



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 60 stp.
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Prosessmålingsteknologi for proteinhydrolysater: FTIR- spektroskopi, SEC og OPA-metode

Process monitoring technology for protein
hydrolysates: FTIR-spectroscopy, SEC and OPA-
method

Mari Linnéa Ruud
Kjemi

Forord

Denne masteroppgaven i kjemi ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven er utført i samarbeid med Nofima (Ås) i perioden fra august 2017 til mai 2018.

Først vil jeg takke for at jeg var så heldig å få muligheten til å arbeide med min masteroppgave hos Nofima. Det har vært inspirerende å få være en del av deres spennende forskningsmiljø.

Så vil jeg takke veiledere Nils Kristian Afseth og Sileshi Gizachew Wubshet ved Nofima. Nils Kristian for god oppfølging og veiledning underveis. Jeg er svært takknemlig for at han tok seg tid til å veilede meg igjennom skriveprosessen selv under sin pappapermisjon. Sileshi for god hjelp med oppbygging av prosjektet, instrumenthåndtering og ikke minst med å forklare hvordan dataanalysene skulle utføres. Jeg er veldig takknemlig for all tiden han har satt av til veiledning og diskusjon av resultater underveis. Han har alltid vært tilgjengelig for spørsmål og vært en god støttespiller under dette prosjektet.

Vil også takke MS-forskningsgruppen ved NMBU, med veileder Dag Ekeberg i spissen, for god oppfølging og innspill underveis. Må også få takke Dag for god veiledning underveis i skriveprosessen.

Til slutt vil jeg takke Ulrike Böker ved Nofima for god hjelp med instrumenthåndtering.

Ås, mai 2018

Mari Linnéa Ruud

Sammendrag

Enzymatisk proteinhydrolyse av restråstoff fra kjøtt-, fisk- og meierindustrien, med formål om å produsere spiselige peptidprodukter, er en voksende industri. For å kunne utnytte potensialet til disse proteinene er det viktig at råstoffet behandles riktig. I dag gjøres det målinger av sluttproduktet for å måle hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden. For å få bedre sluttprodukter er det viktig å ha en kontinuerlig kontroll av proteinkvaliteten underveis i prosessen. Det er ønskelig å bruke FTIR-spektroskopi til dette formålet da metoden har vist seg å kunne detektere endringen i proteinets struktur underveis i en hydrolyseprosess. For å få ytterligere informasjon om proteinhydrolysatet er det også ønskelig å undersøke om gjennomsnittlig molekylvekt beregnet ved bruk av SEC er en aktuell metode. Målet med denne oppgaven var å sammenligne FTIR-spektroskopi og OPA-metoden for analyse av proteinhydrolysat ved bruk av PLS-regresjon samt å sammenligne SEC og OPA-metoden. Prosjektet hadde også som formål å undersøke reproduserbarheten til SEC og OPA-metoden.

Til sammenligning av analysemetodene ble hydrolysat fra myseproteinkonsentrat, melkepulver, helmelkspulver og mysepulver hydrolysert ved bruk av Flavourzyme og Alcalase over en periode på 3 timer brukt.

Beregnet hydrolysegrad for proteinhydrolysaten, ved bruk av OPA-metoden, viste en økende hydrolysegrad etter hvert som hydrolysetiden økte. Denne økningen var svært ujevn. En stabilitetstest av OPA-reagenset viste at reagenset var ustabil innenfor anbefalt brukstid, som kan ha spilt inn på resultatene. Ved bruk av Flavourzyme ble det oppnådd dobbelt så høy hydrolysegrad enn ved bruk av Alcalase. Beregnet gjennomsnittlig molekylvekt plottet som funksjon av hydrolysetid viste en jevn minkende kurve. Resultatene fra FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysaten viste at det var mulig å detektere formasjon av frie karboksylat- og aminoterminaler underveis i hydrolyseprosessen. Nedbrytningen av proteinene og peptidene ved amid I og II båndene var noe kompleks å tolke.

OPA-metoden viste seg å være en lite reproduserbar metode (%RTSD=14-30 (6 målinger innfor én dag) og 14-30 (6 målinger over 6 dager)). For SEC ble de relative standardavvikene beregnet til 1-7% for 6 målinger på samme dag. På grunn av feil under forsøket over 6 dager er det ikke mulig å konkludere med hvorvidt metoden er reproduserbar.

FTIR-spektrene viste god korrelasjon med målt absorpsjon ved OPA-metoden ($R^2=0.93$) og gjennomsnittlig molekylvekt ($R^2=0.91$). SEC viste moderat god korrelasjon med målt absorpsjon ved OPA-metoden ($R^2=0.85$). Korrelasjonen mellom hydrolysegrad og FTIR-spektrene og SEC var ikke god ($R^2=0.63$ og 0.65). Dette skyldtes trolig analysen av mengde protein i prøvene.

Abstract

Enzymatic protein hydrolysis of by-products from the fish, meat and dairy industry, with the purpose to produce eatable peptide products, is a growing industry. It is crucial that the by-products are treated right to fully utilize the potential of the proteins. Today the OPA-method is used to perform measurements on the end products to determine the degree of hydrolysis. To obtain better end products it is important to continuously monitor the protein quality during the hydrolysis process. FTIR-spectroscopy has turned out to be a method that can detect changes in the protein structure. Thus, it is desirable to use FTIR-spectroscopy for this purpose. To get ulterior information about the protein hydrolysates, it is desirable to investigate the possibilities of using average molecular weight obtained by SEC as a process monitoring parameter.

The aim of this thesis was to compare FTIR-spectroscopy with the OPA-method, and SEC with the OPA-method for analysis of protein hydrolysates. This comparison was carried out by calculating PLS-regression models. An additional aim was to investigate the reproducibility of SEC and the OPA-method. For the comparison, hydrolysates from whey protein concentrate, milk powder, whole milk powder and whey powder hydrolyzed with Flavourzyme and Alcalase over a period of 3 hours, were used.

The results from the OPA-analysis showed increasing degree of hydrolysis as the hydrolysis time increased. This increase was unsteady and can be a result of the OPA-reagent being unstable within the recommended time for usage. By using Flavourzyme there was obtained a higher degree of hydrolysis than by use of Alcalase. Average molecular weight plotted as a function of hydrolysis time showed a steadily decreasing curve. The results from the FTIR-spectroscopy of the protein hydrolysates showed that it was possible to detect the formation of free carboxylate- and amino terminals during the hydrolysis process. Digestion of proteins and peptides, showed by the amid I and II bands, was complex and hard to interpret.

The OPA-method turned out to not be a reproducible method (%RSTD=14-30 (for 6 measurements intraday) and 14-30 (for 6 measurements interday)). For SEC the percentage relative standard deviation was calculated to 1-7% from 6 intraday measurements. Because of errors occurring during the interday measurements, it is not possible to conclude whether the method is reproducible.

The FTIR-spectra showed a good correlation with the measured absorptions obtained by the OPA-method ($R^2=0.93$) and average molecular weight ($R^2=0.91$). SEC showed a moderate good correlation with the measured absorptions obtained by the OPA-method ($R^2=0.85$). The correlation between the degree of hydrolysis and FTIR-spectra and SEC was not good ($R^2=0.63$ and 0.65). This is most likely due to errors which arised during the analysis for the protein determination.

Liste over forkortelser

DH – Degree of hydrolysis

EMSC - Extended multiplicative signal correction

FTIR – Fourier transform infrared

HPLC – High performance liquid chromatography

MPO – Milk powder

NAC – N-acetylcysteine

OPA – *o*-phthaldialdehyde

PC – Principal component

PCA – Principal component analysis

PLS – Partial least square

RMSECV – Root mean square error cross validation

RPM – Rotations per minute

RSTD – Relative standard deviation

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SEC – Size exclusion chromatography

STD – Standard deviation

WMP – Whole milk powder

WPC – Whey protein concentrate

Innhold

Forord.....	i
Sammendrag.....	iii
Abstract.....	iv
Liste over forkortelser.....	v
1. Innledning.....	1
1.1. Bakgrunn.....	1
1.2 Målet med oppgaven.....	2
1.3 Enzymatisk proteinhydrolyse.....	3
1.3.1. Prinsipp.....	3
1.3.1 Anvendelse av enzymatisk proteinhydrolyse i matindustrien.....	4
1.4 Hydrolysegrad.....	5
1.5 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metode.....	6
1.6 Størrelsesfordelingskromatografi.....	7
1.6.1 Prinsipp.....	7
1.6.2 Beregning av gjennomsnittlig molekylvekt.....	9
1.7 Fouriertransformasjon-spektroskopi.....	10
1.7.1 Prinsipp.....	10
1.7.2 Infrarød spektroskopi.....	11
1.7.3 Det infrarøde spekteret.....	14
1.7.4 Anvendelse av Fouriertransformasjons- midt-infrarødspektroskopi ved måling av peptidstruktur.....	14
1.8 Dataanalyse.....	16
1.8.1 Standardavvik.....	16
1.8.2 Multivariat dataanalyse.....	16
2. Eksperimentelt.....	23
2.1 Enzymatisk proteinhydrolyse.....	23
2.1.1 Materialer.....	24
2.1.2 Utstyr.....	24
2.1.3 Metode.....	26
2.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden.....	28
2.2.1 Kjemikalier.....	28
2.2.2 Utstyr.....	28
2.2.3 Stabilitetstest av OPA-reagenset.....	29
2.2.4 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden.....	29

2.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi....	31
2.3.1 Kjemikalier	31
2.3.2 Utstyr	31
2.3.3 Metode	31
2.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene.....	32
2.4.1 Utstyr	32
2.4.2 Metode	32
2.5 Reproduserbarhetsforsøk	34
2.6 Dataanalyse	34
2.6.1 Programvare	34
2.6.2 Beregning av gjennomsnittlig molekylvekt	34
2.6.3 Behandling av FTIR-måledata	35
2.6.4 PLS-regresjonsanalyse.....	35
3. Resultat.....	37
3.1 Stabilitetstest av OPA-reagenset	37
3.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden.....	38
3.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi....	39
3.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene.....	42
3.4.1 Prinsippal komponentanalyse av FTIR-spektrene.....	44
3.5 Sammenligning av metodene.....	47
3.6 Bestemmelse av reproduserbarheten til OPA-metoden og SEC	52
4. Diskusjon.....	55
4.1 Stabilitetstest av OPA-reagenset	55
4.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden.....	56
4.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi....	58
4.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene.....	59
4.5 Sammenligning av metodene	61
4.6 Bestemmelse av reproduserbarheten til OPA-metoden og SEC	63
4. Konklusjon	65
5. Referanser.....	67
Vedlegg A	71
Vedlegg B.....	73
Vedlegg C.....	77
Vedlegg D	83
Vedlegg E.....	89

1. Innledning

1.1. Bakgrunn

Enzymatisk proteinhydrolyse av restråstoff fra kjøtt-, fisk- og meierindustrien, med formål om å produsere spiselige peptidprodukter, er en voksende industri. Etter slakt av dyr og sløyning av fisk er det store mengder restråstoffer til overs som ender opp som avfall uten videre utnyttelse. For eksempel havner 50-80% av fiskerester i avfall. Her er det stort potensial til å nyttiggjøre dette ved å hente ut proteiner fra restråstoffene for å bruke det som verdifulle produkter i matindustrien [1]. Det å utnytte restråstoffer vil bygge oppunder en bærekraftig utvikling. Det vil også gi økonomisk vinning for produsenten dersom de rette produktene utvikles, og når etterspørselen.

Proteinene fra nyslaktet fisk og dyr samt meieriindustrien har god kvalitet. For å kunne utnytte potensialet til disse proteinene er det viktig at råstoffet behandles riktig. For å hente ut proteinene brukes blant annet enzymatisk proteinhydrolyse. For å si noe om denne prosessen er optimal gjøres det målinger av produktene. I dag gjøres det målinger av sluttproduktet for å måle hydrolysegrad. For å få et enda bedre sluttprodukt er det viktig å ha en kontinuerlig kontroll av proteinkvaliteten underveis i prosessen [2].

For å analysere produktene brukes i dag *o*-phthaldialdehyd (OPA)-metode til måling av hydrolysegraden til produktet. Det er en metode der primære aminosyrer i prøven reagerer med et derivatiseringsreagens og danner et farget addukt som måles spektrofotometrisk [3]. Metoden er tidkrevende, kostbar og ikke mulig å bruke som målingsmetode underveis i hydrolyseprosessen.

Forskere ved Nofima har utviklet en spektroskopisk metode som vil gjøre det mulig å måle proteinkvaliteten underveis [2]. Fourier transformasjons infrarød (FTIR)-spektroskopien er en rask metode for identifisering av funksjonelle grupper i en prøve [4]. Den krever lite prøvemateriale og ingen kjemikaler i tillegg til å ikke destruere prøven. Det er blitt vist at nivået av frie aminosyrer korrelerer med endringer i spekteret, og infrarød spektroskopi ser derfor ut til å være en lovende metode for å kunne forutsi hydrolysegrad av proteiner [5]. Böker et al. viste i sitt eksperiment at det også var mulig å karakterisere proteinkjedereduksjon etter enzymatisk hydrolyse av komplekse matrikser som kylling- og laksevev [6].

1.2 Målet med oppgaven

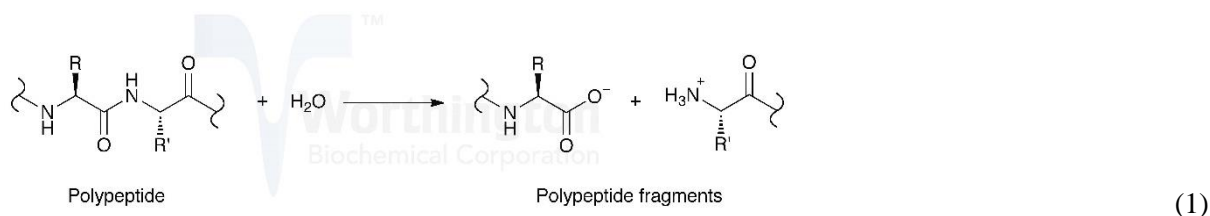
Målet med oppgaven var å videreutvikle og sammenligne henholdsvis OPA-metoden, størrelsesfordelingskromatografi (size exclusion chromatography (SEC)) og FTIR-spektroskopi for karakterisering av proteinhydrolysat. Gjennom dette målet ønsker man å finne ut om det er mulig å bruke FTIR-spektroskopi som kontinuerlig målemetode for hydrolysegrad, samt om SEC kan benyttes for å få ytterligere informasjon om proteinhydrolysatene. Målet ble delt inn i følgende delmål:

- Etablere en effektiv mikroskala OPA-metode for å kunne analysere flere prøver samtidig med bruk av mindre prøvemateriale.
- Undersøke stabiliteten til OPA-reagenset.
- Sammenligne målinger av proteinhydrolysater ved FTIR-spektroskopi med OPA-metoden og SEC ved bruk av Partial Least Square (PLS)- regresjon.
- Sammenligne målinger av proteinhydrolysater ved OPA-metoden og SEC ved bruk av PLS-regresjon.
- Bestemme reproduserbarheten til OPA-metoden og SEC for analyse av proteinhydrolysater.

1.3 Enzymatisk proteinhydrolyse

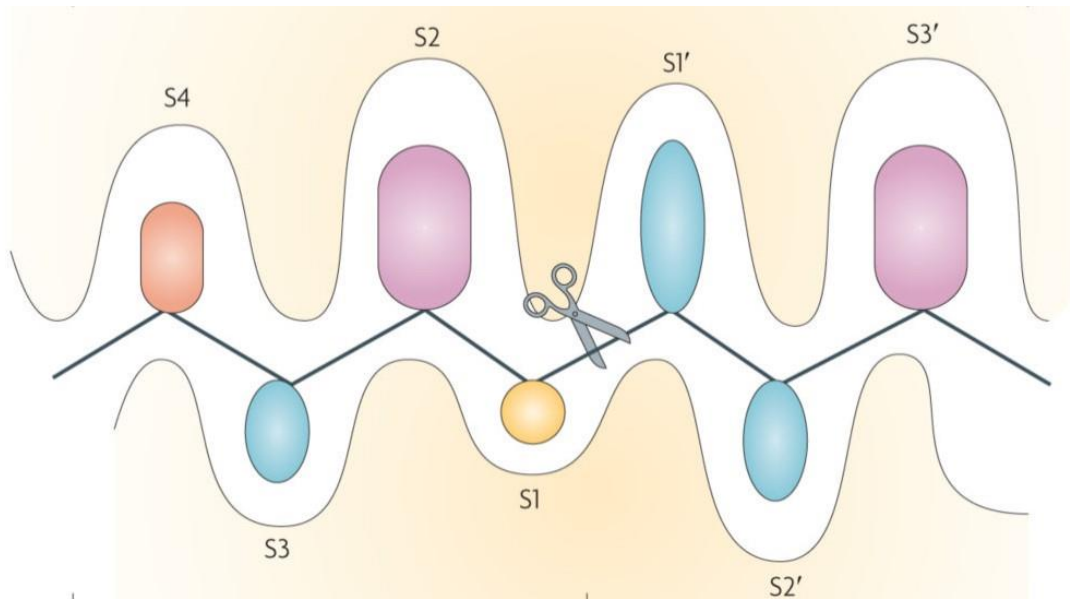
1.3.1. Prinsipp

Under enzymatisk proteinhydrolyse kløyver peptidaser peptidbindinger ved hjelp av et vannmolekyl slik som vist i ligning 1 [7]. Hydrolysen resulterer i dannelsen av C-terminal karboksylat ($-\text{COO}^-$) og en N-terminal aminogruppe ($-\text{NH}_3^+$) der peptidbindingen ble brutt. Bindingsbruddet fører til en endring i primærstrukturen til proteinet, men forkortningen av proteinkjeden vil også påvirke sekundærstrukturen [8].



En peptidase er et katalytisk aktivt protein som kløyver én eller flere peptidbindinger i et protein eller peptid ved hydrolyse. Peptidaser som kløyver i enden av peptidet eller proteinet kalles for eksopeptidaser. Ved bruk av eksopeptidaser vil det dannes mindre peptider og aminosyrer. Peptidaser som kløyver lenger inn i protein- eller peptidkjeden kalles for endopeptidaser [9, 10].

Peptidaser har et aktivt sete som inneholder aminosyrer og er beskyttet av substrat-gjenkjenningsslommer som vil kjenne igjen et spesifikt substrat (se figur 1). Det er disse gjenkjenningsslommene som bestemmer hvorvidt peptidasen er promiskuøs eller spesifikk. Er peptidasen promiskuøs kløyver den mange typer peptider og proteiner på flere ulike steder. Spesifikke peptidaser må kjenne igjen helt spesifikke sekvenser i proteinet eller peptidet som skal kløyves for at de skal kunne gjenkjenne dette som et substrat [10].



Figur 1: Spesifikk kløyvning av en peptidbinding. Her er det brune området det aktive setet med lommene S1-S4 og S1'-S4'. Kløyvingen vil kun skje dersom substratet gjenkjennes av det aktive setet, dette etter en spesifikk aminosyrekkefølge. Her er peptidet vist i form av en kjede med kuler (aminosyrer) som må være i rett størrelse og rekkefølge for å passe inn i det aktive setet [11]. (Bildet er redigert).

1.3.1 Anvendelse av enzymatisk proteinhydrolyse i matindustrien

Tanken bak å bruke enzymer ved hydrolyse av restråstoff er å få kontroll på peptidene som dannes som et resultat av prosessen. Ved å anvende spesifikke enzymer kan det lettere oppnås et ønskelig produkt og dermed nyttiggjøre råstoffet på en bedre måte.

Industrielle peptidaser inneholder som regel en miks av flere peptidaser med forskjellig substratgjenkjenning. Dette for at det skal kunne hydrolysere flere typer kjøtt, fisk med mer. Forskjellige industrielle peptidaseprodukter vil gi ulike hydrolyseprodukter. I dette prosjektet ble peptidasene Flavourzyme og Alcalase brukt. Flavourzyme stammer fra *Aspergillus oryzae* og består av fire endopeptidaser og seks eksopeptidase. Alcalase stammer fra *Bacillus licheniformis* og består av tre endopeptidaser og én eksopeptidase [12, 13]. Da Flavourzyme består av flere eksopeptidaser vil det ved bruk av dette enzymet dannes mindre peptider og flere frie aminosyrer enn ved bruk av Alcalase.

De forskjellige peptidstørrelsene og hvilken sekvens av aminosyren i hvert enkelt peptid påvirker smak, bioaktivitet, allergenitet og funksjonelle evner som emulgerende effekter, skummende effekter, vannbindingsegenskaper med mer. Bitter smak er for eksempel assosiert

med korte peptider med hydrofobe aminosyrer. Bioaktivitet finnes generelt i peptider som ikke er lenger enn 10 aminosyrer. Funksjonelle egenskaper som vannbinding krever ofte lenger peptider [14, 15].

Det har blitt vist at proteiner og peptider med høy molekylvekt ofte kan skape allergiske reaksjoner, noe som ikke vil være å foretrekke dersom hydrolysatet skal brukes til spesialdietter eller tilsetning i matvarer generelt. Ved en molekylvekt under 2000 Da ser dette ut til å opphøre [16].

Proteinhydrolysat har gjort seg mest nyttig innen geriatri, i høy-energi supplement, vektkontrolldietter og i melkeerstatning for allergiske spebarn. Det er også stadig flere som velger å supplere kostholdet med proteiner i form av proteinpulver i forbindelse med trening [17].

1.4 Hydrolysegrad

I dag opererer industrien med hydrolysegrad som et mål på egenskapene til produkter som dannes i en hydrolyseprosess. Hydrolysegrad er definert som antallet kløyvde peptidbindinger i et proteinmolekyl [18].

Det finnes en rekke ulike formler som anvendes ved beregning av hydrolysegrad. Under dette prosjektet ble hydrolysegraden beregnet slik som vist nedenfor.

Verdiene som brukes for å beregne den prosentvise hydrolysegraden er gitt i ligning 2.

$$DH(\%) = \frac{100n}{N} \quad (2)$$

, der n er gjennomsnittlig antall peptidbindinger hydrolysert, N er antall peptider per proteinmolekyl.

n vil da være beregnet ut i fra ligning 3.

$$n = \frac{\Delta Abs M d}{\epsilon c} \quad (3)$$

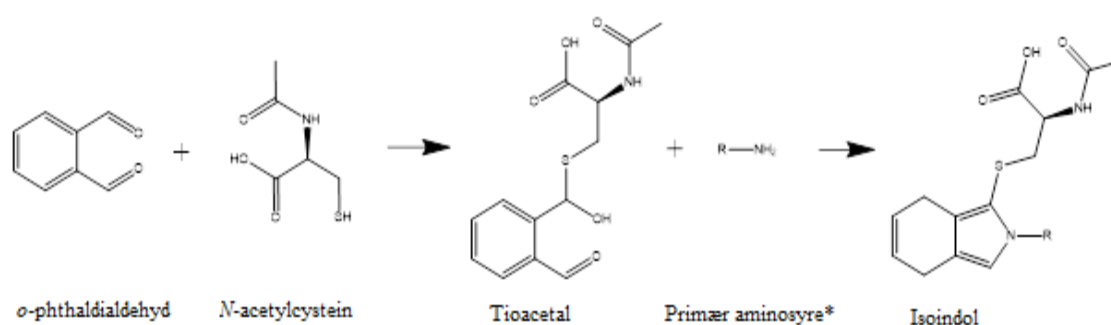
, der ΔAbs er absorpsjonen til hydrolysert prøve – absorpsjonen til uhydrolysert prøve ved 340 nm, M er molekylmassen til proteinet som analyseres (Da), d er fortynningsfaktoren, ϵ er den molare absorptiviteten ved 340 nm ($M^{-1}cm^{-1}$) og c er proteinkonsentrasjonen (g/L).

Church et al. gjorde et eksperiment der den gjennomsnittlige molekylære absorptiviteten for alle α -aminosyrer ble målt til ca. $6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Absorptiviteten er lik for α -og ε -aminosyrer og kvantifisering av frigjorte α -aminogrupper bør derfor ikke bli påvirket av endringer i absorptiviteten til ε -aminogrupper [19].

1.5 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metode

Det er mange ulike metoder som anvendes for bestemmelse av hydrolysegrad. Av disse er *o*-phthaldialdehyd (OPA)-metoden en metode som direkte bestemmer hydrolysegrad [20], og er metoden som ble anvendt i dette prosjektet. Dette fordi OPA-metoden er en av metodene som anvendes av industrien til bestemmelse av hydrolysegrad. Metoden er basert på målingen av aminogrupper generert fra hydrolysen [18].

Prinsippet med OPA-metode er å reagere en primær aminosyre med et derivatiseringsreagens og danne et isoindol som så kan måles spektrofotometrisk slik som vist i figur 2. Roth var den første til å beskrive en metode for måling av aminosyrer ved bruk av *o*-phthaldialdehyd. Tidligere var det vanlig å bruke kolorimetriske metoder for måling og bestemmelse av aminosyreinnhold, men med en fluorometrisk metode ville sensitiviteten til målingen være 100 ganger bedre [21].



Figur 2: Reaksjon mellom *o*-phthaldialdehyd og en primær aminosyre med tilstedeværelse av N-acetylcystein som danner et 1-alkyltio-2-alkyl substituert isoindol. *R representerer den reaktive aminosyren, peptidet eller proteinet som inneholder en primær aminogruppe.

OPA-reagenset består også av andre komponenter enn *o*-phthaldialdehyd. Reagenset inneholder en boratbuffer, N-acetylcystein, som reduserende reagens, og natrium dodekylsulfat (SDS). Roth viste at for alifatiske, syrlige og hydroksyamonsyrer er det pH mellom 8 og 11 som gir høyest fluorescens. Han viste også at en boratbuffer ga sterkere fluorescerende effekt

enn fosfatbuffer som tidligere har vært vanlig å bruke [21]. I dette tilfellet har det blitt brukt boratbuffer med pH 9.5.

N-acetylcystein har vist seg å være mer stabilt enn andre reduserende reagenser som normalt blir brukt i OPA-reagenset [22]. SDS-løsning blir tilsatt reagenset for å gjøre aminosyrene mer tilgjengelig. Dette ved at det folder ut proteinet. I tillegg gjør tilsetning av SDS så proteinet opprettholder dets løselighet [19, 23]. Roth viste at det var essensielt å tilsette *o*-phthaldialdehyd som den siste komponenten. Dette fordi det blir dannet et ikke-fluorescerende produkt dersom *o*-phthaldialdehyd reagerer direkte med aminosyren [21]. De derivatiserte prøvene måles spektrofotometrisk ved 340 nm da de vil ha maksimal absorpsjon ved denne bølgelengden [24].

Fordelen med OPA-metoden er at reagenset spesifikt reagerer med α -aminogruupper som gir økt sensitivitet og direkte bestemmelse av alle produktene fra hydrolysen. Metoden er direkte overførbar til alle proteiner, og sidegruppene i aminosyrene ser ikke ut til å ha noen signifikant innvirkning på det resulterende OPA-adduktet [19]. Ulempen med OPA-metoden er at reagenset kun reagerer med 18 av de 20 vanlige aminosyrene; det reagerer svakt med cystein og det gir ingen reaksjon med prolin [21].

1.6 Størrelsesfordelingskromatografi

Gjennomsnittlig molekylvekt av produktet er en viktig monitoreringsparameter for å få ytterligere informasjon om produktene som dannes. Proteinhydrolysat ble derfor også analysert ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi (size exclusion chromatography (SEC)) for å sammenligne SEC med FTIR-spektroskopi og OPA-metoden.

1.6.1 Prinsipp

Ved SEC separeres en prøves innhold basert på en fysisk filtreringsprosess og brukes til å bestemme vektfordelingen av polymerer i prøven. Prinsippet er å separere molekyler etter størrelse. Dette ved at en prøve sendes gjennom en kolonne med en porøs, inert stasjonærfase. Små molekyler vil bevege seg gjennom porene i det porøse materialet. De større molekylene vil ikke kunne trenge gjennom alle porene, eller ingen av dem da de er for store. Små molekyler må derfor trenge gjennom et større volum og vil eluere senere enn større molekyler slik som

vist i figur 3. Analytter som er for store for porene vil gå rett gjennom kolonnen og eluere som ikke-retensjonsmateriale. Dette kalles total eludering. Når analytten har en molekylstørrelse som er så liten at den vil penetrere alle porene, vil disse og alle mindre analytter elueres likt. Dette kalles total gjennomtrengning [25, 26]. Detektoren, som i dette tilfellet er en ultrafiolett (ultra violet (UV))-detektor, vil detektere molekylene som elueres og danne et kromatogram der intensitet er plottet mot retensjonstid. Tiden analytten bruker på å ferdes gjennom kolonnen kalles for retensjonstid [26].



Figur 3: Illustrasjon av en størrelsesfordelingskolonne. Her vises det at mindre molekyler vil bruke lengre tid på å ferdes gjennom det porøse materialet i kolonnen [27]. (Bildet er redigert).

SEC blir hovedsakelig brukt til å separere molekyler med signifikante masseforskjeller. For hver stasjonær fase kan en konstruere en kalibreringskurve der logaritmen av molekylvekten til valgte standarder er plottet mot elueringsvolum. Molekylvekten til komponentene i den ukjente prøven kan så estimeres ved å sammenligne elueringsvolumet med elueringsvolumet for standardene. En må allikevel være obs på at molekyler med lik masse kan ha ulike former som vil medføre ulik elueringskarakteristikk [26, 28].

1.6.2 Beregning av gjennomsnittlig molekylvekt

For å beskrive molekylvektfordelingen blir toppene i kromatogrammet, med ukjente substanser, ved hjelp av dataprogramvare delt inn i flere skiver. Fra disse skivene blir molekylvektfordelingskurven og den kumulative fordelingskurven beregnet og plottet. Den gjennomsnittlige molekylvekten blir så beregnet ved hjelp av programvaren. Polymeregenskaper avhenger mer av større oligomerer enn de mindre i en polydispers polymer. Det er derfor nyttig å beregne vekt-gjennomsnittlig molekylvekt, M_w , av prøven [26]. Vekt-gjennomsnittlig molekylvekt er definert som vist i ligning 4.

$$M_w = \sum_i w_i M_i = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (4)$$

, der w_i er vektfraksjonen av oligomerer av molekylvekten M_i .

1.7 Fouriertransformasjon-spektroskopi

1.7.1 Prinsipp

Spektroskopi er studie av interaksjon mellom materie og elektromagnetisk stråling. Et spektrofotometer består av en strålingskilde, og brukes til å måle endring i intensitet av strålen før og etter den sendes gjennom et materie [25, 29].

Stråling (lys) kan beskrives som både partikler og bølger. Lysbølger består av perpendikulære, oscillerende elektriske og magnetiske felt. En bølge kan beskrives ved dens bølgelengde og frekvens. En bølgelengde (nm), λ , er lengden mellom to bølgetopper, altså lengden på én oscillasjon. Frekvensen, ν , er definert som antall fullførte oscillasjoner per sekund. Frekvens oppgis med enheten hertz (Hz), der én hertz er én oscillasjon per sekund [25]. Forholdet mellom frekvens og bølgelengde er gitt i ligning 5.

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (5)$$

, der c er lyshastigheten, 2.998×10^8 m/s i vakuum.

Hver partikkel (foton) bærer en energi, E [25]. Energien til et foton kan beskrives ved ligning 6.

$$E = h\nu \quad (6)$$

, der h er Plancks konstant, 6.626×10^{-34} Js.

Kombineres ligning 5 og 6 får man ligning 7.

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (7)$$

, hvor $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) er bølgenummeret (se ligning 8).

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (8)$$

Ligning 7 viser at energi er omvendtproporsjonal med bølgelengden og proporsjonal med bølgetallet. Ultrafiolett lys vil derfor ha en høyere energi enn infrarødt lys da ultrafiolett lys har kortere bølgelengde enn infrarødt lys [25].

Når et molekyl absorberer energien fra et foton vil molekylet eksitere fra dets grunntilstand til et høyere energinivå og få økt energi [25]. Absorpsjonen, A , er definert som vist i ligning 9.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (9)$$

, der I_0 er intensiteten av strålen som treffer molekylet, I er det transmitterte lyset [4, 25].

Ut i fra ligning 9 vises det at for eksempel en absorpsjonsprosent på 90 betyr en transmisjon på 10 % som vil gi absorpsjon lik 1 og absorpsjonsprosent på 99 gir en absorpsjon på 2. Grunnet presisjonen til et spektrofotometer er det optimale å ha en absorpsjon mellom 0.3 og 2 [25].

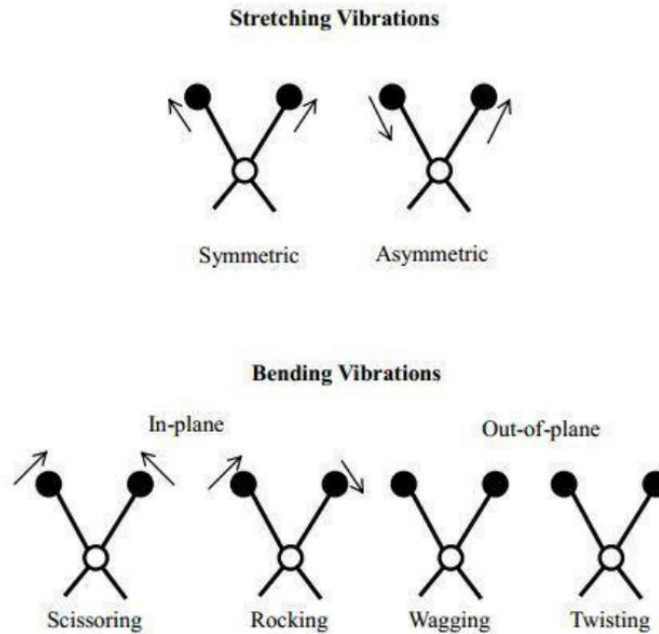
Absorpsjon er en viktig parameter da den er direkte proporsjonal med konsentrasjonen, c , av det lysabsorberende materialet i en prøve. Dette vises tydelig ut i fra Beers lov gitt i ligning 10 [25].

$$A = \epsilon bc \quad (10)$$

, der ϵ er den molare absorptiviteten ($M^{-1}cm^{-1}$), b er lengden på lysveien (cm) og c er konsentrasjonen til prøven (M) [25].

1.7.2 Infrarød spektroskopi

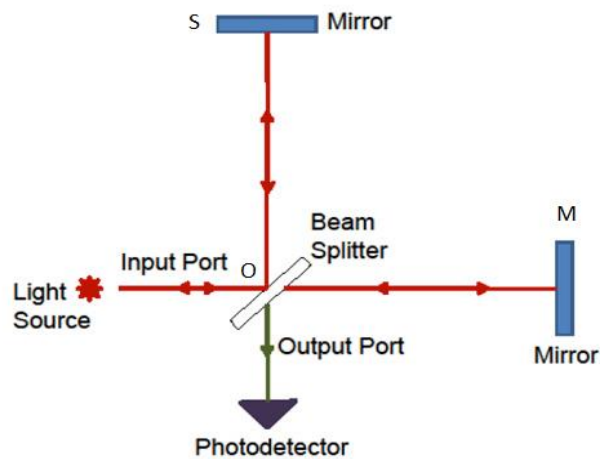
Absorpsjon av ultrafiolett og synlig stråling vil gjøre så molekylet blir eksitert, men infrarød stråling er ikke energifull nok til å kunne indusere elektroniske overganger. Det vil isteden indusere vibrasjonelle overganger i molekylet. Atomene vibrerer allerede naturlig i ulike retninger i sin grunntilstand. Etter absorpsjon av stråling vil molekylet først havne i en tilstand av vibrasjonell hvile, som er det laveste vibrasjonelle nivået. Vibrasjonsenergien vil da overføres til andre molekyler ved kollisjoner. Effekten av dette vil være at energien som absorberes konverteres til varme som sprer seg i mediet [25]. Bølgelengden til det absorberte lyset avhenger av typen vibrasjon og atomer involvert. Forskjellig mengde energi trengs for å kunne øke amplituden av oscillasjonen for forskjellige typer bindinger og vibrasjoner. Ulike funksjonelle grupper vil derfor ha karakteristiske vibrasjonsfrekvenser [4]. Denne kunnskapen kan brukes til å identifisere funksjonelle grupper i en prøve. I figur 4 er de vanligste vibrasjonene illustrert.



Figur 4: Skjematisk presentasjon av strekk- og bøyingsvibrasjoner [30].

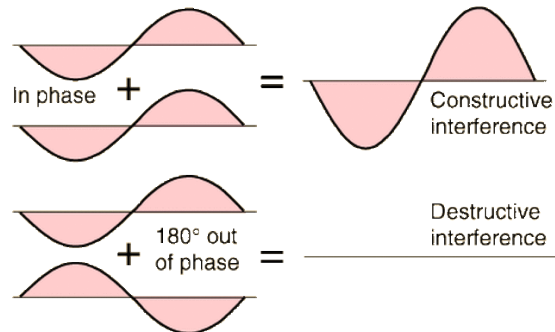
For den infrarøde regionen er den viktigste metoden for observasjon av hele spekteret på en gang Fouriertransformasjonsinfrarød (FTIR)-spektroskopi [25]. FTIR-spektroskopi er den mest anvendte spektroskopiske metoden i dag. Metoden gjør det mulig å måle et helt spektrum på få sekunder [4].

FTIR-spektroskopi fungerer ved at en infrarød stråle emitteres over hele frekvensområdet til instrumentet, som typisk er fra 4600 cm^{-1} til 400 cm^{-1} . Strålen treffer en strålesplitter ved et nullpunkt, O, og splittes i to stråler med identisk intensitet. Den ene av strålen reflekteres mot et stasjonært speil, S, og den andre overføres til et flyttbart speil, M. Strålene reflekteres fra speilet og tilbake til splitteren hvor halvparten av hver stråle reflekteres og resten blir transmittert. Den ene strålen treffer så detektoren mens den andre sendes tilbake til kilden. Konstruksjonen som utfører dette kalles et interferometer, og er hovedkomponenten i et FTIR-instrument [8, 25]. I figur 5 er det illustrert hvordan et interferometer fungerer.



Figur 5: Interferometer, der det stasjonære speilet er markert med S og det flyttbare med M. Strålen splittes ved nullpunkt O [31]. (Bildet er redigert).

Lysveien til det stasjonære speilet og det flyttbare speilet er ulik, og de to bølgene som treffer detektoren vil være forskjøvet i forhold til hverandre. Hvis de overlapper vil de interferere konstruktivt og danne en bølge med dobbelt så stor amplitude. Overlapper de med en halv bølgelengde (180°) vil det oppstå en destruktiv interferens og bølgen flates ut slik som illustrert i figur 6 [25].



Figur 6: Illustrasjon av konstruktiv- og destruktiv interferens [32].

Forskjellen i lysveien til de to bølgene vil være $2(OM-OS)$ (se figur 5). Denne differansen kalles for retardasjon, δ . Konstruktiv interferens oppstår når retardasjonen er et heltall multiplum av bølgelengden. Et bunnpunkt, eller et minimum, oppstår når det er halvtall multiplum av bølgelengden. Dersom speilet flyttes i konstant fart fra strålingsplitteren, vil lys som treffer detektoren gå igjennom en sekvens med minima og maksima ettersom interferensen veksler mellom konstruktive- og destruktive overlappinger [25]. Mønsteret kalles interferogram der lysintensiteten som blir detektert plottes mot retardasjonen. Ved hjelp av Fourier transformasjon konverteres interferogrammet til et plott der absorpsjon er plottet mot bølgetall [4].

1.7.3 Det infrarøde spekteret

Vibrasjonsfrekvensen til en binding vil avhenge av styrken i bindingene i et molekyl og massene til atomene i molekylet. Komplekse molekyler vil derfor ha mange forskjellige typer vibrasjoner. Reastråstoff fra matindustrien er komplekse og består av vann, fett, proteiner, karbohydrater og andre mindre komponenter som gir komplekse spekter (se figur 7) [33].

Under dette prosjektet ble det brukt absorpsjonsspekter fra den midtre infrarøde regionen, som er fra $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Strekkingsvibrasjoner fra O-H og N-H enkeltbindinger og alle typer trippel- og dobbeltbindinger har en frekvens høyere enn 1500 cm^{-1} . Dette er et område som inneholder karakteristiske absorpsjoner for et enkelt molekyl. Strekkingsvibrasjoner av andre enkeltbindinger samt mange bøyingsvibrasjoner gir opphav til en serie absorpsjoner lavere enn 1500 cm^{-1} . Dette området er kalt for fingerprintområdet og er karakteristisk for et gitt molekyl, men vanskelig å tolke [4].

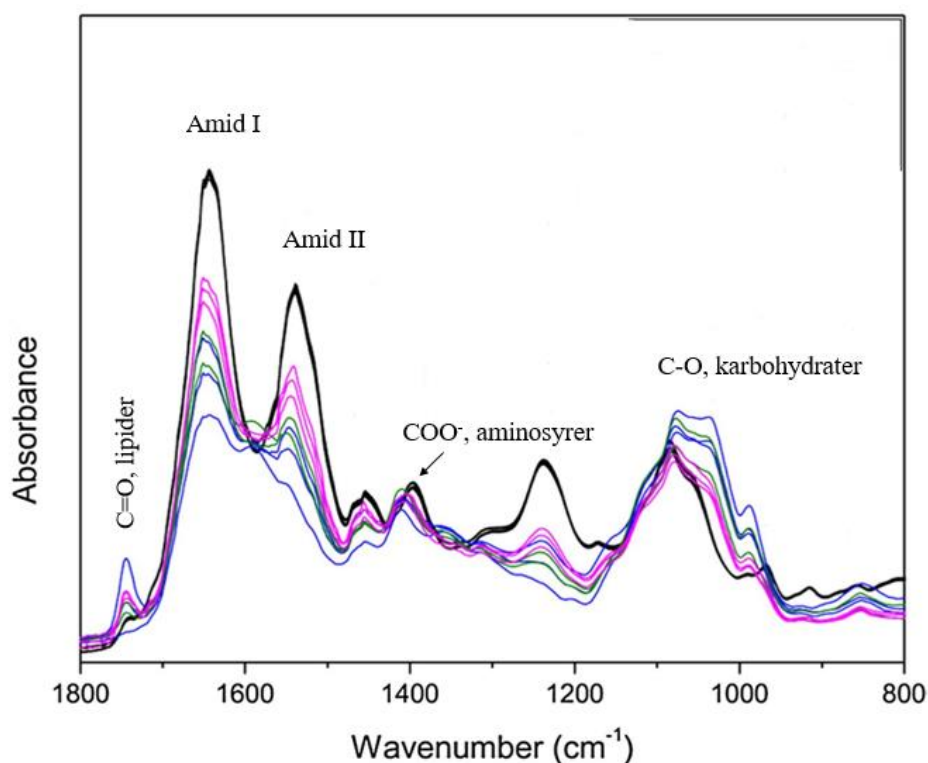
Videre kan området over 1500 cm^{-1} deles inn i tre områder med karakteristiske frekvenser [4]:

- Fra $1900-1500 \text{ cm}^{-1}$ absorberes strekkingsvibrasjoner i dobbeltbindinger samt N-H bøyingsvibrasjon.
- Fra $2400-1900 \text{ cm}^{-1}$ absorberes strekkingsvibrasjoner i trippelbindinger samt kumulerte dobbeltbindinger.
- Fra $4000-2400 \text{ cm}^{-1}$ absorberes strekkingsvibrasjoner av enkeltbindinger til hydrogen.

1.7.4 Anvendelse av Fouriertransformasjons- midt-infrarødspektroskopi ved måling av peptidstruktur

Bruk av FTIR-spektroskopi er en etablert metode for bestemmelse av struktur i små molekyler. Dette fordi metoden er sensitiv til den kjemiske komposisjonen av et molekyl. FTIR-spektroskopi vil derfor være et nyttig verktøy for analyse av protein- og polypeptidstruktur [34-36]. Metoden har et stort bruksområde fra små løselige proteiner til store membranproteiner, som er fordelaktig ved analyse av komplekse prøver [8].

De repeterende enhetene i protein- og polypeptid-ryggraden gir opphav til ni karakteristiske IR-absorpsjoner der alle stammer fra vibrasjoner i en amidgruppe; amid A, B og I-VII. Av disse er amid I og II mest markante [6, 36]. Disse er markert i et illustrerende spekter i figur 7.



Figur 7: Vibrasjonsfrekvenser til ulike funksjonelle grupper i molekylene i hydrolysat fra ulike restråstoff fra matindustrien [37]. (Bildet er redigert).

Amid I vibrasjon absorberer nære 1650 cm^{-1} og oppstår som følge av C=O strekkvibrasjoner samt C-N strekkvibrasjoner, CCN deformasjon og NH bøy i planet, der C=O strekkvibrasjonen utgjør 80% av absorpsjonen. *Amid I* vibrasjonen påvirkes omtrent ikke av sidegruppene i molekylet, men avhenger av sekundærstrukturen til protein- og peptidryggraden. *Amid I* er derfor viktig i analyse av sekundærstrukturen [4, 8].

Amid II vibrasjon absorberer nære 1550 cm^{-1} , og er en kombinasjon av NH bøying- og CN strekkvibrasjoner med noe bidrag fra CO-bøy i planet, CC- og NC strekkvibrasjoner. Heller ikke *amid II* vibrasjoner blir noe særlig påvirket av vibrasjoner i sidegruppene. *Amid II* er også viktig for analyse av sekundærstruktur, men korrelasjonen mellom frekvens og sekundærstrukturen er mer kompleks [4, 8].

Ved enzymatisk proteinhydrolyse vil det, som nevnt, dannes -COO^- og -NH_3^+ -grupper. -COO^- vil gi opphav til symmetriske strekkvibrasjoner som absorberes fra $1420\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. -NH_3^+ vil gi opphav til saksevibrasjoner som absorberes ved 1500 cm^{-1} [4].

1.8 Dataanalyse

1.8.1 Standardavvik

For å kunne si noe om hvor reproduserbar en målemetode er blir det ofte beregnet standardavvik mellom måleresultatene som et mål for presisjonen til metoden. Under dette prosjektet ble standardavviket for måleresultater fra OPA-metoden og SEC beregnet i et reproduserbarhetsforsøk med målinger over 6 dager. Standardavvik, σ , er definert som gitt i ligning 11 [38].

$$\sigma = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (11)$$

, der x_i representerer verdien til én måling, \bar{x} er gjennomsnittsverdien av alle målingene og n er antall målinger.

Da det ofte er store forskjeller i verdiomfanget til ulike målinger må det beregnes et prosentvis relativt standardavvik for å kunne sammenligne presisjonen til metodene. Det prosentvise relative standardavviket, %RSTD, blir beregnet slik som gitt i ligning 12 [38].

$$\%RSTD = 100 \frac{\sigma}{\bar{x}} \quad (12)$$

1.8.2 Multivariat dataanalyse

Moderne automatiske analysemetoder gjør det mulig å samle store mengder data på en oversiktlig måte. Disse dataene prosesseres der alle variabler blir tatt hensyn til i én og samme analyse. Ofte blir det målt flere variabler av samme prøve, dette kalles et multivariat datasett. Er det flere enn 3 variabler vil det ikke lenger være mulig å lage en grafisk representasjon av dataene. Da anvendes prosesseringsprogrammer til å finne mønstre, trender og likheter i målingsdataene [38].

1.8.2.1 Forbehandling av data

For å få best mulig utbytte av de ulike datanalysene bearbeides datasettet først. Eksperimentelle og instrumentelle effekter, som ikke er relatert til forskjeller i komposisjonen av en prøve, kan oppstå. Dette kan gjøre sammenligning av prøvene vanskelig. For å eliminere disse forstyrrende effektene og forsikre at prøvene har samme utgangspunkt for tolkning, er det viktig å gjøre forbehandling av dataene. En god forbehandling vil øke den kjemiske informasjonen tilgjengelig for prøvene. Viktige faktorer som påvirker dataene er forskjellig avhengig av hvilken analysemetode som brukes [39]. I dette tilfellet har det blitt gjort forbehandling på data fra FTIR-spektroskopi.

For å eliminere uønsket variasjon i datasettet kalkuleres derivater og vektorene normaliseres [40]. Forskjellige fysikalske effekter i prøven og i instrumentet kan føre til ujevnheter i bølgelengdene. Effekten kan mer eller mindre fjernes ved å fokusere på det høyere frekvensområdet av spekteret. Dette ved å jevne ut toppene og se på den første- eller andrederiverte av spekteret. Ved beregning av den andrederiverte blir ofte Savatzky-Golay algoritmen anvendt. Minimaene i det andrederiverte spekteret vil korrespondere med det opprinnelige spekteret, men det vil være lettere å trekke ut informasjon fra dette enn i det originale spekteret med flere overlappende bånd [41].

For normalisering av spektroskopiske data er extended multiplicative signal correction (EMSC) en utbredt metode. EMSC har vist seg å være et nyttig verktøy for å korrigere for grunnlinjeeffektiver, multiplikative måleeffekter og interferenseffekter. I praksis kan dette være for eksempel korreksjon for ulik tykkelse på tørrfilm, vanndamp og karbondioksid [40].

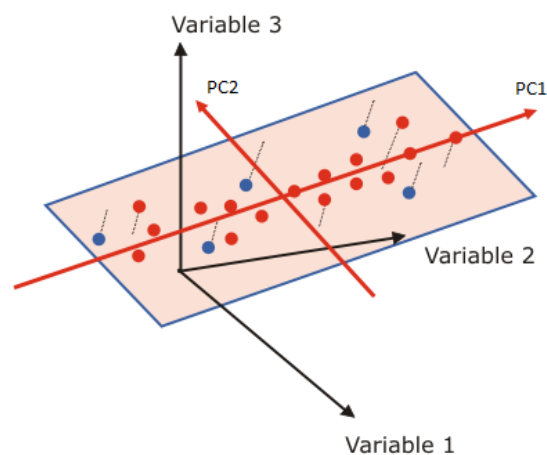
1.8.2.2 Prinsipal komponentanalyse

Målet med de fleste multivariate analyser er å redusere datamengden. Prinsipal komponent analyse (PCA) er en teknikk for å redusere mengden data når det er en korrelasjon til stede. Idéen bak PCA er å finne prinsipalkomponenter (PC); y_1, y_2, \dots, y_n , som er lineære kombinasjoner av originalvariablene som beskriver prøven; x_1, x_2, \dots, x_n . Originalverdiene kan ses på som en matrise. I en matriserepresentasjon vil modellen med et gitt antall komponenter bli representert som i ligning 13.

$$X = \bar{X} + TP^T + E \quad (13)$$

, der \bar{X} representerer den gjennomsnittlige matrisen, T er matrisen til scoreverdiene, P er loadingmatrisen og E er errormatrisen.

En kombinasjon av score- og loadingverdier er den delen av datasettet som er mest informativ. Det som er til overs er kalt residual og representerer den delen av variasjonen som ikke kan modelleres godt. Ved å multiplisere score- og loadingverdier kan strukturen av det originale datasettet rekonstrueres [42]. Koeffisientene er valgt slik at de nye variablene ikke korrelerer slik som originalvariablene. Dette vil ikke minske datamengden, men de nye verdiene vil videre bli plottet i et flerdimensjonalt «rom» [43]. Prinsipalkomponentene har sitt grunnlag i en kovariansmatrise, der kovariansen er et mål på en samlet variasjon mellom to (og to) variabler. Første prinsipalkomponent vil så finnes i den retningen i «rommet» som gjør rede for den største variasjonen i datasettet slik som vist i figur 8. Prinsipalkomponent 2 vil gjøre rede for den nest største variasjon osv.



Figur 8: I dette tre-dimensjonale rommet representerer de røde pilene prinsipalkomponentene. Prinsipalkomponent 1 er tegnet i retningen med mest variasjon. De røde og blå kulene representerer prøvene [42].

Et datasett med p variabler vil resultere i p prinsipalkomponenter, men er det en signifikant korrelasjon mellom originalvariablene kan det gjøres en reduksjon av datasettet. Dette fordi kun få av prinsipalkomponentene vil inneholde nyttig informasjon [38]. Ofte vil det med PC1 og PC2 bli gjort rede for det meste av den totale variasjonen i datasettet. Som et resultat av dette vil det være mulig å representere dataene todimensjonalt ved å plote verdiene for PC1 og PC2 mot hverandre [38]. De nye koordinataksene (PC'ene) er de mest passende for en grafisk representasjon for tolkning av variasjon i datasettet [42].

Ved en prinsipal komponentanalyse er det tre verdier som er karakteristiske; score, loading og residual. Skårverdiene reflekterer hvor prøven er lokalisert langs prinsipalkomponenten, og er «koordinatene» til prøven på prinsipalkomponenten (se figur 8) [42]. Loadingene beskriver datastrukturen i form av bidrag fra variablene og korrelasjoner. Hver variabel har en loading på hver prinsipalkomponent som reflekterer hvor mye den individuelle variabelen bidrar til den spesifikke prinsipalkomponenten samt hvor godt prinsipalkomponenten tar variasjonen i en variabel til betraktning [42]. Residualet er, som nevnt, fraksjonen av variansen som ikke kan beskrives av modellen. Den totale residualvariansen beskriver gjennomsnittsresidualvarians av alle variabler, eller den totale modelleringsfejlen [42].

1.8.2.3 PLS-regresjon

For å effektivisere analyser kan det kalkuleres regresjonsmodeller med hensikt å forutsi resultater i fremtiden. PLS-regresjon er vanlig å bruke når det skal behandles spektroskopiske data med mange variabler. Metoden går ut på at både en x - og y -matrise brukes for å finne latente verdier i x som best mulig vil predikere variabler i y [42]. Formelen som uttrykker x og y er gitt ligning 14 og 15. PLS-komponentene er like prinsipalkomponentene, men refereres til som faktorer.

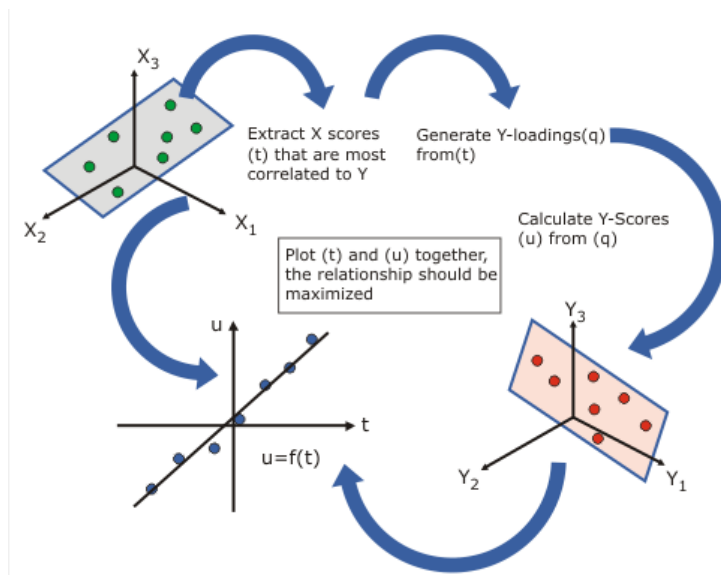
$$X = TP^T + E \quad (14)$$

$$Y = TQ + F \quad (15)$$

, der T representerer matrisen til scoreverdiene, P er loadingmatrisen til X , Q er loadingmatrisen til Y , og E og F er errormatrisene til henholdsvis X og Y .

I dette tilfellet var det ønskelig å undersøke om måldata fra SEC og FTIR-spektroskopi vil kunne predikere hydrolysegrad (målt med OPA-metode). Er det sammenheng i resultatene vil det bety at det er mulig å bruke en regresjonsmodell til å bestemme hydrolysegrad ut i fra en SEC- eller FTIR-spektroskopianalyse. I tillegg er det også av interesse å vite mer om produktet i hydrolysen og med det også se om måldata fra FTIR-spektroskopi kan predikere gjennomsnittlig molekylvekt.

PLS-regresjon maksimerer kovariansen mellom x og y . I PLS-modeller er det scorene og loadingene som uttrykker hvordan prøver og variabler projekteres langs modellens komponenter. PLS- scores blir funnet på samme måte som i PCA der det er prøvekoordinatene langs prinsipalkomponenten, men ved PLS-regresjonsanalyse er det to sett komponenter som blir tatt til betraktning for å summere variasjonen i både x - og y -«rommet». T -scoreverdiene er de nye koordinatene til datapunktene i x -rommet beregnet slik at den viser strukturen av x som vil være mest predikerende for y (se figur 9). Dette er ulikt PCA der scoreverdiene er koordinatene til prøvene i henhold til prinsipalkomponenten som viser størst variasjon. U -scorene summerer delen av strukturen i Y som blir forklart av x langs en gitt faktor relatert til T med en konstant. T - og U -scorene summerer forholdet mellom x og y langs en spesifikk modellkomponent (se figur 9) [42].



Figur 9: Illustrasjon av hvordan en PLS-regresjonsmodell kalkuleres ut i fra x - og y -matriser [42].

Loadingene beskriver hvordan x- og y-variablene er relatert til modellkomponenten summert av T-scorene. Loadingene blir tolket forskjellig i x- og y-«rommet». P-loadinger forklarer hvor mye hver x-variabel bidrar til en spesifikk modellkomponent, og brukes på samme måte som PCA-loadinger. Retningen bestemt av projeksjonen av x-variablene blir brukt til å tolke betydningen av plassen til et prosjektert datapunkt i et T-scoreplott i henhold til variasjoner i x. Q-loadinger forklarer det direkte forholdet mellom y-variabler og T-scorene. Som følge av dette kan retningen bestemt av projeksjonen av y-variablene bli brukt til å tolke betydningen av plasseringen til et prosjektert datapunkt i et T-scoreplott i henhold til variasjonen i prøvene i y. Variabler som viser verdien som har størst korrelasjon med responsvariablene blir ekstra vektlagt da de vil gi den mest effektive prediksjonen.

1.8.2.4 Validering

Det er viktig å undersøke den kalkulerede prediksjonsmodellen for å påse at ikke modellen overtilpasses [39].

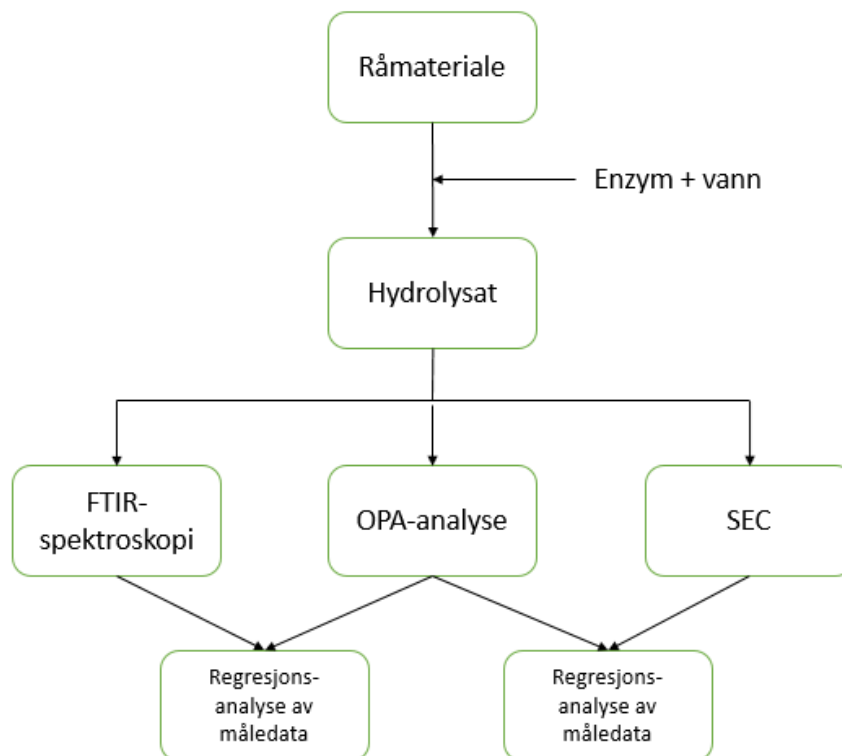
Under dette prosjektet ble det brukt full kryssvalidering der hver prøve tar del i både kalibrerings- og valideringstrinnene individuelt. Metoden brukes ofte når det ikke er nok variasjon i prøvene eller det er for få prøver til å gjøre en testsettvalidering. Ved full kryssvalidering holdes én og én prøve ute av gangen under valideringen. Disse prøvene brukes til prediksjon [42]. Hvor god kryssvalideringen er blir uttrykt ved R^2 og Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV), som en funksjon av PLS-faktorer. R^2 representerer forskjellen mellom de sanne og de kalkulerede verdiene i den statistiske modellen. RMSECV vurderer kvaliteten på predikasjonskapasiteten til modellen, og gir en standardfeil mellom sanne og kalkulerede verdier. Formel for beregning av RMSECV er definert i ligning 16.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-1}} \quad (16)$$

, der i indikerer prøvene fra 1 til n , n er det totale antallet prøver, y_i er referanseverdiene og \hat{y} er de predikerte verdiene [44].

2. Eksperimentelt

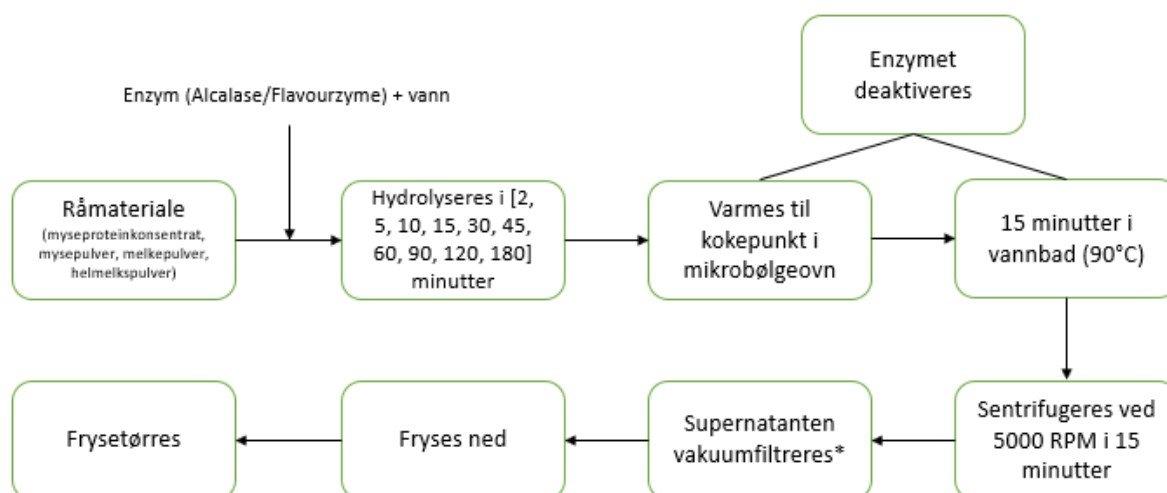
Under dette prosjektet ble det utført enzymatisk hydrolyse ved bruk av materialene myseproteinkonsentrat, melkepulver, helmelkspulver og mysepulver. Hydrolysaten ble så analysert ved bruk av FTIR-spektroskopi, OPA-metoden og størrelsesfordelingskromatografi. Til slutt ble resultatene fra de ulike analysene sammenlignet. En skjematisk oversikt over det eksperimentelle er vist i figur 10.



Figur 10: Skjematisk oversikt over det eksperimentelle utført under dette prosjektet.

2.1 Enzymatisk proteinhydrolyse

Det ble utført en rekke serier med hydrolyser med utgangspunkt i fire forskjellige råmaterialer. Hvert av materialene ble hydrolysert med to ulike enzymer; Alcalase 2.4L og Flavourzyme. Det ble utført individuelle hydrolyser for hver prøve i seriene, og ikke én hydrolyse der man tar ut prøver underveis til gitte tider, som ellers er vanlig prosedyre [3, 6]. Dette for å ha konstante mengder substrat tilgjengelig for enzymet til enhver tid. En skjematisk illustrasjon av hydrolysen og videre behandling av ferdig hydrolysat er vist i figur 11.



Figur 11: Skjematisk illustrasjon av hydrolyseprosessen og videre behandling av det ferdige proteinhydrolysatet. *Dette trinnet ble ikke utført for prøver fra myseproteinkonsentrat.

2.1.1 Materialer

Myseproteinkonsentrat (WPC80), Tine, 77% protein

Mysepulver (WPO), Tine, 12% protein

Helmelkspulver (WMP), Tine, 28% protein

Melkepulver (MPO), Tine, 28% protein

Peptidase fra *Bacillus Licheniformis* - Alcalase 2.4L, CAS nr.: 9014-01-1, Sigma-Aldrich®

Peptidase fra *Aspergillus oryzae* – Flavourzyme, EC nr.: 232-752-2, Sigma-Aldrich®

2.1.2 Utstyr

Vannbad, GFL®, Fisher Scientific

Mikrobølgeovn, MenuMaster® commercial

Magnetrører, VARIOMAG, Thermo Scientific

Automatpipette 10-100 µL, FINNPIPETTE®, ThermoFisher Scientific

Sentrifuge, Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter™

Frysetørker, Alpha 1-2 LO plus, Christ®

Frysetørker, Gamma 1-16, Christ®

Vekt, AG204 DeltaRange®, Mettler Toledo

2.1.3 Metode

Hver hydrolyse ble utført i hver sin 200 mL pyrexflaske. 4% (w/v) myseproteinkonsentratløsninger ble først tillaget. Ut i fra disse prøvene ble det beregnet hvor mye pulver fra de øvrige råmaterialene som måtte brukes for å få et tilsvarende enzym-substrat forhold. Det ble da henholdsvis 8 g av myseproteinkonsentratpulveret, 52 g mysepulver og 22 g melke- og helmelkspulver i 200 mL Milli-Q (deionisert og filtrert (0.22 μm), Millipore) vann.

Løsningene ble varmet opp til 50°C i et vannbad som holdt ca. 50 °C, under omrøring med magnetrører (ca. 450 RPM). Da løsningen nådde 50°C ble 123, 2 mg enzym tilsatt. Hver prøve ble hydrolysert i henholdsvis 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 og 180 minutter i et oppsett slik som vist i figur 12. Etter endt hydrolyse ble enzymet deaktivert ved å varme opp prøven til kokepunkt ved bruk av mikrobølgeovn (ca. 35 sekunder på effektnivå 8). Prøvene ble deretter overført til et vannbad som holdt ca. 90°C hvor de stod i 15 minutter.



Figur 12: Oppsett for hydrolysene - I vannbad med magnetrører i bunn.

Avkjølte hydrolysat ble sentrifugert i 15 minutter ved 5000 RPM. Supernatanten ble så vakuumfiltrert og filtratet ble overført til et plastbeger med hull i lokket. Supernatanten fra myseproteinkonsentrat ble ikke vakuumfiltrert, men direkte overført til plastbeger etter sentrifugering. Begrene ble så satt i et fryserom som holdt -20 °C. Da prøvene var gjennomfrosne ble de satt til frysetørring i én uke. Frysetørringen ble utført som anvist i brukermanualen til instrumentet. Pulveret som nå var igjen ble videre løst på nytt i Milli-Q vann og analysert ved FTIR-spektroskopi, OPA- metoden og SEC.

Bestemmelse av proteininnhold i prøvene

For å kunne beregne hydrolysegraden av hydrolysatene ved bruk OPA-metoden, må proteininnholdet i prøven være tilgjengelig. Prøvene ble derfor sendt til analyse ved Norges miljø-og biovitenskapelige universitet – fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning. Der ble det foretatt en jordanalyse av totalt nitrogeninnhold i prøven etter Dumasmetsoden, beskrevet i Bremmer og Mulvaney [45]. Prøvene ble analysert på analyseinstrumentet Leco TruSpec CHN. Analysen utføres ved å veie inn ca. 200 mg prøvemateriale som så forbrennes fullstendig ved 1050°C. Nitrogenforbindelsene i prøven vil da bli redusert til N₂ ved hjelp av kobber. Konsentrasjonen av nitrogengassen blir så målt ved termisk konduktivitet, og en får oppgitt en prosent nitrogen av den totale prøven. For å beregne tilbake til mengde protein ble det brukt en faktor for konvertering fra nitrogeninnhold i prøven til proteininnhold [46].

2.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden

Ved bruk av OPA-metoden skal proteinhydrolysatsene derivatiseres med OPA-reagens og deretter måles spektrofotometrisk. For å effektivisere analysemetoden, var det ønskelig å kunne analysere flere prøver samtidig samt bruke mindre prøvemateriale og reagenser. Det ble derfor utarbeidet en mikroskalametode med utgangspunkt i metoden beskrevet av Spellman et al. [3]. Dersom metoden fungerer vil det minske ulikheter i målingene som følge av ulik analysetid samt være mer økonomisk da det anvendes mindre reagens. Det første eksperimentet ved bruk av denne metoden var en stabilitetstest av reagenset.

2.2.1 Kjemikalier

o-phthaldialdehyd (OPA), $C_6H_4(CHO)_2$, CAS nr.: 643-79-8, Sigma-Aldrich[®], $\geq 99\%$

N-Acetylcystein (NAC), $C_5H_9NO_3S$, CAS nr.: 616-91-1, Sigma-Aldrich[®], $\geq 99\%$

Natrium dodekylsulfat (Sodium dodecyl sulfate (SDS)), $NaC_{12}H_{25}SO_4$, CAS nr.: 151-21-3, Bio-Rad, elektroforesegrad

Borsyre, H_3BO_3 , CAS nr.: 1004-35-3, Sigma-Aldrich[®], $\geq 99,5\%$

Natriumhydroksid, NaOH, CAS nr. 1310-73-2, Merck

Metanol, CH_3OH , CAS nr.: 67-56-1, VWR Chemicals[®], HPLC-grad

2.2.2 Utstyr

pH-meter, inoLab pH7110, WTW

Vekt, AG204, DeltaRange[®], Mettler Toledo,

UV-Spektrofotometer, SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH

96-brønnsmicroplate 400 μ L, Thermo

Automatpipette 20-200 μ L, FINNPIPETTE[®], Thermo Fisher

Automatpipette 5-50 μ L, FINNPIPETTE[®], Thermo Fisher

Automatpipette 100-1000 μ L, FINNPIPETTE[®], Thermo Fisher

Digitalpipette 300 μ L, sartorius-Picus[®] 120, Biohit

Digitalpipette 150 μ L, sartorius-Picus[®] 300, Biohit

Magnetrorer, CD162, Stuart[®]

2.2.3 Stabilitetstest av OPA-reagenset

Det ble utført et eksperiment for å undersøke stabiliteten til OPA-reagenset ved å blande alle kjemikaliene i reagenset, der *o*-phthaldialdehyd ble tilsatt sist. Reagenset ble så målt spektrofotometrisk.

2.2.3.1 Metode

0,1 M boratbuffer ble tillaget ved å løse borsyre i Milli-Q vann. Bufferen ble deretter justert til pH lik 9.5 ved å tilsette 1 M NaOH-løsning under måling med et pH-meter. En 50 mM *o*-phthaldialdehyd-løsning i metanol ble tillaget. En 50 mM NAC-løsning ble tillaget ved å løse NAC i Milli-Q vann. Til slutt ble en 20% (w/v) SDS-løsning preparert.

Stabilitetstesten ble utført ved å applisere hver av komponentene til brønnene i en mikroplate i mengdene og rekkefølgen slik som vist nedenfor. Det ble analysert 5 paralleller. 3 paralleller av en blankprøve ble analysert for korrigerende av absorpsjonen. Til blankprøvene ble det tilsatt 10 µL SDS-løsning istedenfor *o*-phthaldialdehyd.

- 150 µL boratbuffer
- 10 µL SDS-løsning
- 20 µL NAC-løsning
- 20 µL *o*-phthaldialdehyd-løsning

Mikroplaten ble umiddelbart satt inn i spektrofotometeret og målingen startet. Det ble målt absorpsjon av hver av brønnene hvert 5 minutt over 235 minutter.

2.2.4 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden

Alle prøvene ble analysert med OPA-metoden ved å tilsette prøvene til reagenset og måle de spektrofotometrisk. Her ble også uhydrolisert prøvemateriale målt. Måledataene ble videre brukt til å beregne hydrolysegraden av hver prøve.

2.2.4.1 Metode

Det ble tillaget et 100 mL OPA-reagens ved å tilsette 5 mL SDS-løsning, 10 mL NAC-løsning og 10 mL *o*-phtaldialdehyd-løsning til 75 mL boratbuffer. Reagenset ble satt til røring (340RPM) med en magnetrører i litt over én time. Under omrøringen var reagenset dekket av aluminiumsfolie. Reagenset ble oppbevart i kjøleskap til det skulle brukes til analyse. Det ble også laget en 5% (w/v) SDS-løsning. 5%-løsninger av hver prøve ble forberedt ved å løse det tørkede hydrolysatet i Milli-Q vann. Prøvene ble så fortynnet 20 ganger med 5% (w/v) SDS-løsning.

For å beregne hydrolysegraden måtte også absorpsjonen av uhydrolysert råmateriale måles. Dette ble løst ved å la råmaterialet gå igjennom den samme prosessen som de hydrolyserte prøvene for utenom den enzymatiske hydrolysen. Hvert råmateriale ble derfor løst i 200 mL Milli-Q vann, samme mengde som løsningene som undergikk enzymatisk hydrolyse beskrevet i kapittel 2.1.3. Videre ble de sentrifugert, vakuumfiltrert (utenom myseproteinkonsentratet) og frysetørret. Pulveret som nå var igjen ble brukt til å lage 5%-løsninger. Disse løsningene ble igjen fortynnet 20 ganger med 5% (w/v) SDS-løsning.

I og med at måleresultatet vil være avhengig av tiden prøven får til å reagere med reagenset, var det viktig å tilsette prøvene så likt som mulig. Dette ble løst ved å bruke digitalpipetter med 8 kanaler. Hver fortynnet prøve ble tilsatt hver sin brønn for å lettere kunne overføres til reagenset senere. Dette var den enkleste metoden for å kunne hente opp og applisere alle prøvene på samme tid. Analysene ble gjort for én serie (der en serie består av hydrolysat fra et av råmateriale hydrolysert med et av enzymene, altså totalt 10 prøver- én for hver av de ulike hydrolysetidene) av gangen.

Det ble klargjort en 96-brønns mikroplate med 195 μL OPA-reagens i hver brønn som skulle tilsettes prøve. Til applisering av reagenset ble det brukt revers pipetteringsmetode da SDS-løsningen i reagenset danner bobler som vil kunne ødelegge for målingene. 5 μL prøve ble så applisert til OPA-reagenset ved hjelp av funksjonen *multi dispense* til digitalpipetten - 5 paralleller av hver. For blankprøvene ble det tilsatt 5 μL 5% (w/v) SDS-løsning istedenfor fortynnet hydrolysat. Det ble også forberedt 5 paralleller av blankprøven. Prøvene ble målt spektrofotometrisk etter 10 minutter ved 340 nm. Absorpsjonen til de uhydrolyserte prøvene ble målt etter 2 minutter.

2.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi

Prøvene ble analysert ved bruk av SEC med mål om å finne ut mer om produktene som har blitt dannet under hydrolysen. Alle prøvene ble analysert én gang, og den gjennomsnittlige molekylvekten for hver prøve bestemt.

2.3.1 Kjemikalier

Acetonitril, C₂H₃N, CAS nr.: 75-05-8, VWR Chemicals[®], HPLC-grad

Trifluoreddiksyre (Trifluoroacetic acid (TFA), CF₃COOH, VWR Chemicals[®], HPLC-grad

Natrium-di-hydrogenfosfat, NaH₂PO₄, VWR Chemicals[®]

Standarder, oppgitt i tabell A1 i vedlegg A, Sigma-Aldrich[®]

2.3.2 Utstyr

Millex filter 0.45 µm, Merck

Prøveglass, Thermo Scientific

Væskekromatograf, Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific UHPLC Focused

- Pumpe, Ultimate 3000

- Autosampler, Ultimate 3000

- Kolonne, BioSept[™], 5 µm, SEC-s2000, phenomex[®]

- Forkolonne, Security Guard[™] ID 4 x 3.0 mm

2.3.3 Metode

Det ble tillaget en mobilfase bestående av 30% acetonitril og 1% TFA. Det ble også preparert en 0.1 M NaH₂PO₄ løsning som ble brukt som en vaskeløsning.

Det ble først analysert en rekke standarder (se tabell A1 i vedlegg A) for å kunne lage en kalibreringskurve til videre beregninger av den gjennomsnittlige molekylvekten til prøvene.

5 %-løsninger for hver av proteinhydrolysatene ble tillaget. Disse ble så filtrert med et filter med porestørrelse 0.45 µm. De filtrerte prøvene ble så overført til prøveglass. 10 µL av prøvene ble analysert kromatografisk med isokratisk eluering over en tid på 50 minutter. Etter 20 minutter ble det i 3 minutter sendt en vaskeløsning gjennom kolonnen. Mobilfase og vaskeløsningen hadde en konstant gjennomstrømningshastighet på 0.9 mL/min. Prøvene ble detektert ved hjelp av en UV-detektor ved 214 nm.

2.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene

Det ble utført FTIR-målinger av prøvene for å se om det er en tydelig endring i absorpsjonen etter hvert som hydrolysetiden øker. Videre ble resultatene brukt til å sammenligne med resultater fra SEC- og OPA-analyse. Det ble først utført en test for å se hvilken konsentrasjon av tørket hydrolysat i vann som ga resultater der det var tydelig absorpsjon i proteinområdet. Det ble da bestemt hvilken konsentrasjon som skulle brukes i de videre analysene. Denne testen ble gjort i forkant av alle analysene og bestemte hvilken konsentrasjon av hydrolysatløsningen som ble brukt videre.

2.4.1 Utstyr

FTIR-spektrometer, High-Throughput-Screening-Extension (HTS-XT) koblet til Tensor 27 spektrometer med DLATGS (deuterated L-alanine doped triglycene sulphate)-detektor,

Bruker Optics

Vekt, AG204 DeltaRange[®], Mettler Toledo

Millex filter 0.45µm, Merck

Silicaplater, Bruker

Automatpipette 5-50 µL, FINNPITPETTE[®], Thermo Fisher

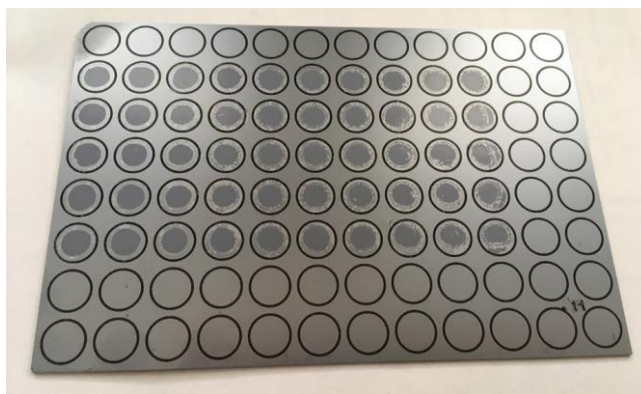
2.4.2 Metode

Test av prøvekonsentrasjon til videre analyse

Testen ble utført med hydrolysat fra råmaterialene myseproteinpulver og myseproteinkonsentrat hydrolysert med Flavourzyme over 2 minutter. Det ble laget 2.5%- og 5%-løsninger av begge materialene som deretter ble filtrert gjennom 0.45 µm filter. 10 µL filtrert løsning ble applisert til en silicaplate (se figur 13), 5 paralleller av hver. Da filmen var tørket inn ble prøvene analysert under følgende betingelser:

- Oppløsning: 4 cm⁻¹
- 40 scans
- Måling av bakgrunn før hver prøve

Spektrene ble tatt opp fra 4000-400 cm⁻¹.



Figur 13: Silicaplate brukt til å applisere prøve på til FTIR-måling. Her er det applisert mysekonsentratprøver hydrolysert med Flavourzyme.

Under denne testen kom det frem at en 5%-løsning ga de beste måleresultatene. Det kom også frem at hydrolysatene fra mysepulveret hadde for lav konsentrasjon av protein, og disse ble derfor ikke analysert videre.

FTIR-analyse av alle prøvene

Det ble tillaget 5%-løsninger av proteinhydrolysatene fra myseproteinkonsentrat, melke-og helmelkspulverene. Disse ble så filtrert med 0.45 μm filter. 10 μL filtrert løsning ble så applisert på silicaplater (se figur 13), 5 paralleller av hver. Det ble forberedt én plate per serie hydrolysat. Prøvene ble analysert etter betingelsene beskrevet over for testforsøket.

2.5 Reproduserbarhetsforsøk

For å bestemme hvor presise metodene er ble det gjort reproduserbarhetsforsøk. Dette ble gjort for SEC og OPA-metoden. Serien med proteinhydrolysat fra myseproteinkonsentrat hydrolysert med Flavourzyme ble valgt ut til dette formålet.

For OPA-analysene ble dette gjort over 6 dager. Første dagen ble serien analysert 6 ganger, 5 paralleller av hver prøve. Alle 6 analysene ble utført med samme OPA-reagens. Dag 2-6 ble det kun utført måling én gang, og det ble brukt nylaget OPA-reagens hver dag. Analysene ble utført som beskrevet i kapittel 2.2.4.1.

For SEC ble det valgt ut 3 prøver fra hydrolyseserien for å kunne analysere prøvene 6 ganger i løpet av ett døgn. Prøvene hydrolysert i 5, 30 og 120 minutter ble valgt ut og analysert én gang den første dagen med betingelser som gitt i kapittel 2.3.3. Videre ble hver av prøvene analysert én gang per dag fra dag 2-6.

2.6 Dataanalyse

2.6.1 Programvare

WinGPC UniChrom, versjon 8.0.6, Polymer standards service

The Unscrambler®X, versjon 10.4, CAMO Software AS

2.6.2 Beregning av gjennomsnittlig molekylvekt

Vekt-gjennomsnittlig molekylvekt ble ved hjelp av WinGPC UniChrom beregnet. Det ble først laget en kalibreringskurve med bruk av molekylvekten og retensjonstiden til hver av standardene (se tabell A1 i vedlegg A). Dataene fra hver av prøvene ble så importert inn i programmet og M_w ble beregnet ut i fra kalibreringskurven med formelen gitt i ligning 4. Det ble brukt et grunnlinjeområde fra 5-20 minutter i disse beregningene.

2.6.3 Behandling av FTIR-måledata

Til denne dataprosesseringen ble programmet The Unscrambler® X brukt. Én og én serie ble behandlet av gangen der én serie er hydrolyseserien for ett av råmaterialene med ett av enzymene.

Først ble de fem parallellene av hver prøvene redusert til én verdi ved å beregne et gjennomsnitt. Savatzky-Golay algoritmen ble så brukt til å andrederivere dataene med polynomgrad 2 og en smoothing window size på 13 punkt. Hvert spektrum ble normalisert ved bruk av EMSC. Det ble så utført en prinsippal komponentanalyse på verdiene i spekterområdet fra 1800 til 850 cm^{-1} .

2.6.4 PLS-regresjonsanalyse

Det ble utført fem PLS-regresjonsanalyser ved hjelp av en automatisk analysefunksjon i The Unscrambler X. Forbehandlingen for FTIR-dataene ble gjort på samme måte som beskrevet i kapittel 2.6.3. Det ble utført PLS-regresjonsanalyse på følgende måledatasett:

- Hydrolysegrad predikert ved bruk av FTIR-data.
- Gjennomsnittlig molekylvekt predikert ved bruk av FTIR-data.
- Absorpsjon målt ved OPA-metoden predikert ved bruk av FTIR-data.
- Hydrolysegrad predikert ved bruk av SEC-data
- Absorpsjon målt ved OPA-metoden predikert ved bruk av SEC-data.

Det ble utført PLS-regresjonsanalyse på data direkte på absorpsjonen målt ved OPA-metoden da det ligger store usikkerheter i den beregnede hydrolysegraden. Dette i form av måling av proteininnhold og estimerte verdier for molekylvekt og antall peptidbånd.

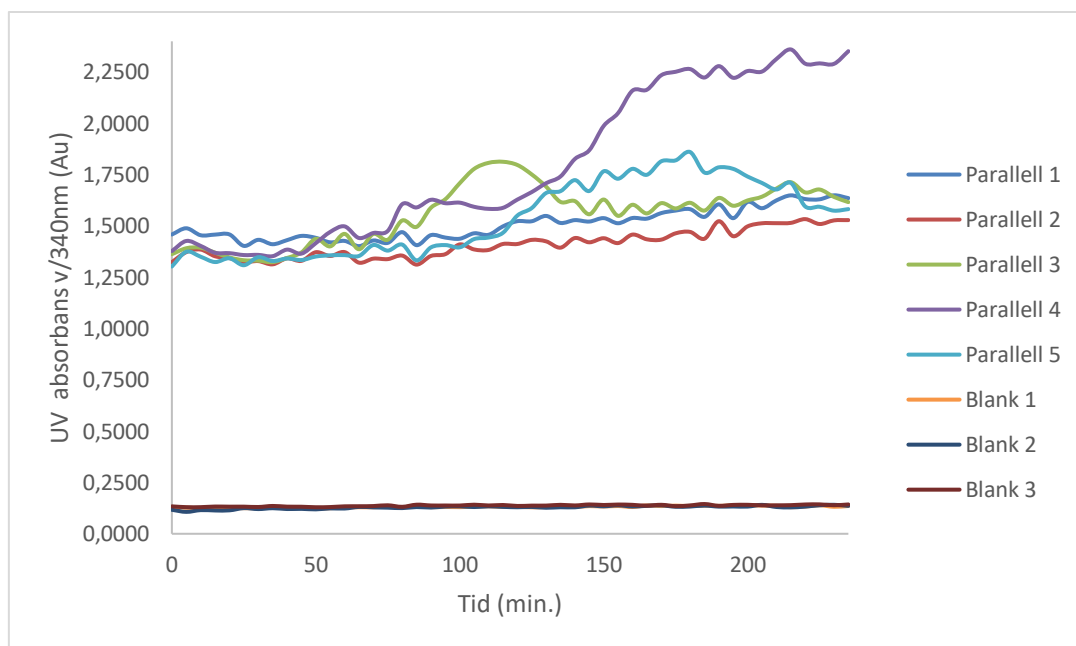
Hver av regresjonsanalysene ble validert ved bruk av tilfeldig kryssvalidering med 20 segmenter.

3. Resultat

Det ble utført enzymatisk proteinhydrolyse av myseproteinkonsentrat, mysepulver, helmelkspulver og melkepulver ved bruk av Flavourzyme og Alcalase. Hydrolysatene ble videre analysert ved bruk av FTIR-spektroskopi, SEC og OPA- metoden. Resultatene fra hver av analysene er presentert for seg, og deretter resultatene fra regresjonsanalysene og reproduserbarhetsforsøkene.

3.1 Stabilitetstest av OPA-reagenset

Alle komponentene i OPA-reagenset ble tilsatt en mikroplate og målt spektrofotometrisk ved 340 nm over et tidsrom på 235 minutter. Absorpsjonen ble målt hvert 5 minutt. Absorpsjonene for prøvene og blankeprøvene ble plottet som funksjon av tiden og er gitt i figur 14.

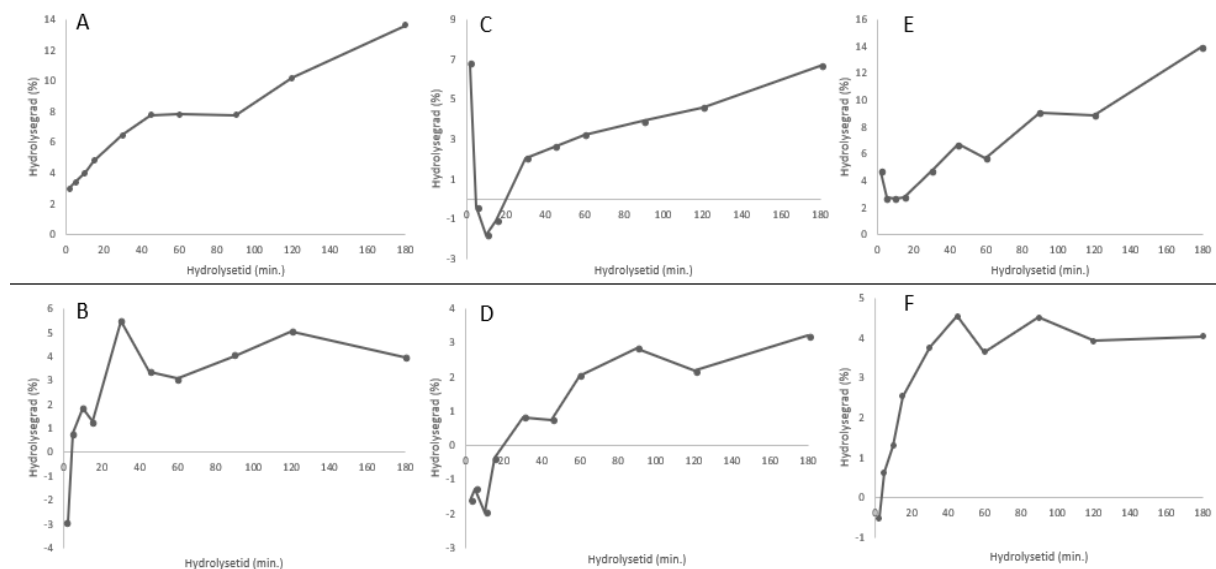


Figur 14: Absorpsjonen målt av OPA-reagenset (5 paralleller) samt blankprøver (3 paralleller) over 235 minutter.

Figur 14 viser at det skjer en økning i absorpsjonen for alle parallellene etter ca. 100 minutter. Det er en større økning i absorpsjon for parallell 4. Ved 185 minutter skjer det en økning i absorpsjon for samtlige paralleller. Det samme ser også ut til å skje ved 85 minutter, der alle parallellene har en lavere absorpsjon enn ved forrige måling.

3.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden

Det ble målt absorpsjon av alle prøvene etter reaksjon med OPA-reagens. De målte absorpsjonene samt den målte konsentrasjonen av protein i prøven ble brukt til å beregne hydrolysegraden til de ulike prøvene ut i fra formel gitt i ligning 2. Ytterligere parametere brukt i beregningene er gitt i tabell A2 i vedlegg A. I figur 15 er hydrolysegraden plottet som en funksjon av hydrolysetiden for hver av hydrolyseseriene. Beregnet hydrolysegrad for alle seriene er lagt ved i tabell B1-3 i vedlegg B.



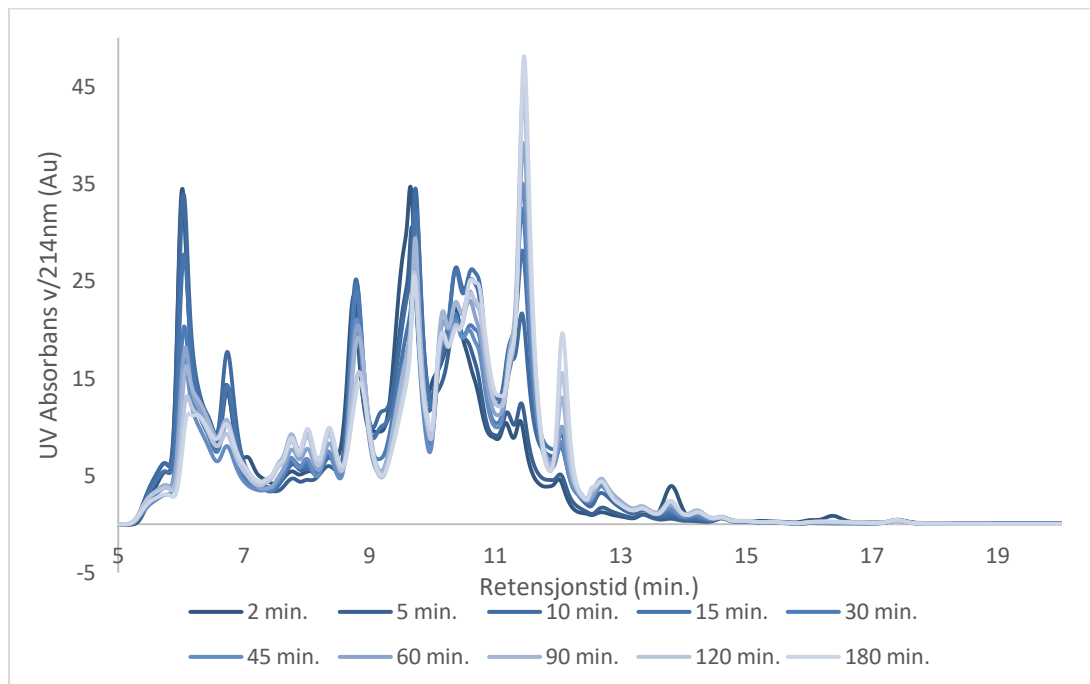
Figur 15: Hydrolysegrad plottet som en funksjon av hydrolysetiden. Her vist for myseproteinpulver hydrolysert med Flavourzyme (A) og Alcalase (B), melkepulver hydrolysert med Flavourzyme (C) og Alcalase (D) og helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme (E) og Alcalase (F).

Den generelle trenden for alle seriene i figur 15 er at hydrolysegraden øker med økt hydrolysetid. Resultatene forteller at det ved bruk av Flavourzyme (figur A, C, E) oppnås en dobbelt så høy hydrolysegrad enn ved bruk av Alcalase (figur B, D, F) for disse råmaterialene. Det observeres også at ved bruk av Alcalase er det raskere kløyving av proteiner og peptid i starten av hydrolysen da det tydelig ut i fra figurene er en raskere økning i mengde isoindol som dannes. Allikevel skjer det ikke en like effektiv kløyving som ved bruk av Flavourzyme (etter hva som observeres ut fra disse figurene) da hydrolysegraden av prøvene med kortest hydrolysetid er betydelig lavere enn de hydrolysert med Flavourzyme.

Det observeres også at hydrolysegraden til prøvene fra myseproteinkonsentrat er høyere enn prøvene fra melk- og helmelkspulver med unntak av helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme.

3.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi

Alle prøvene ble analysert ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi. Kromatogrammene for hver av hydrolyseseriene er vist i figur 16 og C1-5 i vedlegg C.



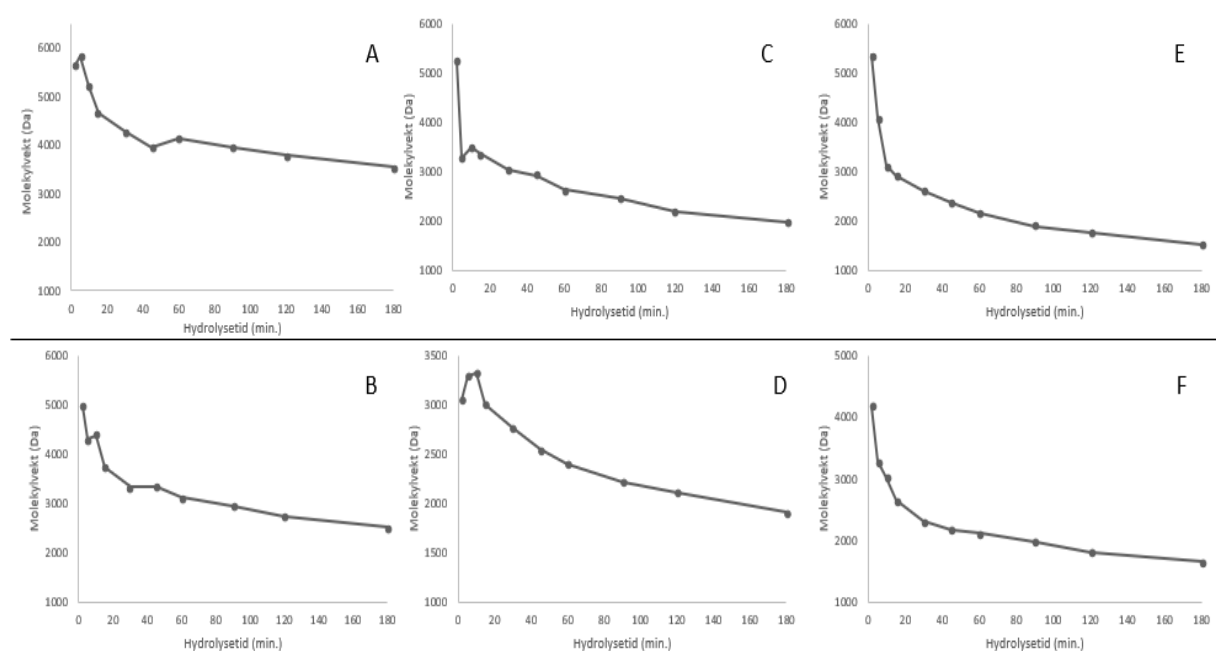
Figur 16: Kromatogram for myseproteinkonsentrat hydrolysert med Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

Figur 16 viser ved retensjonstidene fra 5-11 minutter at prøver hydrolysert over kortere tid har en høyere absorpsjon, og at det etter 11 minutter er de prøvene som er hydrolysert over lengre tid som har høyest absorpsjon. For prøvene hydrolysert i 2 og 5 minutter har det skjedd en forskyvning for de minste molekylene eluert sist, ca. fra 10.5 minutter.

Kromatogrammene i figur C1-5 (se vedlegg C) viser også en tydelig økning av mindre molekyler etter hvert som hydrolysetiden øker. Serien der myseproteinkonsentrat er hydrolysert med Alcalase (figur C1) har en tydeligere endring i molekylvekt enn serien der det ble hydrolysert med Flavourzyme (figur 16). Ved ca. 6 minutter er absorpsjonen for prøven hydrolysert i 10 minutter høyere enn de hydrolysert i 2 og 5 minutter. Absorpsjonen ved ca. 11.5 minutter ser ut til å synke med hydrolysetiden. For melkepulver hydrolysert med Flavourzyme (figur C2) er kromatogrammet for prøven hydrolysert i 2 minutter forskjøvet.

Det er også større endringer i molekylstørrelsen innad i denne serien enn for seriene fra myseproteinkonsentrat. I kromatogrammet for prøver av melkepulver hydrolysert med Alcalase (figur C3) har det også skjedd en forskyvning for prøven hydrolysert i 2 minutter, men her mot høyre og ikke mot venstre slik som de foregående seriene. Kromatogrammene i figur C4 for prøver av helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme ser ut til å vise tydeligere endringen i molekylstørrelse enn de øvrige seriene. Kromatogrammene i figur C5 for prøver av helmelkspulver hydrolysert med Alcalase viser også en liten forskyvning mot venstre i toppen ved 8 minutter for prøvene hydrolysert i 90, 120 og 180 minutter.

For å illustrere endringen i molekylvekt etter hvert som hydrolysetiden øker, ble gjennomsnittlig molekylvekt for hver prøve plottet som en funksjon av hydrolysetiden. Den gjennomsnittlige molekylvekten av hver prøve ble beregnet ved bruk av funksjonen «quick analysis» i programmet WinGPC UniChrom ut i fra kalibreringskurven. Kalibreringskurven hadde en R^2 -verdi på 0.92. Resultatet er vist i figur 17. Beregnet gjennomsnittlig molekylvekt for alle prøvene er lagt ved i tabell C1-3 i vedlegg C.



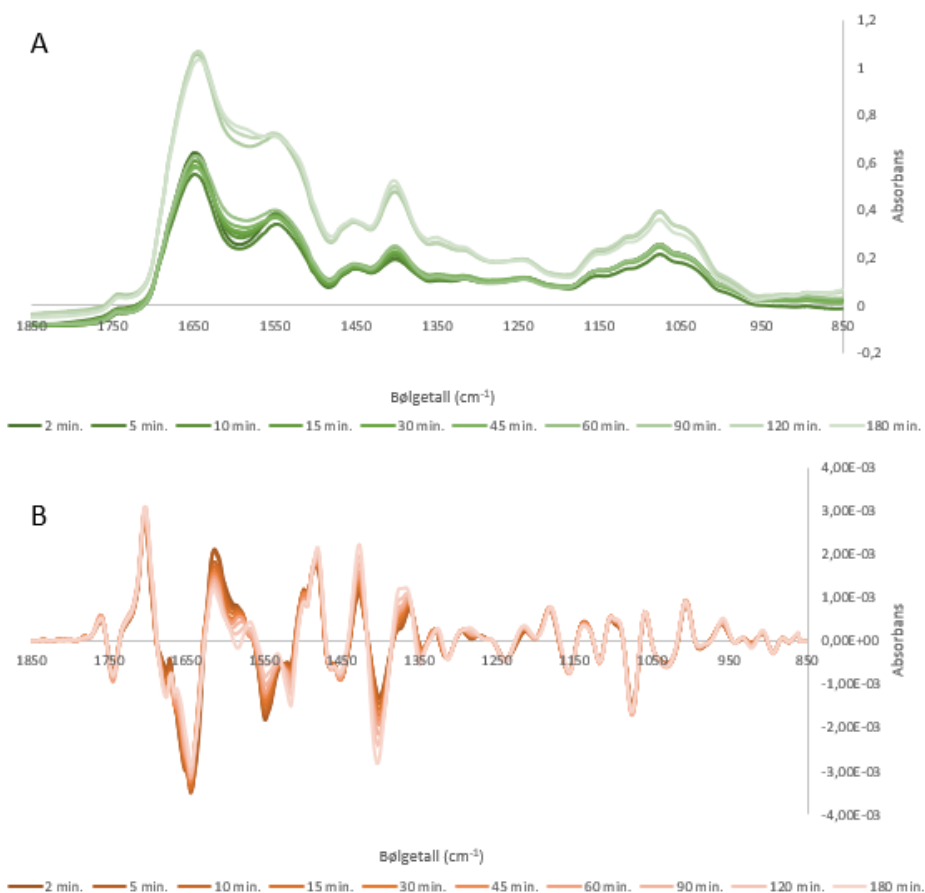
Figur 17: Gjennomsnittlig molekylvekt plottet som en funksjon av hydrolysetiden. Her vist for myseproteinpulver hydrolysert med Flavourzyme (A) og Alcalase (B), melkepulver hydrolysert med Flavourzyme (C) og Alcalase (D) og helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme (E) og Alcalase (F).

Figur 17 viser at det er en tydelig nedgang i molekylvektstørrelse etter hvert som hydrolysetiden øker. Dette vises tydeligst for prøvene med råmateriale helmelkspulver som har en jevn kurve. Ut i fra figuren fremkommer det også at prøvene hydrolysert ved bruk av Alcalase (17 B, D, F) har lavere molekylvekt enn prøvene hydrolysert med Flavourzyme (17 A, C, E). Melkepulverprøven hydrolysert med Flavourzyme i 2 minutter (figur 17C) har en gjennomsnittlig molekylvekt på ca. 2000 Da høyere enn neste prøve. I figur 17B er det en økning i gjennomsnittlig molekylvekt for prøven hydrolysert i 10 minutter i en ellers synkende kurve.

3.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene

Tørrfilm fra hver av seriene med proteinhydrolysat ble analysert spektrofotometrisk. Råspektrene og de forbehandlede andrederiverte spektrene er vist i figur 18 og D1-5 i vedlegg D.

Myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Flavourzyme



Figur 18: Råspekter (A) og bearbejdet andrederivert FTIR-spekter (B) av myseproteinkonsentrat hydrolysert med Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

Spekteret i figur 18B viser en økning i absorpsjon i båndene ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. For amid I båndet ved $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ og amid II båndet ved $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ er det en minkende absorpsjon ved økende hydrolysetid. Figur 18A viser at prøvene hydrolysert i 90, 120 og 180 minutter generelt har høyere absorpsjon i frekvensområdet fra 1700-1000 cm^{-1} . Denne forskjellen er ikke proporsjonal med tiden.

Myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Alcalase

Spekteret i figur D1B (se vedlegg D) viser en økning i absorpsjonen ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. For amid I båndet ved $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ er det ingen jevn økning eller minskning i absorpsjonen over tid. Det kan heller se ut som at prøvene hydrolysert over lengre tid har en høyere absorpsjonsverdi ved denne frekvensen. Det samme gjelder for amid II båndet ved $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$, men her er det en mer tydelig økning ettersom hydrolysetiden øker. Råspekteret i figur D1A viser at absorpsjonen for de ulike prøvene har jevnere økning og minskning enn for myseproteinkonsentratprøvene hydrolysert med Flavourzyme.

Melkepulver hydrolysert ved bruk av Flavourzyme

Spekteret i figur D2B (se vedlegg D) viser en økning i absorpsjonen ved ~ 1515 og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. Amid II båndet ved $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ viser at absorpsjonen minker etter hvert som hydrolysetiden øker. Ved amid I båndet ved $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ er det vanskelig å tolke en trend av økning eller minking av absorpsjon i forhold til hydrolysetid. Prøven med kortest og lengst hydrolysetid har omtrent lik absorpsjon. Det ser i tillegg ut til at absorpsjonsbåndene for amid I båndet er forskjøvet, der prøvene med lenger hydrolysetid absorberer ved en høyere frekvens. I råspekteret i figur D2A er det absorpsjonsbånd fra $1150\text{-}1040 \text{ cm}^{-1}$. Disse representerer C-O strekk i laktosen som finnes melkepulveret [4].

Melkepulver hydrolysert ved bruk av Alcalase

Spekteret i figur D3B (se vedlegg D) viser en økning i absorpsjonen ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. Båndet ved $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ viser en økende absorpsjon etter hvert som hydrolysetiden øker. Absorpsjonsbåndet ved $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ viser en mer kompleks endring der det ikke er mulig å tolke noen trend i økende eller minkende absorpsjon ettersom hydrolysetiden øker. Råspekteret i figur D3A viser innhold av laktose i form av absorpsjon i frekvensområdet $1150\text{-}1040 \text{ cm}^{-1}$ som følge av C-O strekk.

Helmelkspulver hydrolysert ved bruk av Flavourzyme

Spekteret i figur D4B (se vedlegg D) viser en økning i absorpsjonen ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. Ved $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ er det ingen tydelig trend som viser at det er økende eller minkende absorpsjon etter hvert som hydrolysetiden øker. Absorpsjonen for amid I båndet for prøven hydrolysert i 2 minutter ser ut til å ha lavere frekvens enn de ytterligere prøvene. Ved $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ er det minkende absorpsjon etter hvert som hydrolysetiden

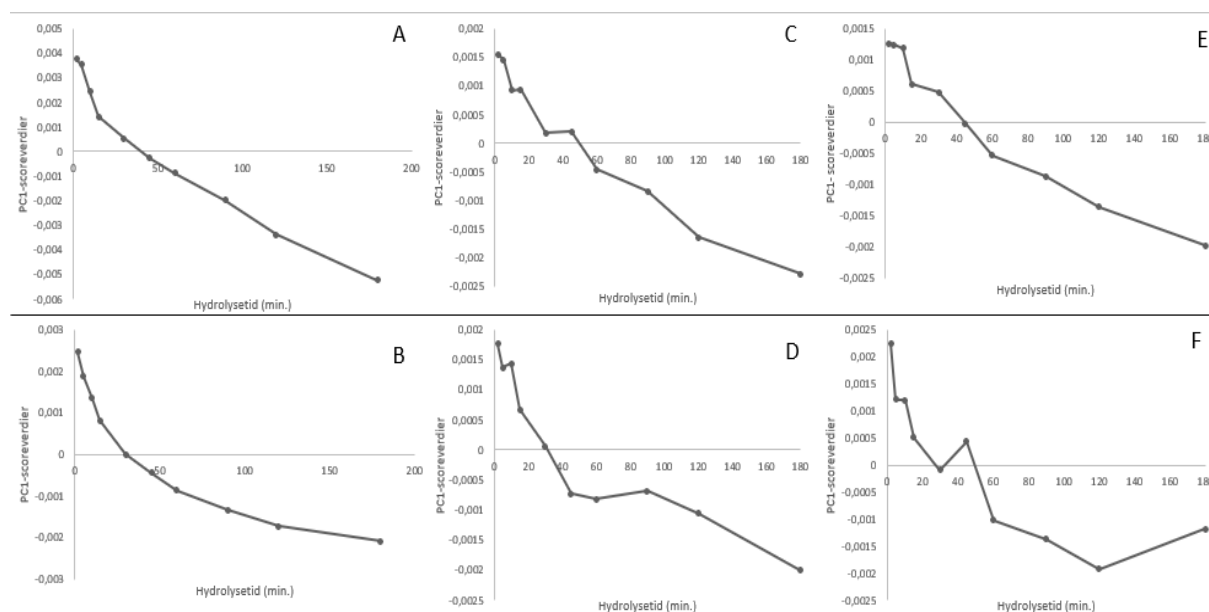
øker. I spekteret i figur D4A er det fra 1150-1040 cm^{-1} absorpsjonsbånd som har opphav i C-O strekk fra laktosen i prøven.

Helmelkspulver hydrolysert ved bruk av Alcalase

Spekteret i figur D5B (se vedlegg D) viser en økning i absorpsjonen ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ etter hvert som hydrolysetiden øker. Absorpsjonene ved ~ 1660 og $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ som representerer henholdsvis amid I og II båndene viser ingen tydelig trend i endring i absorpsjon etter hvert som hydrolysetiden endres. Allikevel ser det ut som at prøvene hydrolysert lengst har litt lavere absorpsjon enn de hydrolysert i en kortere tidsperiode. Amid I båndene for prøvene hydrolysert over lenger tid ligger også ved en litt høyere frekvens (7 cm^{-1} lenger opp i frekvensområdet). Spekteret i figur D5A viser absorpsjonsbånd i området $1150\text{-}1040 \text{ cm}^{-1}$ som følge av laktoseinnholdet i prøven.

3.4.1 Prinsipal komponentanalyse av FTIR-spektrene

Det ble utført en prinsipal komponentanalyse av FTIR-spektrene for hver av seriene. Ut i fra scoreplottene fra analysen (PC2-scoreverdier plottet mot PC1-scoreverdier) kommer det frem at den største variasjonen i serien for samtlige serier ligger i hydrolysetiden. Denne variasjonen er forklart ut i fra den første prinsipalkomponenten. For å illustrere dette ble scoreverdiene for første prinsipalkomponent plottet mot hydrolysetiden slik som vist i figur 19.



Figur 19: Scoreverdiene for PC1 plottet som en funksjon av hydrolysetiden. Her vist for myseproteinpulver hydrolysert med Flavourzyme (A) og Alcalase (B), melkepulver hydrolysert med Flavourzyme (C) og Alcalase (D) og helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme (E) og Alcalase (F).

Figur 19 viser at den generelle trenden for alle seriene er at variasjonen er avhengig av hydrolysetiden (forklart ut i fra PC1) og at det er en raskere endring i begynnelsen av hydrolysen. I tabell 1 er det vist hvor mange prosent av den totale variasjonen i datasettet som er forklart ut i fra PC1 for de ulike seriene.

Loadingplottene (ikke vist) fra analysene til de ulike seriene viser at den største variasjonen i settene har opphav i endringer i absorpsjonen ved henholdsvis ~1650, ~1550, ~1515 og ~1400 cm^{-1} .

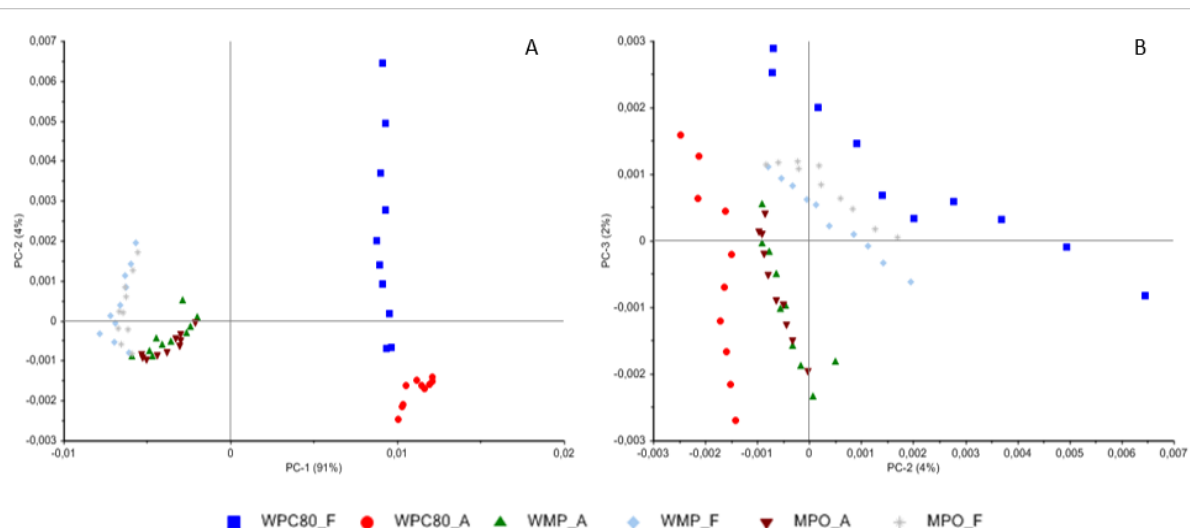
Tabell 1: Oversikt over andelen forklart variasjon ut i fra første prinsipalkomponent for de ulike hydrolyseseriene.

Hydrolyseserie	Andel forklart variasjon ut i fra PC1 (%)
Myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Flavourzyme (WPC80_F ^a)	91
Myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Alcalase (WPC80_A ^b)	91
Melkepulver hydrolysert ved bruk av Flavourzyme (MPO_F)	82
Melkepulver hydrolysert ved bruk av Alcalase (MPO_A)	90
Helmelkspulver hydrolysert ved bruk av Flavourzyme (WMP_F)	83
Helmelkspulver hydrolysert ved bruk av Alcalase (WMP_A)	90

^a Hydrolysert ved bruk av Flavourzyme.

^b Hydrolysert ved bruk av Alcalase.

Ut i fra verdiene i tabell 1 ser det ut som at variasjonen i spektrene fra melke- og helmelkspulveret er avhengig av hvilket enzym som er brukt i hydrolysen. For å se nærmere på dette ble det utført en prinsippal komponentanalyse der spektrene fra alle seriene ble analysert sammen. Scoreplottene fra PCA'en er vist i figur 20.



Figur 20: Scoreverdier for PC2 plottet mot scoreverdier for PC1 (A) og scoreverdier for PC3 plottet mot scoreverdier for PC2(B).

Figur 20A viser at både melke- og helmelksprøvene blir mer påvirket av hvilket enzym det har blitt hydrolysert med enn myseproteinkonsentratet. Dette fordi den første prinsipalkomponenten forklarer 91% av forskjellen i datasettet, og scoreverdiene for PC1 til myseproteinkonsentrat med både Flavourzyme og Alcalase er relativt like. Melke- og helmelksprøver hydrolysert med Flavourzyme grupperer seg sammen og melke- og helmelksprøver hydrolysert med Alcalase grupperer seg sammen. Loadingplottet (ikke vist) for PC1 viser at den største variasjonen ligger i absorpsjoner ved $\sim 1740, \sim 1650, \sim 1550, \sim 1515, \sim 1400$ og $1040-1150 \text{ cm}^{-1}$. Her er variasjonen i absorpsjonen ved $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ mest markant.

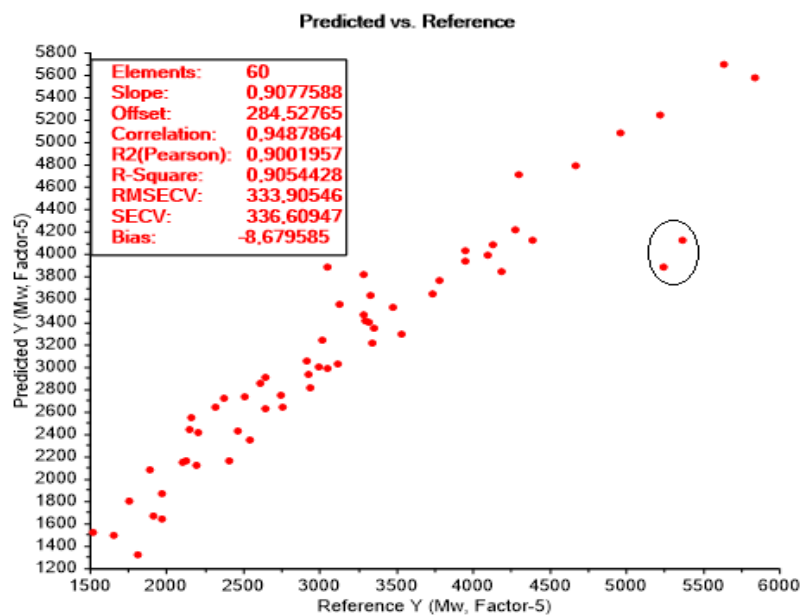
I figur 16B er PC3 scoreverdiene plottet mot PC2 scoreverdiene. Her er fortsatt melke- og helmelksprøvene hydrolysert med Alcalase gruppert sammen og variasjonen mellom disse spektrene er heller ikke her å se. Variasjonen som forklares av PC3 for disse prøvene forklares med ulik hydrolysetid, og prøver med lik hydrolysetid er plassert nesten likt i dette scoreplottet. Ut i fra dette plottet vises det at variasjonen i helmelksprøvene hydrolysert med Flavourzyme og Alcalase forklares ut i fra PC2 og PC3, men disse beskriver bare henholdsvis 4 og 2% av den totale variasjonen i datasettet. For mysekonsentratprøvene forklares variasjonen også delvis av PC2 og PC3, men i større grad enn for helmelksprøvene. Loadingplottet (ikke vist) for PC2 viser at variasjonen ligger i absorpsjoner ved $\sim 1740, \sim 1515, \sim 1400$ og $1040-1150 \text{ cm}^{-1}$, men her er variasjonen i absorpsjonen ved $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ mest markant. For PC3 ligger variasjonen i absorpsjoner ved $\sim 1740, \sim 1550, \sim 1515$ og ~ 1400 og $1040-1150 \text{ cm}^{-1}$, der variasjonen ved 1400 cm^{-1} er mest markant.

3.5 Sammenligning av metodene

Det ble utført 5 PLS-regresjoner. Først ble det undersøkt hvor god korrelasjon det var mellom data fra FTIR-spektrene og henholdsvis hydrolysegrad, gjennomsnittlig molekylvekt og absorpsjon målt ved bruk av OPA-metoden. Det ble så undersøkt hvor godt SEC-data (UV-absorpsjonene fra kromatogrammene) korrelerer med hydrolysegrad og absorpsjon målt ved bruk av OPA-metoden. Modellene er basert på måleresultater fra alle seriene med proteinhydrolysat.

Prediksjon ved bruk av data fra FTIR-spektrene

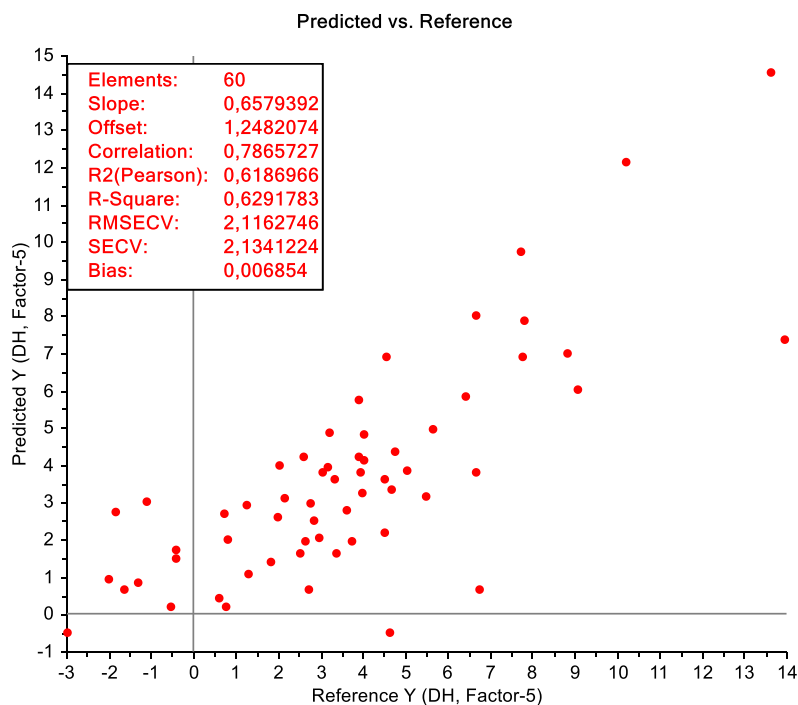
Plott for predikerte verdier som funksjon av beregnede verdier fra prediksjonsmodellen for gjennomsnittlig molekylvekt predikert ved bruk av FTIR-data er vist i figur 21. Plott for regresjonskoeffisientener er vist i figur E1 i vedlegg E.



Figur 21: Predikerte verdier som funksjon av referanseresponsverdier for PLS-modellen basert på gjennomsnittlig molekylvektsdata og FTIR-data for alle 60 prøvene fra dette prosjektet.

Modellen i figur 21 har en RMSECV-verdi på 333.91 (Da) og en R^2 -verdi på 0.91, og ble bestemt ved bruk av 5 faktorer. R^2 -verdien viser at det er god korrelasjon mellom de beregnede og de predikerte verdiene. De markerte prøvene er hydrolysat fra melke- og helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme i 2 minutter. Plottet for regresjonskoeffisienten (figur E1) viser at den variabelen som har størst korrelasjon med responsverdiene er absorpsjonen ved ~ 1650 cm^{-1} .

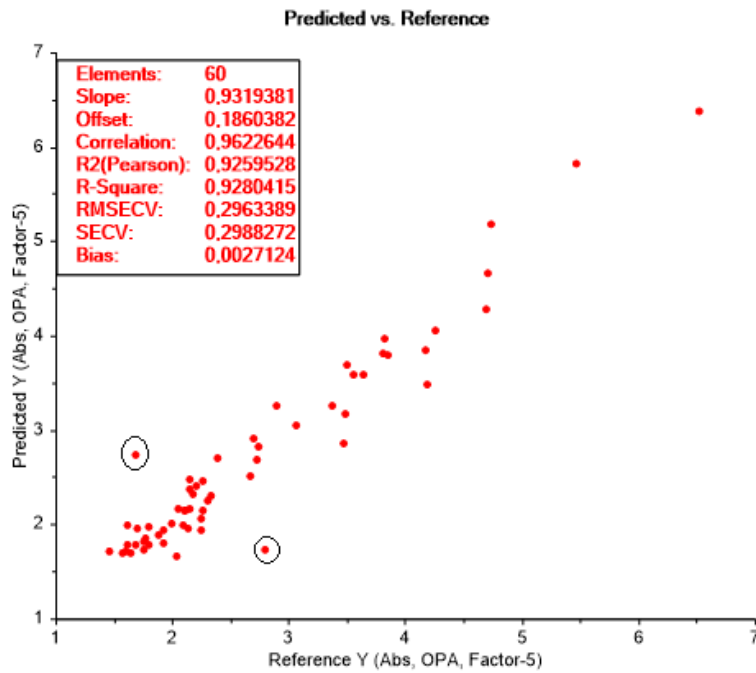
Plott for predikerte verdier og beregnede verdier fra prediksjonsmodellen for hydrolysegrad predikert ved bruk av FTIR-data er vist i figur 22.



Figur 22: Predikerte verdier som funksjon av referanserresponsverdier for PLS-modellen basert på data for beregnet hydrolysegrad og FTIR-data for alle 60 prøvene fra dette prosjektet.

Modellen i figur 22 har en RMSECV-verdi på 2,12 (%) og en R^2 -verdi på 0.63, og ble bestemt ved bruk av 5 faktorer. R^2 -verdien på 0.63 viser at det ikke er en god korrelasjon mellom de predikerte verdiene og referanseverdiene.

Plott for predikerte verdier som funksjon av målte verdier fra prediksjonsmodellen for absorpsjon ved bruk av OPA-metoden predikert ved bruk av FTIR-data er vist i figur 23. Plottet for regresjonskoeffisienter er vist i figur E2 i vedlegg E.

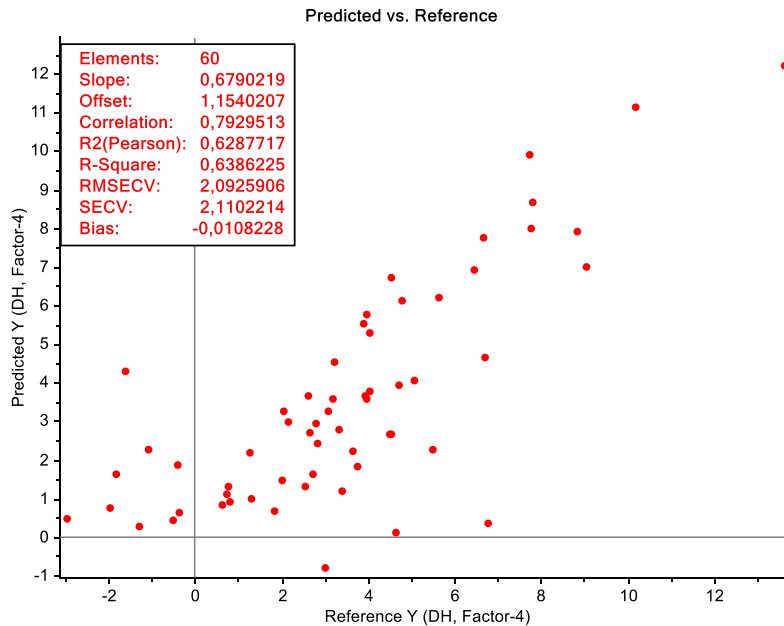


Figur 23: Predikerte verdier som funksjon av referanserresponsverdier for PLS-modellen basert på data for absorpsjon ved OPA-metode og FTIR-data for alle 60 prøvene fra dette prosjektet.

Modellen i figur 23 har en RMSECV-verdi på 0.30 (Au) og en R^2 -verdi på 0.93, og ble bestemt av 5 faktorer. R^2 -verdien forteller at det er god korrelasjon mellom referanseverdiene og de predikerte verdiene. De markerte punktene er prøvene med hydrolysat fra melkepulver hydrolysert med Flavourzyme i 2 minutter og myseproteinkonsentrat hydrolysert med Alcalase i 2 minutter. Plottet for regresjonskoeffisienten (figur E2) viser at de variabelene som har størst korrelasjon med responsverdiene er absorpsjonene ved ~ 1400 , ~ 1515 og $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$.

Prediksjon ved bruk av SEC-data

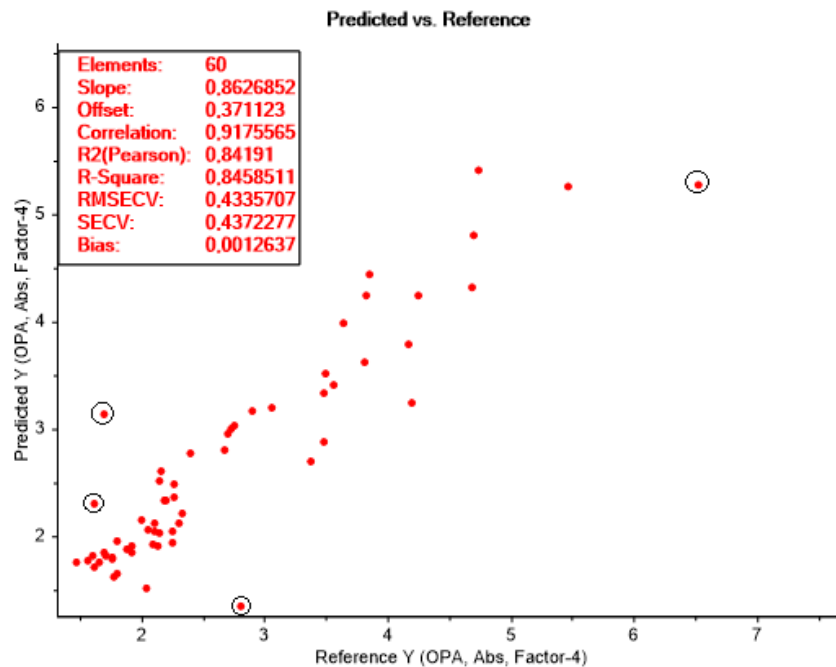
Plott for predikerte verdier som funksjon av beregnede verdier fra prediksjonsmodellen for hydrolysegrad predikert ved bruk av SEC-data er vist i figur 24.



Figur 24: Predikerte verdier som funksjon av referanserresponsverdier for PLS-modellen basert på data for hydrolysegrad og SEC-data for alle 60 prøvene fra dette prosjektet.

Modellen i figur 24 har en RMSECV-verdi på 2.05 (%) og en R^2 -verdi på 0.65, og ble bestemt av 4 faktorer. R^2 -verdien forteller at det ikke er god korrelasjon mellom referanseverdiene og de predikerte verdiene.

Plott for predikerte verdier som funksjon av målte verdier fra prediksjonsmodellen for absorpsjon ved bruk av OPA-metoden predikert ved bruk av SEC-data er vist i figur 25. Plottet for regresjonskoeffisienter er vist i figur E3 i vedlegg E.



Figur 25: Predikerte verdier som funksjon av referanserensponsverdier for PLS-modellen basert på data for målt absorpsjon ved OPA-metoden og SEC-data for alle 60 prøvene fra dette prosjektet.

Modellen i figur 25 har en RMSECV-verdi på 0.43 (Au) og en R^2 -verdi på 0.84, og ble bestemt av 4 faktorer. R^2 -verdien forteller at det ikke er god korrelasjon mellom referanseverdiene og de predikerte verdiene. De markerte punktene er prøvene der melkepulver er hydrolysert med Alcalase og Flavourzyme over 2 minutter, og myseproteinkonsentrat hydrolysert med Alcalase over 2 og 180 minutter. Plottet for regresjonskoeffisienten (figur E3) viser at de variabelen som har størst korrelasjon med responsverdiene er absorpsjonstoppene ved retensjonstidene 8.3, 8.7 og 11.5 minutter.

3.6 Bestemmelse av reproduserbarheten til OPA-metoden og SEC

Standardavviket og det prosentvise relative standardavviket ble beregnet for målinger gjort ved SEC- og OPA-analyse. Det ble beregnet med verdier fra 6 målinger utført innenfor samme dag samt målinger gjort over 6 dager. Til beregning ble formlene gitt i ligning 13 og 14 brukt. Resultatet er vist i tabell 2 og 3.

Tabell 2: Standardavvik og prosentvis relativt standardavvik for målinger gjort med OPA-metode; 6 repetisjoner innenfor én dag, og 6 repetisjoner over 6 dager.

Prøve	Hydrolysetid (min.)	Snitt DH (%) ^b	STD (%) ^c	%RSTD ^d	Snitt DH (%) ^e	STD (%) ^f	%RSTD ^g
WPC80_F_002 ^a	2	2,48	0,74	29,93	3,30	0,98	29,71
WPC80_F_005	5	2,56	0,67	26,26	4,61	0,89	19,18
WPC80_F_010	10	3,44	0,62	18,21	4,86	0,90	18,45
WPC80_F_015	15	4,40	0,67	15,38	5,62	0,78	13,89
WPC80_F_030	30	4,30	0,64	14,92	6,42	0,98	15,15
WPC80_F_045	45	5,40	1,52	28,39	7,06	1,06	14,96
WPC80_F_060	60	4,80	0,85	17,86	7,74	1,15	14,81
WPC80_F_090	90	4,53	0,83	18,55	8,14	1,52	18,60
WPC80_F_120	120	7,07	0,96	13,70	9,53	1,62	16,96
WPC80_F_180	180	8,36	1,13	13,59	12,22	1,97	16,08

^a WPC er forkortelse for whey protein concentrate-myseproteinkonsentrat. Prøvene er hydrolysert med Flavourzyme, F. Numrene beskriver antall minutter prøven er hydrolysert.

^b Gjennomsnittlig hydrolysegrad (degree of hydrolysis (DH)) beregnet fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^c Standardavvik for beregnet hydrolysegrad fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^d Det prosentvise relative standardavviket for beregnet hydrolysegrad fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^e Gjennomsnittlig hydrolysegrad beregnet fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

^f Standardavviket for beregnet hydrolysegrad fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

^g Det prosentvise relative standardavviket for beregnet hydrolysegrad fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

Tabell 3: Standardavvik og prosentvis relativt standardavvik for målinger gjort ved bruk av SEC; 6 repetisjoner innenfor én dag, og 6 repetisjoner over 6 dager.

Prøve	Hydrolysetid (min.)	Snitt molekylvekt (Da)^a	STD (Da)^b	%RSTD^c	Snitt molekylvekt (Da)^d	STD (Da)^e	%RSTD^f
WPC80_F_005	5	4298,80 ^g	45,24	1,05	2620,83	1190,43	45,42
WPC80_F_030	30	3142,83	210,64	6,70	2197,33	781,17	35,55
WPC80_F_120	120	2756,67	65,31	2,37	1975,50	583,38	29,53

^a Gjennomsnittet av den gjennomsnittlige molekylvekt beregnet fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^b Standardavvik for beregnet gjennomsnittlig molekylvekt fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^c Det prosentvise relative standardavviket fra beregnet gjennomsnittlig molekylvekt fra 6 målinger gjort innenfor én dag.

^d Gjennomsnittet av den gjennomsnittlige molekylvekt beregnet fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

^e Standardavvik for beregnet gjennomsnittlig molekylvekt fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

^f Det prosentvise relative standardavviket fra beregnet gjennomsnittlig molekylvekt fra 6 målinger målt over 6 dager-én måling per dag.

^g Verdien er beregnet ut i fra 5 av de 6 målingene som ble gjort.

4. Diskusjon

4.1 Stabilitetstest av OPA-reagenset

Resultatene fra stabilitetstesten av OPA-reagenset viser tydelig at det er ustabil. Det skjer en økning i absorpsjon etter ca. 100 minutter i tillegg til at det er ujevne målinger. Det er altså ikke en stabil økning. Dette fører til at målinger gjort ved bruk av reagenset kan være vanskelig å reproducere. Noen av ujevnhhetene i målingene for samtlige paralleller var lik, og kan skyldes instrumentet, men dette gjelder kun for noen av ujevnhhetene. Da økningen skjer for alle parallellene og ikke blankprøvene kan det sies med stor sikkerhet at økningen i absorpsjonen skyldes endringer i reagenset og ikke skyldes endringer i instrumentet.

Reagenset skal stå i minst 1 time under omrøring før bruk for å reagere skikkelig før anvendelse i analyse. Det ser ut til at tar ca. 100 minutter før komponentene i reagenset begynner å reagere, og at det er derfor økningen i absorpsjonen skjer. Molnár-Perl rapporterte i sin artikkel at reagenset ikke bør brukes før det har stått i minst 90 minutter [47]. Dette ser ut til å stemme overens med hva som har blitt observert i dette forsøket. Det kan se ut til at absorpsjonen fortsetter å øke og ikke stabiliserer seg igjen innen de nesten 3 timene absorpsjonen ble målt. Det kan tenkes at absorpsjonen igjen vil stabiliseres, men dette er ikke mulig å si noe om uten å gjøre videre forsøk. Uansett vil det ikke, ut i fra resultatene fra dette forsøket, være forsvarlig å sammenligne resultater gjort ved bruk av OPA-reagenset etter den anbefalte timen miksing da det er en økning i absorpsjon ved ca. 100 minutter. Hvor signifikant ujevnhhetene i målingen er avhenger av formålet ved bruken av reagenset.

Det er anbefalt at det lages et nytt OPA-reagens daglig [3]. Resultatene forteller at det bør gjøres analyser der tiden kontrolleres, og ikke anta at reagenset holder seg «like stabilt» en hel dag. Heller ikke dette er nok da det er endring fra parallell til parallell. Dette skyldes selvfølgelig også endringer under applisering av *o*-phthaldialdehyd, men da parallell 5 har lavest absorpsjon i starten for deretter å øke mer enn de ytterligere parallellene (foruten om parallell 4) kan heller ikke dette utelukkende forklares med ulik mengde *o*-phthaldialdehyd tilsatt. Reagensets stabilitet avhenger av konsentrasjonen av reaktanter og bufferen, lagring og pH (reagenset er ustabil ved høy pH [48]). Disse usikkerhetene kan føre til resultater som ikke er sammenlignbare [47]. Nevne parametere bør derfor kontrolleres ved bruk av reagenset.

4.2 Bestemmelse av hydrolysegrad ved bruk av OPA-metoden

Resultatene fra bestemmelse av hydrolysegrad viste at hydrolysegraden øker med tiden. Dette er som forventet da det kløyves flere peptidbinger etter hvert som hydrolyseprosessen går. Denne økningen i hydrolysegrad var på ingen måte jevn. Dette kan være fordi derivatene som dannes ikke er helt stabile [47, 49]. Spellman et al. fikk i sitt eksperiment en jevnere økning i hydrolysegrad ved bruk av OPA-metode. Der ved analyse av proteinhydrolysat fra myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Alcalase [3]. De hydrolyserte over 6 timer og gjorde ikke uttak like hyppig som i dette forsøket. Ved hyppigere uttak vil det kanskje observeres større ujevnheter i målingene. De anvendte også et større volum av prøve og reagens ved måling av absorpsjon. Det er lettere å arbeide med større volum, men det er ikke mulig å si om dette påvirket resultatet da det ikke ble gjort sammenlignende forsøk i større skala under dette prosjektet. Ut i fra resultatene i figur 15 kom det frem at det oppnås dobbelt så høy hydrolysegrad ved bruk av Flavourzyme enn ved bruk av Alcalase. Merz et al. gjorde lignende observasjoner i sitt forsøk der de hydrolyserte et nøytralt modellsubstrat (lupinprotein) ved bruk av Flavourzyme og Alcalase [12]. De kom frem til at det enzymatisk hydrolyse ved bruk av Flavourzyme ga høyere hydrolysegrad og høyere antall frie aminosyrer enn ved bruk av Alcalase. At prøver hydrolysert med Flavourzyme gir høyere hydrolysegrad kommer antagelig av komposisjonen til enzymet. Flavourzyme består av flere peptidaser enn Alcalase og vil derfor ha en mer promiskuøs kløyving av proteiner og peptider. Det at også Flavourzyme inneholder flere eksopeptidaser enn Alcalase fører til at det dannes flere frie aminosyrer og mindre peptider. Disse er lettere tilgjengelig for reaksjon med OPA-reagenset, og vil føre til høyere målt absorpsjon og derfor også høyere beregnet hydrolysegrad.

Flere av proteinhydrolysatene hydrolysert over kort tid ga negativ hydrolysegrad. Ut i fra formelen for beregning av hydrolysegrad (ligning 2) er et av leddene å subtrahere absorpsjonen til uhydrolysert prøve fra hydrolysert prøve. Dette er stammen til de negative verdiene. Dette kan forklares ut i fra usikkerheten til metoden som er vist i reproduserbarhetsforsøket. Nielsen et al. konkluderte i sitt eksperiment, der de målte standardavvik av hydrolysegrad, at OPA-metoden bør brukes med forsiktighet ved kort hydrolysetid [20].

Resultatene viste at det oppnås høyere hydrolysegrad for prøver fra myseproteinkonsentrat enn melk- og helmelkspulver. Dette kan komme av at melke- og helmelkspulverne har mer komplekse matrikser. De inneholder fett og karbohydrater som kan hindre tilgjengeligheten til proteinet. At det er andre typer proteiner i melk vil også påvirke hvor effektivt enzymet virker

på disse proteinene fremfor proteinene i myse. Chobert et al. beregnet en høyere hydrolysegrad for hydrolysat av kasein (melkeprotein) enn myseprotein i sitt eksperiment [50]. De undersøkte løselighet og emulgerende effekter etter enzymatisk hydrolyse med Flavourzyme og Alcalse. I deres eksperiment brukte de rent kasein. Dette tyder på at fett, karbohydrater og ytterligere molekyler i matriks gjør proteinet i melkepulverne mindre tilgjengelig for enzymet. Det er også kjent at OPA-metode vil underestimere hydrolysegraden ved cystein til stede. Myseprotein har et høyt innhold av cystein [51]. Dette medfører underestimerte beregnede verdier for hydrolysegrad. Melk inneholder også myseproteiner, men bare ca. 18% [52]. Altså vil det ved bruk av OPA-metoden være en større underestimering av hydrolysegrad for myseproteinkonsentratprøvene enn for melkepulverprøvene hvis man ser bort i fra matriksen.

Under forsøket ble det ikke målt pH, men det faktum at enzymene har ulik pH optimum vil ha kunnet påvirket hvor god enzymaktiviteten var [12].

4.3 Bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt ved bruk av størrelsesfordelingskromatografi

Kromatogrammene i figur 16 og C1-5 viser at det er tydelig økning i mengden av mindre molekyler som elueres etter hvert som hydrolysetiden øker. Dette gjenspeiles også i figur 17 der gjennomsnittlig molekylvekt er plottet som funksjon av hydrolysetiden. For prøver hydrolysert over 2 og 5 minutter var det forskyvninger i kromatogrammene. Prøvene er grumsete og prøvene med kortest hydrolysetid var nesten umulig å filtrere under prøveopparbeidingen til analysen (dette avtok med økende hydrolysetid). Trykket økte også ved injisering av disse prøvene. Dette kan være årsaken til forskyvningen.

I kromatogrammet i figur C2 for melkepulver hydrolysert med Flavourzyme ble det observert at kromatogrammet for prøven hydrolysert i 2 minutter hadde et skift mot venstre og lavere retensjonstid. Dette medførte at det ble beregnet en for høy verdi for den gjennomsnittlige molekylvekten for denne prøven. Dette vises i plottet i figur 17C. Det samme gjelder for melkepulverprøven hydrolysert med Alcalase (figur 17D), men her med et skift mot venstre (figur C3) og lavere retensjonstid som har ført til at denne verdien har blitt beregnet lavere. For myseproteinkonsentrat hydrolysert med Alcalase viser prøven hydrolysert i 10 minutter en høyere beregnet gjennomsnittlig molekylvekt i en ellers synkende kurve. Dette er også i tråd med hva som ble observert i kromatogrammet i figur C1 der prøven hadde en høyere absorpsjon for tidlig eluerte molekyler enn prøvene hydrolysert i 5 minutter. For myseproteinkonsentrat hydrolysert med Flavourzyme i 2 minutter er det også en lavere beregnet verdi for den gjennomsnittlige molekylvekten (figur 17A), som også gjenspeiles i forskyvningene i kromatogrammet til prøven (figur 16).

Proteinhydrolysatene fra helmelk viste en jevn endring i gjennomsnittlig molekylvekt over økende hydrolysetid (Figur 17E og F). Kromatogrammene for disse seriene (figur C4 og C5) var også de som viste den tydeligste endring av minkende mengde større molekyler og økende mengde mindre molekyler over tid.

Det ble gjort en interessant observasjon for serien med myseproteinkonsentrat hydrolysert med Alcalase (figur C1) der absorpsjonen ved ca. 11.5 minutter for prøver med økende hydrolysetid synker. Dette i et område hvor det ellers er en økning i mengde mindre molekyler og da en økning i absorpsjon med hydrolysetiden.

Resultatene i figur 17 viste at prøvene hydrolysert ved bruk av Alcalase (17B, D, F) har en lavere molekylvekt enn prøvene hydrolysert med Flavourzyme (17A, C, E). Dette kommer av

at Flavourzyme inneholder flere eksopeptidaser enn Alcalase og kløyver av mindre peptider og aminosyrer fra proteinene og peptidene enn Alcalase. De gjenværende molekylene vil derfor ha høyere gjennomsnittlig molekylvekt.

Hver av prøvene ble kun analysert én gang. For å kunne oppnå mer nøyaktige resultater bør det analyseres flere paralleller.

4.4 FTIR-spektroskopi av proteinhydrolysatene

Båndene ved ~ 1645 og $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ beskriver amid I (symmetriske strekkvibrasjoner i C=O bindingen (α -heliks)) og amid II (α -heliks) båndene. Det observeres at en generell trend er at absorpsjonen ved disse frekvensene minker over tid, men resultatene er komplekse og vanskelig å tolke. Proteinmolekylene brytes ned til mindre peptidfragmenter, som fører til at proteinet mister dets sekundærstruktur og det vil være forventet å observere at absorpsjonen for amid I og II båndene minker over tid. Det viste seg at det ikke for hver serie var noen tydelig minking i absorpsjon ved disse båndene. Amid II båndet har tidligere blitt rapportert å være mer kompleks, men under dette forsøket har resultatene vist at det er vanskeligere å tolke endringer i amid I båndene [8]. Lignende observasjoner har også blitt gjort av Wubshet et al. der de tok opp spekter for hydrolysat av mekanisk utbeinet kylling og kyllingfilet [53]. Det er ikke mulig å finne en trend for denne kompleksiteten ut i fra hverken råmateriale eller enzym. Absorpsjonen ved $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ har opphav i saksevibrasjoner i $-\text{NH}_3^+$ og absorpsjonen ved $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ oppstår som følge av symmetriske strekkvibrasjoner i COO^- . Som forventet øker absorpsjonen ved disse frekvensene etter hvert som hydrolysetiden øker. Dette fordi det formeres flere primære aminogrupeer og karboksylat etter hvert som hydrolysetiden øker. Disse observasjonene indikerer at det er mulig å måle formasjon av frie karboksylat- og aminoterminaler under enzymatisk nedbrytning av et protein.

PCA'ne viste at den største variasjonen i datasettene for samtlige hydrolyseserier var i tråd med hydrolysetiden. Denne endringen er klartest for myseproteinkonsentrat hydrolysert ved bruk av Alcalase. Proteinhydrolysatet fra helmelk hydrolysert med Alcalase i 45 minutter ser det ut til å ha skjedd noe galt med. Dette er trolig en appliseringsfeil da dette ikke gjentar seg for SEC-resultatene og disse analysene ble gjort av fra de samme prøvene. Loadingplottene viste at variasjonen i samtlige serier hadde opphav i endringer ved henholdsvis ~ 1650 , ~ 1550 , ~ 1515 og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$. Dette stemmer overens med hva som ble observert ut i fra det andrederiverte spektrene. Det er tydelig nyttig informasjon for endringen i komposisjonen av prøven ved 1650

cm^{-1} . Fra loadingplottene kom det også frem at store deler av variasjonen mellom spektrene har sitt opphav i absorpsjoner ved denne frekvensen. Med det ser man en tydelig verdi ved å ta opp spekter av tørrfilm, da disse absorpsjonene ellers ville vært maskert av signaler fra vann ved $1560\text{-}1715 \text{ cm}^{-1}$ [5]. Figur 15 viste at det er en raskere endring i begynnelsen av hydrolysen, noe som er gjennomgående for alle analysene. Dette har blitt observert av flere forskningsgrupper tidligere [3, 6, 53, 54]. Denne endringer er forventet med tanke på at det er en høyere kinetisk rate i begynnelsen av en enzymatisk reaksjon.

Ved sammenligning av de ulike råmaterialene ble det foretatt en prinsipalkomponentanalyse av alle spektrene sammen. Fra analysen ble det gjort interessante observasjoner hvor det viste seg at variasjonen mellom spektrene fra melke- og helmelksprøvene hadde størst variasjon i hvilket enzym som var brukt over matriks. Naturlig nok vil disse skille seg mindre fra hverandre enn fra myseproteinkonsentratprøvene da de inneholder samme type protein. Matriksforskjeller så ut til å være ubetydelig for prøvene hydrolysert med Alcalase da disse seriene fortsatt var gruppert sammen etter at 97% av den totale variasjonen i datasettet var gjort rede for. Loadingplottene viste at den største variasjonen lå ved ~ 1650 , ~ 1550 , ~ 1515 og ~ 1400 , ~ 1740 og $1040\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$. Endringene ved ~ 1650 , ~ 1550 , ~ 1515 og $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ som følge av nedbrytning av proteinet og endringene ved $1040\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ som følge av at melke- og helmelksprøvene inneholder laktose. Absorpsjonen ved $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ har mest sannsynlig opphav i en esterbinding. Det oppstår naturlig nok en variasjon ved denne frekvensen da melkeprøvene inneholder fett.

4.5 Sammenligning av metodene

Prediksjonsmodellen for gjennomsnittlig molekylvekt predikert ved bruk av data fra FTIR-spektrene (figur 21) viste en veldig god korrelasjon ($R^2=0.91$). De uteliggende prøvene ligger et stykke fra regresjonslinjen så korrelasjonskoeffisienten vil bli betydelig høyere hvis disse prøvene utelukkes. Wubshet et al. fant i sin sammenligning av FTIR-spektroskopi og gjennomsnittlig molekylvekt en god korrelasjon mellom måledataene fra metodene ($R^2=0.94$ ved bruk av hydrolysat fra kyllingfilet og $R^2=0.92$ ved bruk av hydrolysat fra mekanisk utbeinet kylling). Resultatene deres viser at det også er god korrelasjon mellom metodene ved bruk av mer komplekse og ikke minst industrielt relevante råmaterialer. Variabelen som hadde størst korrelasjon med responsverdiene var absorpsjonene ved $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$. Dette er frekvensen der det var vanskeligst å tolke endringen i absorpsjon med økende hydrolysetid. Den gjennomsnittlige molekylvekten domineres av større molekyler, og større molekyler har en mer dominerende sekundærstruktur. Dette gjenspeiles i at den største regresjonskoeffisienten er nettopp ved amid I båndet ved 1650 cm^{-1} . Prediksjonsmodellen for absorpsjon ved bruk av OPA-metoden (figur 23) predikert ved bruk av data fra FTIR-spektre viste også en god korrelasjon ($R^2=0.93$). Her var det uteliggere på begge siden av regresjonslinjen, så korrelasjonskoeffisienten vil bli høyere dersom disse prøvene utelukkes. Variablene som hadde størst korrelasjon med responsverdiene var absorpsjonsverdien ved ~ 1400 , ~ 1515 og $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$. Dette stemmer overens med hva som har blitt observert i FTIR-spektrene for samtlige serier, der endringer ved disse absorpsjonene beskriver den største variasjonen mellom prøvene. Disse vil også da naturlig nok være ved de absorpsjonene som korrelerer mest med endringer i absorpsjon målt ved OPA-metoden da OPA-metoden er en direkte funksjon av frie N-terminaler (og derfor også C-terminale) som er dannet.

Prediksjonsmodellen for absorpsjon ved bruk av OPA-metoden predikert ved bruk av SEC-data (figur 25) viste en moderat god korrelasjon mellom metodene ($R^2=0.85$). Her var det også noen uteliggende prøver. Variablene som hadde størst korrelasjon med responsverdiene var absorpsjonstoppene ved retensjonstidene 8.3, 8.7 og 11.5 minutter. Frem til ca. 10 minutter er det en negativ korrelasjon mellom metodene for å så gå over til en positiv korrelasjon. Dette er i tråd med informasjonen som tolkes ut i fra kromatogrammene. Prøvene hydrolysert i 2 min vil ved tidlig eluering ha en høyere absorpsjon enn prøven hydrolysert i 180. Ved senere eluerte fraksjoner er det motsatt.

Prediksjonsmodellene der hydrolysegrad predikeres av data fra FTIR-spektre (figur 22) og SEC-data (figur 24) har en dårlig korrelasjon (henholdsvis $R^2=0.63$ og $R^2=0.6$). Dette ligger i usikkerheten i de ulike parameterne som brukes til å beregne hydrolysegraden. Ved å sammenligne det målte nitrogeninnholdet i prøvene med den målte absorpsjonen viste det seg at det kun for 3 av de totalt 6 seriene var et ca. proporsjonalt forhold. Dette tyder på at store deler av bakgrunnen for at det ikke er like god korrelasjon med den beregnede hydrolysegraden ligger i feil under nitrogenmålingen. Flere er kritiske til hvorvidt konverteringsfaktoren for å konvertere nitrogeninnhold til proteininnhold er riktige å bruke [55]. Denne faktoren vil omtrent ikke gi utslag for den endelige beregnede hydrolysegraden da faktorene for myse og melk omtrent er like (0.2 forskjell). Molekylvekten til proteinene som brukes til å beregne hydrolysegraden er også veldig lite nøyaktige. Dette hadde ikke gitt utslag dersom det ble bestemt prediksjonsmodeller for én og én serie, men dette er ikke tilfelle. Den beregnede molekylære absorptiviteten er satt til $6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for alle prøvene. Denne verdien er umulig å forutsi for de ulike materiale, men er beregnet til ca. $6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for alle de vanlige aminosyrene. Også bruk av denne verdien vil gi utslag da PLS-modellen er basert på materialer med ulike proteinkomposisjoner. Disse usikkerhetene vil ikke heller ha så store utslag, så den største feilen ligger antagelig i analyse av nitrogeninnholdet. Ved å se på endringene for hver prøve ut i fra absorpsjonen til ferdig beregnet hydrolysegrad er det altså en del usikkerhet i beregningene. Det kan tenkes at det vil være bedre å arbeide ut i fra en forhåndsbestemt standardkurve for å oppnå bedre resultater i fremtiden. Dette har blitt gjort av flere ulike forskningsgrupper tidligere [19, 20].

Resultatene fra alle analysene viste problemer med prøvene hydrolysert over 2 minutter. Dette kommer tydelig frem i disse modellene. Da dette er gjennomgående for alle analysene vil det være grunnlag nok til å ikke ta disse prøvene til betraktning. Det vil da være gode muligheter for å bruke FTIR-spektre til å predikere gjennomsnittlig molekylvekt og absorpsjon ved OPA-metoden samt SEC-data til å predikere absorpsjon ved OPA-metoden. Forsøkene er gjort på veldig lite kompliserte matrikser. Böker et al. viste i sitt eksperiment at absorpsjonene, for bindingene som best beskriver endringen i proteinet, lokaliserer seg ved ulike frekvens for ulike råmaterialer [6]. Ved eventuell anvendelse av en slik prediksjonsmodell må det tas hensyn til et hvert råmateriale og gjøres justeringer for å oppnå best mulig resultat. Dette arbeides det med ved Nofima i dag. Det bør også brukes større kalibreringssett og uavhengige testsett for å kunne utvikle robuste prediksjonsmodeller som kan anvendes i praksis.

4.6 Bestemmelse av reproduserbarheten til OPA-metoden og SEC

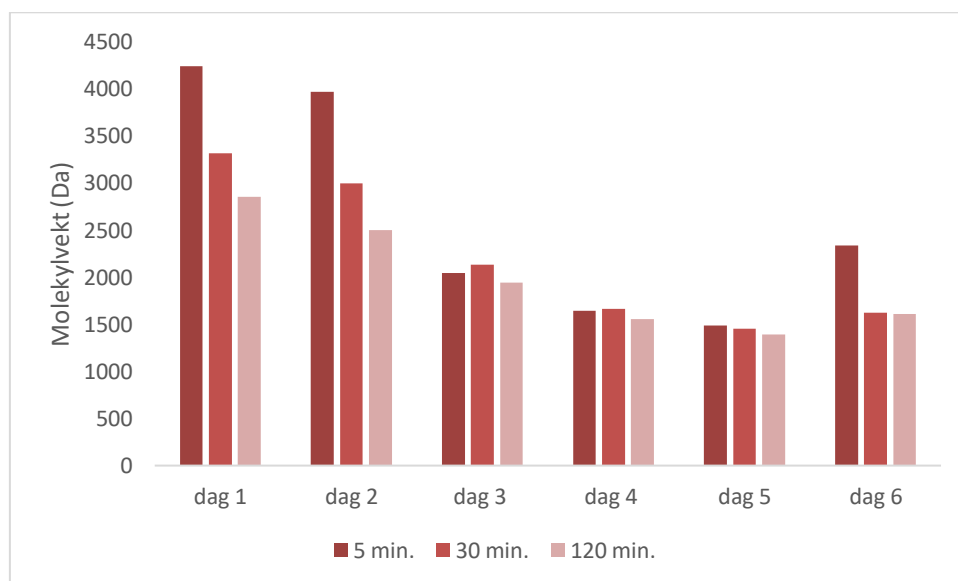
Resultatene fra reproduserbarhetsforsøket gjort for OPA-metoden viser en stor forskjell i resultatene beregnet for hydrolysegraden fra de 6 forsøkene gjort den første dagen, og gjennomsnittet fra forsøk gjort over 6 dager. For målingene gjort over én dag ble det beregnet standardavvik fra 0.62 til 1.13 prosent hydrolysert, som er et stort avvik når det er snakk om verdier fra 2.5 - 8.4 prosent hydrolyserte peptidbindinger. For målinger over 6 dager ble det beregnet standardavvik fra 0.8 – 2.0 prosent hydrolyserte peptidbindinger for verdier fra 3.3-12.2 prosent hydrolyserte peptidbindinger (se tabell 2).

Det er økning fra 1 til 4 prosent for gjennomsnittlig beregnet hydrolysegrad fra serien målt første dag og for seriene målt over 6 dager. Dette kan delvis forklares ut i fra at forsøkene fra den første dagen er gjort med samme OPA-reagens, mens det ble laget nytt reagens ti hver av analysene de andre dagene. Allikevel er det ikke en jevn økning, så dette alene er ikke grunnen til at økningen er så ujevn innad i serien. Analysene ble utfør med de samme prøvene, så konsentrasjonen av selve prøvene er konstante. Derimot kan det ha bli gjort feil ved fortykning av prøvene, men dette vil trolig heller ikke føre til så store forskjeller i måleresultatene. Ut i fra stabilitetstesten kom det frem at det var en ujevn økning innenfor de 4 timene stabiliteten ble målt. Dette kan føre til at det innad i en serie har blitt målt ujevne måleresultater. Det at det også over disse 4 timene under stabilitetstingen var en økning av absorpsjon kan også være grunnen til at prøvene for den første dagen viser høyere verdier. Dette fordi det vil ta lenger tid å analysere en serie 6 ganger. Dersom resultatene fra stabilitetstesten er rett vil det da si at absorpsjonen øker med etter ca.100 minutter og dermed også den beregnede hydrolysegraden. I tillegg ligger det stor usikkerhet i selve konsentrasjonen til reagenset som vil ha en innvirkning på absorpsjonen. Det å skulle lage et reagens med helt identisk konsentrasjon vil være vanskelig, spesielt når det er 4 komponenter i reagenset. OPA og NAC er statiske og veldig vanskelig å jobbe med.

Når det kommer til selve appliseringen av prøve til OPA-reagenset er dette veldig kronglete. Det er omtrent umulig å skulle tilsette alle prøvene ved helt lik tid (slik at alle får reagert i 10 minutter før måling) uten et automatisert system. Forskjellig reaksjonstid vil også føre til økt eller minkende absorpsjon som ikke har opphav i konsentrasjonsforskjeller i prøvene. Det kan også ha påvirket resultatene at det jobbes med små volum, men igjen er det ikke mulig å si om dette har hatt noen innvirkning uten å gjøre et forsøk der mikroskalametoden sammenlignes med analyser i større skala.

Summert opp ligger det mye usikkerhet i menneskelige feil ved bruk av denne metoden samt økning i absorpsjonen til reagenset under analysene.

Resultatene fra reproduserbarhetsforsøket gjort for SEC den første dagen viste standardavvik fra 45.2-210.6 Da. Dette er ikke et veldig stort avvik med tanke på at det er beregnet for høye verdier fra 4298.8-2756.7 Da (se tabell 3). For reproduserbarhetsforsøket gjort over 6 dager ble det beregnet standardavvik fra 1190.4-583.4 Da. Ved å se på dataene fra forsøket viser det seg at verdiene synker for hver dag som går. Ut i fra kromatogrammene viste det seg at for hver dag som gikk ble det målt en lavere absorpsjon for de største molekylene. Dette er illustrert i et diagram i figur 26. Ut i fra observasjonene gjort fra kromatogrammene kan det se ut som at de større molekylene har sunket mot bunnen av prøveglasset. Dette medførte at prøven som ble analysert hadde en lavere gjennomsnittlig molekylvekt. Grunnen til at det påstås at det skyldes at større molekyler har sunket, til bunnen og at det ikke har skjedd som følge av problemer med kolonnen, er fordi det på dag 6 igjen er en økning. Før målingen på dag 6 ble prøvene flyttet og det ble da bevegelse i prøveglasset. For å undersøke dette nærmere ble det derfor laget en prøve med lik konsentrasjon av proteinhydrolysat. Denne ble så observert over 6 dager. Etter 4 dager var det mulig å se at det hadde dannet seg et bunnfall. De beregnede standardavvikene gjort over 6 dager vil derfor ikke være representative for metoden.



Figur 26: Diagram for den gjennomsnittlige molekylvekten beregnet for de tre prøvene som ble analysert over 6 dager. Hver søyle representerer én enkelt prøve hydrolysert i henholdsvis 5, 30 og 120 minutter.

4. Konklusjon

Målet var å sammenligne SEC, FTIR-spektroskopi og OPA-metoden for måling av proteinhydrolysat samt etablere en mikroskala metode for OPA-metoden og måle OPA-reagensets stabilitet. Undersøkelsen av reagenset viste at reagenset ikke holder seg stabilt innenfor anbefalt brukstid. Resultatene fra bestemt hydrolysegrad viste ujevne resultater etter hvert som hydrolysetiden økte. Sammen med resultatene fra stabilitetstesten av reagenset og resultatene fra reproduserbarhetsforsøket ser ikke OPA-metoden ut til å være en god metode for bestemmelse av hydrolysegraden med noe som helst sikkerhet. SEC til bestemmelse av gjennomsnittlig molekylvekt viste seg å være en god metode for anskaffelse av ytterligere informasjon om proteinhydrolysatet. Plottene for gjennomsnittlig molekylvekt som funksjon av hydrolysetid viste jevn nedgang i molekylvekt ved økende hydrolysetid dersom man ser bort i fra prøvene som skapte problemer med trykket under analysen. Det relative standardavviket innad i målingene gjort over én dag var lave (%RTSD 1.05-6.70). Da forsøket over 6 dager ikke var representativt på grunn av «feil» med prøven er det ikke mulig å konkludere med hvorvidt metoden er reproduserbar. FTIR-spektrene for seriene viste tydelig en økning i absorpsjon ved ~ 1400 og ~ 1550 cm^{-1} . Dette viser at metoden kan anvendes til å måle formasjon av frie karboksylat- og aminoterminaler underveis i en hydrolyseprosess.

Regresjonsmodellene viste at korrelasjonen mellom FTIR-spektrene og gjennomsnittlig molekylvekt, og FTIR-spektrene og absorpsjon ved bruk av OPA-metoden var nokså god ($R^2=0.91$ og $R^2=0.93$). Dersom prøver hydrolysert i 2 minutter utelukkes ser FTIR-spektroskopi ut til å være en lovende metode for å kunne forutsi gjennomsnittlig molekylvekt og absorpsjon målt ved OPA-metode. Det viste seg også å være en moderat god korrelasjon mellom SEC og absorpsjon målt ved OPA-metoden ($R^2=0.85$). Det er derfor potensiale for at SEC-data kan forutsi målt absorpsjon ved OPA-metode, men foreløpig bare med en slags ca. verdi.

For å kunne anvende disse prediksjonsmodellene i fremtiden må det gjøres ytterligere forsøk med flere ulike typer materialer. Dette for å få mer informasjon om hvordan ulike proteiner og proteinsammensetninger vil gi utslag under de ulike analysene. Det må også gjøres justeringer da det ble vist at absorpsjonen for amid I båndet forskjøvs seg mellom de ulike hydrolyseseriene. Det må også brukes større kalibreringssett og utarbeides uavhengige testsett for å kunne oppnå en prediksjonsmodell som er robust nok til å kunne anvendes i praksis i industrien.

5. Referanser

1. Li, Z., et al., *Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa**. Food Research International, 2013. **51**(1): p. 283-293.
2. Afseth, N.K.W., Ragnhild Dragøy, Moren, Mari. *Proteiner med potensial*. 2016 [cited 2018 5. april]; Available from: <https://nofima.no/nyhet/2016/11/proteiner-med-potensial/>.
3. Spellman, D., et al., *Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis*. International Dairy Journal, 2003. **13**(6): p. 447-453.
4. Fleming, I. and D. Williams, *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Vol. 6th. 2008, United Kingdom: McGraw-Hill Education.
5. Poulsen, N.A., et al., *Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy*. International Dairy Journal, 2016. **61**: p. 44-50.
6. Böcker, U., et al., *Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of protein chain reductions in enzymatic reactions*. Analyst, 2017(15).
7. Corporation, W.B. 2018 [cited 2018 13. april]; Available from: <http://www.worthington-biochem.com:8080/enzyme-manual/STAP/>.
8. Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2007. **1767**(9): p. 1073-1101.
9. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Peptidases*, in *Major Reference Works*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2014: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000670.pub3>.
10. Moran, L.A., et al., *Principles of Biochemistry*. 5 ed. 2014: Pearson.
11. Drag, M. and G. S Salvesen, *Emerging principles in protease-based drug discovery*. Vol. 9. 2010. 690-701.
12. Merz, M., et al., *Characterization of commercially available peptidases in respect of the production of protein hydrolysates with defined compositions using a three-step methodology*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016. **127**: p. 1-10.
13. Rao, M.B., et al., *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. Microbiology and molecular biology reviews, 1998. **62**(3): p. 597-635.
14. Panyam, D. and A. Kilara, *Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification*. Trends in Food Science & Technology, 1996. **7**(4): p. 120-125.
15. Aspevik, T., et al., *Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry*, in *Topics in current chemistry*, C.S.K. LIN, Editor. 2017, Springer International Publishing Switzerland.
16. González-Tello, P., et al., *Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins*. Biotechnology and Bioengineering, 1994. **44**(4): p. 523-528.
17. Bugge, S. *Undersøkelse: 1 av 4 unge gutter tar proteintilskudd*. 2016 [cited 2018 27. mars]; Available from: <https://www.vg.no/nyheter/innenriks/mat/undersokelse-1-av-4-unge-gutter-tar-proteintilskudd/a/23611982/>.
18. Rutherford, S., *Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review*. Journal of AOAC International, 2010. **93**(5).
19. Church, F.C., et al., *Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins I*. Journal of Dairy Science, 1983. **66**(6): p. 1219-1227.

20. Nielsen, P.M., D. Petersen, and C. Dambmann, *Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis*. Journal of food science, 2001. **66**(5): p. 642-646.
21. Roth, M., *Fluorescence reaction for amino acids*. Analytical Chemistry, 1971. **43**(7): p. 880-882.
22. Hernández, M.J.M., et al., *Use of the o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-Cysteine the Evaluation of Milk Proteins*. Journal of Dairy Science, 1991. **74**(6): p. 1779-1785.
23. Kachuk, C. and A.A. Doucette, *The benefits (and misfortunes) of SDS in top-down proteomics*. Journal of Proteomics, 2018. **175**: p. 75-86.
24. Stoney Simons Jr., S. and D.F. Johnson, *Reaction of o-Phtalaldehyde and Thiols with Primary Amines: Formation of 1-Alkyl(and aryl) thio-2-alkylisoindoles*. Journal of organic chemistry 1978. **43**(14).
25. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. Vol. 8th. 2010, United States of America: Freeman.
26. Miller, J.M., *Chromatography, concepts & contrasts*. Vol. 2nm ed. 2009, New Jersey og Canada: John Wiley & Sons, Inc.
27. Brodeur, J. and M. Toussaint *Chromatographie*. 2006.
28. Scientific, T.F., *User Manual Chromeleon 7 Extension Pack GPC Templates*, T. Scientific, Editor. 2011, Thermo Fisher Scientific.
29. Helmenstine, A.M. *Spectroscopy Definition and Difference From Spectrometry*. 2017 [cited 2018 11. januar]; Available from: <https://www.thoughtco.com/definition-of-spectroscopy-605676>.
30. Olawumi, T., *Ultra-low k dielectrics and plasma damage control for advanced technology nodes (10nm and below)*. 2015.
31. Heckel, B. *Classic Michelson Interferometer*. [cited 2018 27. mars]; Available from: <https://www.learner.org/courses/physics/visual/visual.html?shortname=michelson>.
32. Nave, R. *Interference and Phase*. [cited 2018 27. januar]; Available from: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Sound/interf.html#c1>.
33. Li-Chan, E.C.Y., et al., *Vibrational Spectroscopy of Food and Food Products*, in *Food Science*. 2002, John Wiley & Sons Ltd.
34. Arrondo, J.L.R., et al., *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993. **59**(1): p. 23-56.
35. Siebert, F., [20] *Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems*, in *Methods in Enzymology*. 1995, Academic Press. p. 501-526.
36. Jackson, M.M., H.H, *The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1995. **30**.
37. Mata-Miranda, M.M., et al. *Morphological, molecular and FTIR spectroscopic analysis during the differentiation of kidney cells from pluripotent stem cells*. 2017. **50**.
38. Miller, J.M. and J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Vol. 6th ed. 2010, England: Pearson Education Limited.
39. Rajalahti, T. and O.M. Kvalheim, *Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **417**(1): p. 280-290.
40. Afseth, N.K. and A. Kohler, *Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012. **117**: p. 92-99.
41. Kohler, A., et al., *Quality analysis of milk by vibrational spectroscopy*, in *Applications of vibrational spectroscopy in food science*, E. Li-Chan, P.R. Griffiths, and J.M. Chalmers, Editors. 2010, John Wiley & Sons, Ltd.
42. CAMO Software AS, *The Unscrambler X*. 2016.

43. A.M.C, D. and T. Fearn. *Back to basics: the principles of principal component analysis*. Tony Davies Column [cited 2017 23.10].
44. Mayers, J.J., K.J. Flynn, and R.J. Shields, *Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy*. Bioresource Technology, 2013. **148**: p. 215-220.
45. Bremner, J.M. and C.S. Mulvaney, *Methods of Soil Analysis Part 2 Agronomy*. 2nd ed. Methods of Soil Analysis. 1982, Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Inc. 1159.
46. The International Dairy Federation *Comprehensive review of scientific literature pertaining to nitrogen protein conversion factors*. Bulletin of the International Dairy Federation, 2006.
47. Molnár-Perl, I., *Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives*. Journal of Chromatography A, 2001. **913**(1): p. 283-302.
48. Chemical Book. *o-Phthalaldehyde Properties*. [cited 2018 12. mai]; Available from: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6731197.htm.
49. Interchim. *OPA, amine detection reagent*. [cited 2018 11. mai]; Available from: <http://www.interchim.fr/ft/0/02727B.pdf>.
50. Chobert, J.M., C. Bertrand-Harb, and M.G. Nicolas, *Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988. **36**(5): p. 883-892.
51. Swaisgood, H.E., *Chemistry of milk protein*, in *Developments in dairy chemistry-I*, P.F. Fox, Editor. 1982, Applied Science Publishers: London.
52. *Milk Protein*. [cited 2018 18. april]; Available from: <http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Protein.htm>.
53. Wubshet, S.G., et al., *FTIR as a rapid tool for monitoring molecular weight distribution during enzymatic protein hydrolysis of food processing by-products*. Analytical Methods, 2017(29): p. 4247-4254.
54. Qian, J., H. Zhang, and Q. Liao, *The properties and kinetics of enzymatic reaction in the process of the enzymatic extraction of fish oil*. Journal of food science and technology, 2011. **48**(3): p. 280-284.
55. Boisen, S., S. Bech-Andersen, and B.r.O. Eggum, *A Critical View on the Conversion Factor 6.25 from Total Nitrogen to Protein*. Acta Agriculturae Scandinavica, 1987. **37**(3): p. 299-304.
56. University of Wisconsin. *Biochemical Characteristics of Milk Proteins*. [cited 2018 18. april]; Available from: http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milksynth_proteinbiochem.html.
57. Sigma. *Casein from bovine milk*. ProductInformation [cited 2018 18. april]; Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7078pis.pdf.

Vedlegg A

Tabell A1: Oversikt over standarder brukt til kalibreringskurve, deres molekylvekt og retensjonstid.

Kode	Molekylvekt (Da)	Retensjonstid (min.) ^a
AlbChi	44287	6,082
CarbAn	29000	6,101
Lysosym	14300	6,626
Aproptinin	6511	7,154
InsChB	3496	8,763
Renin	1759	8,457
Angill	1046	9,001
Brad17	757	9,493
LeuEnk	570	11,524
Val-Tyr-Val	379	11,129
Trp	204	11,957

^a Verdiene er et gjennomsnitt av verdier fra 3 analyser.

Tabell A2: Parametere brukt til beregning av hydrolysegrad.

Råmateriale	Molekylvekt, M (Da)	Ant. peptidbånd per proteinmolekyl, N
Myseproteinkonsentrat	23644 ^a	204 ^a
Melkepulver	22730 ^b	200 ^c
Helmelkspulver	22730 ^b	200 ^c

^a Verdiene oppgitt er hentet fra Spellmann et al.[3].

^b Verdiene er estimert ut i fra informasjon om molekylvekten til de ulike proteinene og proteinkomposisjonen i melk [3, 52, 56, 57].

^c Verdiene er estimert ut i fra oppgitt informasjon om antall peptidbånd per proteinmolekyl i melkeprotein og proteinkomposisjonen i melk [3, 19, 52].

Vedlegg B

Tabell B1: Oversikt over proteinkonsentrasjon og hydrolysegrad for hydrolysat fra myseproteinkonsentrat.

Prøve	Proteinkonsentrasjon (g/L)	Hydrolysegrad (%)
WPC80 ^a _A ^b _002 ^c	32,70	-2,95
WPC80_A_005	32,90	0,79
WPC80_A_010	33,91	1,83
WPC80_A_015	33,98	1,26
WPC80_A_030	35,19	5,49
WPC80_A_045	35,86	3,34
WPC80_A_060	36,70	3,06
WPC80_A_090	37,14	4,03
WPC80_A_120	37,71	5,06
WPC80_A_180	38,01	3,97
WPC80_F ^d _002	32,91	2,99
WPC80_F_005	32,86	3,40
WPC80_F_010	32,32	3,98
WPC80_F_015	32,06	4,79
WPC80_F_030	31,13	6,44
WPC80_F_045	32,33	7,76
WPC80_F_060	32,32	7,80
WPC80_F_090	33,06	7,75
WPC80_F_120	33,44	10,20
WPC80_F_180	34,02	13,64

^aWPC80 er forkortelse for whey protein concentrate-myseproteinkonsentrat. 80 står for proteininnholdet.

^b A betyr at prøven er hydrolysert med Alcalase.

^c Numrene står for antall minutter prøven er hydrolysert.

^d F betyr at prøven er hydrolysert med Flavourzyme

Tabell B2: Oversikt over proteinkonsentrasjon og hydrolysegrad for hydrolysat fra melkepulver.

Prøve	Proteinkonsentrasjon (g/L)	Hydrolysegrad (%)
MPO ^a _A_002	14,17	-1,61
MPO_A_005	14,41	-1,29
MPO_A_010	14,10	-1,97
MPO_A_015	16,25	-0,38
MPO_A_030	16,05	0,82
MPO_A_045	17,83	0,72
MPO_A_060	18,43	2,012
MPO_A_090	17,46	2,85
MPO_A_120	17,90	2,16
MPO_A_180	18,50	3,20
MPO_F_002	16,72	6,77
MPO_F_005	12,32	-0,39
MPO_F_010	12,59	-1,82
MPO_F_015	11,65	-1,07
MPO_F_030	13,36	2,05
MPO_F_045	13,06	2,62
MPO_F_060	13,00	3,22
MPO_F_090	13,16	3,90
MPO_F_120	14,64	4,55
MPO_F_180	15,24	6,68

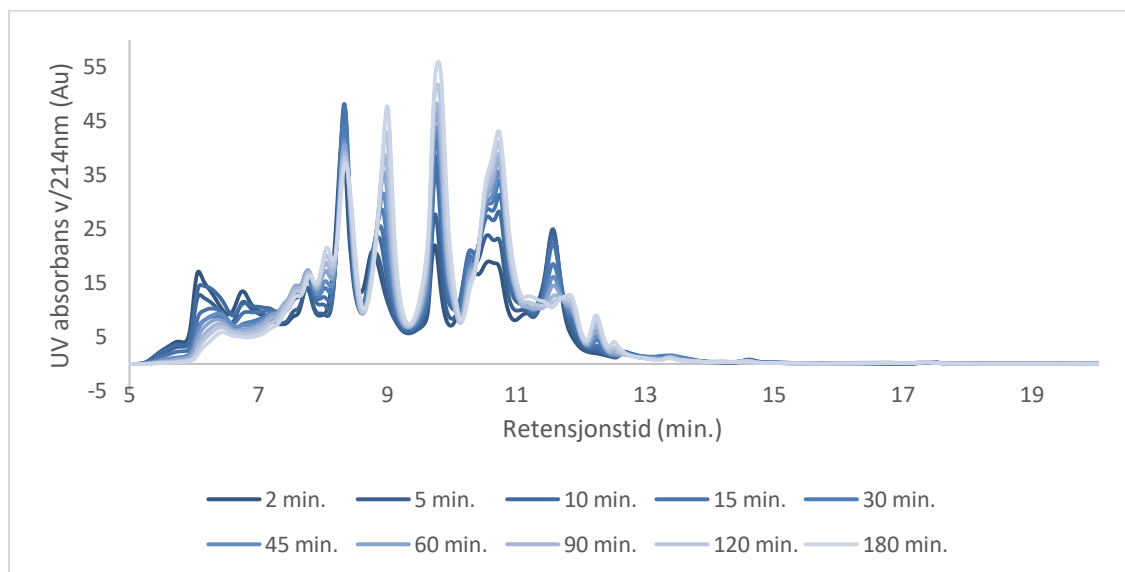
^aMPO er en forkortelse for milk powder-melkepulver.

Tabell B3: Oversikt over proteinkonsentrasjon og hydrolysegrad for hydrolysat fra helmelkspulver.

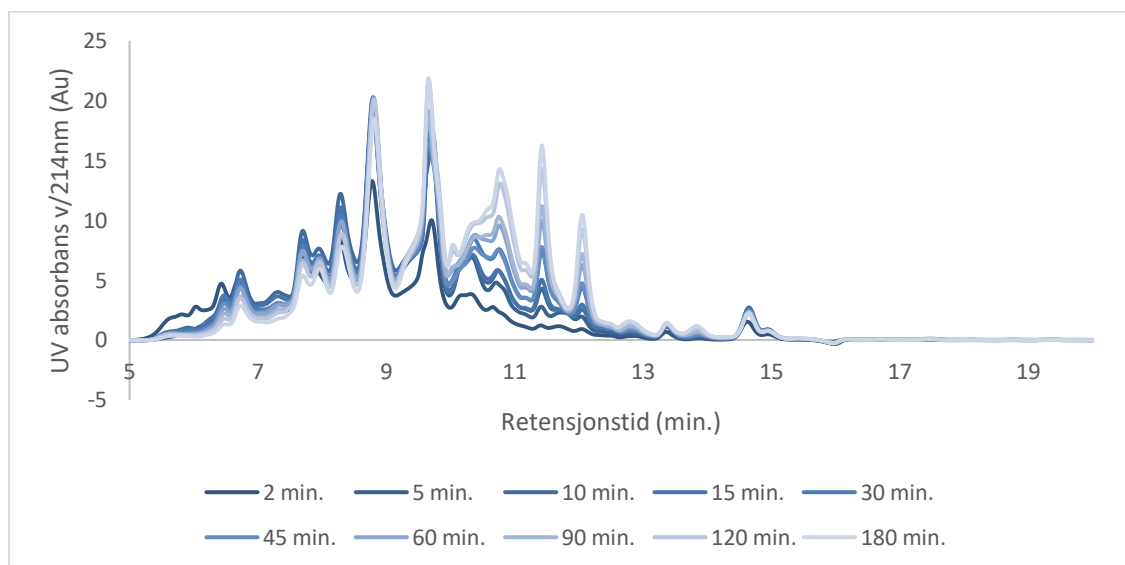
Prøve	Proteinkonsentrasjon (g/L)	Hydrolysegrad (%)
WMP ^a _A_002	11,99	-0,52
WMP_A_005	14,84	0,63
WMP_A_010	14,94	1,30
WMP_A_015	16,22	2,54
WMP_A_030	17,29	3,77
WMP_A_045	18,37	4,54
WMP_A_060	18,33	3,64
WMP_A_090	19,71	4,52
WMP_A_120	19,81	3,93
WMP_A_180	17,76	4,04
WMP_F_002	12,66	4,64
WMP_F_005	11,72	2,72
WMP_F_010	10,34	2,66
WMP_F_015	11,52	2,79
WMP_F_030	11,52	4,71
WMP_F_045	12,56	6,70
WMP_F_060	12,76	5,66
WMP_F_090	14,51	9,07
WMP_F_120	15,58	8,83
WMP_F_180	15,98	13,96

^a WMP er en forkortelse for whole milk powder-helmelkspulver.

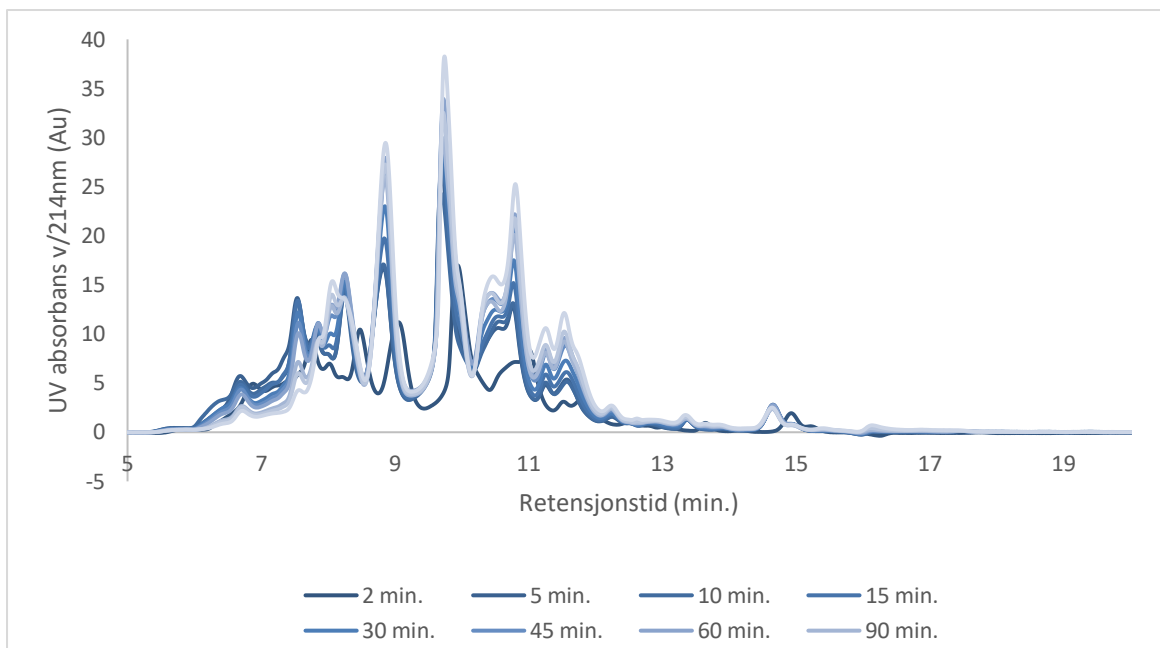
Vedlegg C



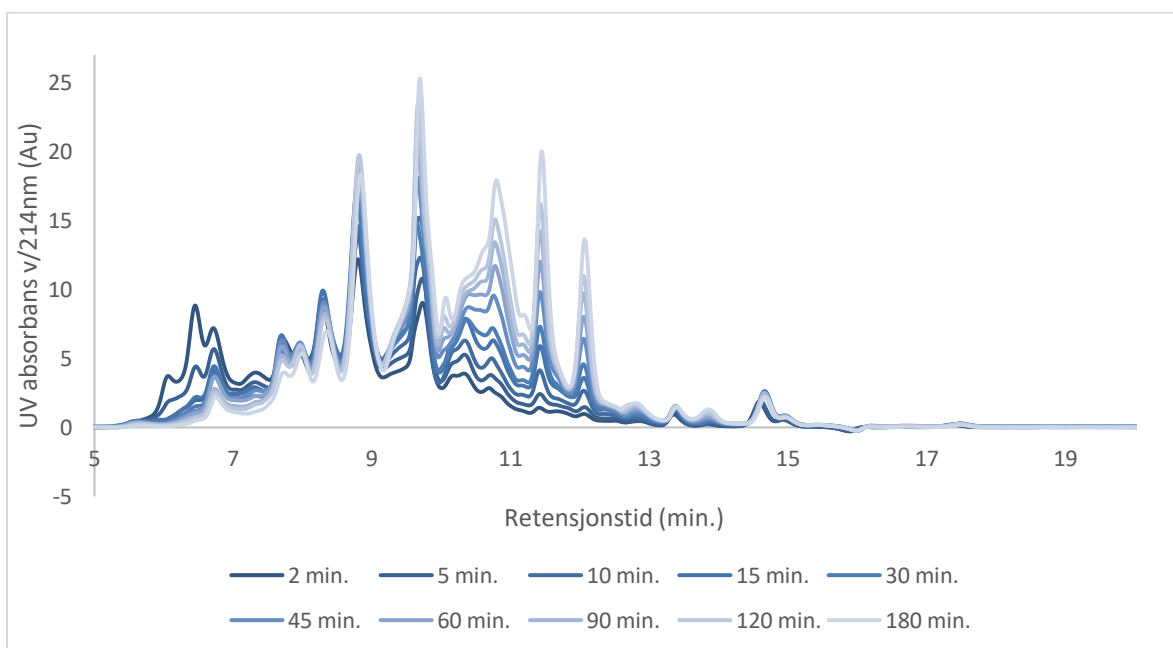
Figur C1: Kromatogram for myseproteinkonsentrat hydrolysert med Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



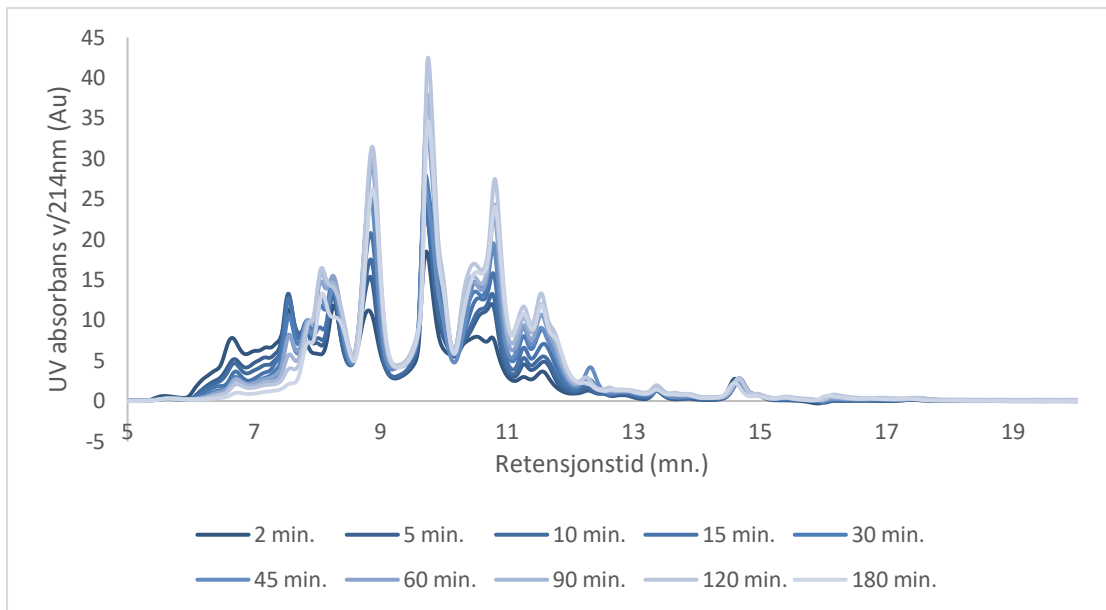
Figur C2: Kromatogram for melkepulverhydrolysert med Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



Figur C3: Kromatogram for melkepulver hydrolysert med Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



Figur C4: Kromatogram for helmelkspulver hydrolysert med Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



Figur C5: Kromatogram for helmelkspulver hydrolysert med Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

Tabell C1: Oversikt over gjennomsnittlig molekylvekt for hydrolysat fra myseproteinkonsentrat.

Prøve	Gjennomsnittlig molekylvekt, M_w, (Da)
WPC_F_002	5636
WPC_F_005	5845
WPC_5_010	5224
WPC_F_015	4667
WPC_F_030	4281
WPC_F_045	3949
WPC_F_060	4127
WPC_F_090	3950
WPC_F_120	3789
WPC_F_180	3541
WPC_A_002	4967
WPC_A_005	4298
WPC_A_010	4386
WPC_A_015	3735
WPC_A_030	3338
WPC_A_045	3350
WPC_A_060	3125
WPC_A_090	2937
WPC_A_120	2744
WPC_A_180	2511

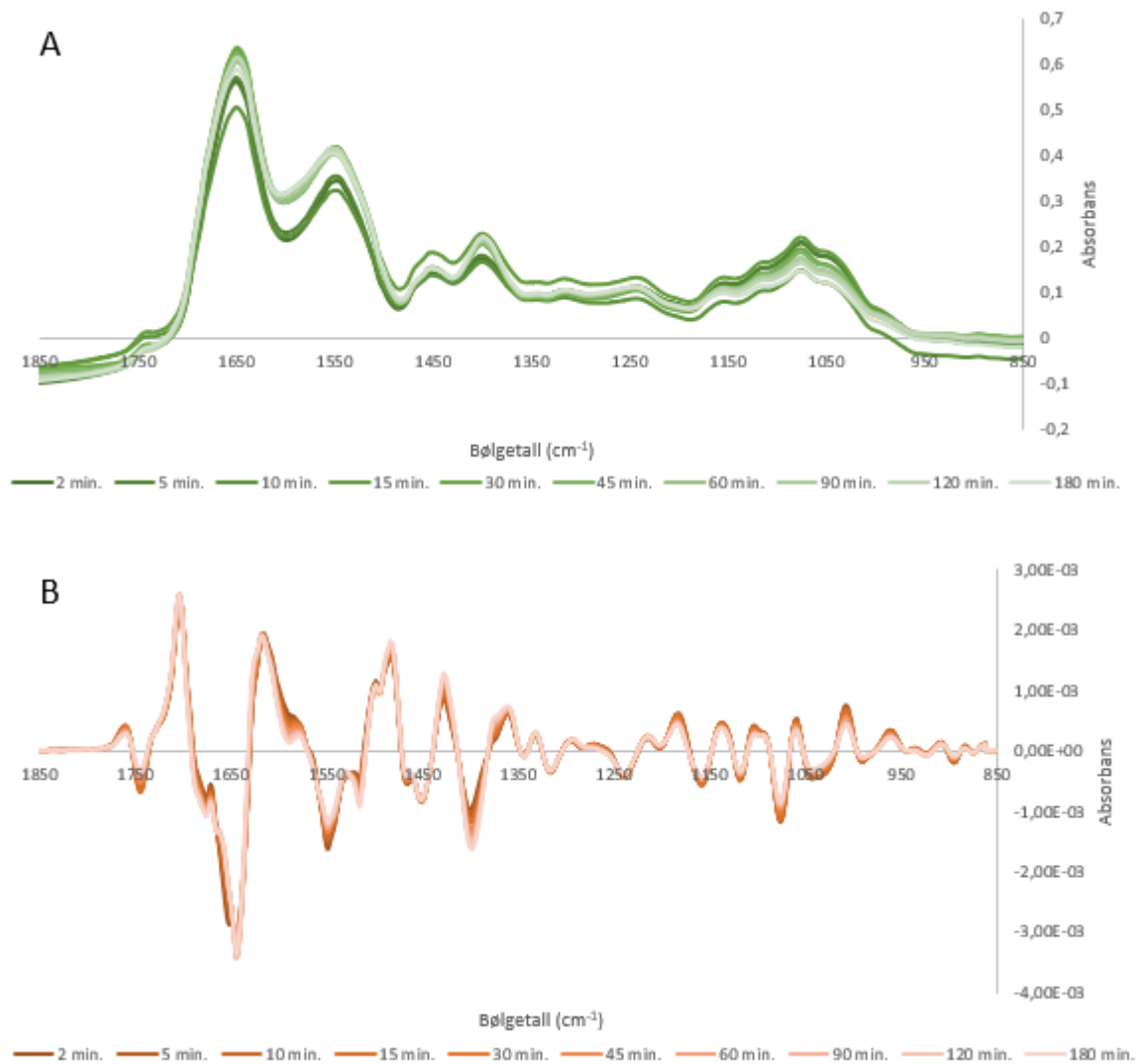
Tabell C2: Oversikt over gjennomsnittlig molekylvekt for hydrolysat fra melkepulver.

Prøve	Gjennomsnittlig molekylvekt, M_w, (Da)
MPO_F_002	5247
MPO_F_005	3291
MPO_F_010	3484
MPO_F_015	3359
MPO_F_030	3048
MPO_F_045	2929
MPO_F_060	2649
MPO_F_090	2473
MPO_F_120	2201
MPO_F_180	1973
MPO_A_002	3054
MPO_A_005	3297
MPO_A_010	3318
MPO_A_015	2999
MPO_A_030	2760
MPO_A_045	2547
MPO_A_060	2406
MPO_A_090	2210
MPO_A_120	2104
MPO_A_180	1912

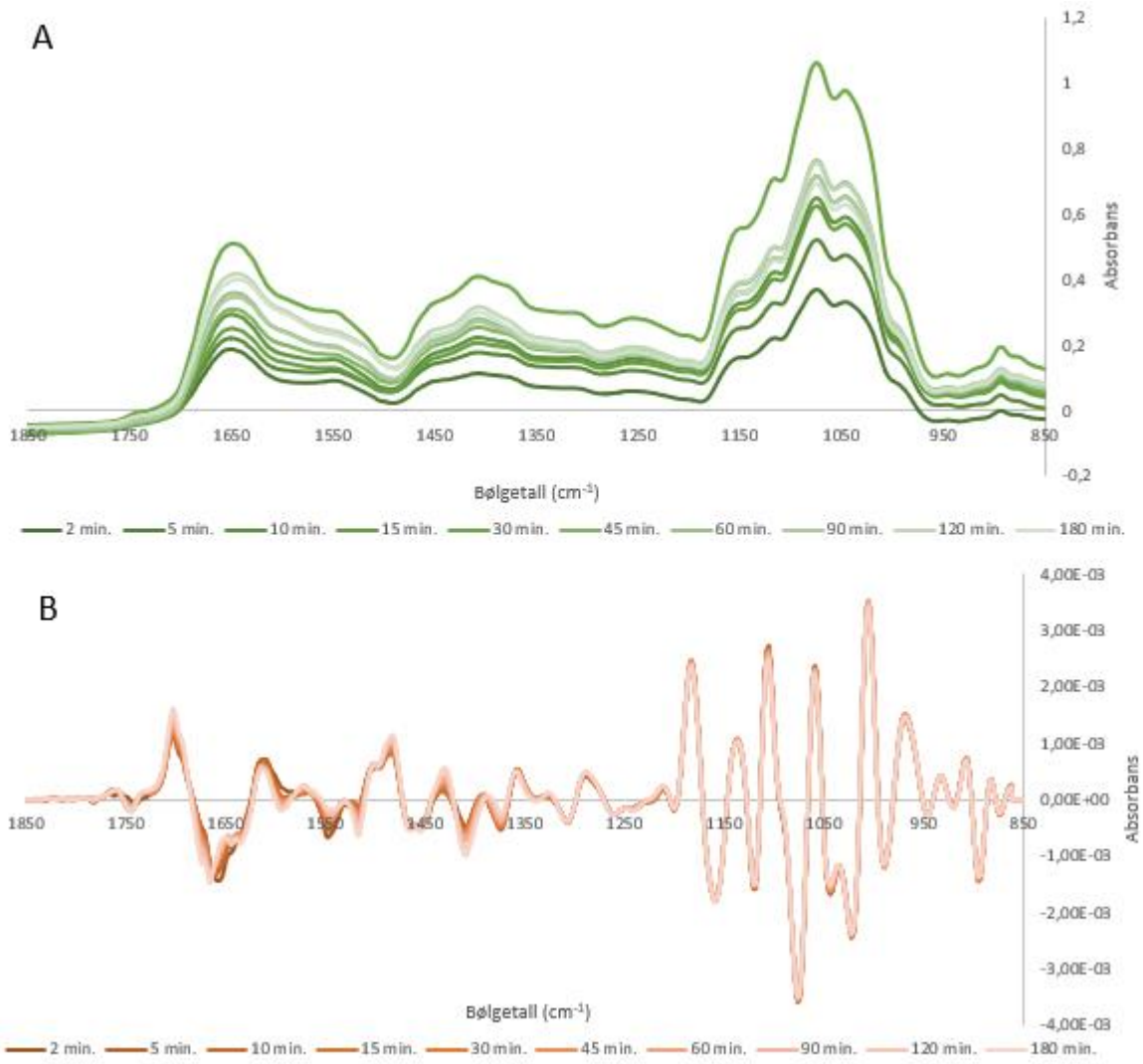
Tabell C3: Oversikt over gjennomsnittlig molekylvekt for hydrolysat fra helmelkspulver.

Prøve	Gjennomsnittlig molekylvekt, M_w, (Da)
WMP_F_002	5375
WMP_F_005	4100
WMP_F_010	3135
WMP_F_015	2923
WMP_F_030	2618
WMP_F_045	2380
WMP_F_060	2153
WMP_F_090	1896
WMP_F_120	1762
WMP_F_180	1517
WMP_A_002	4191
WMP_A_005	3284
WMP_A_010	3015
WMP_A_015	2650
WMP_A_030	2319
WMP_A_045	2161
WMP_A_060	2127
WMP_A_090	1978
WMP_A_120	1819
WMP_A_180	1658

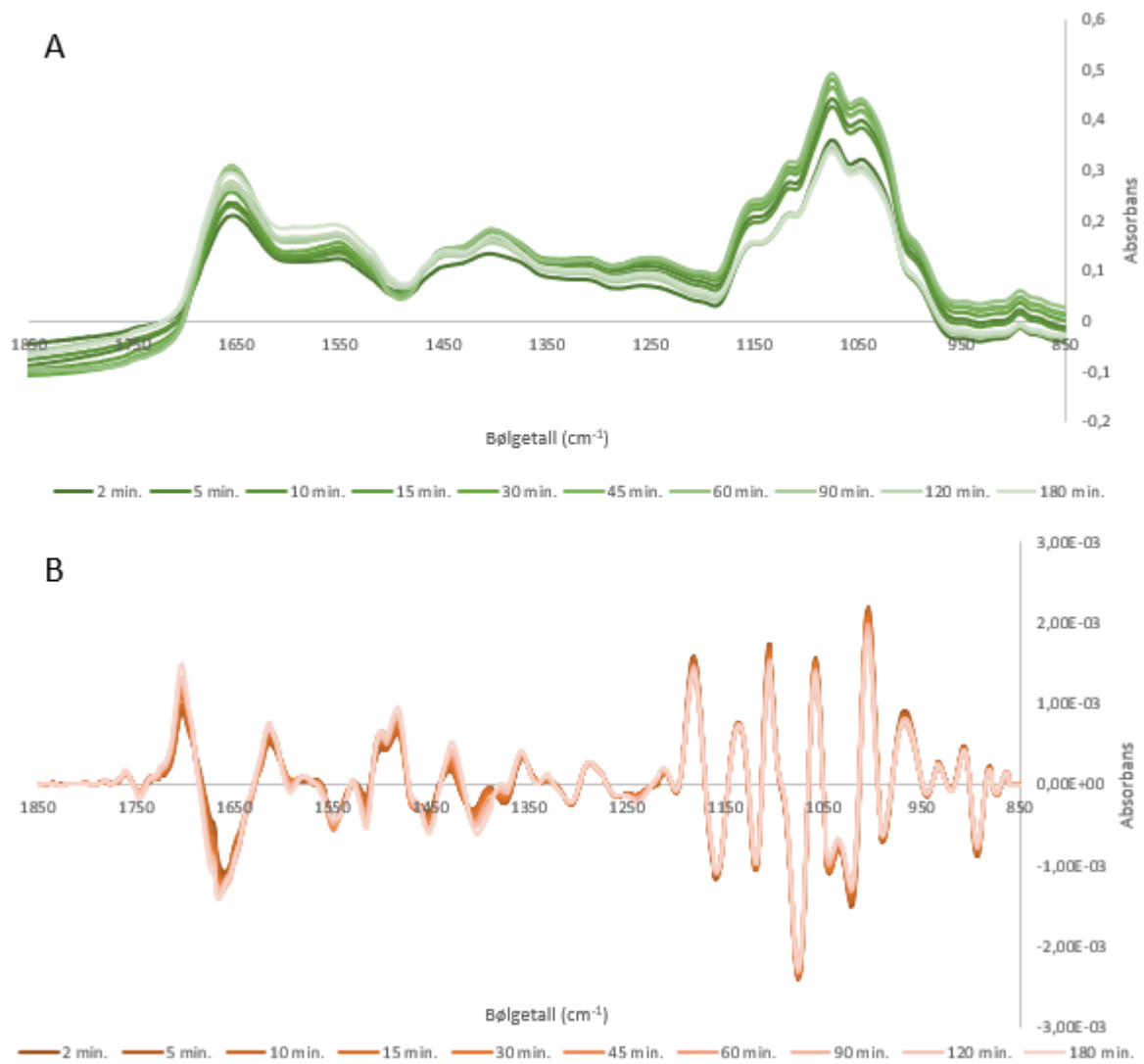
Vedlegg D



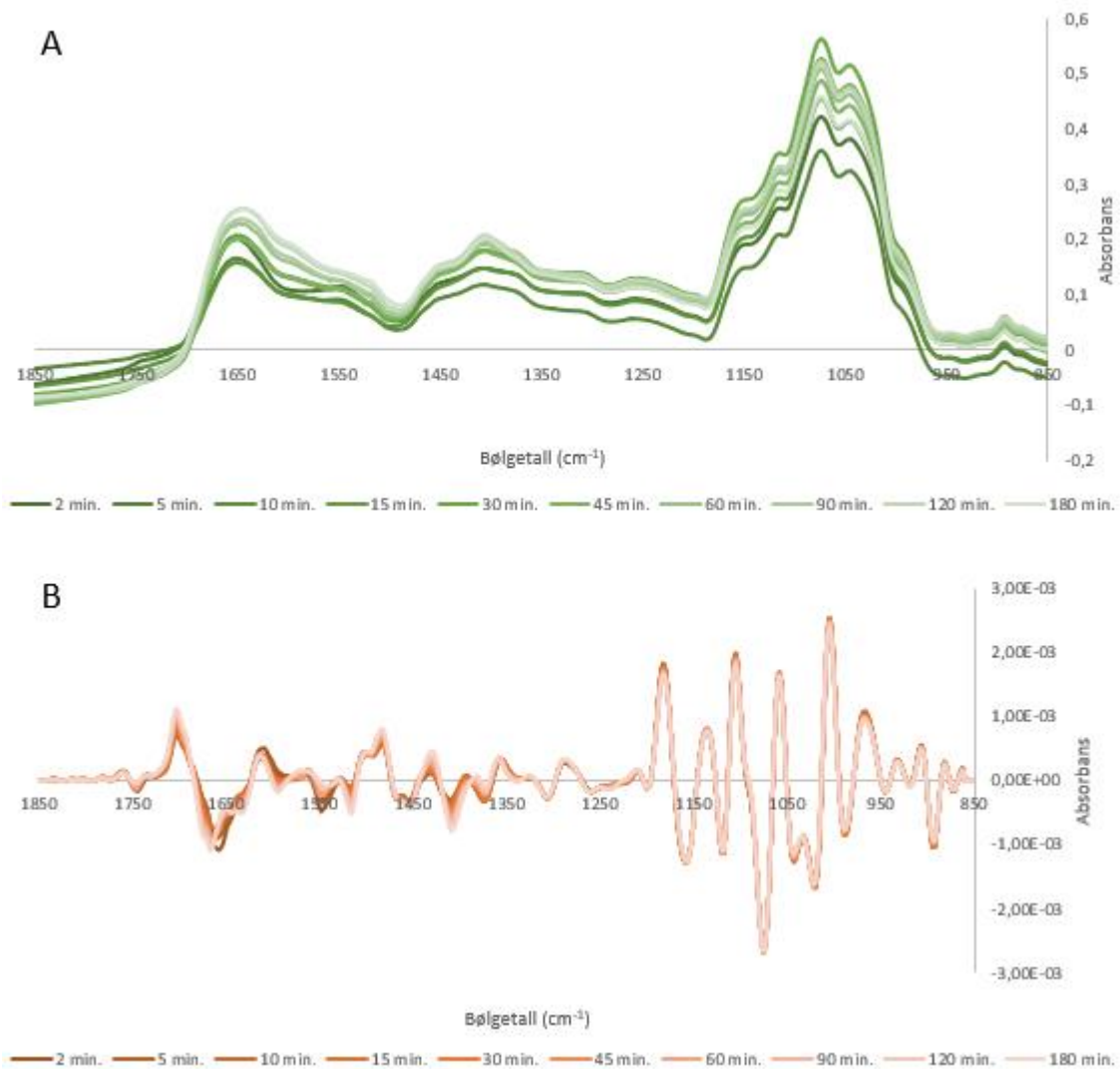
Figur D1: Råspekter (A) og bearbejdet andrederivert FTIR-spekter (B) av myseproteinkonsentrat hydrolysert med bruk av Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



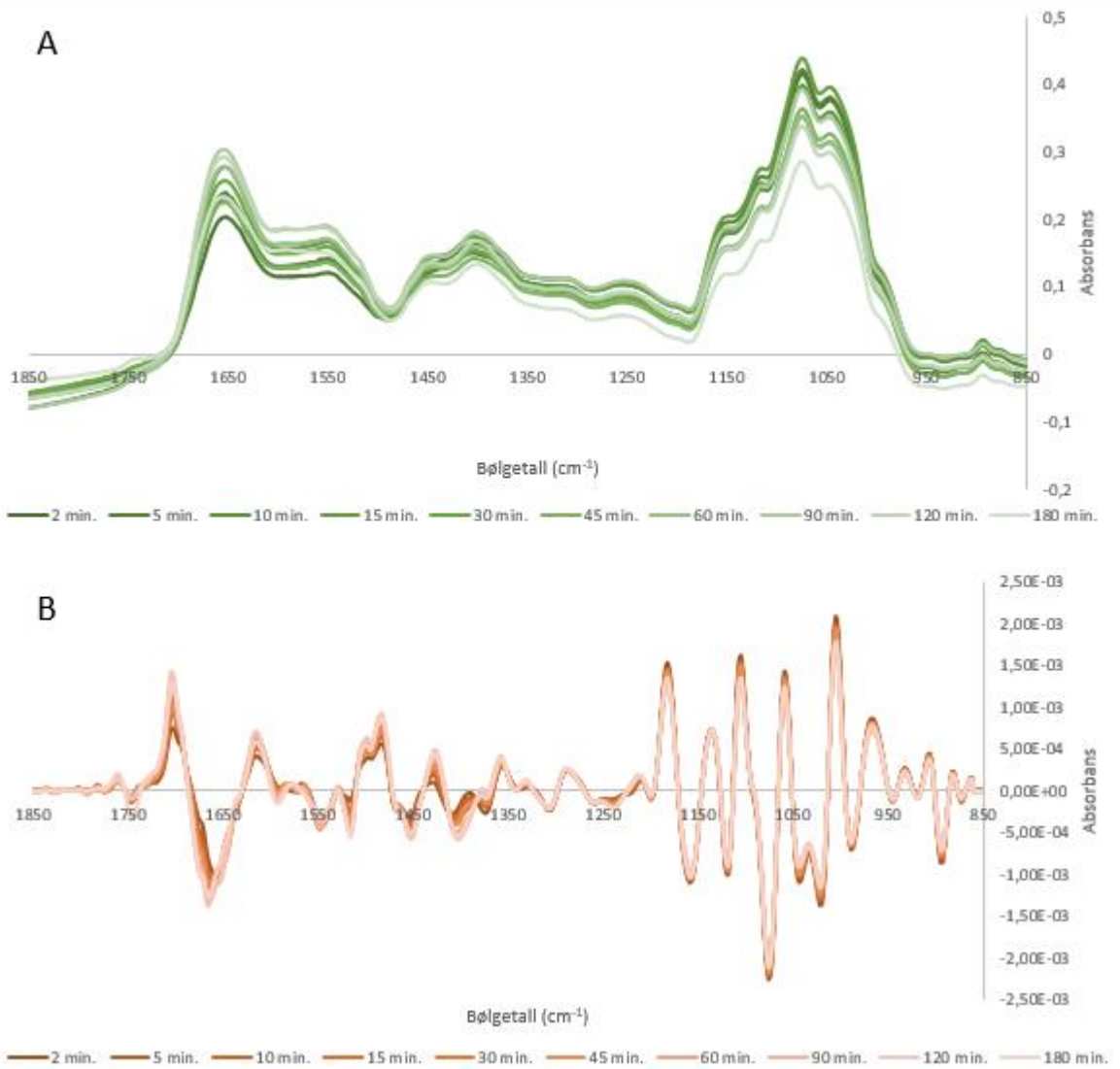
Figur D2: Råspekter (A) og bearbejdet andrederivert FTIR-spekter (B) av melkepulver hydrolysert med bruk av Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.



Figur D3: Råspekter (A) og bearbejdet andrederivert FTIR-spekter (B) av melkepulver hydrolysert med bruk av Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

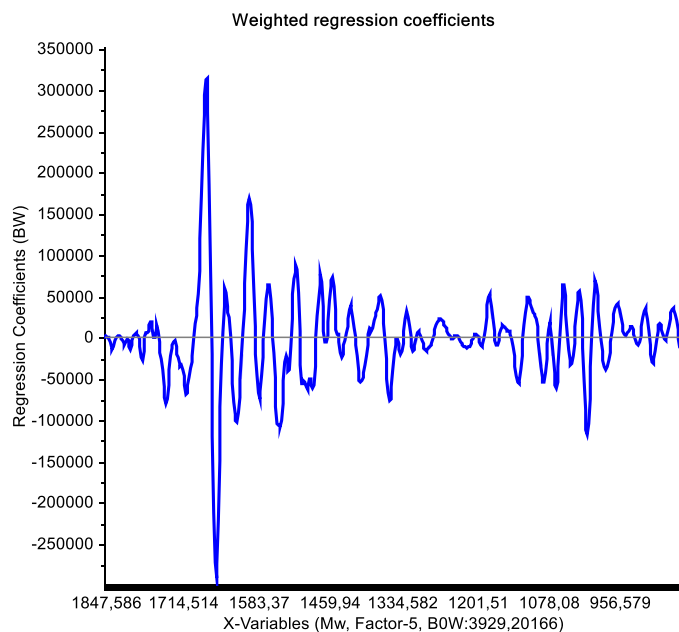


Figur D4: 27Råspekter (A) og bearbeidet andrederivert FTIR-spekter (B) av helmelkspulver hydrolysert med bruk av Flavourzyme i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

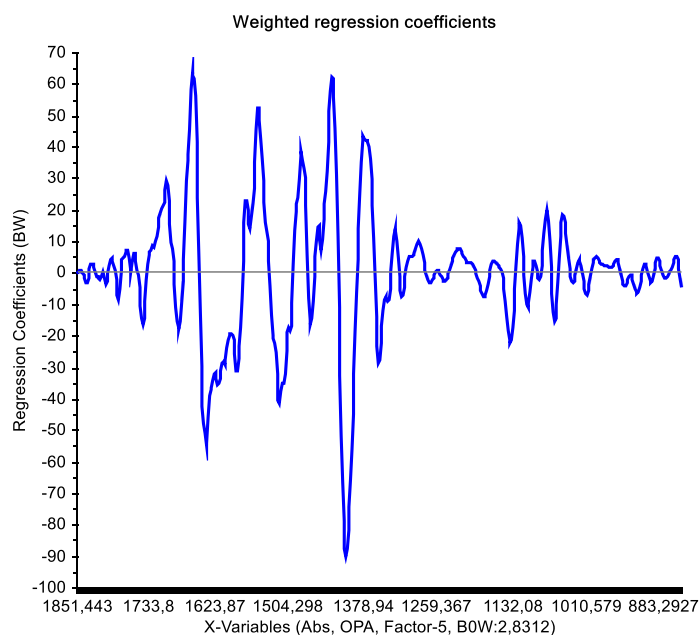


Figur D5: Råspekter (A) og bearbejdet andrederivert FTIR-spekter (B) av helmelkspulver hydrolysert med bruk av Alcalase i [2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180] minutter.

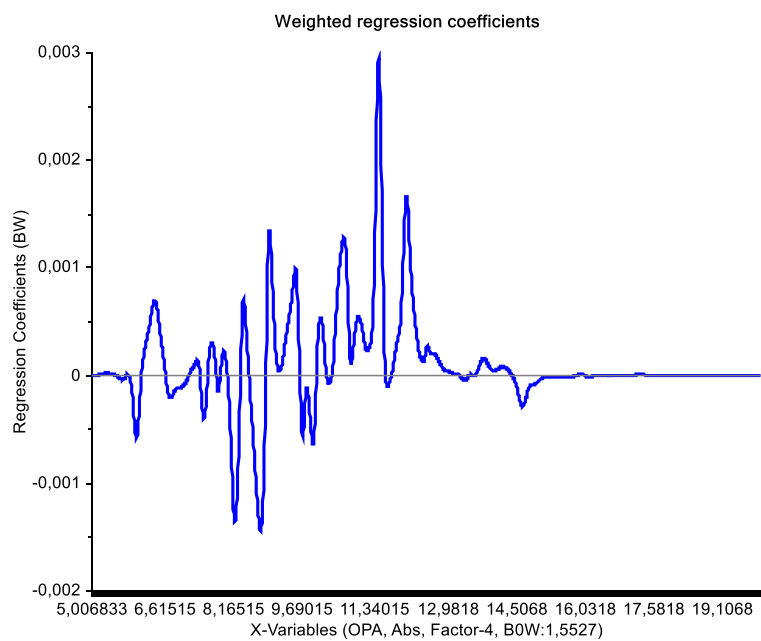
Vedlegg E



Figur E1: Vektete regresjonskoeffisienter fra PLS-modellen for gjennomsnittlig molekylvekt predikert ved bruk av data fra FTIR-spektrene.



Figur E2: Vektete regresjonskoeffisienter fra PLS-modellen for målt absorpsjon ved OPA-metoden predikert ved bruk av data fra FTIR-spektrene.



Figur 28: Vektete regresjonskoeffisienter fra PLS-modellen for målt absorpsjon ved OPA-metoden predikert ved bruk av data fra SEC-kromatogrammene.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway