendbare egenskaper som kan brukes i nye produkter. Der er flere måter en kan få dannet bioaktive peptider. Figuren nedenfor viser ulike måter for å få dem dannet.



Figur 5.3: Ulike veier til å få frem bioaktive peptider som produkt. [11]

5.1.2 Enzymer

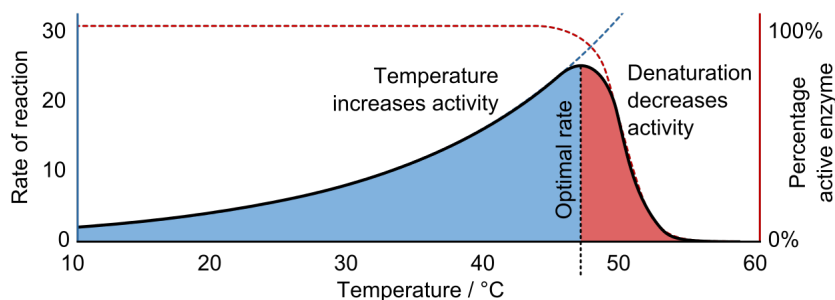
Enzymer beskrives som makromolekylære katalysatorer. De består i høy hovedsak av proteiner i tillegg til litt andre substanser. Enzymer katalyserer reaksjoner, hvor da ingrediensene i prosessen kalles for substrater hvor de konverteres til produkter. Der er et stort spekter av enzymer med forskjellige oppgaver *in vivo* [26]. Enzymer har temperaturer og forhold som f.eks pH før de fungerer optimalt før de eventuelt denaturerer eller med andre ord ødelagt. [28]



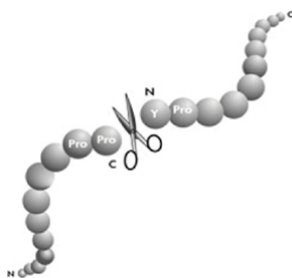
Figur 5.4: Figuren viser strukturen til enzymer med de mest signifikante delene[9]

I denne oppgaven vil det bli brukt enzymet alcalase.

Ved spesifikk hydrolyse vet man hvilket enzym som utfører hydrolysen og hvilke peptidbindinger som brytes. Dette gir et sluttprodukt med en homogen gruppe peptider og lite variasjon. Ved uspesifikk hydrolyse vil enzymer, syrer eller baser splitte aminosyrekjeden ved tilfeldige peptidbindinger slik at det dannes mange forskjellige peptider. Forskjellige enzymer har ulik preferanse for hvor de kutter i peptidkjeden; de mest spesifikke kutter kun ved ett spesifikt kuttsete i et spesifikt protein. Andre er mindre spesifikke og kutter mange typer av proteiner ved flere forskjellige aminosyrer i peptidkjeden. [28]



Figur 5.5: Her vises et eksempel på hvordan enzymer når sin optimale temperatur for effekt før de eventuelt når en temperatur som er for høy før de denaturerer. [9]



Figur 5.6: Viser prinsippet bak hydrolyse [11]

5.2 Metoder for mål av hydrolysegrad

Ofte tas det i bruk en ganske så rask verktøy for måling av konsentrasjon av substans. Her brukes et **refraksjonsmeter** som måler lysbrytningen i substansen. Dette er en enhet som kalles for refractive index også kjent som Brix. Med et refractive index menes lysets hastighet i et vakuum delt på lysets hastighet igjennom en prøve. Den mest vanlige bruken av dette er en måling av oppløst materiale i vann. Desto høyere tallet er, desto høyere er konsentrasjonen. [21]. Dessverre for denne metoden er den lite presis, men er temmelig rask å gjennomføre. [21]

Der er allerede utviklet flere metoder for å fastslå graden av hydrolyse. Metode som **o-phtaldialdehyde (OPA)** er en metode som går ut på å derivatisere aminosyrer stoffet o-phtaldialdehyde. Dette gir en sterke signaler i fluoressens. Metoden krever også et nærvær av thiol-grupper (SH) og har en svakhet med at den reagerer veldig lite med noen aminosyrer. Dette fører til at en får en underestimering av hydrolysegrad.[19]

pH-stat går ut på at etterhvert som hydrolysen foregår, vil det bli få dannet en mer sur løsning grunnet en høyere grad av frie protoner. Denne pH-verdien kan bli satt til sin

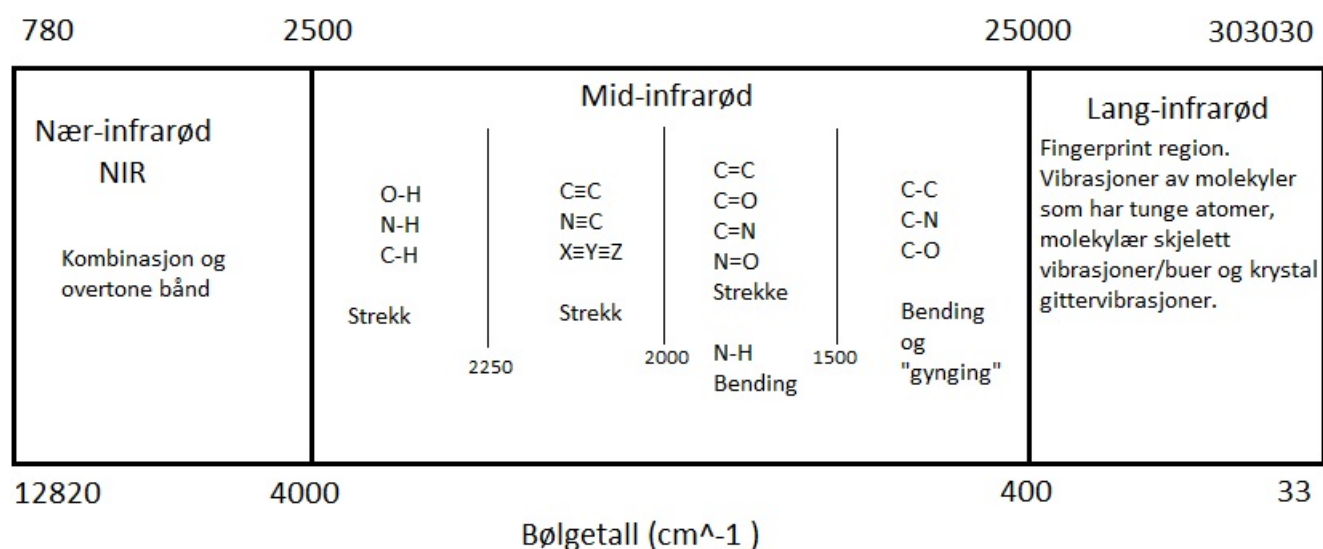
opprinnelige verdi ved å tilsette en base. Ved å gjøre dette vil det bli å en direkte korrelasjon med mengde base tilsatt. Dessverre har metoden en svakhet ved at sammenhengen mellom konsumeringen av base og grad av hydrolyse er kompleks, og dermed kan det ha konsekvenser for nøyaktigheten i metoden. [19]

Trinitro-benzene-Sulfonic syre (TNBS) er en metode som går ut på at stoffet trinitro-benzen- sulfonic syre reagerer med N- terminalen av et peptid for å dermed danne en derivat. Dette derivatet kan dermed bli målt ved hjelp absorbanse på 340nm. Dessverre har det vist seg at stoffet reagerer dårlig om hydroksyl-ioner er i løsningen. [19]

Med de andre metodene for mål av hydrolysegrad kan det argumenteres med at IR-spektroskopi egner seg godt da nærmest hvilken som helst løsning enten det er gassfase, væske eller tørrstoff *in situ*. De er også relativt rimelig med de dyreste utstyrene på 485 000 NOK. IR-spektrofotometeret er anerkjent i den akademiske verden, men i kommersiell analyse av proteiner er enda ikke ute. [16]

5.3 Vibrasjonspektroskopi

IR-spektroskopi eller vibrasjonspektroskopi gjør et spekter av metoder som har vært brukt for å analysere den kjemisk og fysiske komposisjonen av mat og drikkevarer. Evnen til å ta *in situ* analyse av mat og vannfase som gassfase gjør dette til en svært interessant verktøy for matindustrien. Der er nå i hovedsak tre disipliner innenfor vibrasjonspektroskopi: Nær-infrarød, mid-infrarød og ramanspektroskopi. [12]



Figur 5.7: Figuren viser området som IR-spektra definerer

5.3.1 IR-spektroskopi

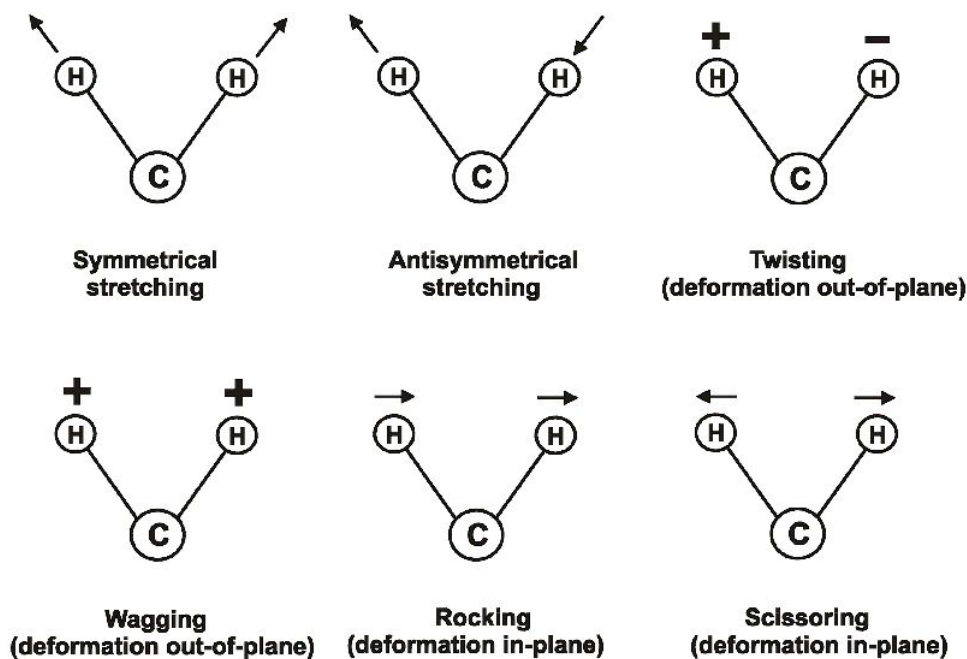
IR eller Infrarødt spektroskopi er en spektroskopisk metode som bruker infrarødt lys for å studere eller måle kjemikalie. Molekylære vibrasjoner kan bli observert i et infrarødt spektrum, hvorav spekteret er sett i et spekter innenfor 2,5-16 μm , men vanligvis er dette uttrykt som bølgenummer [12].

Mange funksjonelle grupper i molekyler har vibrasjonsfrekvenser som er karakteristisk for den gitte funksjonelle gruppen, noe som i dag er gitt som tabellverdier. Disse er i dag som sagt gitt som bølgenummer og følger følgende ligning som er lik en spring-ligning.

$$\nu = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (5.1)$$

Hvor ν er frekvensen, k er en måling av styrken til springen og m er massen. Her er ikke massen gitt som en bestemt masse, men heller er det snakk om to masser De representerer to parter i molekylet.[12].

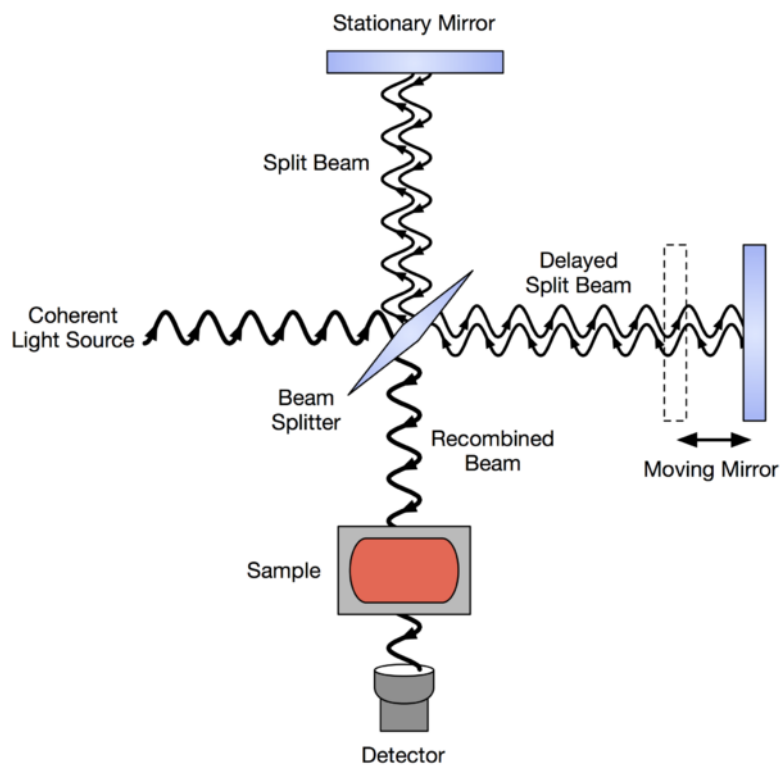
Hvert molekyl har sin helt unike vibrasjons-mode. Et molekyl med n atomer har $3n$ frihetsgrader, noe som korresponderer til rotasjonelle bevegelsen til atomet og tre translatoriske. Derfor er antall måter et atom kan vibrere seg er på $3n-6$.



Figur 5.8: Vibrasjonenes seks modus i IR-spekteret.[14]

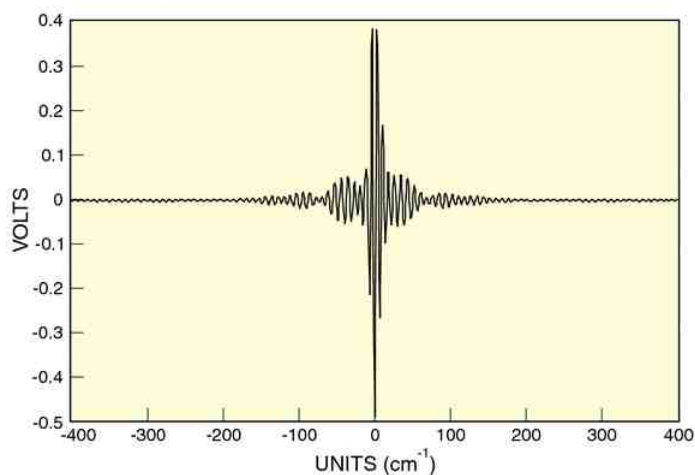
5.3.2 FTIR og dets virkemåte

Med FTIR har IR-instrumentet to stråler som enten begge går igjennom prøven eller bare den ene, men den ene strålen vil gå lengre enn den andre. FTIR-instrumentet består av en lyskilde som produserer lys som splittes i to av en strålesplitter (beam splitter) hvor det ene lyset går mot en stillestående speil (fixed mirror) og den andre går mot en bevegelig speil. Lyset som reflekteres av de begge kommer tilbake til strålesplitteren. Dette resulterer i at halvparten av det totale lyset går til prøven og detektoren mens den andre halvparten går til lyskilden [13].



Figur 5.9: Prinsippet bak interferiometer [17]

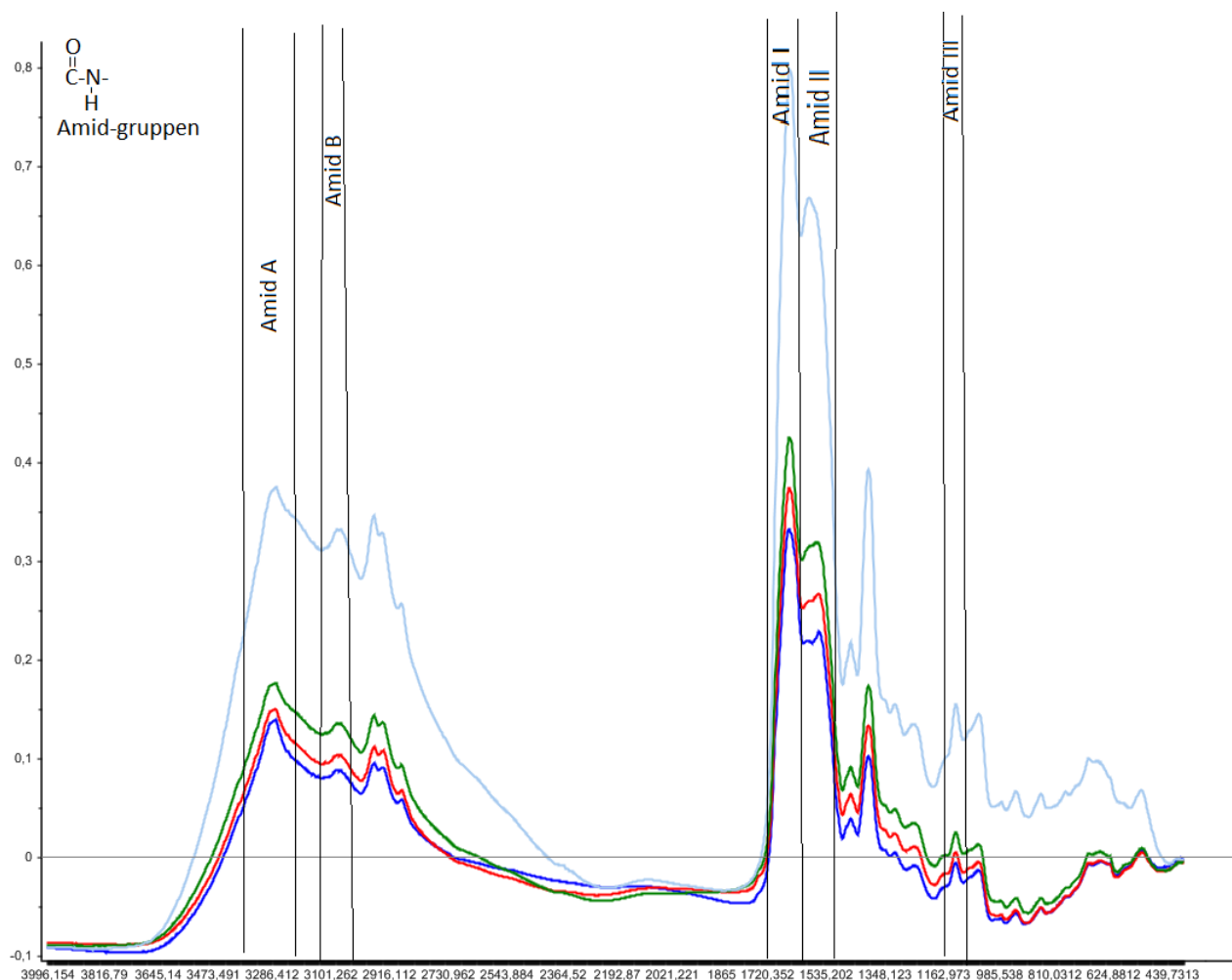
Lyset som dannes av detektoren kommer som et interferogram. Fra interferogrammet blir det utført en Fourier Transformasjon. FTIR har den fordel at instrumentet kan analysere en prøve på mange forskjellige bølglengder på en og samme prøve, i tillegg til at den bistår med en veldig høy oppløsning [13]. Lyset som dannes av detektoren kommer som et interferogram. Fra interferogrammet blir det utført en Fourier Transformasjon som da skaper et IR-spekter.



Figur 5.10: Interferogrammet fra FTIR-instrument.[13]

5.3.3 FTIR og applikasjoner på mat

FTIR ser ut til å kunne ha et stort applikasjonspotensiale på matanalyser. Det er blitt oppdaget at karbonylgruppen (C=O) og i stor grad amid i peptidbindingene er ganske utsatt for konformasjonsendringer. Dette kommer veldig tydelig frem fra IR-spektra, som vist i denne oppgaven. Toppintensiteten på spekterene ser ut til å kunne korrelere med konsentrasjon. Det som er svært gjennomgående når en gjør analyser med FTIR med for eksempel proteiner er amid-bindinger. [15, 16]



Figur 5.11: Figuren viser et FTIR-spektra der hvor det er satt på regioner med amid-topper

Når en kommer til tolkning av av proteiner i IR-spekteret, kommer det en rekke amid-bånd, samt med overlapp med informasjon fra hydrokarboner. Neste avsnitt tar for seg noen av de.

Amid A er først og fremst forårsaket av N-H grupper, som er lite sensitive i konformasjonen av grunnstrukturen til polypeptid til proteiner. Amid B er trolig forårsaket av Fermi resonanse i N-H strekket. Fermi resonanse oppstår når en får en forstyrrelse av molekylene opprinnelige tilstand, som da blir tatt med mens det utføres målinger.

Amid I er topper som oppstår rundt 1650 cm^{-1} , og oppstår hovedsakelig av C=O-

strekke med en liten innflytelse fra C-N strekke, C-C-N deformering og N-H i planet bøyning. Amid I er en del av spektra som har liten innflytelse av sidekjedene på aminosyrene. De er og kjent for å ha hatt stor innflytelse fra sekundærstrukturen til proteinene. Amid II- bindingene oppstår ved 1550 cm^{-1} er laget av ut-av-fase kombinasjon av N-H strekk i planet og C-N strekk- vibrasjoner. De har mindre innflytelse fra C=O i planet med C-C og N-C strekk. Amid III bånd oppstår grunnet N-H i plan bøyning og C-N strekke vibrasjoner med svak innflytelse av C=O i plan bøyning og C-C strekke-vibrasjoner. I tillegg er der mye innflytelse fra CH_2 og sidekjedene på aminosyrene.[15, 16]

5.4 HPLC

HPLC, også kjent som høyoppløselig væskrokromatografi, er en teknikk innenfor analytisk kjemi som brukes til å kunne separere stoffer i en kompleks løsning. Separasjonen i kolonna finner sted nettopp på grunn av ulike båndspredningsprosesser. Dette oppsettet består primært av kolonne rørsystem, pumpe og detektor.

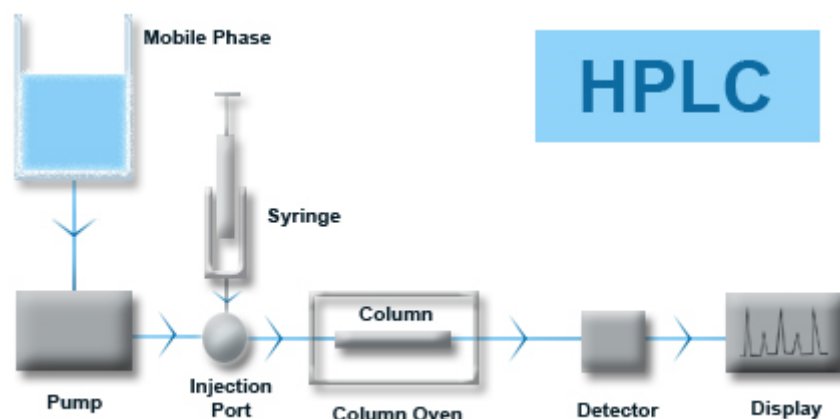
En separasjon av stoffer i en rørkolonne kommer til å skje først og fremst fordi stasjonærfasen og mobilfasen har forskjellig affinitet igjennom kolonna. Ved å regulere elementer som mobilfasehastighet, mobilfasegradient, sammensetningen av mobilfasen, temperaturen eller trykket, kan kolonnen optimaliseres. Grunnen til at det blir spredning i forskjellige stoffer er at det forekommer ulike båndspredningsprosesser. Først og fremst består de av longitudinal diffusjon, eddy diffusjon og massetransport i mobilfasen.

5.4.1 Oppsettet til et HPLC-instrument

Som figuren nedenfor viser består et HPLC-oppsett av en beholder med mobilfase som overføres til en injeksjonsport ved hjelp av en pumpe. Sammen med mobilfasen sprøytes prøven inn og blandingen går igjennom en kolonne. Dette gir en spredning av innhold som kan observeres med en detektor. [5]

Mobilfasen

Mobilfasen for HPLC er relativt inert, og som løsningsmidler er ofte metanol eller acetonitril brukt. Disse kan blandes med vann, en vandig buffer eller med hverandre. Mobilfasen bør ha en temperatur som er i likevekt med systemet, og derfor skal ikke løsningsmidlet blandes før bruk. Mobilfasen bør ha kvaliteter som gjør dem transparente i sammenheng med prøven, de bør være rene, ha lav viskositet, lav toksisitet, lite brennbare og lite reaktive. [5]



Figur 5.12: Figuren viser en skisse som forklarer den generelle oppsettet med kromatografi [7]

5.4.2 HPLC SEC

Size Exclusion Chromatography (SEC) er en metode innenfor kromatografi som går ut på å separere molekyler basert på deres hydrodynamiske volum. Her brukes stasjonære faser som har porestørrelser. Disse er i stand til å diskriminere analyttene i en prøve basert på deres størrelser. SEC brukes stort sett til å analysere større makromolekyler som for eksempel polymerer. Størrelsen på molekylet varierer som regel mellom 2000-2,000,000 Da [6]

5.5 Databehandling

Der er en del variasjoner som gjør at resultatene fra en IR-analyse inneholder en rekke feil. Med førprosessering kan en fjerne en rekke av disse effektene. De neste seksjonene beskriver hver av prosessene.

5.5.1 Savitsky-Golay-algoritmen

Det hender at uønskede variasjoner i et spekter kan gjøre det vanskelig å gjøre analyser på et spekter. Savitsky-Golay-algoritmen er en algoritme som er laget for å ”myke opp” et IR-spekter. Savitsky-golay filteret passer et polynom med et bestemt orden, hvor den lager en polynomfunksjon i forutbestemte kanaler med en definert størrelse på vinduet. Her tar den i bruk alle punktene i vinduet for å danne polynomet, før den deriverer polynomet med en bestemt orden. Dette medfører at en rekke fysiske variasjoner blir fjernet med lite tap av informasjon. [18]

5.5.2 Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC)

EMSC fjerner store deler av de fysiske egenskapene som bidrar til å forstyrre resultatene. Dette gjøres først ved å danne et referansespektrum av de signalene i spekteret.[20] Det gjør den ved å følge en ligning. Denne ligningen beskriver EMS.

$$A_i(v) = a_i + b_i \cdot m(v) + d_{1,i} + d_{2,i}v^2 + E_i(v) \quad (5.2)$$

Hvor A er abosorbans, a er grunnlinjeeffekt, b er en skaleringsparameter, d_1 og d_2 er respektivt linjære og kvadratiske grunnlinjeeffekter. Variabelen $m(v)$ er referansespekteret som sammenlignes og $E(v)$ er residualene i uttrykket. Her er det antatt at $E(v)$ har en spektral profil som er noe uavhengig av referansespekteret og den flate grunnlinjen. Poenget med EMSC er å kunne lage en ny korrigeret spektra hvor uttrykket $A_i(v)$ estimeres, så $E_i(v)$ blir minst mulig. Den korrigerete spektra på følgende måte [20].

$$A_{i,corr}(v) = \frac{A_i(v) - a_i - d_{1,i} - d_{2,i}v^2}{b_i} \quad (5.3)$$

5.5.3 Principal Component Analysis (PCA)

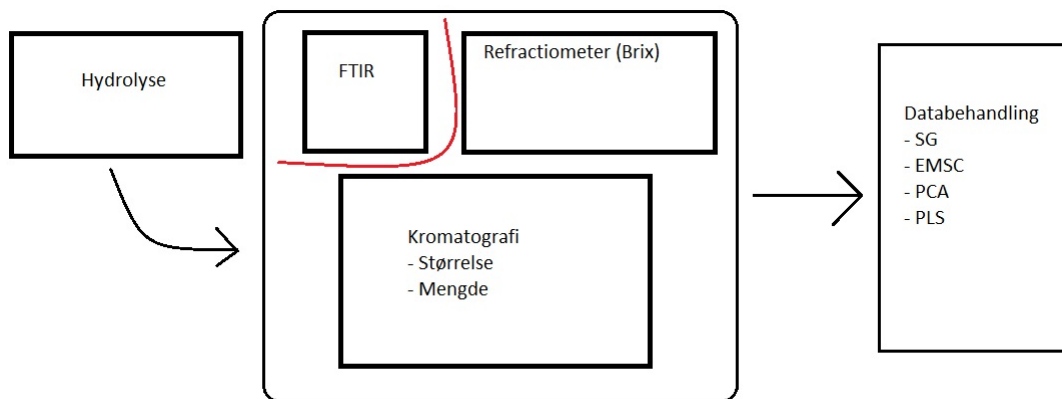
Når det håndteres store mengder informasjon brukes det ofte teknikker som går ut på å forminske antall variabler, med andre ord å redusere mengder dimensjoner uten å redusere på informasjon fra dataene. Her dannes prinsipalkomponenter(PC) som nye variabler. Disse forklarer variasjonen på informasjonen på datasettet i ulike mengder hvor første prinsipalkomponent (PC1) svarer til det meste av informasjonen, andre prinsipalkomponent (PC2) svarer til litt mindre del av informasjonen og så videre. Hver av prinsipalkomponentene danner en score basert på en egendefinert vektning av variablene. Disse kan sees ved hjelp av en produsert loading plot som plottes med prinsipalkomponentene. [24]

5.5.4 Partial Least Square regression analysis (PLS)

PLS er en metode som kombinerer to eller flere datasett til en linjær regresjonsmodell. Den består av flere prediksjonsvariabler og en responsvariabel. Disse er egendefinerte. Med bakgrunn av dette dannes det en modell som tar både prediksjonsvariablene og responsvariablen i betraktning. Videre lages en akse med referanseverdier og prediksjonsverdier. Kvaliteten bedømmes etter korrelasjonen av disse. [25]

6. Materialer og metoder

6.1 Oversikt over det som ble gjort



Figur 6.1: Skissen overfor tar for seg korte trekk hva som ble gjort i oppgaven. Først ble det gjort en hydrolyse av prøvene, videre ble det gjort målinger ved hjelp av de

Som figuren overfor viser starter prosessen med hydrolyse. Her blandes kyllingfilet/skjærebein i vann med en liten mengde enzymer. Videre brukes FTIR for å analysere prøvene, refraksjometer for å gjøre et må på lysbrytningen. Det ble brukt størrelseskromatografi for å kunne gi en indikasjon av størrelsen på de ulike proteinfragmentene. I løpet av oppgaven utføres tre forskjellige oppsett for hydrolyseprosess, hvor de da inndeles i to hovedkategorier. Med en hydrolysator ble det utført hydrolyse av kylling og skjærebein fra kylling. Den siste er et begerglassoppsett som ble brukt for å se om hydrolyseprosessen kunne anvendes med andre hjelpemidler.

Tabell 6.1: Tabellen summerer det som ble gjort i seksjon 6.1.1

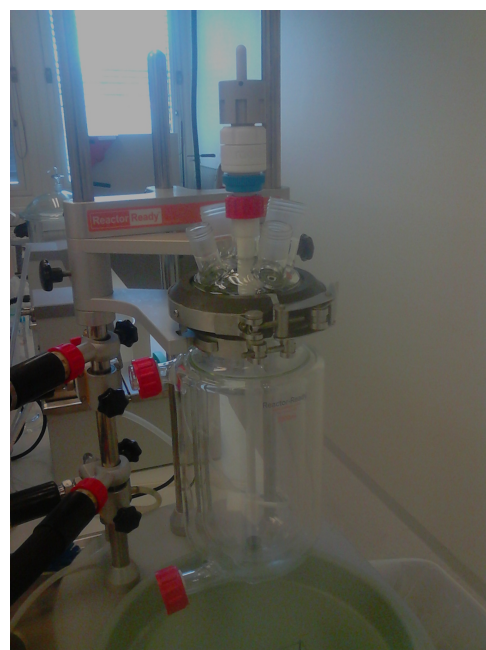
Begerglassoppsett	Hydrolysator med kyllingfilet	Hydrolysator med skjærebein fra kylling
Kyllingfilet ble plassert i et såkalt begerglassoppsett for hydrolyse og en liten temperaturmåler plassert inni for å holde øye med temperaturen. Her blir det kjørt 6 forskjellige replikater som også er kjent som dager. Den eksperimentelle biten er utført av Paul Farstad	Kyllingfilet blir plassert i en hydrolysator. Hydrolysatoren består av en beholder med to lag. Det ytterste laget består av vann som strømmer gjennom med en temperatur som sørger for at temperaturen på innerste laget holder seg på et bestemt nivå. Her ble det kjørt 6 replikater som også er kjent som dager. Den eksperimentelle biten her er utført av Marte Ryen Dalsnes. Paul Farstad utførte samme eksperimentet med samme oppsett.	Skjærebein av kylling blir prossesert i en hydrolysator. Hydrolysatoren består av en beholder med to lag. Det ytterste laget består av vann som strømmer igjennom med en temperatur som sørger for at temperaturen på innerste laget holder seg på et bestemt nivå. Her ble det kjørt 5 replikater som også er kjent som dager. Den eksperimentelle biten her er utført av Marte Ryen Dalsnes

6.1.1 Hydrolysemetoder

I denne oppgaven ble det brukt to forskjellige hydrolysemetoder. En såkalt begerglassoppsett og en hydrolysatoroppsett. For hydrolysatoren utføres eksperimentet med både kyllingfilet og skjærebein fra kylling mens med begerglassoppsettet utføres kun kyllingfilet. For hvert respektive oppsett ble det utført seks eksperimenter.



Figur 6.2: Begerglassoppsettet



Figur 6.3: Hydrolysatoren

Begerglassoppsett

En 500 ml flaske fylles på med 2/3 av totalmassen destillert vann med bruk av målekolbe. Denne plasseres i et 2000 ml begerglass fyllt med 750 ml vann hvor det da settes på et ringlodd for å forhindre oppdrift. Hele oppsettet plasseres på en magnetrører med ovn. Dette sammen med kyllingen ble forsøkt holdt i 50 grader celsius. Her kjøres 6 replikater.

Hydrolysator

Hydrolysatoren tilkobles en pumpe som fylles tilstrekkelig med vann og varmes opp. Hydrolysatoren fylles med 2/3 av totalmassen destillert vann ved bruk av målekolben. Forholdene optimaliseres så til å oppnå 50°C i hydrolysatoren. Enzymet Alcalase fra *Bacillus licheniformis* veiges opp slik at det blir en masse respektivt 1 % av kyllingen. Det vil si 1g enzym per 100g kjøtt. I tillegg måles opp 3 µl av samme enzym og blendes massen med 1 ml vann i et reagensrør. Denne kalles heretter blank. Her kjøres 6 replikater for både skjærebein fra kylling og ren kyllingfilet.

6.2 Innsamling av prøvene

Kylling fra Solvinge ble kjøpt inn og kvernet til mindre biter ved hjelp av en kjøkkenkverner i porsjoner på 150 gram, oppbevart og plassert i fryseren i mindre poser. Disse ble tatt i bruk i dagene som kommer. Skjærebeinet er hentet fra Nofima Hærland slakteri. Skjærebein er rester fra dyr der det inkluderes bindevev og beinrester.

6.2.1 Veiging

Kjøttet veies opp på veieskip hvor massen er 1/3 av totalmassen og plasseres i en 500 ml flaske. 3 gram kjøtt veies også opp for blank prøve. Enzymet Alcalase fra *Bacillus licheniformis* veies opp slik at det blir en masse respektivt 1 % av kyllingen. Det vil si 1g enzym per 100g kjøtt. I tillegg måles opp 3 µl av samme enzym og blendes massen med 1 ml vann i et reagensrør. Denne kalles heretter blank. Her kjøres 6 replikater for både skjærebein fra kylling og ren kyllingfilet.

6.2.2 Prøvetaking og plassering i varmebadet

Etter at oppsettet er blitt varmet opp til 50° C, ble det tatt ut en prøve på 5 ml og ble respektivt kalt Raw. Dette er da en råprøve som ble tatt før enzym blir tilsatt. Sammen med råprøvene ble blankprøven satt i varmebadet som har vann på 90°C. Her blir de plassert i 15 minutter for å kunne stoppe hydrolyseprosessen.

Reagensrøroppsett

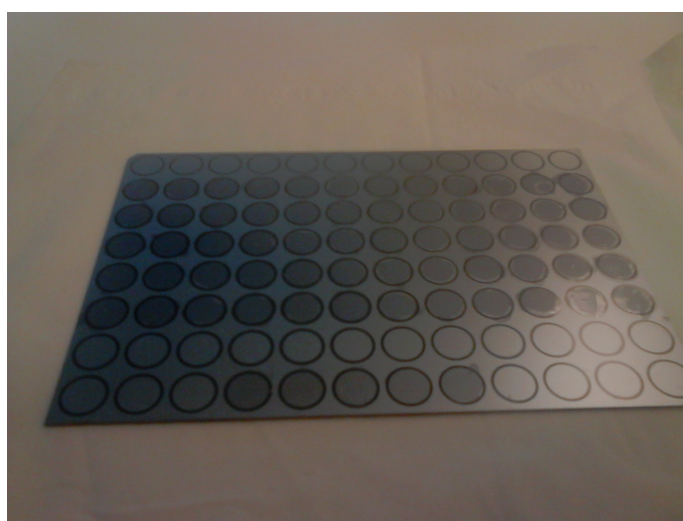
Tolv(12) reagensrør plasseres i stativ i tillegg til blankprøven og merkes respektivt som vist i tabellen under. Merk at blank allerede er laget.

Tabell 6.2: Oppsett for hver av uttakene

Raw	Før tilsatt enzym
Blank	Deaktivert enzym tilsatt kjøtt
005	30 sek
025	2 min 30 sek
050	5 min
075	7 min 30 sek
100	10 min
150	15 min
200	20 min
300	30 min
400	40 min
500	50 min
600	60 min

Etter at prøvene ble tatt ut ble de plassert i varmbad på $90^{\circ}C$ i 15 minutter. Etter at alle prøvene ble tatt ut, ble de sendt til sentrifugering på 4600 rpm i 5 minutter. Dette ble gjort for å separere vannfasen og fast fase fra kyllingen

6.2.3 Applisering på mikroplate og Brix prøvetaking



Figur 6.4: Applisering av prøver på mikroplate

Det aller meste av vannfasen ble tatt opp med sprøyte, og så filtrert gjennom filter som ble brukt i laboratoriet og plassert i nye reagensrør. Med hver av disse ble de applisert på microplater som ble brukt til IR analyse. Her ble de applisert med fem replikater, som da er representert som kolonner i mikroplaten ved hjelp av en pipette. Det ble gjort Brix målinger ved hjelp av en refractrometer. Her ble brix enheten og temperaturen notert.



Figur 6.5: Bruk av Refraktiometeret



Figur 6.6: IR-instrumentet

6.3 Kromatografi (HPLC SEC)

Denne delen ble gjort av to forskjellige personer. Hydrolysatene med begerglassoppsett ble utført av Paul Farstad, mens prøvene med hydrolysatoroppsettene ble utført av Sileshi Gizachew Wubshet. Eksperimentene ble utført på akkurat samme måte.

Prøvene fra hydrolysen ble tatt ut fra oppbevaringen med 1 ml pippette over til kolonneglass og merket kopierte. I tillegg fylles et av glassene med Mili-Q vann. Prøvene tas med til Kromatografi-instrument hvor prøvene plasseres i et brett.

Instrumentet er Millex-HV PVDF 0.45 m 33 mm filter (Millipore AS) og kolonnen er av typen BioSep-SEC-s2000 column (Phenomenex).

Tabell 6.3: Innstillingene for HPLC-instrumentet

Utstyr/Kjemikalie	Innstilling
Kolonne	BioSep-SEC-s2000 column
Løsningsmiddel	Acentonitril og ultrarent vann med proporsjon 30:70 v:v med 5% TFA
Rensemiddel	0,1M NaH ₂ PO ₄
Elueringshastighet	0,90 ml/min
Detektor	214 nm UV



Figur 6.7: HPLC-instrumentet

Før injeksjonen av prøvene var de filtrert igjennom en Millex-HV PVDF 0.45 m 33 mm filter (Millipore AS). Injeksjonsvolumet var på $10 \mu\text{l}$. Mobilfasen bestod av en blanding med acetonitrile og ultra ren vann med fordeling 30:70 (v:v), som inneholder 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). Elueringen hadde en flow speed på $0,9\text{mL}/\text{min}$ på 17 minutter. Mellom tidene 17.0 og 17.1, mobilfasen ble skiftet til NaH_2PO_4 og opprettholdt til minutt 20.00 for å kunne rense kolonnen. Innstillingene til eluering ble opprettholdt imellom 20.0 og 20.1 og holdt opp til minutt 45.00 for å komme til likestillingspunktet. Kolonnen ble holdt i romtemperatur med en fotometrisk detektor på 214 nm.

Alle de oppbevarte prøvene fra hydrolyseprosessen ble tatt ut for hver replikat de representerte og ble kjørt med HPLC. Informasjonen derifra ble kalibrert frem til parametrene gjennomsnittelig molekylstørrelse (g/mol) og et tall for mengde protein(areal). Denne kalibreringen er laget ved hjelp av en rekke standarder med kjente molekylvekter som vist i Kalibrering HPLC og gjort ved å selektere ut det relevante toppområdet.

6.4 Kjemometri

Før det ble gjort en mer sammenhengende analyse som inkluderer PCA og PLS ble det utført preprocessing. Alt av kjemometri ble utført ved hjelp av The Unscrambler X 10.3.

Det ble brukt Savitsky-Golay derivivering av IR-spekterene med følgende instillinger.

Tabell 6.4: Instillingene for Savitsky golay

Polynom order	Derivative order	Smoothing points
2	2nd derivative	11 (symmetric kernel)

Det kjøres EMSC med følgende instillinger under options (bare options).

Tabell 6.5: Instillingene for EMSC

Function	Channel number	Squared channel number
Full MSC	Model & substract	Model & substract

PCA

Ut av de tallene ble tallverdiene redusert med gjennomsnitt med reduksjonsfaktor 5 på prøvene. Dette for å ta gjennomsnitt av replikatene. Videre ble det brukt PCA med 7 prinsippal komponenter. Dette ble gjort for å se om de forskjellige uttakstidspunktene gav forskjellig verdi og om de er separable basert på deres opptakstidspunkt som vist i tabell 3.1.

PLS

Det ble utført en PLS-analyse. Her brukes responsvariabelen gjennomsnittelig molekylvekt(g/mol) over areal parameteret (nevnt som AMW/A) og de preprosesserte dataene fra FTIR. Dette gjøres først og fremst fordi en ønsker å standardisere tallene ettersom tiden før hydrolyseprosessen startet varierer. Flere PLS-analyser ble kjørt for å finne frem til et godt antall faktorer og som kan forklare mest mulig informasjon uten betydelig grad av ”overfitting”.

7. Resultater og diskusjon

Et moment ved eksperimentet er å kunne se om en kan bruke begerglassoppsett ved hydrolyse av proteinprodukter som en fungerende alternativ for hydrolysatoren, da prinsippet er betydelig enklere. Metoden testes også på skjærebein i håp om et større spekter av applikasjoner.

7.1 FTIR

I denne seksjonen vil alle resultater som omhandler FTIR. Her diskuteres resultatene fra begerglassoppsettet, og hvor informasjonen her blir sammenlignet med informasjonen fra hydrolysator. Videre sammenstilles resultatene fra kyllingfilet med skjærebein fra kylling.

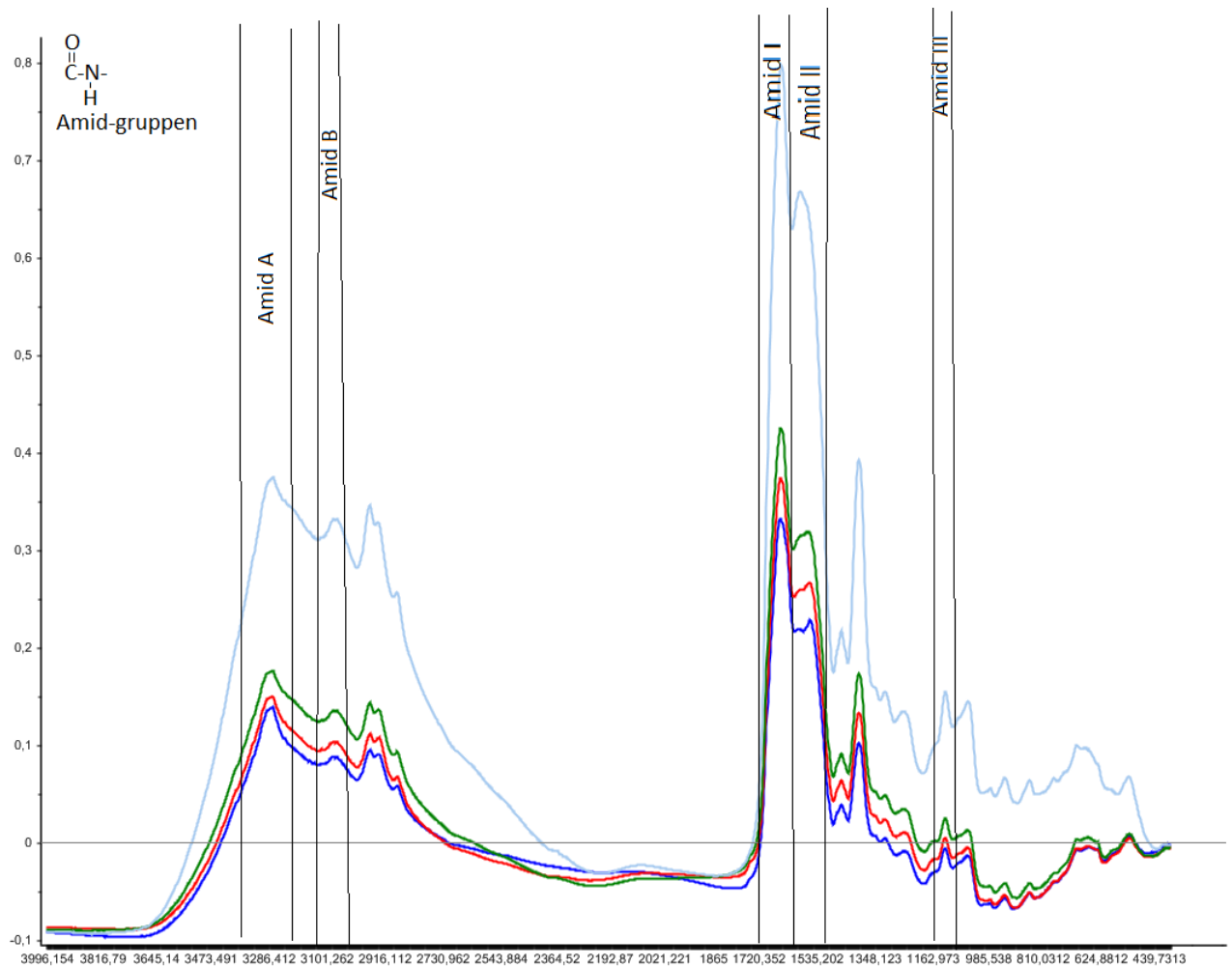
7.1.1 Råspektre

Figurene nedenfor viser til et såkalt IR råspekter av hydrolyseprosessen med flere bånd som representerer de nevnte uttakstider. Utifra det en kan se i spektra her er at i området rundt 1600 cm^{-1} er det stor variasjon i de ulike uttakstidene. Dette skyldes mest sannsynlig karbonyl og amider-bindinger. Det lange strekket som oppstår i området $2500\text{--}3500$ tilsvarer med stor sannsynlighet et alkohol-område med amid A og B som beskrevet i seksjon 5.3.3.

Informasjonen fra begerglassoppsettet og hydrolysator ser ut til å være veldig lik hverandre med tanke på formen av spekteret. Begge ser ut til å ha veldig tydelige Amid I og Amid II-bånd, mens for skjærebein er Amid II-båndet noe mer sammenlagt i spekteret.

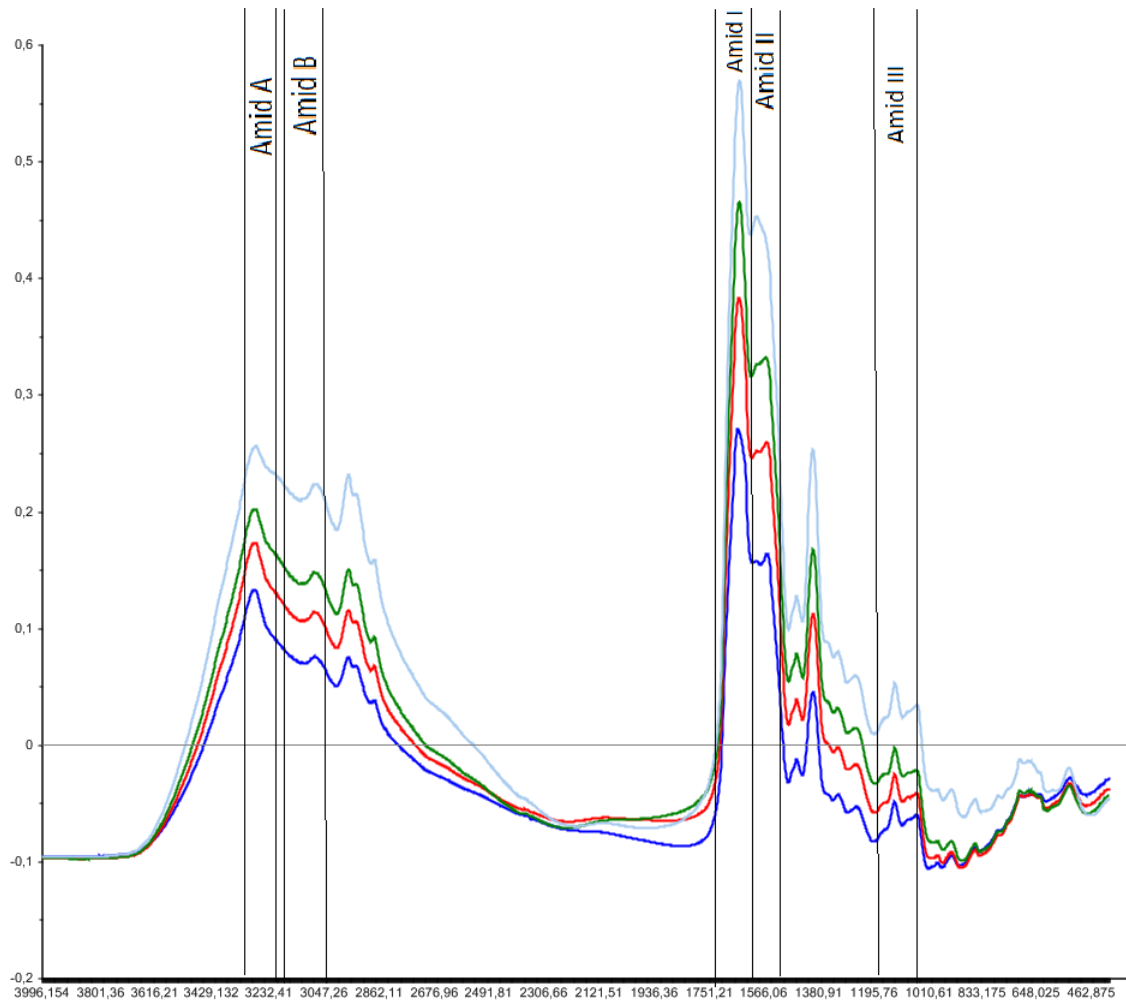
Generelt ser en at signalene blir sterkere og sterkere med uttakstidene. Når en differensierer mellom de forskjellige linjene, ser en at de øverste toppene på ca 1600 cm^{-1} forskyver seg til litt lavere bølgetall. Teoretisk gir dette mening, da dette kan svare til dannelse av flere primære amider. Dette er en konsekvens av hydrolyseprosessen. Disse gir litt lavere lesning i bølgetall. [12].

Figur 7.1 viser at det kommer et økende mål på intensitet etterhvert som tiden går, noe som kan tyde på at mengde proteiner som kommer ut i vannfasen øker eksponensielt. Siste noterte måling på 50 minutter har betydelig høyere intensitet og en får en økende intensitet i mindre definerte områder, særlig på området 2500 cm^{-1} . Videre kan en se at amid I og amid II-båndene blir mer og mer "smeltet" sammen og blitt mer og mer tydelig. Ratioen av amid I og amid II endres også med tiden på den måten at amid I båndet får høyere og høyere intensitet enn amid II. Dette kan brukes til å estimere kjedelengen hos proteinene.



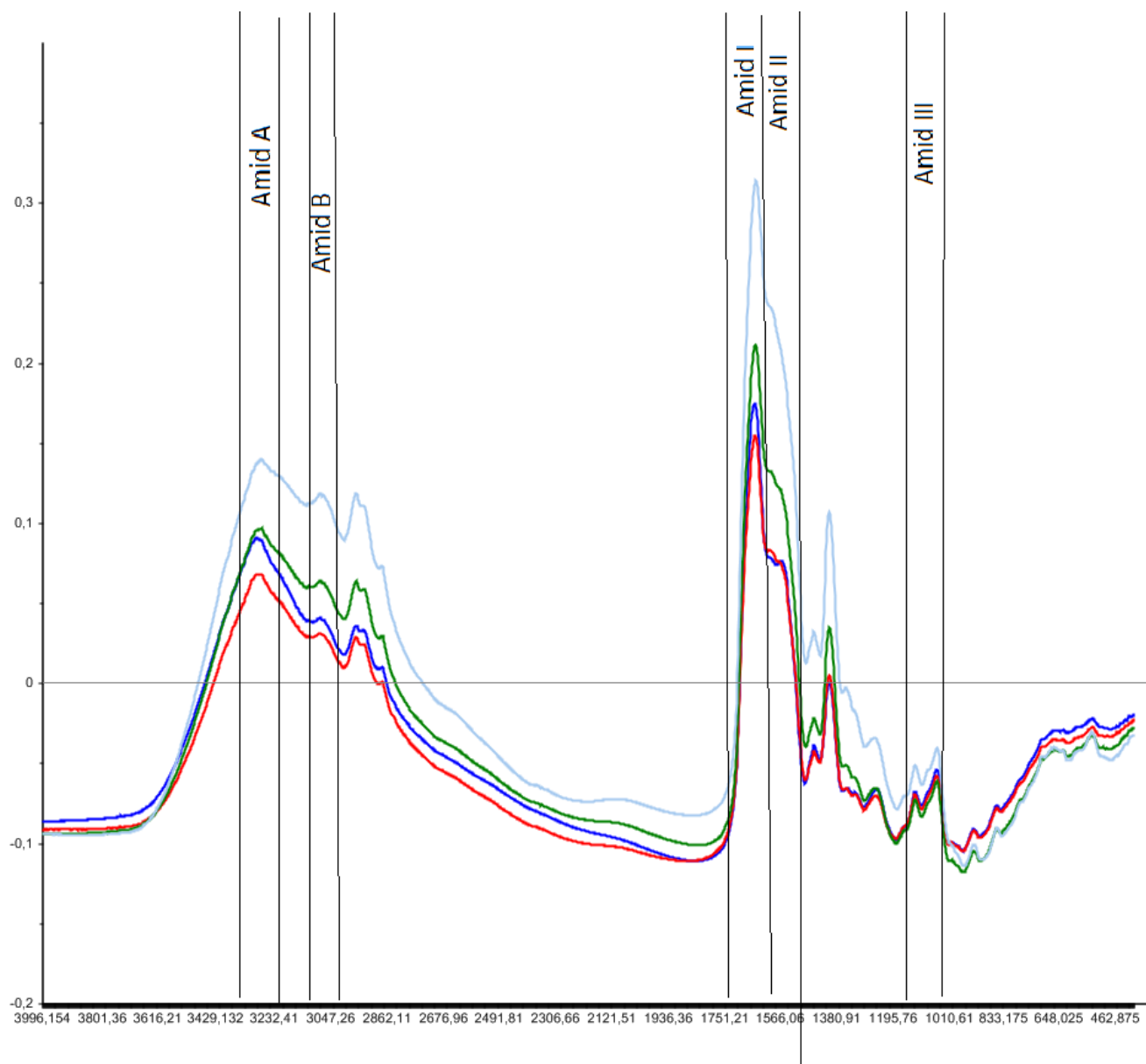
Figur 7.1: IR spektra viser noen av uttakstidene for kyllingfilet i begerglassoppsett. He vises uttakstidene 30 sekunder(blå), 7 min 30 sek(rød), 20 min (grønn) og 50 min (lys blå)

Figur 7.2 viser et IR-spektra fra kyllingfilet i hydrolysator. Intensitetenene her økes over tid, men i langt mindre grad enn det som er observert i figur 7.1. Det er også tegn til en spesiell "lomme" ved region 1750 cm^{-1} som også er observert i figur 7.1, men som i dette tilfellet er mye mer tydelig. Overlappingen av amid I og II er og blitt mer tydelig og endringen av ratioen skjer på samme måte som hos figur 7.1.



Figur 7.2: IR spektra viser noen av uttakstidene for kyllingfilet i hydrolysator. He vises uttakstidene 30 sekunder (blå), 7 min 30 sek (rød), 20 min (grønn) og 50 min (lys blå)

Figur 7.3 viser et IR-spektra av hydrolyseprosessen til skjærebein i hydrolysator. Intensiteten til hver av uttakstidene øker over uttakstidene, men langt fra så dramatisk som de andre oppsettene. Spekterene ser ut til å ha en mykere form enn for de andre oppsettene som trolig vil si at der er mer overlapp i dette tilfellet. Dette legges særlig merkes til i amid I og II. Videre ser det ut til at strekkene over hele spekteret "løftes" opp med uttakstidene, i sammenligning med de andre spekterene som har denne effekten avgrenset til bestemte regioner.



Figur 7.3: IR spektra viser noen av uttakstidene for skjærebein i hydrolysator. He vises uttakstidene 30 sekunder(blå), 7 min 30 sek(rød), 20 min (grønn) og 50 min (lys blå)

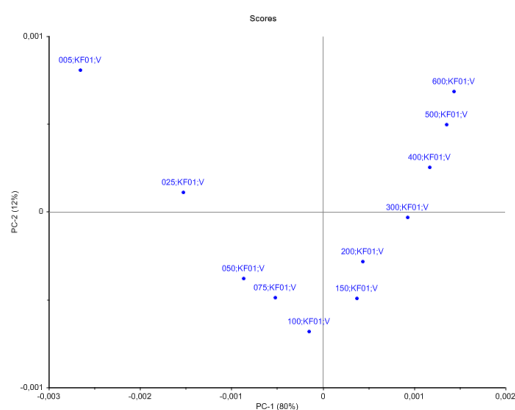
7.1.2 PCA-plot og deres tilhørende loading plot.

Figurene nedenfor utgjør eksempler på informasjon fra FTIR som er plottet i PCA med deres loading plot ved siden av. Alle disse ble førprosessert med både Savitsky-Golay, EMSC og de fem replikatene på microplate ble det tatt gjennomsnittet av. PCA- figurene viser en relativ forskjell mellom prøvene der all informasjon fra FTIR-dataene er tatt med.

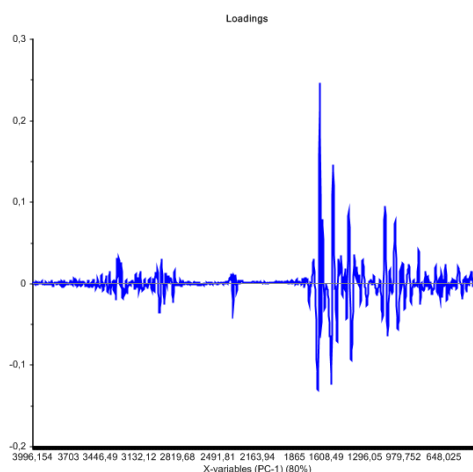
Her er det klart skille mellom de ulike uttakstidene som en kan se variasjonen ved hjelp av X-aksen, også kjent som PC1, og inneholder mye mer informasjon. Begerglassoppsettet og kyllingfilet i hydrolysator set ut til å ha dataene formet på tilnærmet lik måte, men informasjonen fra skjærebein er mye mer annerledes. Informasjonen fra skjærebein på PCA set ut til å gå i motsatt retning formen på de ulike data-punktene.

Figur 7.4 viser et klart skille mellom de ulike uttakstidene på PCA, hvor en kan se at det er mye sammenheng mellom uttakstidene og PC1. Loadingplottet (figur 7.5) som er

vist som er et linje av PC1 med spredning av informasjon er det vist at området på 1600 cm^{-1} er det tydelig mest variasjon.

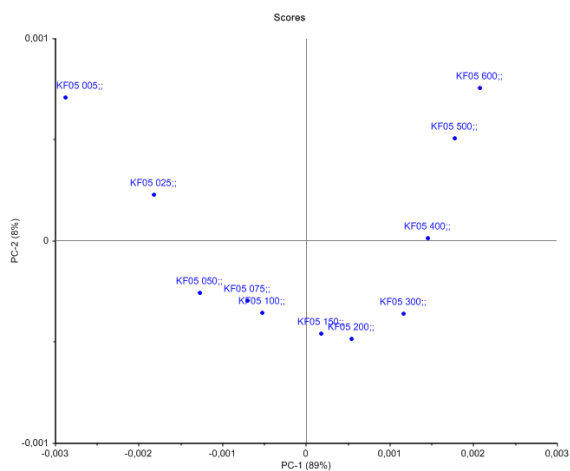


Figur 7.4: Et representativt bilde av IR-dataene ved hjelp av PCA på beerglassoppsettet

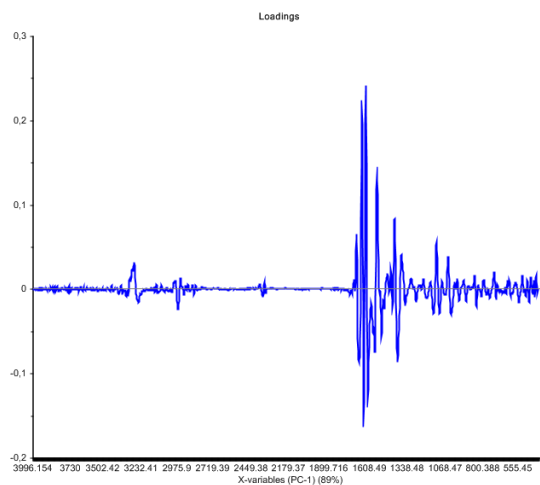


Figur 7.5: Loadingplot av PCA-figuren med beerglassoppsett.

Figur 7.6 viser et PCA-plott av oppsettet med kyllingfilet i hydrolysator. Her er det en klar linær forhold mellom PC1 og uttakstidene som en kan lese av med tidligst uttakstid fra venstre og som følges kronologisk opp mot høyre. Loading plottet på figur 7.7 viser spredningen av informasjon på et mer konsentrert område enn for figur 7.5.

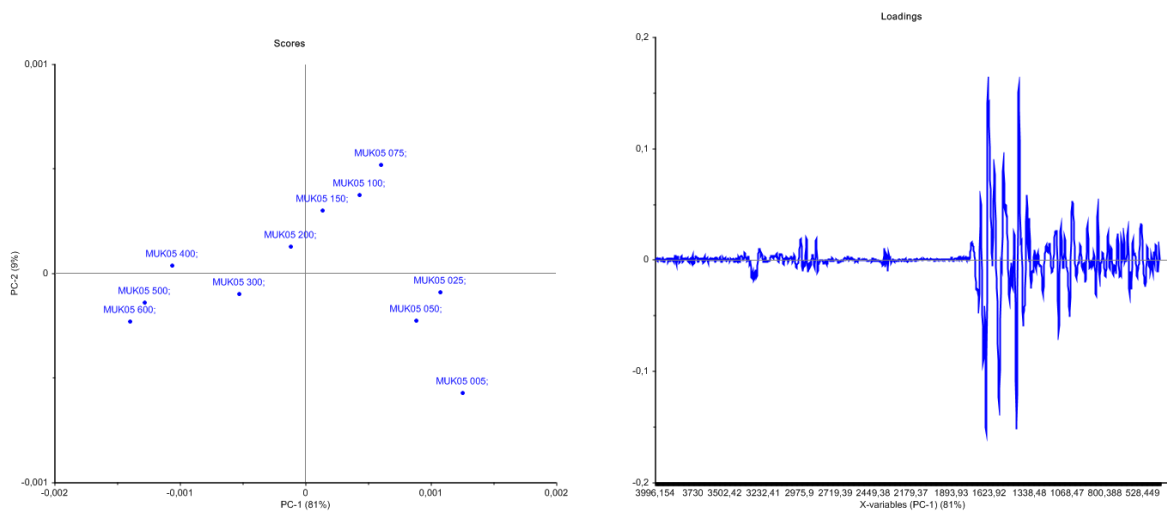


Figur 7.6: Et representativt PCA-plott av kyllingfilet ved hjelp av hydrolysator



Figur 7.7: Loadingplot av PCA-modellen med kyllingfilet i hydrolysator.

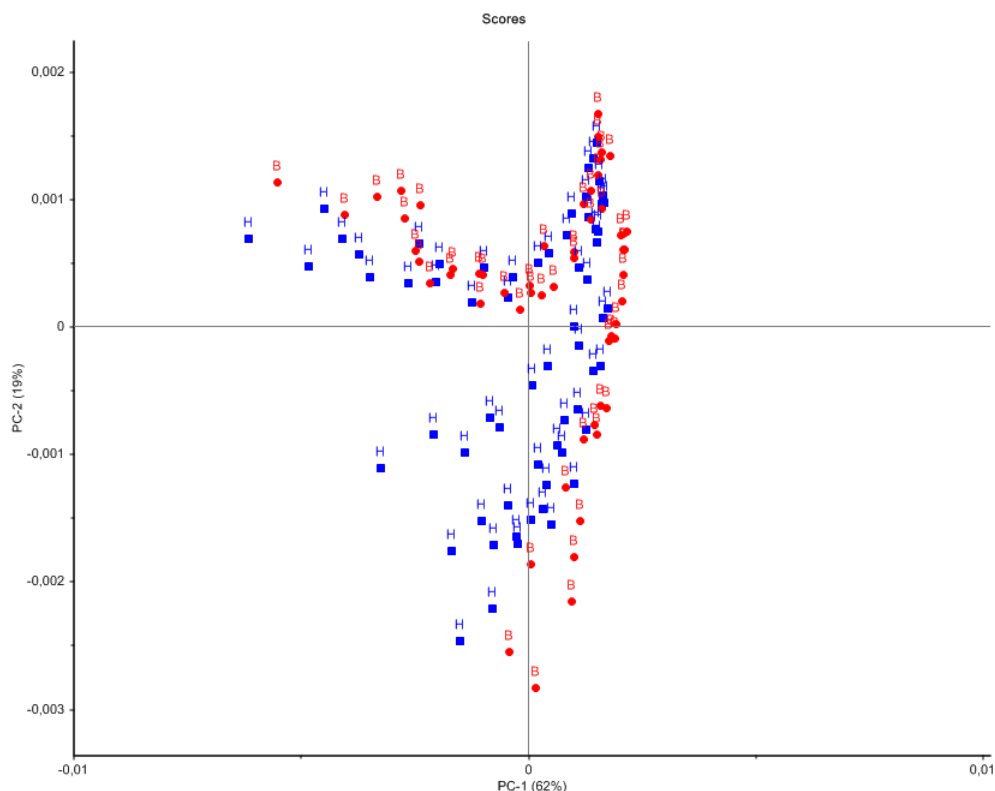
Figur 7.8 viser et PCA-plott av oppsett med skjærebein i hydrolysator. En kan se her at PCA-plottet for skjærebein går i en motsatt retning av de andre oppsettene, og har også en helt annen form. Retningen er relativ, men likevel er det viktig å ha klart for seg at skjærebein har et mer komplekst oppbygging av komponenter enn for kyllingfilet. Figur 7.9 viser loading plottet som viser at variasjonen på informasjonen er noe mer spredt sammenlignet med de oppsettene som er gitt for kyllingfilet-oppsettene. Trolig kommer dette av flere andre komponenter i løsningen enn det som er i ren kyllingfilet. Råspekteret på figur 7.3 viste og et "løft" i hele spekteret med uttakstidene, noe som trolig kommer frem i figur 7.9.



Figur 7.8: Et representativt PCA-plott med Figur 7.9: Loadingplot av PCA-modellen med skjærebein fra kylling.

7.1.3 Sammenligning mellom begerglass og hydrolysatoroppsett

Figur 7.10 viser til den relative forskjellen mellom dataene i FTIR mellom kyllingfilet prosessert i begerglass og i hydrolysator. Den informasjonen ser ut til å indikere at datene er nokså like. Det ser en ved at de danner paralelle mønstre med svært kort avstand mellom punktene. Dette er med på å indikere at det er mulig å bruke begerglassoppsett for hydrolysering av kyllingfilet. Informasjonen her er tilsvarende for det som ble funnet ut i råspekteret.



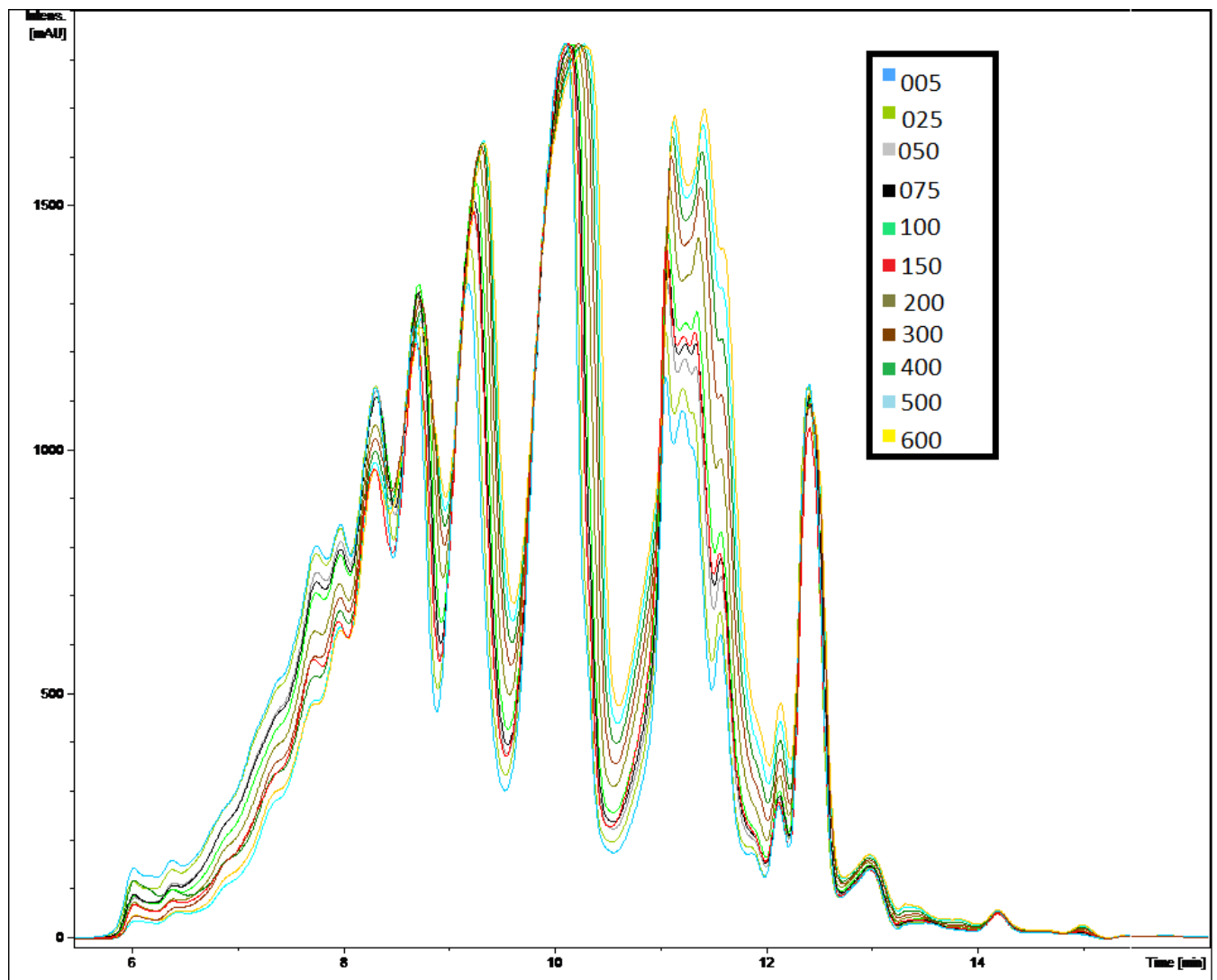
Figur 7.10: FTIR spektra av hydrolysator hydrolysate plottet sammen i PCA med beerglass-hydrolysate. Rød B viser til beerglassoppsett og blå H viser til Hydrolysatoroppsett.

7.2 HPLC kromatogrammer

Med alle fotografiene av kromatogrammene er der en trend i hvor intensiteten øker og senker seg. I de kromatogrammene ser en tydelig at fra tid 6-8 minutter viser trenden seg på den måten at tidligste uttakstider kommer øverst og følger kronologisk ned mot senere uttakstider. Denne trenden er stort sett satt på hode i region 10-12 minutter. Dette her bidrar til å gjøre det noe lettere å finne sammenhengen mellom HPLC- data og FTIR data. Her er det også tydelig at figuren for beerglass og hydrolysatoroppsett i formen er heller identisk.

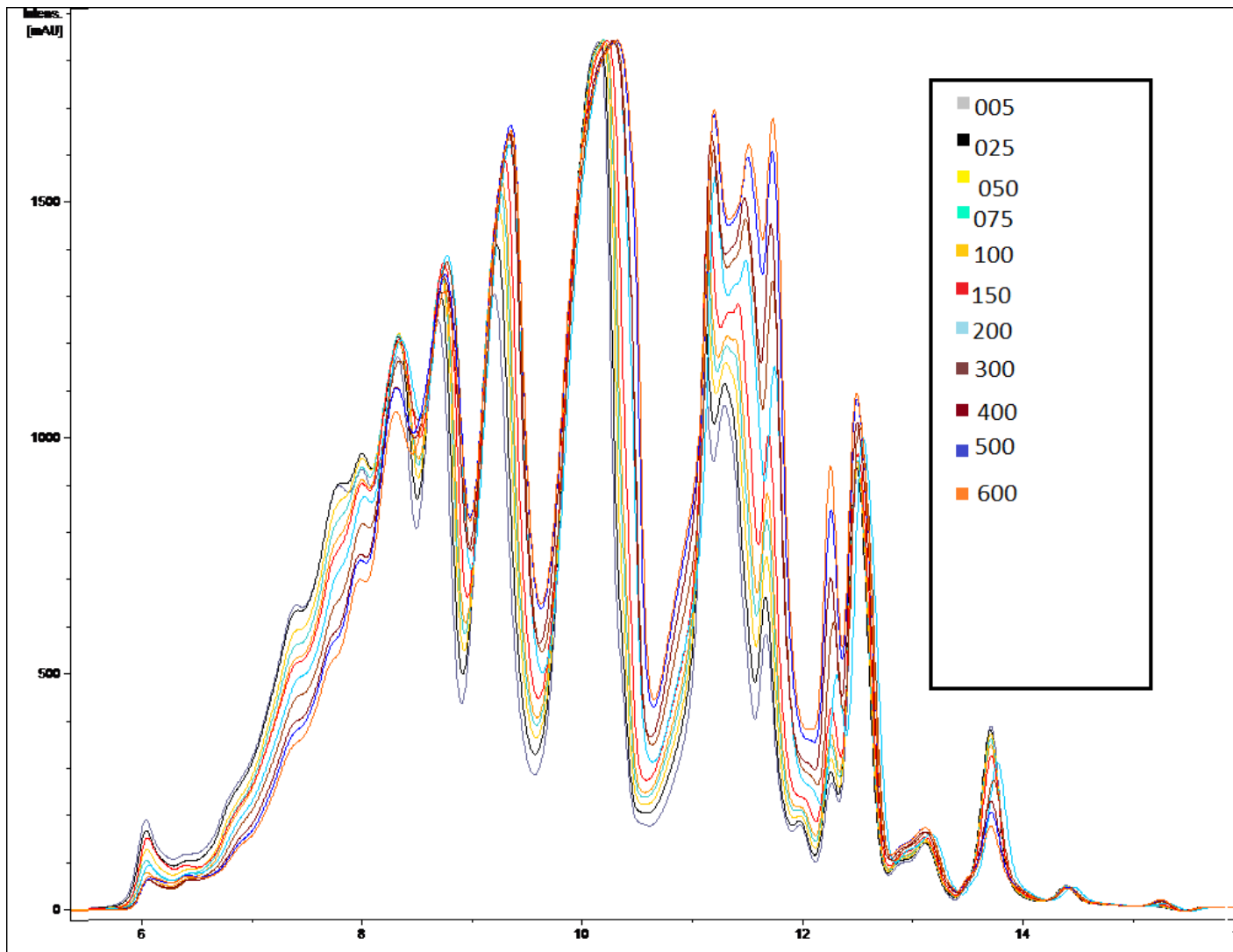
Ifølge det kalibreringen (se vedlegg Kalibrering HPLC) viste, har det seg slik at de molekylene som kommer med retensjonstid rundt 12 er svært korte peptidkjeder på lengde to eller tre om de ikke består av helt separate aminosyrer. Molekylvekten der estimeres til ca 200-300 g/mol. Det er stor variasjon i området på 10-12 minutter og 6-8 minutter. Dette svarer til rundt 600 g/mol og en variasjon fra 66000- 4000 g/mol. Et felles moment med alle tre kromatogrammer er at det ser ut til å skje en vending av de forskjellige uttakstidene på tispunktet 8,1 minutter noe som svarer til ca 5200 g/mol utifra kalibreringen.

Begerglassoppsettet (figur 7.11) ser ut til å ha en en trend på 6-8 minutter hvor intensitetene senker seg og i området på 10-12 minutter viser trenden til å være helt motsatt. I området fra 8 til 10 minutter ser det ut til å være svært liten spredning av informasjon av de ulike prøvene på ulike uttakstider.



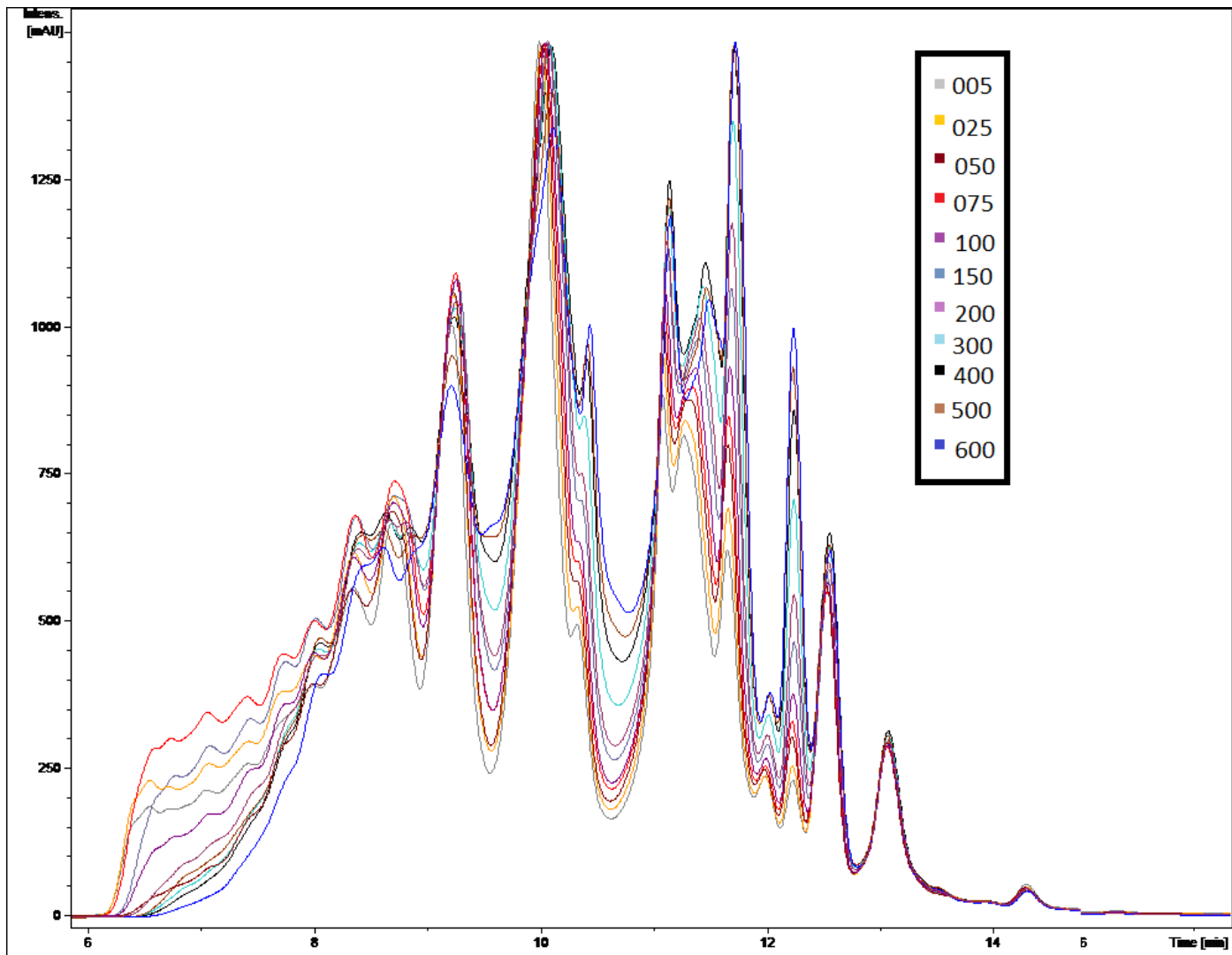
Figur 7.11: Et representativt bilde av kromatogram med begerglassoppsett

Oppsettet med kyllingfilet i hydrolysator har et kromatogram som er mer tilnærmet lik for begerglassoppsettet som vist i figur 7.12. Spredningen i de ulike prøveuttakene skjer på samme tid, men her ser det ut som om denne figuren har noe mer større proteiner og tendensen er litt mer definert for de tidligere uttakstidene.



Figur 7.12: Et representativt bilde av kromatogram med kyllingfilet i hydrolysator.

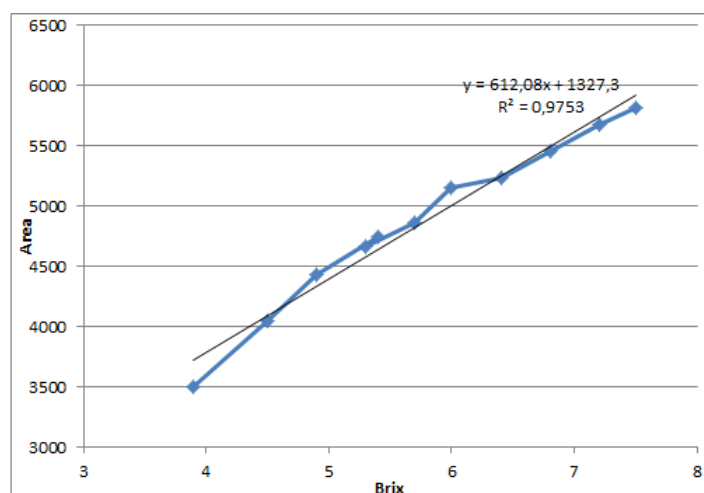
Oppsettet med skjærebein ser ut til å være forskjellig fra de andre oppsettene. Det som først og fremst blir lagt merke til er at skjærebein har et betydelig mindre antall store proteiner. I tillegg er det noe mer spredning i de forskjellige uttakstidene.



Figur 7.13: Et representativt bilde av kromatogram med skjærebein i hydrolysator.

7.3 Et representativt modell av Brix og areal

I eksperimentet ble det brukt et refractometer for å se etter sammensetningen imellom parameteren Brix fra refractometeret og areal fra kalibreringen i HPLC SEC. Arealparameteren gir et grovt mål på proteinmengden i løsningen og brix gir et grovt mål på lysbrytningen i en løsning. Trolig er det en sammenheng mellom disse. Med en korrelasjonskoeffisient på $R^2=0,9753$ så viser figur 7.13 at det er en sammenheng mellom parameterene areal og brix. Likevel vil dette være i en meget grov forstand, men likevel egner brix seg for å kunne brukes til å gjøre et relativt mål på mengde peptider i prøvene.



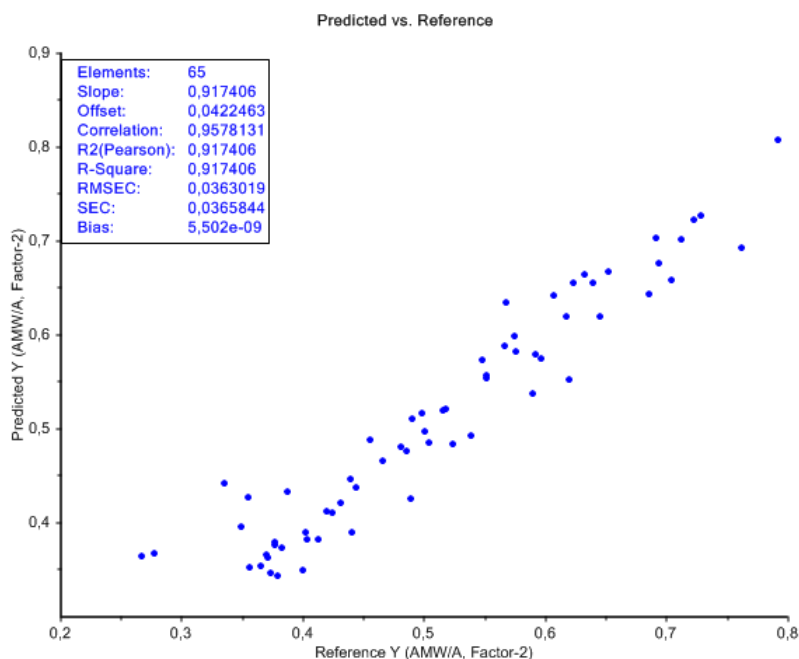
Figur 7.14: Informasjonen her viser parameteren areal plottet som en funksjon av Brix.

7.4 PLS-figurer og sammenstilling av informasjonen

Nedenfor kommer tre forskjellige PLS-figurer fra de forskjellige hydrolyse-oppsettene. Alle disse har informasjon som er blitt preprosessert på lik måte som beskrevet i seksjon 6.4. De har hver sin R^2 -verdi og en tilhørende "root mean squared error of prediction" (RMSE) verdi som er et mål på distanse fra modellen generert av ved hjelp av PLS. Av aksene på figurene brukes gjennomsnittelig molekylvekt (g/mol) over areal som responsvariabel som da forklares ved hjelp av FTIR signaler. Disse er samlet til en variabel kalt AMW/A. Grunnen til at AMW/A ble brukt var for å få ut mer standardiserte tall ettersom kalibreringen gav ut flere verdifulle variabler, hovedsakelig fordi prøvene hadde visse differanser for oppstart av hydrolyseprosessen.

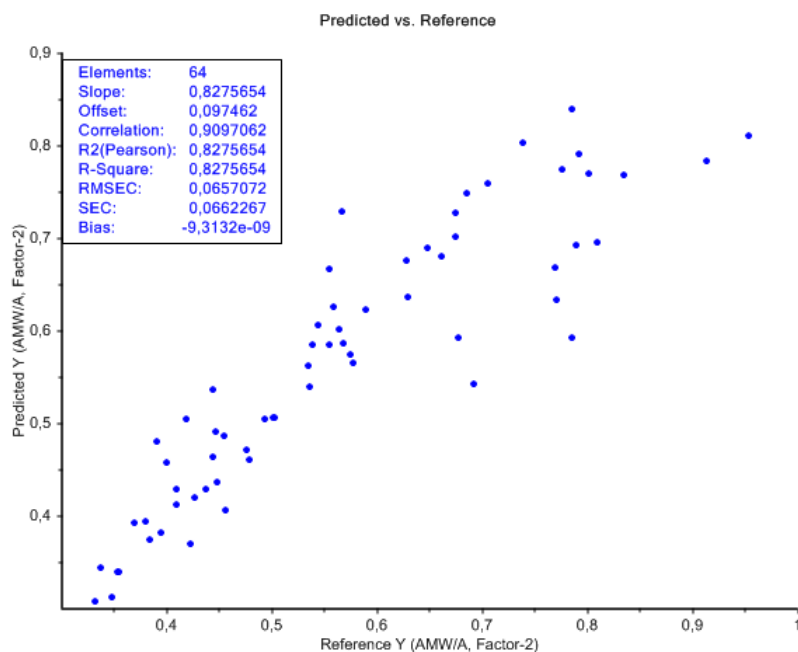
Hos alle PLS-figurene ser en at der er en ganske stor korrelasjon med FTIR- målingene og de størrelsene som er oppgitt med HPLC SEC med tanke på deres R^2 - verdi. Den resulterende grafen for skjærebein for kylling ser ut til å ha større korrelasjon enn både kyllingfilet i begerglassoppsettet og i hydrolysator.

Med kylling i begerglassoppsettet (Figur 7.16) ser modellen ut til å ha en veldig stor linæritet på nesten hele området med liten spredning av informasjon. På grunn av et lavt antall faktorer som ble brukt til å forklare informasjonen, er modellen svært solid for å forklare informasjonen.



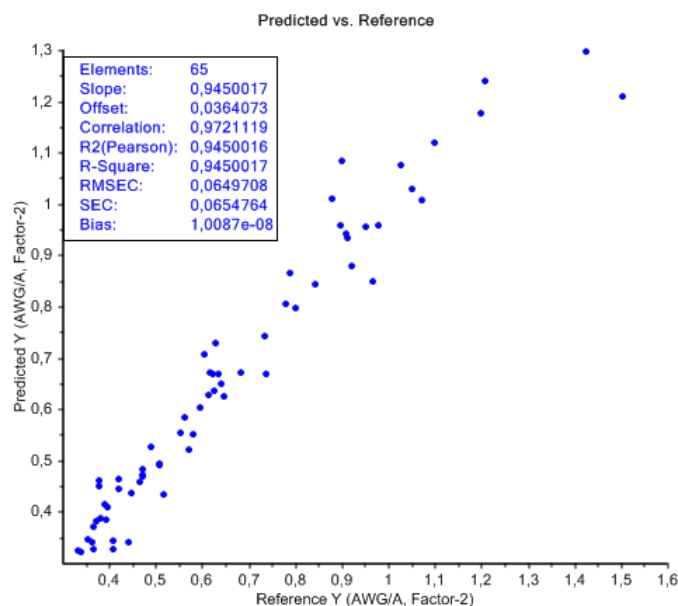
Figur 7.15: PLS av Kyllingfilet i begerglassoppsett. Her ble det brukt preprosessert FTIR-resultater som prediksjonsvariabler og responsvariabelen gjennomsnittelig molekylvekt over areal. Her brukes fem faktorer.

PLS-figuren med kyllingfilet i hydrolysator har en $R^2 = 0.83$, noe som er litt lavere enn for begerglassoppsettet. I tillegg ser det ut til at etterhvert som variabelen AMW/A øker, så endes det opp med en økende spredning av informasjon. Dette kan bety at modellen ikke er godt egnet til å kunne brukes på molekyler med større molekylvekt. Ifølge kalibreringen for HPLC SEC så ser det ut som at molekyler med molekylvekt med større vekt enn 30000 g/mol havner utenfor det lineære området og på HPLC-modellen ser det ut til at der er flere større molekyler til stede.



Figur 7.16: PLS av Kyllingfilet i hydrolysator. Her ble det brukt prerprosessert FTIR-resultater som prediksjonsvariabler og responsvariabelen gjennomsnittelig molekylvekt over areal. Her brukes 6 faktorer for å forklare informasjonen.)

Figuren for skjærebein ser ut til å ha korrelasjonskoeffisient som er meget høy, har et antall faktorer på 4 og i tillegg er det veldig liten spredning av informasjon. Dette tilsier at modellen er svært solid til å forutsi variabelen gjennomsnittelig molekylvekt over areal (AWG/A). En grunn til at modellen virker solid kan være at skjærebein inneholder betydelig færre større molekyler og har det aller meste av sine molekyler inne i det lineære området for kalibreringen.



Figur 7.17: PLS av skjærebein av kylling. Her ble det brukt forprosessert FTIR-resultater som prediksjonsvariabler og responsvariabelen gjennomsnittelig molekylvekt over areal. Her brukes 4 faktorer til å forklare informasjonen

7.5 Oppsummerende diskusjon

I løpet av resultatene ble det vist hvorledes verktøyene FTIR og HPLC SEC henger sammen med størrelsen til hydrolyserte peptider. Først og fremst er det kommet frem at de forskjellige uttakstidene på alle hydrolyseeksperimentene har en forskjell på intensitetsmålinger. De korrelerer med uttakstidene med mønstre av intensitetsgrad, noe som hjelper med å kunne lage kalibreringen.

Råspekterene av FTIR viste at ratioen av amid I og amid II forandret seg over tid på uttakene, noe som har vist seg å være en betydelig parameter i å lage kalibreringen av PLS (se appendix).

HPLC-resultatene viste at kyllingfileet inneholder mange flere større proteiner, noe som i den mer ekstreme delen av kromatogrammet falle utenfor kalibreringen. Dette tas med i betraktning når gjennomsnittelig molekylvekt blir beregnet og tilsier at metoden har noen begrensninger med tanke på kvantitative målinger. Dette kan sees både i figur 7.12 og i sin tur kommer konsekvensene som vist i figur 7.16, med alle ”uteliggerene” av PLS-modellen.

Parameteren areal gav oss et relativt mål på hvor mye proteiner det er i løsningen, noe som ble verifisert ved bruk av refraksjonmeteret. Refraksjonmetri er en metode som er industrielt brukt til å måle grad av hydrolyse (DH%), og her blir det validert at areal over kromatogrammet i HPLC SEC gir et tilsvarende mål på hydrolysegrad.

Konklusjon og videre arbeid

Utifra resultatene som er kommet opp har det vist seg at det er en sammenheng mellom FTIR og HPLC SEC. Dette tyder på at det er mulig å tilfredsstille industriens økonomiske krav, i det de kan stille med mindre kostbare løsninger på å bruke hydrolyse for å fremstille ønskede proteinprodukter. Korrelasjonen på PLS-metoden med skjærebein fra kylling viste seg å være høyere enn for begge de andre oppsettene for hydrolyse. Dermed ser det ut til at metoden fungerer godt for det tilfellet. Med kylling i begerglass og hydrolysator hender det at der er makromolekylene som havner utenfor det lineære området for kallibreringen, som og har konsekvenser for deres resultat. Dermed kan det enda ikke fastslås at skjærebein fungerer ”bedre” til metoden. For både begerglass og hydrolysatoroppsettet, viste PLS-diagrammet likevel en høy korrelasjon mellom deres FTIR og HPLC SEC data. Dette indikerer at der muligheter for å kunne lage en kalibrering mellom deres FTIR og HPLC SEC data.

Det har ikke vært observert store forskjeller mellom hydrolyse fra begerglassoppsettet og hydrolysatoroppsettet. Dette indikerer at hydrolysatet kan produseres uavhengig av en hydrolysator og at tilsvarende resultater kan likevel oppnås. Skjærebein har en litt mer komplekst oppbygning inkludert bindevev og beinmateriale, men likevel blir det endt opp med en modell som er absolutt brukbar for å kunne gjøre et mål på grad av hydrolyse.

Metoden kan videreutvikles ved å lage en kalibrering for HPLC SEC som faller innenfor det lineære området, eller tilpasse forholdene slik at proteinene faller innenfor et lineært område. I håp om å en gang utviklet en mer universell applikasjon av IR, burde denne metoden også testes ut på andre produkter enn for kylling. Siden sammenstillingen av FTIR og kalibrering fra HPLC SEC ikke bare gir et mål på hydrolysegrad, men også et mål på proteinenes gjennomsnittlige størrelse, er det likevel stort potensiale i dette.

Referanser

- [1] Ginsburg, A., Schachman, H., *Studies on the Enzymatic Breakdown of Proteins: Action of chymotrypsin on insulin* Volume 2 (1), 1960
- [2] Ruckebusch, C., L. Duponchel, et al. (2001). *Degree of hydrolysis from mid-infrared spectra*, *Analytica Chimica Acta* 446(1-2): 257-268.
- [3] <http://www.vg.no/nyheter/innenriks/mat/en-tredel-av-maten-i-verden-kastes/a/10141811/> (20.04.2016)
- [4] Paddon-Jones, D. et al. Protein weight management and satiety. 2008 *American Journal of Clinical Nutrition* (87)
- [5] Miller, J., 2009 *Chromatography Concepts & Contrasts*, 2nd edition, Wiley, 186
- [6] Miller, J., 2009 *Chromatography Concepts & Contrasts*, 2nd edition, Wiley 226-232
- [7] <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-5/> (10.04.2016)
- [8] <http://www.framtiden.no/201301105962/aktuelt/mat/halvparten-av-verdens-mat-kastes.html> (20.04.2016)
- [9] <https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme> (15.06.16)
- [10] <https://quizlet.com/31428351/proteins-flash-cards/> (20.04.2016)
- [11] Rønning, S., Pedersen, M., Kirkhus, R., Rødbotten, R., Lindberg, D., 2016 *Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoff - fremstilling, funksjon og markedsmuligheter*,
- [12] Williams, D., Fleming, I., 2008 *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 6th edition, McGraw-Hill Higher Education, 27-33
- [13] <http://www.newport.com/Introduction-to-FTIR-Spectroscopy/405840/1033/content.aspx> (27.04.16)
- [14] Nawrocka, A., Lamorska, J., (2013). *Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods*, *Advances in Agrophysical Research*, Prof. Stanisław Grudnas, <http://www.intechopen.com/books/advances-in-agrophysical-research/determination-of-food-quality-by-using-spectroscopic-methods>, s354 (23.06.16)
- [15] Böcker, U., 2007 *Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy of Muscle Food-Process-Related Changes in Secondary Structure of Myofiber protein and their relationships to meat functional properties.*, UMB, 13-17, PhD
- [16] Barth, A (2007) *Infrared spectroscopy of proteins*, Vol 1767,(9)

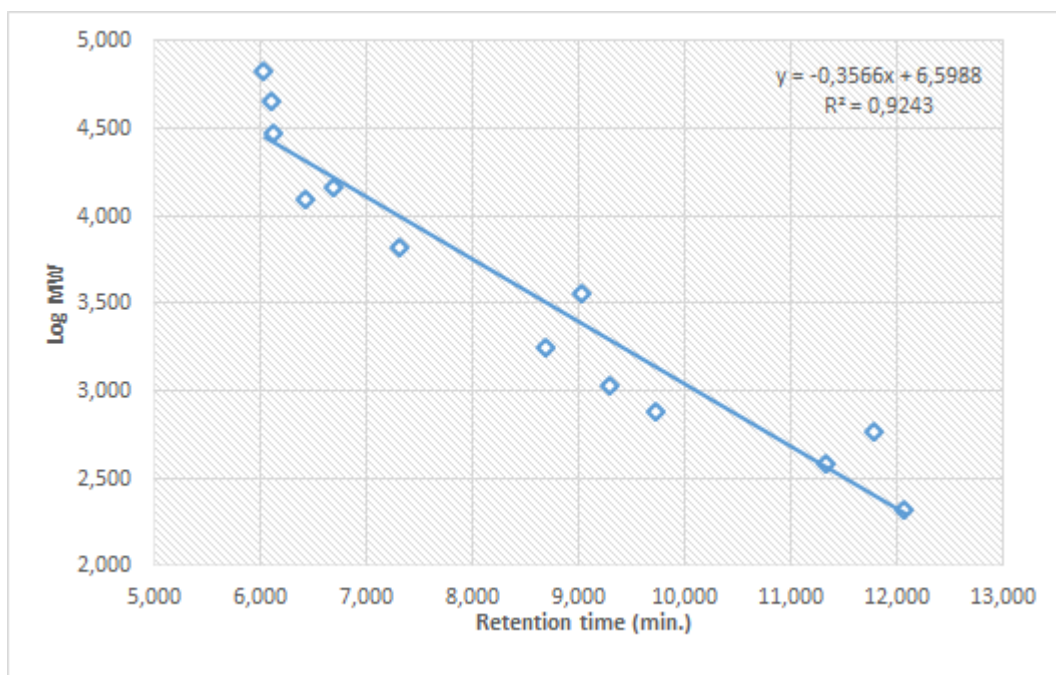
- [17] https://en.wikipedia.org/wiki/Fouriertransform_infrared_spectroscopy (27.04.2016)
- [18] Zimmermann, B., Kohler, A. 2013 Optimizing SavitzkyGolay Parameters for Improving Spectral Resolution and Quantification in Infrared Spectroscopy, 67(8),892-902.
- [19] Rutherford, S. (2010) *Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Protein in Hydrolysates: A Review* Vol 93(5)
- [20] Li-Chan, E., Chalmers, J., Griffiths, P. (2010) *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science*, 2 Volume,
- [21] DePalma, A., PHD Refractometer Uses in Industry and Selection <http://rudolphresearch.com/refractometers-use-selection/> (28.04.2016)
- [22] Aksnes, A., Hope, B., Jnsso, E., Bjrnsson, B., Albrektsen, S. *Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review*
- [23] Darine Selmane, Vial Christophe, Djelveh Gholamreza., (2008) *Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties*
- [24] James, G., Witten, D., Hastie, T., Tibshirani, R., (2013) *An introduction to Statistical Learning* s231-233
- [25] James, G., Witten, D., Hastie, T., Tibshirani, R., (2013) *An introduction to Statistical Learning* s237-238
- [26] Lesk, A., (2010) *Introduction to Protein Science* secondnd edition. Oxford University press, 2-6
- [27] Lesk, A., (2010) *Introduction to Protein Science* secondnd edition. Oxford University press, 188-194
- [28] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>*
- [29] Davensport, M., Smiley, S. (2016) Determination of Reaction Progress in the Enzymatic Hydrolysis of Seafood Processing Byproducts: A Simple Alternative to the Degree of Hydrolysis, Volume 2 Issue

A. Vedlegg

Kalibrering HPLC

Tabell A.1: Kalibreringen som ble brukt for å sege ut parameteret gjennomsnittelig molekylstørrelse

	Name Cmpd	M, Wt,	MeanRT	LogMW
1	Bovine albumin	66000	6,039	4,820
2	Albumin from chicken egg white	44287	6,108	4,646
3	Carbonic anhydrase	29000	6,130	4,462
4	Lysosyme	14300	6,703	4,155
5	Cytochrome c from bovine heart	12327	6,431	4,091
6	Aprotinin from bovine lung	6511	7,313	3,814
7	Insulin Chain B Oxidized from bovine pancreas	3496	9,041	3,544
8	Renin Substrate Tetradecapeptide porcine	1759	8,693	3,245
9	Angiotensin II human	1046	9,300	3,020
10	Bradykinin Fragment 1-7	757	9,728	2,879
11	[D-Ala ²]-Leucine enkephalin	570	11,785	2,756
12	Val-Tyr-Val	379	11,331	2,579
13	Trp	204	12,080	2,310



Figur A.1: Figur med de variablene som er vist i tabell A.1



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway