

# Hurtigmetode for måling av enzymaktivitet basert på viskositetsmålinger

Line Bach Christensen og Torstein Skåra





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

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

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5828 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølseng  
NO-6600 Sunndalsøra

**Felles kontaktinformasjon:**

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

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835**

# Rapport

	ISBN: 978-82-8296-325-1 (trykt) ISBN: 978-82-8296-326-8 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> <b>Hurtigmetode for måling av enzymaktivitet basert på viskositetsmålinger</b>	<i>Rapportnr.:</i> 36/2015 <i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Line Bach Christensen & Torstein Skåra	<i>Dato:</i> 24. august 2015
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 13
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF#901033
<i>Stikkord:</i> Sild, matjes, enzym, gelatin, enzymaktivitet bindevev	<i>Prosjektnr.:</i> 11065
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Denne rapporten beskriver en utvikling av en analysemetode for bestemmelse av aktiviteten til bindevevsnedbrytende enzymer i ekstrakter av sild. Metoden er basert på måling av viskositet, og kvantifisering av den effekten som tilsats av enzymerkstrakt har på viskositeten i en gelatinløsning. Metoden krever ingen kjemikalier utenom substrat (gelatin), og kan gjennomføres i løpet av en drøy time.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i> <p>This report describes the development of a rapid analytical method, aiming to quantify the activity of connective tissue degrading enzymes, in extracts of herring. The method is based on measurement of viscosity, and quantification of the effect obtained by the addition of enzyme extract on the viscosity of a gelatin solution. The analysis can be carried out without any additional chemicals than substrate (gelatin), within a little more than an hour.</p>	

# Innhold

<b>1</b>	<b>Bakgrunn</b> .....	<b>1</b>
1.1	Mål.....	1
<b>2</b>	<b>Materialer og Metoder</b> .....	<b>2</b>
2.1	Innledende forsøk med viskositetsmåling.....	2
2.2	Bestemmelse av enzymaktivitet.....	7
2.2.1	Prøveopparbeidelse .....	7
2.2.2	Substrat - Gelatin.....	7
2.2.3	Spektrofotometrisk metode.....	7
2.2.4	Spesifikk enzymaktivitet .....	7
2.3	Viskositet (Brookfield) .....	8
2.3.1	Valg av spindler og hastighet.....	8
2.3.2	Valg av inkubasjonsbetingelser .....	8
<b>3</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>9</b>
3.1	Gelatinedbrytende aktivitet i laker og filet .....	9
3.2	Cathepsin B+L og collagenase aktivitet i laker og filet .....	10
3.3	Viskositet (Brookfield) .....	11
<b>4</b>	<b>Metodebeskrivelse</b> .....	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>13</b>

# 1 Bakgrunn

Resultater fra forsøk i tidligere FHF-prosjekter på matjessild (Skåra *et al.*, 2013, 2014a, 2014b) viser at salte og modningsprosessene er reproduerbare, men også at det gjenstår utfordringer knyttet til å måle enzymaktivitet og modningsgrad. Disse to parameterne viser seg å henge nøye sammen. Analysene som er gjennomført i forsøkene – i etterkant av produksjonen – er imidlertid tidkrevende og omstendelige og lite egnet for industrielle formål. Og det er et industrielt behov for en enklere metode.

Denne rapporten beskriver utvikling og dokumentasjon av en metode som tar utgangspunkt i endringer i viskositet i en gelatinløsning. Tilsvarende tilnærming er brukt for å bestemme pectinaseaktivitet (Gusakov *et al.*, 2002). Denne tilnærmingen reduserer behovet for kjemikalier og utstyr, forenkler målingene i forhold til de metodene som er brukt så langt i matjesprosjektene, og forventes å kunne redusere analysetiden til noe over en time. En slik analyse vil være svært nyttig/nødvendig for å kunne produsere laker med jevnt enzymaktivitetsnivå – og dermed produkter med jevn kvalitet.

Når det gjelder hurtigmetoder for måling av enzymaktivitet, kjenner vi ikke til at det er gjort arbeid som er relevant for denne prosessen. I FHF-prosjektet «Hurtig metode for å estimere buksprenging i pelagisk fisk om bord» er det utviklet en metode for å påvise proteolytisk aktivitet. Men denne metoden er for generell og ikke egnet til å vurdere modningslake, fordi man i modningsprosessen vil måle aktiviteten av enzymer som bryter ned bindevev.

Utvikling av denne type analysemetoder vil bidra til å forbedre prosesskontrollen. Ny analyseteknologi vil redusere behovet for subjektive vurderinger og erfaringsbasert kunnskap, og dessuten bidra til jevnere produktkvalitet og bedre prosess-styring.

## 1.1 Mål

Målet for dette arbeidet er å utvikle en enkel og hurtig analysemetode for enzymaktivitet som kan bidra til å gi bedre kontroll med modningsprosessen for jomfrusild.

## 2 Materialer og Metoder

Metoden er basert på måling av viskositet i en gelatinløsning. Endringen i viskositet i gelatinløsningen etter inkubasjon med lake skal bli et mål for enzymaktiviteten i laken.

Viskositeten til en løsning endrer seg med temperaturen. Det var derfor avgjørende at metodeutviklingen ble foretatt under kontrollerte temperaturbetingelser. I Nofimas laboratorier er temperaturen cirka 21 °C. Dette er vanlig romtemperatur, som ble ansett som den mest utbredte og enklest kontrollerbare.

Dersom ønskelig kan metoden tilpasses andre temperaturbetingelser, men det er avgjørende at temperaturen holdes konstant.

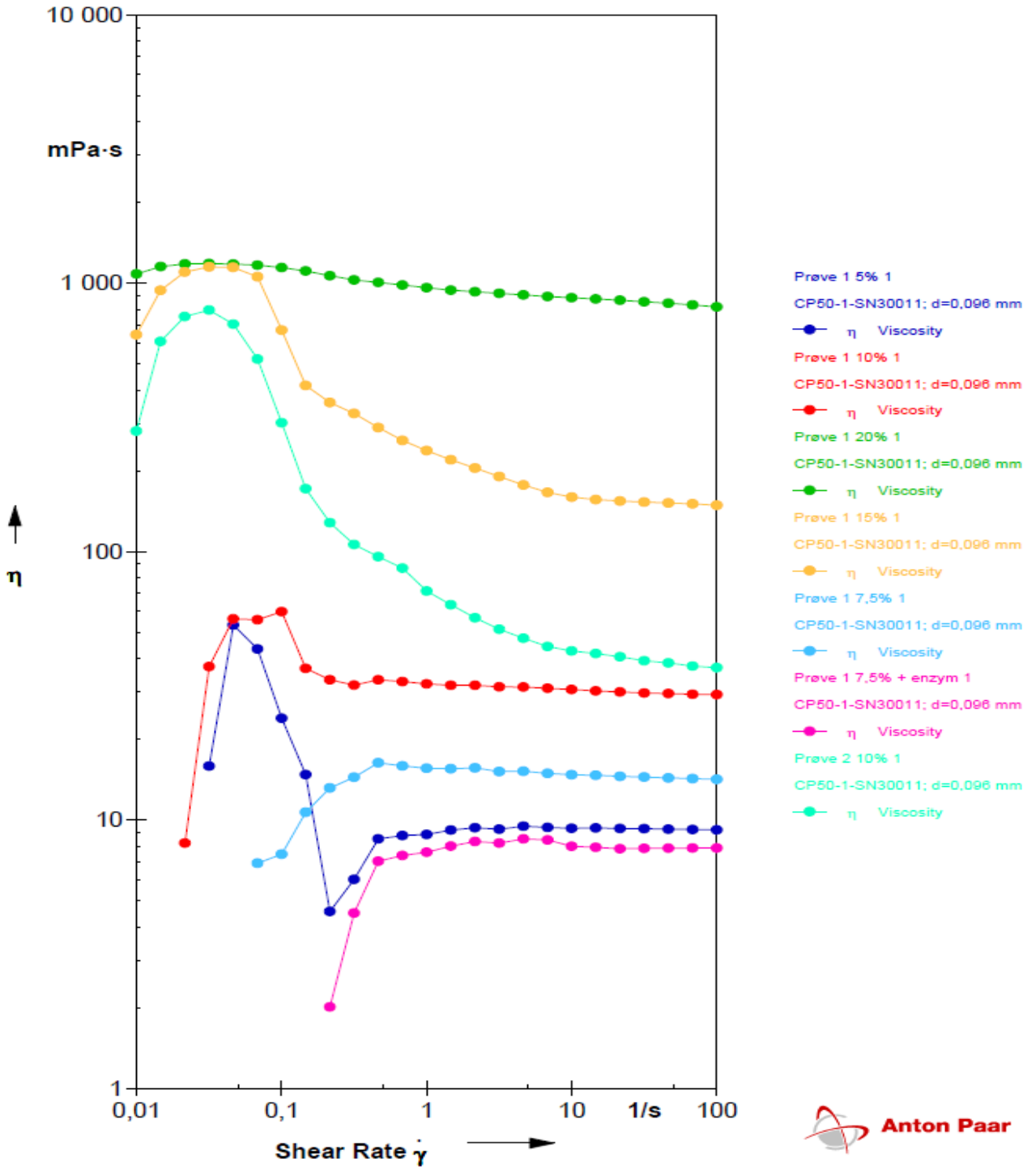
### 2.1 Innledende forsøk med viskositetsmåling

Metoden ble utviklet i flere trinn, der første trinn var å karakterisere gelatinens egenskaper og måle viskositeten før og etter lakeinkubasjon, samt lage en standardkurve med ulike gelatinkonsentrasjoner. I neste steg ble det testet en ny type gelatin. I tredje steg ble inkubasjonstid og ulike blandingsforhold (lake:gelatin) utprøvd. De første 3 trinn ble gjennomført på et veldig nøyaktig og følsomt viskosimeter (Anton Paar Physica 501, ST Instruments B.V., NL), hos institutt for petroleumsteknologi ved Universitetet i Stavanger.

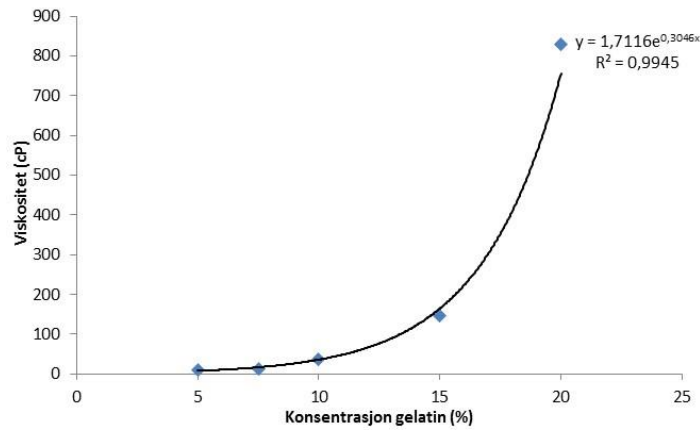
#### Karakterisering av gelatin

Viskositeten i 1,5 ml gelatin i ulike konsentrasjoner ble målt i ved ulike hastigheter (shear rates) for å karakterisere gelatinens egenskaper samt finne best egnet hastighet til stabil viskositetsmåling (Figur 1). Resultatene viser at forholdet mellom viskositet og gelatinkonsentrasjon er positivt; viskositeten øker med økende gelatinkonsentrasjon. Viskositeten av gelatin endrer seg med endret shear rate, hvilket betyr at gelatin defineres som en ikke-Newtonske væske.

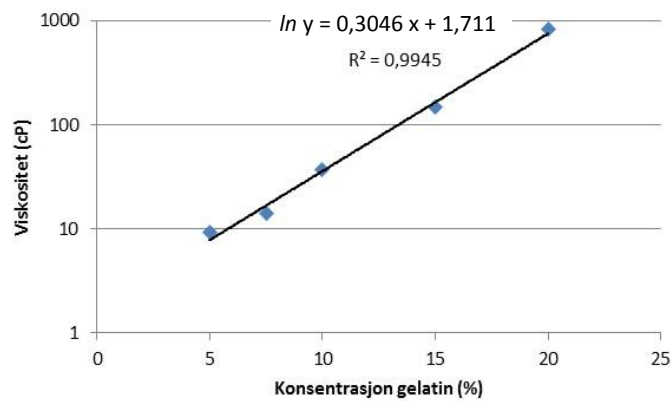
Basert på resultatene i Figur 1, ble en shear rate på 100/s valgt til de følgende forsøk, der viskositeten av hver enkelt gelatinkonsentrasjon ble analysert ved 100/s. Resultatet er vist i Figur 2 og Figur 3. Sammenhengen mellom viskositet og gelatinkonsentrasjon ved en shear rate på 100/s er log-lineært. Dette gjør gelatin veldig godt egnet til viskositetsmåling. Det var stor variasjon mellom gjentatte målinger med samme gelatinkonsentrasjon og betingelser. Denne variasjon ble mindre når gelatinkonsentrasjonen økte til 15 % og 20 %.



Figur 1 Shear rate ramp (0,01–100/s) på 5; 7,5; 10; 15 og 20 % gelatin, samt 7,5 % gelatin med lake (7,5 % + enzym).



Figur 2 Standardkurve. Viskositet av gelatin som funksjon av konsentrasjon (%)



Figur 3 Logaritmisk standardkurve. Viskositet av gelatin (logaritmisk) som funksjon av konsentrasjon (%).

### Viskositet etter lakeinkubasjon

Viskositeten ble målt etter inkubasjon i 1,5 ml 20 % gelatinløsninger tilsatt 250  $\mu$ l 20X fortynnet lake (gelatinkonsentrasjonen blir da 17 %). Inkubasjonstiden var 30 minutter ved romtemperatur.

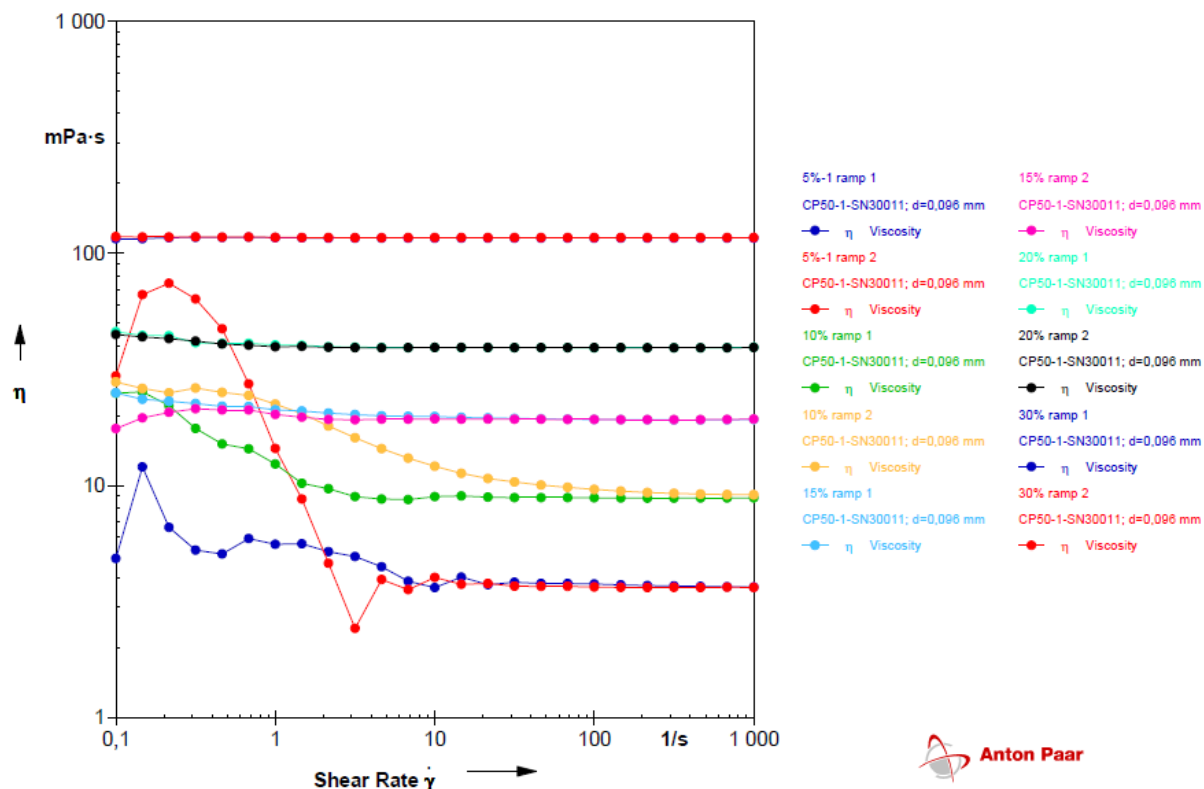
Tabell 1 Viskositet (cP) i 20 % gelatin etter inkubasjon med vann (17 % gelatin) og lakene A-D.

Løsning	Viskositet
17 % gelatin	304,89 cP
+ lake A	216,40 cP
+ lake B	155,23 cP
+ lake C	161,68 cP
+ lake D	225,93 cP

### Test av kommersiell gelatin

For å redusere variasjonen i gelatinen ble et kommersielt gelatinpulver (Norland gelatin from cold water fish) testet ut. Viskositeten var lavere, men variasjonen mellom gjentak ble vesentlig redusert ved alle konsentrasjoner (se Figur 4).





Figur 4 Shear rate ramp for kommersielt gelatin (Norland). To paralleller av konsentrasjoner mellom 5 og 30 %.

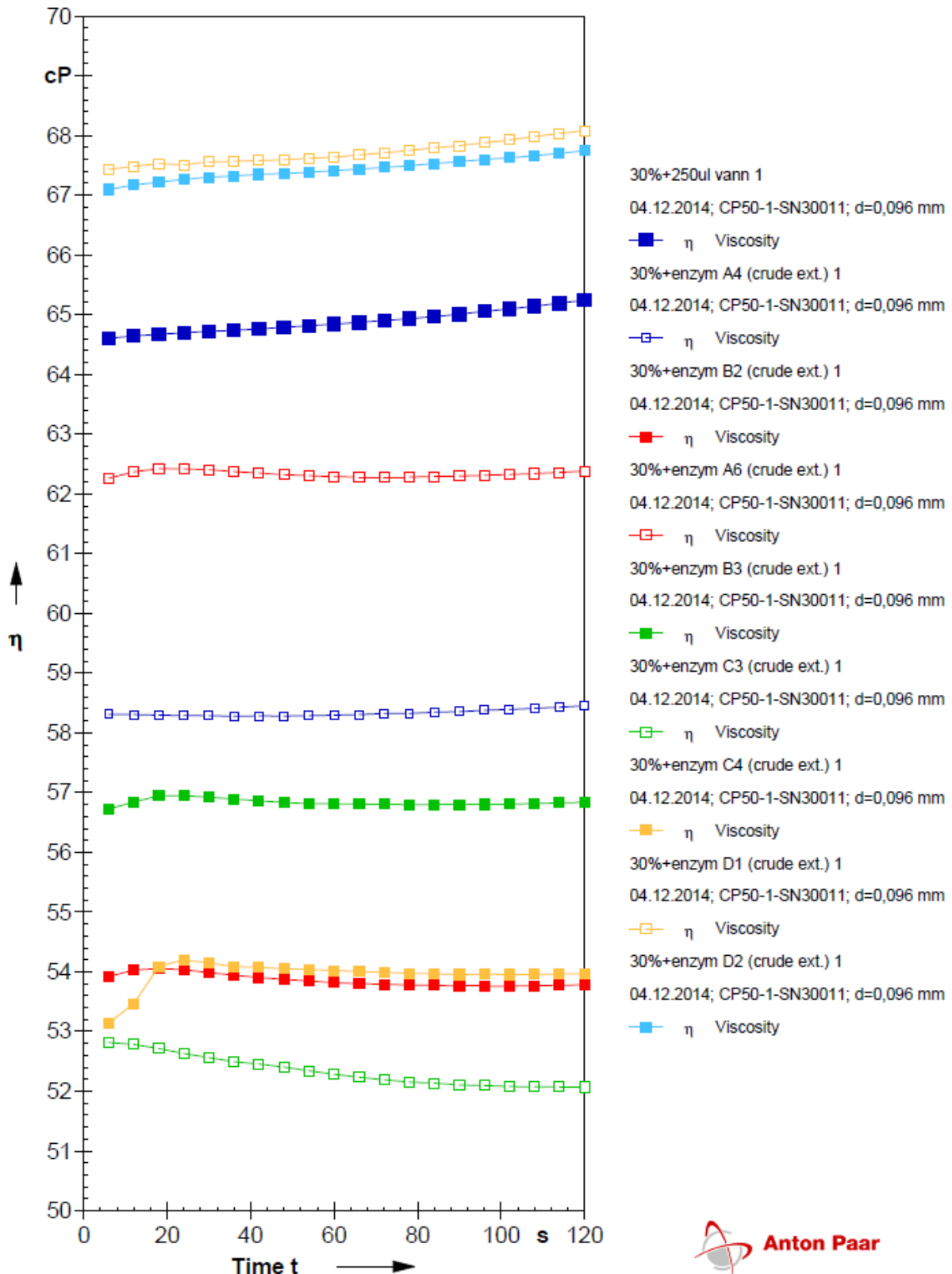
Etter inkubasjon av 30 % gelatin med lakene A-D ble viskositeten målt (se Figur 5). Resultatene viser, at gelatin inkubert med lake D hadde høyest viskositet, dernest lake A, og med lavest viskositet var lake B og C som overlappet hverandre.

Sammendrag (gjennomsnitt) av viskositeten etter lakeinkubasjon er vist i Tabell 2.

Tabell 2 Viskositet (cP) i 30 % gelatin etter inkubasjon med vann (25,7 % gelatin) og lakene A-D.

Løsning	Viskositet
25,7% gelatin	65,1 cP
+ lake A	60,3 cP
+ lake B	55,3 cP
+ lake C	53,1 cP
+ lake D	67,7 cP

Resultatene viste at kommersielt gelatin har mange fordeler med hensyn til repeterbarhet og variasjon, men med denne løsningen klarer man ikke helt å fange opp viskositetsendringene helt tydelig. Dette skyldes sannsynligvis at gelatinen er hydrolysert for å lette oppløsningen; dermed er noen av bindingene allerede brutt, og enzymet kan ikke fungere like effektivt som i gelatin fra torskeskinn.



Figur 5 Viskositet i kommersielt gelatin (30%) etter inkubasjon med vann eller lake A-D i 30 minutter ved romtemperatur.

## 2.2 Bestemmelse av enzymaktivitet

Enzymmålinger forteller noe om aktiviteten i forhold til nedbryting av bindevevsproteiner i råstoff og laker som er benyttet ved framstilling av matjessild. For å påvise aktivitet som kan bryte ned bindevev er det brukt gelatin fra torskeskinn. Gelatin er en denaturert form av det native kollagenet som finnes i frisk muskelstruktur. Dermed kan man ikke ukritisk hevde at en høy aktivitet målt mot gelatin nødvendigvis trenger å bety en høy aktivitet mot intakte bindevevsstrukturer i muskelen. I en studie med begrenset omfang, slik som dette, vil det likevel være nyttig å se på nedbrytning av gelatin, fordi den i alle fall er en god indikasjon på aktiviteter som kan bryte ned fiskens bindevev.

### 2.2.1 Prøveopparbeidelse

Fileter og laker fra matjessild ble mottatt som frosne prøver i juni 2014. Prøver av fileter og lake ble tatt ut før prosess (0 timer) (A), etter 3 timer (B), 6 timer (C) og 9 timer (D). Prøvene ble frosset inn umiddelbart etter uttak og lagret ved -25 °C. De ble tint ved cirka 3 °C i cirka 24 timer. Homogeniseringen ble foretatt med kjøttkvern. Fra homogenisatet ble 100 g prøve suspendert i 400 ml destillert vann ved cirka 10 °C og rørt en time før sentrifugering (40 min, 7000 x g, cirka 4 °C). Supernatantprøver ble fryselagret ved -25 °C inntil enzymmålinger ble utført.

### 2.2.2 Substrat - Gelatin

Til dette forsøket ble det brukt substrat fra torsk. Bindevev i torsk skiller seg noe fra dem man finner i sild, men siden dette substratet ble brukt i de foregående forsøkene med matjes-sild, ble dette vurdert som den beste løsningen.

Etter flere vasketrinn ble gelatin ekstrahert fra torskeskinn under svakt sure betingelser ved cirka 55 °C, i hovedsak slik som beskrevet av Gudmundsson *et al.* (1997). Etter ekstraksjonen ble løsningen filtrert, salter ble fjernet ved en to-trinns ionebytter-prosedyre før den ble inndampet og tørket ved cirka 40 °C (Arnesen *et al.*, 2007). Ett kg torskeskinn gir cirka 100 g tørt, rensset gelatin. Framstilling av enzymsubstrat skjer ved at tørt gelatin svelles over natt ved 10 °C og løses opp under røring og oppvarming til 40–50 °C. Substratprøver fryselagres og løses opp ved 25 °C rett før bruk.

### 2.2.3 Spektrofotometrisk metode

Enzymaktiviteter ved pH 7 ble målt i fortyninger av lake og i oppmalte sildefileter. Alle enzymprøver ble inkubert med 8 % gelatin i en time ved 25 °C, før reaksjonene ble stanset ved tilsats av tri-klor eddiksyre (TCA). Sluttkonsentrasjon av TCA i prøver inkubert med gelatin var 10 % (Gildberg *et al.*, 1983). Aktiviteter ble beregnet ut fra friggitt folin positivt materiale fra substratene, målt spektrofotometrisk (Barrett, 1972) og angitt som  $\mu\text{mol Tyr ekv./g(ml) h}$ .

### 2.2.4 Spesifikk enzymaktivitet

Aktiviteten av cathepsin B+L og collagenase i lakene ble målt som beskrevet av Christensen *et al.* (2011) med modifikasjoner. Lake (50  $\mu\text{l}$ ) i passende fortykning ble tilsatt 100  $\mu\text{l}$  buffer (0,36 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM TES, pH 7,5) og temperert til 40 °C i vannbad. Prøvene ble så tilsatt 100  $\mu\text{l}$  substrat (cathepsin B+L: 12,5  $\mu\text{M}$  Z-Phe-Arg-Nmec; Collagenase: 12,5  $\mu\text{M}$  Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC) og inkubert i 10 minutter ved 40 °C. Reaksjonen ble stoppet med 1 ml buffer (100 mM NaOH, 30 mM natrium acetat, 70 mM 100 % eddiksyre, 100 mM kloreddiksyre, pH 4,3). Fluorescens ble målt i 250  $\mu\text{l}$  ved eksitasjon- og

emisjons bølgelengder på henholdsvis 355 og 460 nm. Aktiviteten oppgis i U/ml, der 1 unit (U) er definert som 1  $\mu$ mol produkt produsert per minutt ved 40 °C.

## 2.3 Viskositet (Brookfield)

### 2.3.1 Valg av spindule og hastighet

Første steg var å finne best egnet spindule og hastighet, samt teste om gelatinkonsentrasjon og –egenskaper målt tidligere kunne gjenskes med det nye utstyret. I neste steg ble inkubasjonstid og blandeprosedyre fastsatt.

Valg av spindule og hastighet er avhengig av gelatinløsningens viskositet. Målingene baseres på torque (motstand/friksjon) i % og denne skal ligge mellom 10 og 100 % for mest nøyaktig og pålitelig måling. For å tilpasse torque velges passende spindule og hastighet. Er løsningen lavviskøs (< 100 cP) skal minste spindule benyttes. Er torque-% mindre enn 10 % eller høyere enn 100 % økes eller senkes hastigheten, tilsvarende.

Viskositeten i en 15 % torskogelatinløsning ble målt med spindule #LV3 med en hastighet på 100 rpm.

### 2.3.2 Valg av inkubasjonsbetingelser

Viskositeten ble målt i begre med 75 ml 15 % torskogelatin før og etter enzyminkubasjon. Gelatinprøvene tinte over natten ved 5 °C og ble temperert til romtemperatur i cirka 2 timer før måling. 75 ml 15 % gelatin ble tilsatt 3 ml lake (20X fortynnet) og inkubert under omrøring ved romtemperatur i 30 minutter.

Etter dette ble alle forsøk utført på nytt viskosimeter (DVT2, Brookfield).



Bilde 1 Brookfield viskosimeter.

### 3 Resultater

#### 3.1 Gelatinedbrytende aktivitet i laker og filet

Enzymaktivitet i lakene A-D er oppgitt som konsentrasjonen av tyrosin ekvivalenter (Tabell 3).

Tabell 3 Konsentrasjon av tyrosin ekvivalenter i laker (n=1-3).

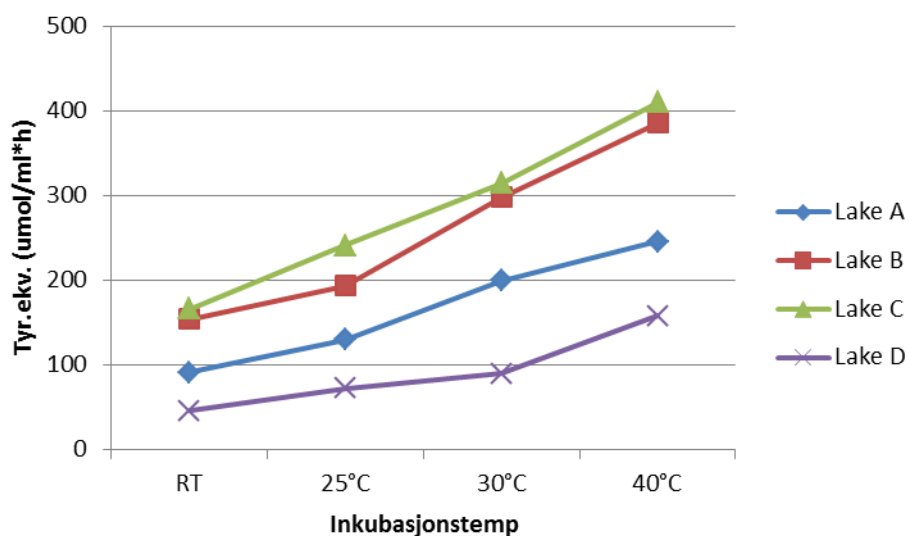
Lake	Fortynning	Kons. Tyr. Ekv. ( $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{h}$ )
A	10X	7,5
	20X	73 $\pm$ 5
	50X	91,5
B	10X	63,2
	20X	121 $\pm$ 21
	50X	166 $\pm$ 9
C	20X	114
	50X	198 $\pm$ 45
D	20X	37 $\pm$ 4
	50X	33 $\pm$ 18

Enzymaktiviteten i lakene økte med økt fortynning, muligens på grunn av samtidig fortynning av tilstedeværende inhibitorer. Lake C hadde høyest enzymaktivitet, dernest lake B, mens lake A og D hadde lavest aktivitet. Det ble ikke påvist vesentlig gelatinedbrytende aktivitet i filetene (Tabell 4).

Tabell 4 Konsentrasjon av tyrosin ekvivalenter i filet (n=5).

Filet	Kons. Tyr. Ekv. ( $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{h}$ )
A	0, $\pm$ 0,4
B	0,3 $\pm$ 0,3
C	0,3 $\pm$ 0,6
D	0,1 $\pm$ 0,8

For å studere effekten av inkubasjonstemperatur på enzymaktiviteten i lakene, ble aktiviteten målt ved etter inkubasjon ved romtemperatur, 25, 30 og 40 °C (Figur 6). Resultatene viser, at aktiviteten øker med økende temperatur.



Figur 6 Konsentrasjon av tyrosin ekvivalenter ( $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{h}$ ) i laker som funksjon av inkubasjonstemperatur.

### 3.2 Cathepsin B+L og collagenase aktivitet i laker og filet

For å komme nærmere en identifikasjon av hvilke enzymer som er aktive i laker og filet på prøveuttakstidspunktet, ble aktivitet av cathepsin B+L og collagenase målt med spesifikke syntetiske substrater (Tabell 5).

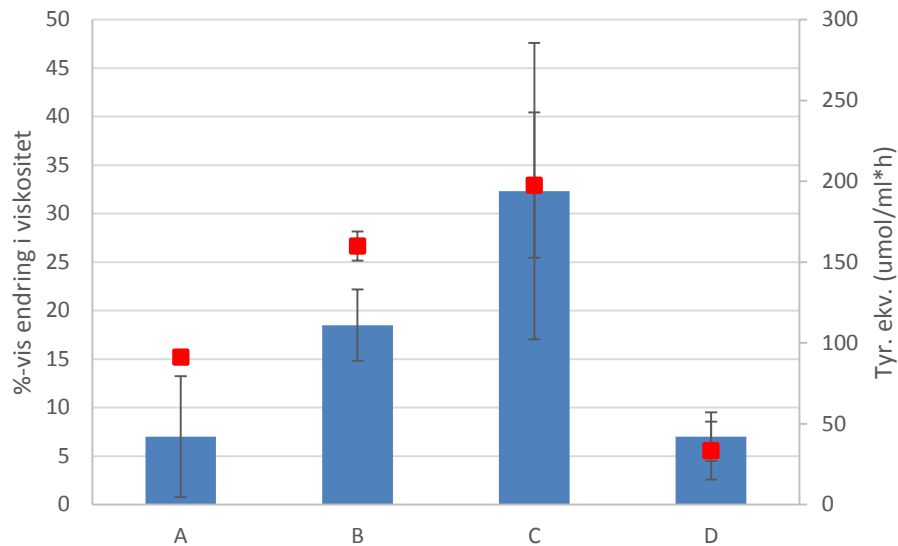
Tabell 5 Cathepsin B+L og collagenase aktivitet (U/ml) i laker og filet (n=1).

		Fortynning	Cathepsin B+L	Collagenase
LAKE	A	20X	4633	151
		50X	9388	137
	B	20X	5264	173
		50X	12069	62
	C	20X	4658	0
		50X	11137	0
	D	20X	3319	14
		50X	4931	41
FILET	A	1X	0	9
	B	1X	0	14
	C	1X	0	11
	D	1X	0	16

Det går fram av Tabell 5 at lakene hadde høy cathepsin B+L aktivitet, mens aktiviteten av collagenase var lav. Forskjellene i aktiviteten av cathepsin B+L i de 4 lakene er lik forskjellen i enzymaktivitet målt mot gelatin i avsnitt 3.1, der lake B og C hadde høyest aktivitet, mens A og D hadde lavest aktivitet. Enzymaktivitet i filetene ble ikke detektert.

### 3.3 Viskositet (Brookfield)

På grunn av varierende viskositet i gelatinløsningene før inkubasjon ble den prosentvise endring i viskositeten mellom før og etter inkubasjon beregnet. Deretter ble resultatene beregnet som prosentvis endring i forhold til viskositetsendringen i 15 % gelatin inkubert med vann (0 % endring), slik at bidraget fra enzymenes nedbryting av gelatinen illustreres. Resultatet av viskositetsmålingen i 15 % torskjelatin i de 4 ulike ekstrakter A-D er illustrert i Figur 7.



Figur 7 Blå stolper representerer endring i viskositet (%) etter inkubasjon med enzymekstrakt (A, B, C og D) (ekstrakt 20X fortynnet; etter tilsetning til gelatinløsning 500X fortynnet) i forhold til inkubasjon med vann (0%). Røde felter representerer enzymaktiviteten i de anvendte ekstrakter (tyrosin ekvivalenter ( $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{h}$ )). Feilfelter angir standardavvik på parallelle prøver.

Resultatene på viskositet korrelerer bra med resultatene på enzymaktivitet målt med den spektroskopiske metoden, der lake C hadde høyest aktivitet, deretter lake B og lavest aktivitet ble målt i lakene A og D.

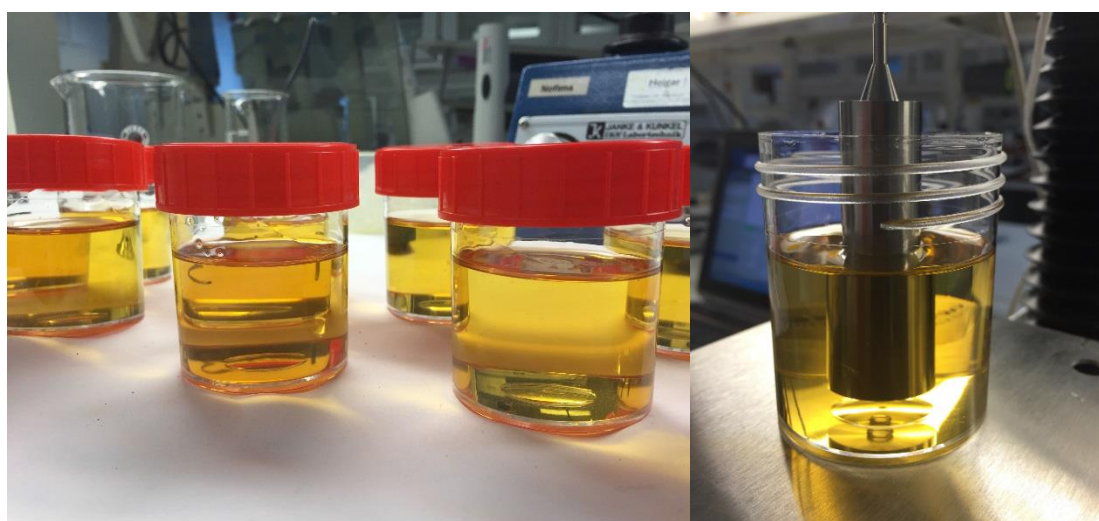
## 4 Metodebeskrivelse

15 % tørt gelatin sveller over natten ved 4 °C og løses opp under omrøring og oppvarming til cirka 50 °C. Prøvene tempereres til romtemperatur før måling.

Viskositeten måles i alle gelatinløsninger før lakeinkubasjon og spindlet og hastighet tilpasses. Avlesning av viskositet foretas etter 1 minutt.

Beholderen med 75 ml 15 % gelatin tilsettes 3 ml lake (20X fortynt (1:20)) og inkuberes i 30 minutter i «overhead shaker» ved romtemperatur. Som referanse inkuberes en prøve med 3 ml destillert vann. Viskositeten måles i alle løsninger.

Viskositetsendringen i % ( $V_{\text{før}} - V_{\text{etter}} / V_{\text{før}} * 100$ ) beregnes.



Bilde 2 Gelatinløsninger til måling av viskositet.



## 5 Referanser

- Arnesen, J.A. & A. Gildberg (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, **98**:1, pp. 53–57.
- Barrett, A.J. (1972). Lysosomal enzymes. In *Lysosomes – A Laboratory Handbook*. J.T. Dingle (ed.). Amsterdam: North Holland Publishing Company, pp. 46–135.
- Christensen, L., P. Ertbjerg, M.D. Aaslyng, & M. Christensen (2011). Effect of prolonged heat treatment from 48C to 63C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Science*, **88**:2, 280–285.
- Gildberg, A. & J. Raa (1983). Purification and Characterization of Pepsins from the Arctic Fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, **75**:3, pp. 337–342.
- Gudmundsson, M. & H. Hafsteinsson (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal Food Science*, **62**:1, pp. 37–39.
- Gusakov, A.V., A.V. Markov, S.G. Grishutin, M.V. Semenova, E.G. Kondratyeva & A.P. Sinitsyn (2002). Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases. *Biochemistry-Moscow+*, **67**:6, pp. 676–682.
- Skåra, T., M. Carlehög, J. Skaret, A. Gildberg, F. Jessen, H.H. Nielsen & T. Løvdal (2013). Alternativ produksjon av Matjessild. Del 1: Nordsjøsil. Rapport 28/2013, Nofima, Tromsø.
- Skåra, T., R. Skåra, M. Carlehög, P. Lea, A. Gildberg, F. Jessen & H.H. Nielsen (2014a). Alternativ produksjon av matjessild. Prosessutvikling og oppskalering. Rapport 22/2014, Nofima, Tromsø.
- Skåra, T., S. K. Stormo, M. Carlehög, P. Lea, A. Gildberg, F. Jessen & H.H. Nielsen (2014b). Alternativ produksjon av Matjessild. Del 2: NVG sild. Rapport 13/2014, Nofima, Tromsø.

