

Biokjemiske egenskaper til grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil

Anja Sjøvoll

Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2017

Biokjemiske egenskaper til grakse fra produksjon av Calanus[®] Oil

Anja Sjøvoll

Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Norges fiskerihøgskole,
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi,
UiT, Norges arktiske universitet
og
Calanus AS



Tromsø
Mai 2017

Forord

Denne oppgaven ble utført og skrevet ved Norges Fiskerihøgskole, UiT, Norges arktiske universitet. Oppgaven ble utført i samarbeid med bedriften Calanus AS, hvor jeg fikk kombinert min kunnskap fra bachelorgraden min i biologi, klima og miljø, samt masterfagene fra studieprogrammet i marin bioteknologi. Takk til Calanus AS og Alice Marie Pedersen for å ha gitt meg spennende problemstillinger og oppgaver, i tillegg til god veiledning og kunnskap fra bedriften sin side.

Jeg ønsker først og fremst å takke min hovedveileder, Ragnar L. Olsen for å ha vært en helt utmerket veileder. Du har bidratt med mye faglig kunnskap, erfaring og tid, i tillegg til en god prat om livet generelt. Ditt smittende lidenskapelige engasjement, faglige oversikt og at du alltid prioriterer studentene dine når vi trenger din uerstattelige hjelp, står det stor respekt av. Jeg har lært så mye av deg!

En stor takk til Lars Dalheim, Guro Edvinsen, Hanne K. Mæhre, Ida-Johanne Jensen og Birthe Vang for god hjelp under laboratoriarbeidet og gode faglige svar på mine spørsmål. Takk til alle i sjømatgruppa, det har vært lærerikt å være en del av en meget inkluderende forskningsgruppe.

Takk til alle mine medstudenter, som har bidratt til at studietiden har vært en fantastisk tid, som jeg kommer til å savne. Takk til alle på fiskehelsekontoret for en god dose utenomfaglig morro!

Til min kjære Magnus, takk for at du har bidratt som en stor støttespiller i hverdagen og gjennom en intensiv periode. Du stiller alltid opp og får meg til å føle at det ikke er noe i denne verden jeg ikke klarer. Til slutt vil jeg gi en stor takk mamma og pappa for å ha vært fantastiske støttespillere gjennom alle mine år som student og at dere har lært meg verdien av hardt arbeid og god arbeidsmoral. Og til alle dere andre som har heiet meg frem, tusen takk!

Anja Sjøvoll
Tromsø, mai 2017

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	IV
Summary	V
Ordliste.....	VI
1 Innledning	1
2 Bakgrunn	5
2.1 Restråstoff og bioøkonomi	5
2.2 <i>Calanus finmarchicus</i>	6
2.3 Oksidasjon av fettsyrer	9
2.4 Direkte metylering av fettsyrer.....	13
2.5 Mikrobiologisk stabilitet	13
2.6 Kvantifisering av aminosyrer	14
2.6.1 Analyse av aminosyresammensetning	15
2.6.2 Aminosyreanalyse	16
2.7 Antibakteriell aktivitet.....	17
3 Materialer og metoder	18
3.1 Materialer	18
3.2 Metoder	21
3.2.1 Mikrobiologisk stabilitet	21
3.2.2 Oksidativ stabilitet	21
3.2.3 Vanninnhold.....	22
3.2.4 Askeinnhold	22
3.2.5 Fettekstraksjon	22
3.2.6 Metylering	23
3.2.7 Direkte metylering	23
3.2.8 Fettsyresammensetning.....	23
3.2.9 Fettklassesammensetning.....	24
3.2.10 Frie fettsyrer.....	24
3.2.11 Måling av TBARS	25
3.2.12 Måling av pH	26
3.3 Eksperimenter.....	27
3.3.1 Enzymbehandling av grakse	27

3.3.2	Antibakteriell testing.....	27
3.3.3	Tryptofaninnhold	28
3.3.4	Aminosyreanalyse.....	30
4	Resultater.....	32
4.1	Sammensetning av graksene.....	32
4.2	Fettsyresammensetning av grakse.....	33
4.3	Fettklasser i fett fra grakse	34
4.4	Lagringsstabilitet av grakse.....	35
4.4.1	Mikrobiologisk stabilitet.....	35
4.4.2	Oksidativ stabilitet av langtidslagret grakse	35
4.5	Enzymatisk hydrolyse av grakse.....	40
4.5.1	Visuelle observasjoner	40
4.5.2	Fettinnholdet i grakse etter enzymatisk hydrolyse.....	41
4.5.3	TLC av fett ekstrahert fra enzymatisk hydrolysert grakse.....	41
4.6	Antibakteriell aktivitet i grakse og proteinfase fra enzymatisk behandlet grakse.....	43
4.7	Tryptofan	43
4.7.1	Analyse av tryptofan med aminosyreanalysator	43
4.7.2	Stabilitet av rent tryptofan.....	44
4.7.3	Frie aminosyrer og totale aminosyrer i hydrolysat etter 6 M HCl hydrolyse	45
4.7.4	Totale aminosyrer i hydrolysat etter MSA-hydrolyse.....	47
5	Diskusjon.....	49
6	Konklusjon	56
	Referanser	57

Sammendrag

En rekke helseorganisasjoner anbefaler å øke inntaket av de langkjedete flerumettede fettsyrene EPA (20:5 n-3) og DHA (22:6 n-3). Det er derfor et stort behov for nye marine lipidkilder med et høyt innhold av LC-PUFA. Den store biomasseproduksjonen av raudåte (*Calanus finmarchicus*) i Norskehavet gjør den unik. Den årlige produksjonen av *Calanus*-arter er i Norskehavet estimert til å være 290 millioner tonn. I sommerhalvåret høster firmaet Calanus AS raudåte. Fra raudåte utvinnes firmaet den kommersielle oljen Calanus[®] Oil. Gjennom prosessen dannes også to andre produkter, et proteinhydrolysat og en grakse (presskake). Til forskjell fra andre kommersielle marine oljer, foreligger fettene i all hovedsak i form av voksester. Det overordnede målet med masteroppgaven var å karakterisere biokjemiske egenskaper til graksen som dannes under industriell produksjon av oljen. Det ble målt et høyt fettinnhold i graksene, og dette viser at olje-utvinningen fra *Calanus finmarchicus* ikke er fullstendig. En årsak kan være at det er et høyt innhold av polare lipider som kan være vanskelig å utvinne. Det ble funnet et høyt innhold av frie fettsyrer i fett ekstrahert fra graksen (13,2-28,4 %) og i Calanus[®] Oil (9,9 %), noe som trolig skyldes aktive fosfolipaser. Fett ekstrahert fra graksen inneholdt 16,3 % stearidonsyre (18:4 n-3), 13,9 % EPA (20:5 n-3) og 13,2 % DHA (22:6 n-3). Voksester var den dominerende fettklassen både i fett ekstrahert fra graksen og i Calanus[®] Oil. Resultatene antyder at direkte metylering er en mer presis metode enn metylering av ekstrahert fett, for bestemmelse av fettsyresammensetning i relativt fosfolipidrike prøver. Semikvantitative analyser viste at fett ekstrahert fra graksen inneholdt mer PL enn Calanus[®] Oil. Graksen måtte ha en pH på minimum 2,9-3,1 for å hindre bakterievekst ved romtemperatur og ved 37 °C. Under lagringsforsøket av våt grakse, var det en rask økning av malondialdehyd i øvre lag av graksen lagret uten N₂-gass, som også ble observert i en fargeforandring. Lagring av våt grakse med N₂-gass førte til en forsinket MDA-utvikling og MDA-økningen var svak i det midtre laget hvor oksygentilgangen var begrenset. Fett i graksen ble frigjort ved enzymbehandling. En varmebehandling av graksen både med og uten Alcalase[®], reduserte innholdet av fett i pelleten. Rent tryptofan var stabil når det ble lagret i 3 uker ved 50 °C og pH 2,7. Tryptofan i hydrolysatet ble ikke detektert med en standard 6 M HCl-hydrolyse, men det ble detektert ved analyse av frie aminosyrer. Den alternative 4 M MSA-hydrolysen detekterer heller ikke tryptofan i hydrolysatet, men det ble detektert når tryptofan var tilsatt bovine serum albumin. Resultatene indikerte at tryptofan tåler hydrolysen alene, men ikke når det er tilsatt eller tilstede i et komplekst materiale som hydrolysat.

Summary

Several health organizations recommended an increased dietary intake of the long chain polyunsaturated fatty acids EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3). This has led to an increase of demand for marine lipid sources with high content of LC-PUFA. The high biomass production of *Calanus finmarchicus* in the Norwegian sea makes it unique, and the annual production of *Calanus* species is estimated to be 290 million tons. Commercial harvesting of *Calanus finmarchicus* is done by Calanus AS. During extraction of the oil (Calanus[®] Oil), two other products are formed; a protein hydrolysate and a press cake (sludge). Contrary to other commercial marine oils, the lipids from *C. finmarchicus* occur mostly as wax esters. The aim of this master thesis has been to characterize the biochemical properties of the press cake formed during the industrial process. A high fat content was in the press cake and reflects that oil recovery from *C. finmarchicus* is not complete. This may be caused by high content of polar lipid which could be difficult to recover. The high content of free fatty acids in the fat extracted from the press cake (13.2-28.4 %) and in Calanus[®] Oil (9.9 %), may be formed by phospholipases. Fat extracted from the press cake contained 16,3 % stearidonic acid (18:4 n-3), 13,9 % EPA (20:5 n-3) and 13,2 % DHA (22:6 n-3). Wax ester was the main lipid class in the fat extracted from the press cake and in Calanus[®] Oil. The results indicated that direct methylation gives a more true picture of the fatty acid composition than methylation of fat extracted from material rich in phospholipids. By semi quantitative analysis, the press cake contained more PL compared to Calanus[®] Oil. To avoid bacterial growth in the press cake in room temperature and 37 °C, the pH must be minimum 2,9-3,1. A rapid increase in malondialdehyd was detected in the upper layer of the press cake with high water content during storage without N₂-gas, which was also seen in a color change. This development was delayed when the press cake was stored with N₂-gas. In the middle layer with low oxygen, the oxidation was limited. Enzymatic treatment released fat from the press cake. Heat treatment with or without Alcalase[®], reduces the fat content in the pellet. Pure tryptophan was stable when stored in three weeks with 50 °C and pH 2.7. By a standard 6 M HCl-hydrolysis, tryptophan in the hydrolysate was not detected, but it was detected in the analysis of free amino acids. Alternative hydrolysis method using 4 M MSA also failed to detect tryptophan. When bovine serum albumin was added tryptophan, the amino acid was detected. These results indicated tryptophan is not destroyed in a hydrolysis, when it's not present in a complex material like a hydrolysate.

Ordliste

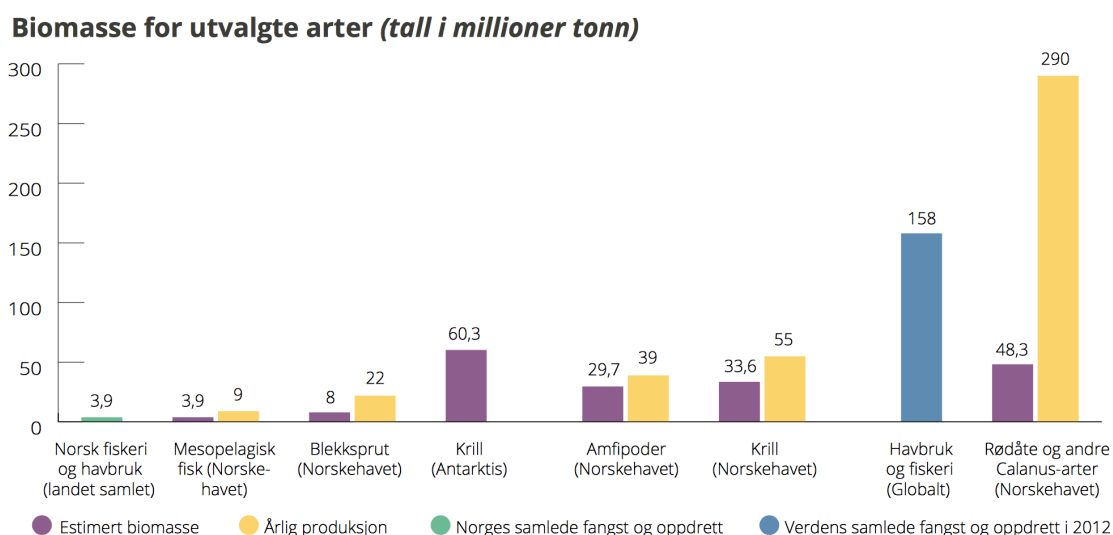
a_w	Vannaktivitet
BHT	Butylhydroksytoluen
BSA	Bovine serum albumin
d.H ₂ O	Destillert vann
DAG	Diacylglycerol
DB	Dobbelbinding
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre
DPA	Dokosapentaensyre
EPA	Eikosapentaensyre
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FFA	Frie fettsyrer
HCl	Saltsyre
HP-TLC	High performance thin layer chromatography
LC	Langkjedete
LC-PUFA	Langkjedede flerumettede fettsyrer
MAG	Monoacylglycerol
MDA	Malondialdehyd-bis (diethylacetal)
MeOH	Metanol
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon
MSA	Metansulfonsyre
Nle	Norleucine
N ₂ -gass	Nitrogengass
OD	Optical density
PL	Fosfolipider
PUFA	Flerumettede fettsyrer
RH	Fettsyre
SDA	Stearidonsyre
SSA	Sulfosalisylysyre
TAG	Triacylglycerol
TBARS	Thiobarbitursyre reaktive stoffer
TLC	Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography)
TS	Tørrstoffbasis
WHO	World Health Organization
ΣLCn-3	Summen av langkjedede omega-3 fettsyrer
ΣSAT	Summen av mettede fettsyrer

1 Innledning

Som følge av et økt fokus på positive helseeffekter ved inntak av de langkjedete flerumettede fettsyrene (LC-PUFA), eikosapentaensyre (EPA, 20:5 n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6 n-3), er det en økende etterspørsel etter fiskeoljer. Dagens produksjon av fiskeolje er ikke tilstrekkelig for å dekke behovet med en økende befolkning, samtidig som etterspørselen innen akvakulturproduksjonen og til kosttilskudd er stor (Tocher, 2015; Ytrestøyl *et al.*, 2015).

Ulike helseorganisasjoner anbefaler å øke inntaket av LC-PUFA ved å spise mer sjømat (FAO/WHO, 2003; Kris-Etherton *et al.*, 2009; Nasjonalt råd for ernæring, 2011). Disse fettsyrene har vist seg å ha en rekke helsebringende fordeler i forbindelse med hjerte- og karsykdommer i flere studier (Burr *et al.*, 1989; Psota *et al.*, 2006; Delgado-Lista *et al.*, 2012; Rizos *et al.*, 2012; Calder, 2015). EPA og DHA virker antakelig ved å dempe betennelsesreaksjoner og det har også blitt foreslått at de kan hemme utviklingen av enkelte mentale sykdommer og redusere sjansen for lidelser relatert til fedme (Ruxton *et al.*, 2005; Hibbeln *et al.*, 2006; Swanson *et al.*, 2012; Calder, 2015; Abeywardena & Belobrajdic, 2016; Oulhaj *et al.*, 2016). På bakgrunn av dette er det et stort behov for nye marine lipidkilder som er rik på LC-PUFA.

Calanus finmarchicus, på norsk raudåte, er unik på grunn av dens store biomasseproduksjon i Norskehavet (figur 1).



Figur 1. Anslått biomasse og årlig produksjon av *Calanus*-arter i Norskehavet sammenlignet med krill, amfipoder, blekksprut og mesopelagisk fisk i Norskehavet. I tillegg viser figuren estimert biomasse av antarktisk krill, verdens samlede produksjon av fisk og den totale produksjonen av norsk fiskeri og havbruksnæring (Nærings- og fiskeridepartementet, 2016).

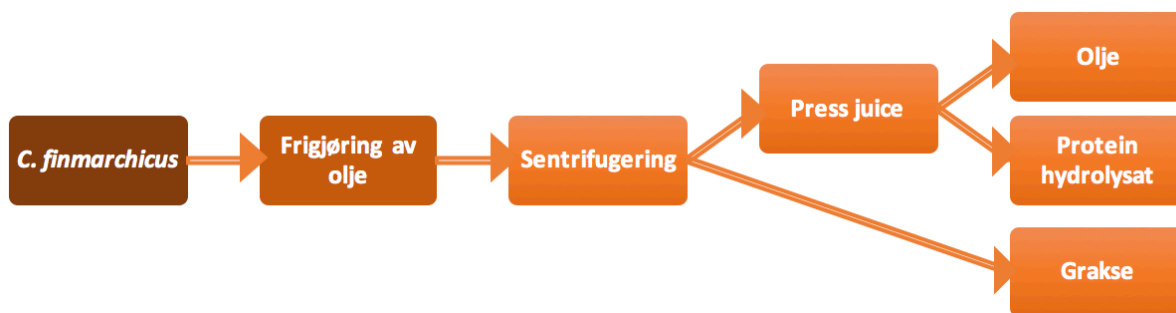
I Norskehavet er biomassen av zooplankton generelt dominert av raudåte (Wiborg, 1955; Hirche, 1991), og den stående biomassen var tidligere estimert til å være 74 millioner tonn i de nordiske hav (Norskehavet, Grønlandshavet og Islandshavet) (Aksnes & Blindheim, 1996). Nylig er den årlige produksjon av raudåte og andre *Calanus*-arter estimert til å være 290 millioner tonn, og den stående biomassen til å være 48,3 millioner tonn i Norskehavet (figur 1).

Planteplankton, som raudåta livnærer seg av, utgjør det første trinnet i næringskjeden. Dette, i tillegg til at den har en ettårig livssyklus, bidrar til at raudåta ikke er utsatt for opphopning av miljøgifter. Fettet som raudåta lagrer, er hovedsakelig i form av voksester som kan utgjøre mer enn 86 % av det totale fettinnholdet (Cook *et al.*, 2016). Dette skiller den fra fiskeoljer hvor i overkant av 90 % av fettene foreligger esterifisert i triacylglycerol (TAG) (De Silva *et al.*, 2011) og fra krillolje som inneholder cirka 44 % fosfolipider (PL) og 40 % TAG (Yurko-Mauro *et al.*, 2015).

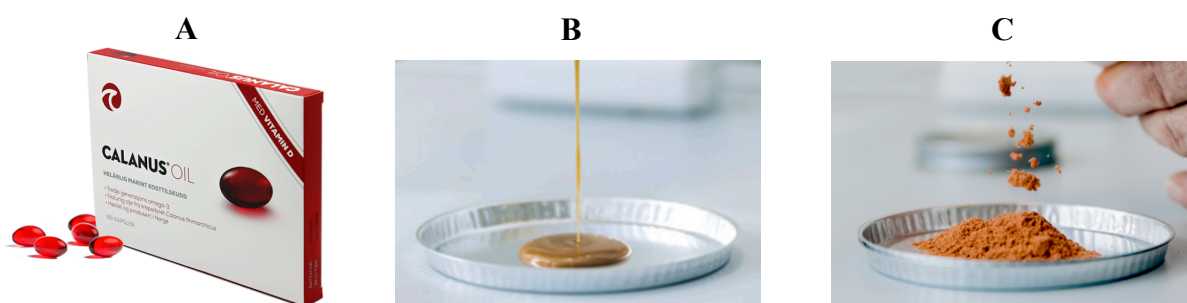
Tidligere har det vært tvil om voksester kan fordøyes av pattedyr, men nyere studier viser at voksester fordøyes i tarmen hos mus (Pedersen *et al.*, 2014) og mennesker (Cook *et al.*, 2016). Studier har indikert at Calanus[®] Oil kan ha helseeffekter utover de som er beskrevet for inntak av LC-PUFA alene. Små mengder med Calanus[®] Oil har vist seg å kunne redusere utviklingen av aterosklerotiske skader (forkalkning av blodårer) og kroppsvektøkning, i tillegg til å øke glukosetoleransen hos mus føret med en typisk vestlig diett som inneholder en stor andel fett (Eilertsen *et al.*, 2012; Höper *et al.*, 2013; Höper *et al.*, 2014).

Firmaet Calanus AS høster raudåta i sommerhalvåret (mai-august), hovedsakelig i havområdene utenfor Nord-Norge. Høstingen skjer i korrelasjon med våroppblomstringen av planteplankton. Da migrerer raudåta til havoverflaten (0-50 m) for å beite og får derfor et høyt fettinnhold. Høsting av raudåte har siden 2003, vært drevet i medhold til en forsøksstillatelse tildelt Calanus AS, som årlig har kunnet fisket 1000 tonn raudåte. Nå er det lagt frem et forslag til en norsk kvote på 165 000 tonn (Fiskeridirektoratet, 2016). Når raudåta høstes inneholder den 78,8 % vann, 11 % protein, 6,9 % lipider, 2,1 % mineraler (Vang *et al.*, 2013) og omtrent 550-850 ppm astaxanthin på tørrvekstbasis (Lotocka & Styczynska-Jurewicz, 2001; Lotocka *et al.*, 2004) og i ekstrahert olje 1600 ppm astaxanthin (Pedersen, 2007).

Olje kan utvinnes fra *Calanus finmarchicus* ved å bruke enzymer. En slik ekstraksjon gir et bedre oljeutbytte enn tradisjonell fiskeoljeproduksjon (Vang *et al.*, 2013). Fra raudåte utvinnes firmaet Calanus AS oljen med produktnavnet Calanus[®] Oil. Under produksjonen dannes det også to andre produkter, et proteinhydrolysat og en grakse (presskake) (figur 2).

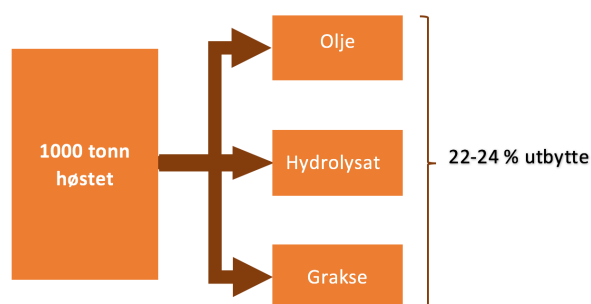


Figur 2. Flytskjema for produksjonen av olje fra *Calanus finmarchicus* og de tre sluttproduktene som dannes under produksjonen av Calanus[®] Oil (modifisert fra Vang, 2015).



Figur 3. A: Oljeprodukt (Calanus[®] Oil) fra *Calanus finmarchicus*. B: Inndampet proteinhydrolysat (Calanus[®] Hydrolysate). C: Tørket grakse (Calanus[®] Powder) (copyright Calanus AS).

Produksjonen resulterer i et totalt produktutbytte på 22-24 % (figur 4).



Figur 4. Utbytte av 1000 tonn høstet raudåte (figur modifisert fra Calanus AS).

Under produksjon av hovedproduktet, Calanus[®] Oil, dannes det, som nevnt, også to andre produkter: hydrolysatet (Calanus[®] Hydrolysate) og grakse (Calanus[®] Powder). De to sistnevnte produktene ønsker firmaet å få mer kunnskap om, slik at de kan selges med dokumenterte egenskaper og forhåpentligvis med en høyere avkastning. Mer kunnskap kan også føre til at nye anvendelsesområder av produktet oppdages. I følge firmaet selges hydrolysatet i dag som

startfôr til marin fisk og reker, og som smaksattraktant i fôr til fisk og dyr. Graksen (Calanus[®] Powder) er minst undersøkt og brukes i dag som ingrediens i dyrefôr og i fôr til akvariefisk.

Hovedmålet med denne oppgaven var derfor å karakterisere biokjemiske egenskaper til graksen dannet ved produksjonen av Calanus[®] Oil. I noen sammenhenger ble også hydrolysatet undersøkt.

Delmål:

- Sammenligning av to metoder for bestemmelse av fettsyresammensetningen til grakse.
- Bestemmelse av fettklasser og frie fettsyrer (FFA) i fett ekstrahert fra grakse.
- Undersøkelse av den mikrobiologiske stabiliteten til våt grakse.
- Undersøkelse av den oksidative stabiliteten til våt og tørket grakse.
- Enzymatisk hydrolyse av grakse ved bruk av det kommersielle enzymet Alcalase[®].
- Undersøkelse av eventuelle antibakterielle egenskaper i graksen og væskefasen (supernatanten) fra enzymbehandlet grakse mot fire ulike bakterier (to Gram-positive og to Gram-negative).
- Undersøkelse av muligheter for kvantitativ analyse av tryptofan i proteinhydrolysat.

2 Bakgrunn

2.1 Restråstoff og bioøkonomi

I senere tid har det vært et økende fokus på utnyttelse av restråstoff fra fiskeri- og havbruksnæringen. Sentralt er at man ikke skal kaste ressurser som kan utnyttes som produkter med næringsverdi, eller som på andre måter kan være til fordel for samfunnet (FAO, 2016). Restråstoff defineres som de delene av fisken eller andre marine dyr, som ikke regnes som en del av hovedproduktet. Regjeringen la nylig frem en ny bioøkonomi-strategi. Et av tiltakene som ble nevnt var gjennomgang av etablerte regelverk for bedre bruk av råstoff og utvikling av forvaltningsregimer som kan gi bedre utnyttelse av marine arter (Nærings- og fiskeridepartementet, 2016). Begrepet bioøkonomi omfatter en bærekraftig og lønnsom produksjon, i tillegg til uttak og utnyttelse av fornybare biologiske ressurser til mat, fôr, ingredienser, helseprodukter, kjemikalier, energi, materialer og andre produkter (Nærings- og fiskeridepartementet, 2016). Med en økende verdensbefolkning, kan en større tilførsel av sjømat være en del av løsningen på de globale utfordringene med matmangel og helseproblematikk som verden står ovenfor. En bedre utnyttelse av råstoffene gjennom hele prosessen, kan bidra til å redusere svinn av viktige komponenter som kan utnyttes til for eksempel mat til mennesker og dyr, og kanskje også til legemidler, helsekost og kosmetikk. På internett fremstilles ofte verdipyramider for utnyttelse av biomasse på følgende måte (fra høy til lav verdi): Medisiner, mat og fôr, bioplast og polymerer, kjemikalier og drivstoff, og til slutt energi og varme, hvor energi og varme har lavest verdi og utnyttelse innen medisin har høyest verdi (figur 5).



Figur 5. Verdipyramide med verdi og volumpotensial for ulike anvendelser av biomasse, slik den oftest fremstilles. Pyramiden viser rangeringen av verdien til de ulike produktkategoriene for utnyttelse av biomasse på internett. Rangeringen går fra energi og varme, som har lavest verdi, til medisinprodukter, som har høyest verdi. Y-aksen illustrerer økningen i verdien for de ulike produktkategoriene og X-aksen illustrerer mengden av materiale fra de ulike produktkategoriene (Miljødirektoratet, 2015).

Et mer riktig og presist oppsett av verdipyramiden kan være: medisiner, helsekost, biopolymerer, mat, fôr og drivstoff (biodiesel), med en rangering fra høy til lav verdi. Med unntak av mikrobiell biomasse (bakterier og sopp), er nok det å produsere legemidler (medisin) fra annen biomasse, for eksempel fra fiskeslo, vel optimistisk etter min mening.

Tradisjonelt sett ble restråstoff/biprodukter tidligere ansett å ha en lav verdi, og ble vanligvis benyttet som mat til husdyr, gjødsel eller kastet. Nå fokuseres det på å bruke restråstoffer/biprodukter direkte som mat til mennesker eller for å produsere fôr-ingredienser som fiskemel, fiskeprotein konsentrater og fiskeoljer, i tillegg til leting etter bioaktive komponenter (se oversiktsartikkel: Olsen *et al.*, 2014).

2.2 *Calanus finmarchicus*

Calanus finmarchicus (raudåte) er et zooplankton i klassen *Crustacea* (figur 6). Den nevnes ofte som en copepod (subklasse *Copepoda* - hoppekreps), og tilhører familien *Calanidae*.



Figur 6. Raudåte (*Calanus finmarchicus*) (copyright Calanus AS).

Raudåta har hovedsakelig en ettårig livssyklus (Diel & Tande, 1992) og i løpet av sin levetid kan den produsere en-tre generasjoner med avkom (Melle *et al.*, 2004). Avkommene klekkes som nauplierlarver, og utvikler seg gjennom seks nauplierstadier og fem copepodittstadier før de blir kjønnsmoden (figur 7).

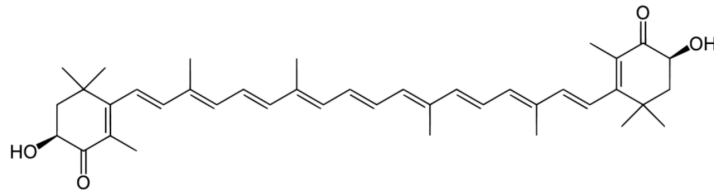
i dinoflagellater, som er et planteplankton som raudåta beiter på, og reflekteres i raudåtens depotfett (Graeve *et al.*, 1994; Kattner & Hagen, 1995).

Tabell 1. Fettsyresammensetningen (%) i fett fra *C. finmarchicus*, og i frie fettsyrer (FFA) og voksester (WE) i oljen (Vang *et al.*, 2013).

<i>Fatty acid</i>	<i>Oil</i>	<i>FFA</i>	<i>WE</i>
14:0	14.7	4.7	15.4
16:0	9.3	21.2	7.6
16:1 n-7	6.7	4.1	6.4
16:2 n-4	1.0	0.6	0.9
16:3 n-4	2.5	1.7	2.4
18:0	1.0	7.9	0.8
18:1 n-9	4.1	2.9	4.0
18:1 n-7	2.5	1.8	2.4
18:2 n-6	0.9	1.1	0.8
18:3 n-3	1.3	1.2	1.1
18:4 n-3	12.4	8.0	11.4
20:1 n-9	5.9	1.3	6.0
22:1 n-9	9.0	1.7	8.8
20:5 n-3	14.4	17.0	11.6
24:0	0.7	0.5	0.6
24:1 n-9	0.8	0.6	0.6
22:6 n-3	7.7	18.3	4.1
Σ SAT	25.7	34.3	24.4
Σ MUFA	44.1	30.0	40.4
Σ PUFA	40.2	48.0	32.3
n-3	35.8	44.6	28.1
n-6	0.9	1.1	0.8

Den røde fargen på raudåta kommer av det høye innholdet av lipofile karotenoidpigmenter. Omtrent 85-90 % av det totale innholdet av disse pigmentene, kan utgjøres av astaxanthin (Funk & Hobson, 1991). Av dette er omkring 90 % bundet i form av di- og monoester (Foss *et al.*, 1987). Alle fotosyntetiserende organismer inneholder karotenoider, og det høye innholdet i raudåta gjenspeiles av dietten som består av fotosyntetiserende planteplankton. Copepoder bruker β-karotenet som en forløper for syntesen av astaxanthin som er et xanthofyll, det vil si at det inneholder oksygen i tillegg til karbon og hydrogen som i karotenoider (Andersson *et al.*, 2003).

Hovedfunksjon til astaxanthin er å fungere som en antioksidant ved å beskytte PUFA mot oksidasjon (Lotocka & Styczynska-Jurewicz, 2001; Sommer *et al.*, 2006).



Figur 9. Struktur av uesterifisert astaxanthin.

Strukturen (figur 9) til astaxanthin med to OH-grupper gjør at molekylet kan foresters med en eller to fettsyrer. Dette gjør molekylet mer fettløselig og derved kan det kanskje fungere bedre som antioksidant (se oversiktsartikkel: Guerin *et al.*, 2003).

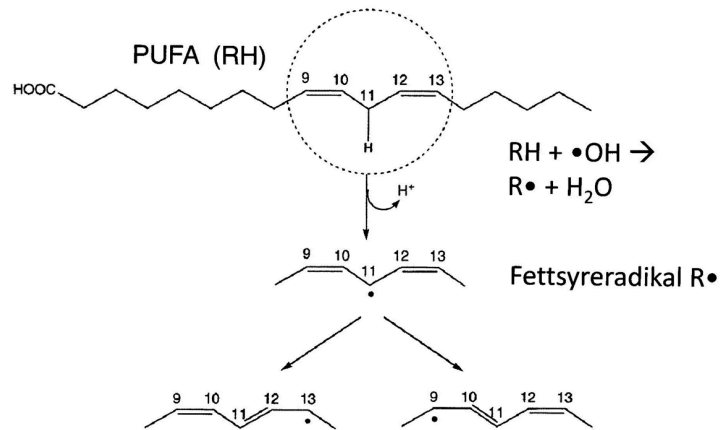
2.3 Oksidasjon av fettsyrer

Oljer som er rike på LC-PUFA er kjent for sine ernæringsmessige fordeler, men lipidoksidasjon begrenser utnyttelsen av slike oljer i prosessert mat og kosttilskudd (Shahidi & Finley, 2001; Frankel, 2005). I oppgaven omtales flerumettede fettsyrer med 20 eller flere karbonatomer, som langkjedete flerumettede fettsyrer. Oksidasjon av marine lipider kan føre til en reduksjon i andelen LC-PUFA (Dulavik *et al.*, 1998). Som en konsekvens av dette kan næringsverdien reduseres og en uønsket harsk lukt og smak dannes, men denne lukten og smaken vil kunne oppdages lenge før det vil kunne detekteres en endring i fettsyresammensetningen (Olsen, 2017). Fettsyrene kan i matvarer bli oksidert gjennom enzymatisk eller ikke-enzymatisk autokatalytiske mekanismer. For marine produkter som inneholder LC-PUFA er sistnevnte klart viktigst.

Oksidasjon skjer ved at et oksygen-molekyl binder seg til en fettsyre og fører til nedbrytning av disse, til mindre og flyktige forbindelser via en tretrinns prosess (autooksidasjon). Tretrinnsprosessen innebærer initiering (induksjon), propagering (kjedereaksjon) og terminering (avslutning) (Olsen, 2017). Dobbelbindingene i LC-PUFA svekker bindingene mellom karbonatom og hydrogen i fettsyren, og fører til at de lettere angripes av et radikal, for eksempel hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) som har et uparet elektron (figur 10). Dette resulterer i at et fettsyreradikal ($\text{R}\bullet$) og vann (H_2O) dannes (induksjon):



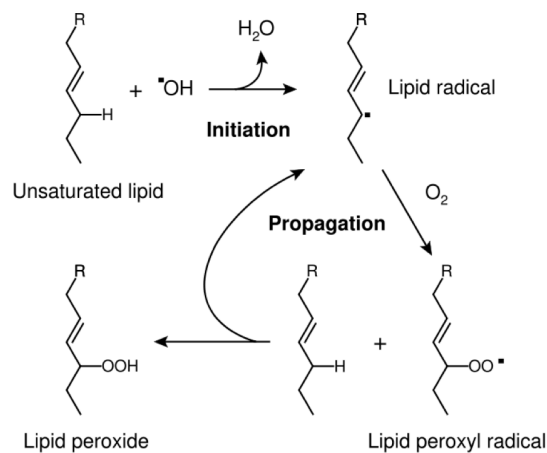
Fettsyreradikalet er ustabilt og har to enkeltbindinger mellom hver dobbeltbinding (DB). Dette fører til en konjugering av dobbeltbindingene, slik at fettsyreradikalet får en enkeltbinding mellom hver DB (figur 10).



Figur 10. Initiering av oksidasjon av en PUFA hvor dobbeltbindingene svekker bindingen mellom karbonatom (n-11) og hydrogen. Dette fører til at bindingen angripes av et radikal (X•) (som i dette tilfellet er •OH), og fører til dannelsen av et fettsyreradikal (R•), vann (H₂O) og et ustabil fettsyreradikal (med to enkeltbindinger mellom hver DB). Deretter konjugerer dobbeltbindingene slik at det bare blir en enkeltbinding mellom dobbeltbindingene (Olsen, 2017).

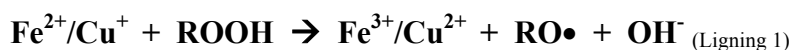
Antall angrepspunkter øker derfor med antall DB i fettsyren, og resulterer i at kjedereaksjonen kan starte raskere.

Fettsyreradikalet (R•) kan raskt reagere med oksygen (O₂) og det dannes et fettsyreperoksidradikal (lipid peroxy radical) (ROO•), som igjen kan angripe en ny umettet fettsyre. Dette resulterer i dannelsen av et fettsyreperoksid (ROOH) (primært oksidasjonsprodukt) og et nytt fettsyreradikal (R•). Reaksjonen videreføres (propagenering) ved at R• reagerer med et nytt oksygen-molekyl og fører til økende mengder av ROOH (figur 11).

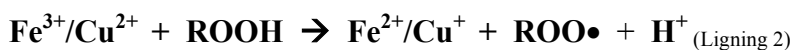


Figur 11. Svekkelsen i bindingen mellom karbon- og hydrogenatomet i PUFA fører til at den angripes av et hydroxylradikal (•OH) og resulterer i dannelsen av H₂O og et fettsyreradikal (R•) (initiering). Rettsyreradikalet (R•) reagerer med O₂, og det dannes et lipid peroxy radikal (ROO•) som igjen reagerer med PUFA. Da er propageneringen startet ved at det dannes et fettsyreperoksid (ROOH) og et fettsyreradikal (R•), som på nytt kan reagere med O₂ (Olsen, 2017).

De primære oksidasjonsproduktene som er uten lukt og smak, er ustabile og kan lett brytes ned til nye radikaler, eksempelvis fettsyrealkylradikaler (RO•) og fettsyreperoksidradikaler (ROO•). Denne nedbrytningen kan forårsakes av transisjonsmetaller (jern og kobber) som virker som kraftige prooksidanter fordi de kan skifte mellom to valenser (Fe²⁺/Fe³⁺ og Cu⁺/Cu²⁺) (Olsen, 2017). Jern og kobber kan katalysere autooksidasjonen, ved at redusert form av jern/kobber (Fe²⁺/Cu⁺) kan reagere med et fettsyreperoksid (ROOH). Som et resultat dannes oksidert form av jern/kobber (Fe³⁺/Cu²⁺), alkylradikal (RO•) og et hydroksid (OH⁻) (ligning 1).



Oksidert form av jern/kobber (Fe³⁺/Cu²⁺) kan også reager med et fettsyreperoksid (ROOH) og resultere i dannelsen av redusert form av jern/kobber (Fe²⁺/Cu⁺), samt fettsyreperoksidradikal (ROO•) og hydrogen (H⁺) (ligning 2).



To fettsyreperoksidmolekyler (2ROOH) kan omdannes til et fettsyreperoksidradikal (ROO•) og et alkylradikal (RO•) med kobber eller jern som katalysator (ligning 3).

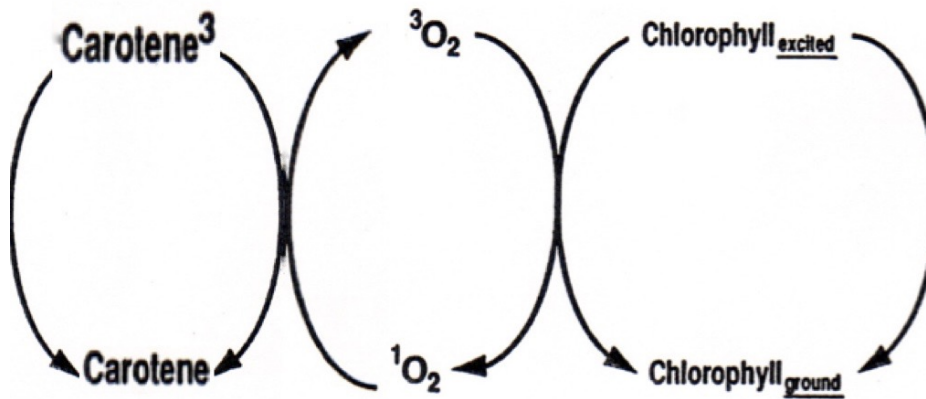


Ustabile fettsyreperoksidradikaler (ROO•) kan reagere med nye umettede fettsyrer og resultere i et nytt fettsyreradikal (R•) og et fettsyreperoksid (ROOH). Det primære oksidasjonsproduktet, fettsyrealkylradikal (RO•), kan alternativt brytes ned og føre til dannelse av alkoholer, aldehyder og ketoner, eksempelvis malondialdehyd (MDA), hexenal, heptenal og nonenal. Dette er sekundære oksidasjonsprodukter, som forårsaker harsk lukt og smak. MDA kan kryssbinde proteiner. Ved store mengder av fettsyrealkylradikalet (RO•), kan det reagere med en ny fettsyre, og danne en hydroksylert fettsyre (ROH) og et fettsyreradikal (R•) som resultat.



Mengden oksidasjonsprodukter vil øke eksponentielt og termineringsfasen vil inntreffe når konsentrasjonen av oksidasjonsproduktene (fetsyreradikaler og fettsyreperoksidradikaler) blir så høy at de tvinges til å reagere med hverandre. Dette fører før til dannelsen av polymere forbindelse, også kalt tertiære oksidasjonsprodukter. Mengden sekundære oksidasjonsprodukter vil så avta og oksidasjonsprosessen opphører (Olsen, 2017).

Mengden antioksidanter tilstede i et produkt, kan påvirke lengden av induksjonsperioden. Den viktigste måten karotenoider, som eksempelvis astaxanthin, fungerer som antioksidant, er hemming av foto-aktivert singlet oksygen dannelse (figur 12).

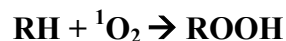


Figur 12. Singel oksygen ($^1\text{O}_2$) som dannes av eksitert klorofyll vil tilbakedannes til grunntilstanden, oksygen ($^3\text{O}_2$), av karotenoider (her karoten). Eksitert karoten (Carotene³) vil gradvis gi fra seg energi. Figur modifisert fra Frankel (2005).

Det som skjer under en slik fotooksidasjon, er av "sensitizers" (som oftest er pigmenter, for eksempel klorofyll) eksiteres til en høyere energitilstand når de utsettes for lys (sensitizer_{eksitert}). Fra vanlig triplet oksygen ($^3\text{O}_2$) vil slike eksiterte sensitizers danne singlet oksygen ($^1\text{O}_2$):



Singlet oksygen ($^1\text{O}_2$) er mer reaktiv enn triplet oksygen ($^3\text{O}_2$), og vil derfor kunne reagere direkte med en flerumettet fettsyre (RH). Dette fører til dannelsen av ROOH direkte:



Karotenoider som astaxanthin og karoten vil tilbakeføre $^1\text{O}_2$ til triplet oksygen ($^3\text{O}_2$) (figur 12).

Oksidasjon av fettsyrer kan påvirkes av flere faktorer som for eksempel tilgangen på oksygen, lys og varme, sammensetningen av fettsyrer, tilstedeværelsen av pro- og antioksidanter, pigmenter, fosfolipider og FFA (se oversiktsartikkel: Choe & Min, 2006). FFA vil kunne fungere som prooksidanter og er mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer som er forestret til alkoholer (Kinsella *et al.*, 1978; Miyashita & Takagi, 1986; Choe, 2008; Olsen, 2017). Det er ofte enzymer (vanligvis fra mikroorganismer) som fører til dannelsen av FFA fra triglyserider (lipaser) og membranlipider (fosfolipaser). Mengden FFA blir derfor ofte benyttet som et kvalitetskriterium (Olsen, 2017).

En metode for å måle oksidasjon i næringsmidler, er analyse av thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS). Dette er en kolorimetrisk metode der MDA-innhold blir bestemt med bruk av thiobarbitursyre. Et rødt pigment vil dannes og kvantifiseres med et spektrofotometer ved 532 nm.

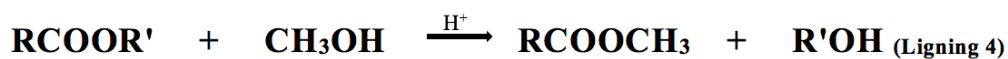
For å forhindre/reducere oksidasjon i næringsmidler, kan det en rekke preventive tiltak benyttes som for eksempel:

- Fjerne/reducere tilgangen på oksygen, for eksempel i lukket beholder med nitrogengass (N₂-gass).
- Redusere energitilgangen, ved å redusere/fjerne tilgangen på lys og varme.
- Inkludering av antioksidanter, eksempelvis butylhydroksytoluen (BHT), etoxyquin, tokoferol eller astaxanthin.
- Redusere/fjerne tilgangen på transisjonsmetaller som kobber og jern.

2.4 Direkte metylering av fettsyrer

For å bestemme fettsyresammensetningen i en biologisk prøve ekstraheres fett vanligvis først fra prøven, ofte med Folchs metode som benytter organiske løsemidler. Deretter hydrolyseres og metyleres fettsyrene. Ved direkte metylering ekstraheres ikke fett i en prøv på forhånd før forsåping og metylering. Fettsyrene i det forsåpbare fett i prøven hydrolyseres og metyleres.

De forsåpbare fettklassene (RCOOR'), for eksempel TAG og fosfolipider, i det ekstraherte fett vil bli hydrolysert med syre og CH₃OH vil metylere de frigjorte fettsyrene (ligning 4).



Prosessen gjøres i et trinn og de metylerte fettsyrene er flyktige og kan analyseres med en gasskromatograf. Direkte metylering kan se ut til å gi et mer presist bilde av fettsyrene og metoden krever liten tid og færre kjemikalier, det vil si ikke løsemidler til ekstraksjon (Christie & Han, 2010). Det er ikke sikkert at man klarer å ekstrahere alle de forsåpbare fettklassene gjennom ekstraksjon av fett i prøven. Direkte metylering blir ofte benyttet i tilfeller hvor små mengder av testmateriale er tilgjengelig, slik som blodprøver.

2.5 Mikrobiologisk stabilitet

Mikroorganismer utgjør sammen med oksidasjon av fett, en av hovedårsakene til bedervelse av sjømatprodukter. Det kan være flere viktige spesifikke faktorer som påvirker den mikrobiologiske stabiliteten i næringsmidler. Flere ulike forhold vil influere på veksten av mikroorganismer, de viktigste er pH, atmosfære, tilgang på vann og næring, temperatur og

konkurrerende flora (Granum, 2015). En rekke fysisk-kjemiske metoder kan hindre eller hemme invadering og formering av uønskede mikroorganismer:

- Nedkjøling eller frysing.
- pH-senkning med svake organiske syrer som maursyre, eddiksyre og melkesyre.
- Senkning av vannaktiviteten (a_w), ved tørking eller tilsats av salt eller sukker.
- Varmebehandling, med koking og autoklaving.
- Pakking i kontrollerte atmosfærer, ved vakuumpakning og/eller tilsats av gasser som N_2 og CO_2 .
- Konserveringsmidler, som for eksempel røyking av mat som kan tilføre kjemikalier som fenoliske forbindelser som kan virke konserverende.

Ofte kombineres flere av disse metodene for en best mulig kontroll av eventuelle mikroorganismer.

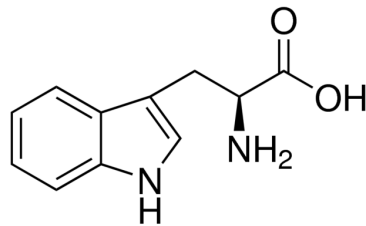
2.6 Kvantifisering av aminosyrer

Proteiner er bygd opp av aminosyrer bundet til hverandre med peptidbindinger. Det fins 20 forskjellige aminosyrer som kan utgjør en del av et protein. For mennesker er det ni og for fisk ti aminosyrer som regnes som essensielle (tabell 2), det vil si at de ikke kan syntetiseres fra andre mellomprodukter i metabolismen og derfor må bli tilført gjennom kosten eller fôret.

Tabell 2. Essensielle aminosyrer og behovet for friske voksne mennesker (mg/g^{-1} protein) for hver av aminosyrene, samt essensielle aminosyrer for fisk og behovet (gKg^{-1} fôrprotein) for hver av aminosyrene. i.e. = ikke essensiell (modifisert fra ²Wilson & Halver, 1986; ¹World Health Organization, 2007).

Aminosyre	Mennesker: Behov mg/g protein ¹	Fisk: Behov mg/g fôrprotein ²
Arg	i.e.	40-50
His	15	15-21
Thr	23	20-40
Ile	30	20-26
Leu	59	33-40
Val	39	30-40
Lys	45	40-60
Met+Cys	22	20-40
Phe+Thr	38	50-65
Trp	6	5
Arg	i.e.	40-50

Tryptofan er en aminosyre som har fått mye oppmerksomhet den siste tiden. Den utgjør en av de ni aminosyrene som er essensielle for mennesker og andre dyr inkludert fisk (tabell 2) (Waagbø *et al.*, 2001; Widmaier *et al.*, 2011).



Figur 13. Struktur av tryptofan.

Tryptofan har en aromatisk indolring i sidekjeden, og den aromatiske sidekjeden gjør den til en relativt upolar (hydrofob) aminosyre (Nelson & Cox, 2008). Aminosyren er også en forløper for flere viktige forbindelser i kroppen, som for eksempel melatonin, tryptamin, serotonin og niacin. I tillegg er den forløperen for koenzymene NAD og NADP. Overdrevent inntak og mangel av tryptofan, er begge skadelig for helsen (se oversiktsartikkel: Sainio *et al.*, 1996). Aminosyren har vist å ha spesielle egenskaper. Det kan se ut til at den blant annet kan ha positiv virkning i forbindelse med irritabel tarmsyndrom, fibromyalgi og kronisk utmattelsessyndrom. I tillegg til allergi og autoimmune sykdommer (se oversiktsartikler: Le Floc'h *et al.*, 2011; Berstad *et al.*, 2015).

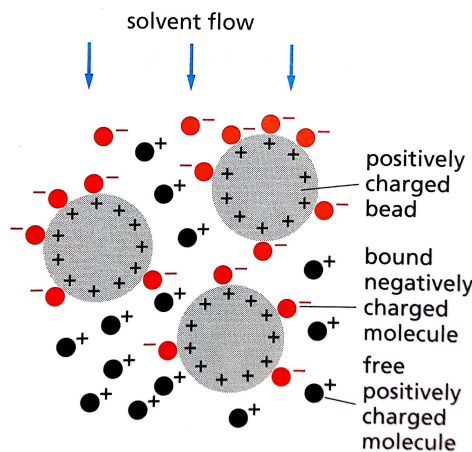
2.6.1 Analyse av aminosyresammensetning

Når aminosyresammensetningen i en biologisk prøve skal bestemmes, må proteinene hydrolyseres til frie aminosyrer. Den mest kjente metoden benytter 6 M saltsyre (HCl) ved 110 °C i 24 timer (Moore & Stein, 1963). Tryptofan ødelegges fullstendig under slike ekstreme betingelser og dette er et velkjent problem med metoden (Hugli & Moore, 1972; Fountoulakis & Lahm, 1998).

På bakgrunn av at HCl-hydrolyse er den mest brukte metoden for måling av aminosyrer innen forskning og matvaredata, finnes det lite info om tryptofan i matvarer og andre biologiske materialer. Det vil derfor være viktig å finne en velegnet metode for analyse av tryptofan. Chiou & Wang (1988) har beskrevet en hydrolysemetode som benytter metansulfonsyre (MSA) i stedet for HCl. Det påstås at denne metoden skal gi en bedre hydrolyse, uten å føre til ødeleggelse av tryptofan, i tillegg til at hydrolysen tar kortere tid, ved at det benyttes høyere temperatur.

2.6.2 Aminosyreanalyse

For separasjon og kvantifisering av aminosyrer benyttes vanligvis ionebytterkromatografi. Ionebyttekromatografi er separering av komponenter i en løsning, med hensyn til deres overflateladning. Metoden baseres på interaksjoner mellom en ladd komponent og et motsatt ladd kromatografisk medium (Alberts *et al.*, 2008). Overflateladninger til aminosyrene varierer med omgivelsenes pH. Generelt vil komponenter binde til en positivt ladd anionebytter når den er over sitt isoelektriske punkt (pI), og når den er under sitt isoelektriske punkt vil det binde til en negativt ladd kationebytter. Det isoelektriske punkt er pH-verdien hvor et molekyl har en netto ladning på null. Elueringen fra kolonnen utføres ved at saltkonsentrasjonen gradvis økes i kolonnen. Da vil komponentene endre sin ladning og elueres ut av kolonnen (GE Healthcare, 2010).



Figur 14. Ionebyttekromatografi av en anionebytter, hvor det separeres på anioner. Anionene fester seg til stasjonærfasen i ulike grad avhengig av deres affinitet (elektrostatisk tiltrekning) til den stasjonære fasens anioniske grupper, mens løsningen skylles gjennom kolonnen (Alberts *et al.*, 2008).

Komponentene med lavest affinitet til kolonnen vil eluere ut først, og deretter vil komponentene eluere ut etter tur, avhengig av affiniteten til kolonnen (Alberts *et al.*, 2008). Aminosyrene med den høyeste affiniteten til kolonnen vil derfor kreve den høyest saltkonsentrasjonen for å eluere ut (figur 14).

I denne oppgaven ble alle aminosyreanalyser utført på BioChrom 30 Amino Acid Analyzer (Biochrom Co, Cambridge, UK). Når prøven tilsettes til kolonnen med en lav buffer (omkring pH=2), vil de positivt ladde aminosyrene bindes sterkest til kolonnen. Deretter vil aminosyreelueringen skje ved at pH-verdien økes gradvis ved å benytte litiumcitratbuffer med ulike pH og ionestyrke. Aminosyrene vil eluere ut av kolonnen når pH-verdien når det isoelektriske punktet til hver enkelt aminosyre.

2.7 Antibakteriell aktivitet

Allerede i 1945 da Alexander Fleming fikk Nobelprisen for oppdagelsen av Penicillin, advarte han mot antibiotikaresistens. Bare kort tid etter antibiotika ble tatt i bruk, ble det observert at patogene bakterier som tidligere kunne bli effektivt behandlet med et antibiotikum, kunne motstå denne effekten. I dag er antibiotikaresistens et raskt voksende problem og utgjør en alvorlig trussel mot global helse.

På bakgrunn av at utnyttelse av produkter innen farmasøytisk industri betegnes som utnyttelsesområdet med høyest verdi, ville det være interessant å undersøke om graksen har antibakterielle egenskaper (molekyler). Tidligere har det blitt vist at proteinhydrolysatet som dannes under utvinningen av Calanus[®] Oil, inneholder molekyler som kan hemme veksten av enkelte bakterier (Jørstad, 2015).

Ofte gjøres testing av antibakteriell aktivitet ved å teste minimum inhiberende konsentrasjonen (MIC). En slik test vil angi den laveste konsentrasjon av test-substansen som hemmer veksten av bakterier. Metoden går hovedsakelig ut på at testmaterialet blir inkubert sammen med bakterier som er i en aktiv vekstfase. Deretter undersøkes den fotometriske veksten over tid, og resultatene vises i form av vekstkurver. Disse kan indikere om test-substansen har en hemmende effekt eller en positiv effekt på veksten av bakteriene som det testes mot.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Kommersiell olje (kalt Calanus[®] Oil), våt grakse, tørket grakse (også kalt pulver) og hydrolysat fra produksjon av Calanus[®] Oil, var levert av firmaet Calanus AS, Tromsø.

Tabell 3. Grakser og hydrolysat benyttet i oppgaven. i.o.= ikke oppgitt.

Materialer	Tilstand	LOT-nr. og produksjonsdato
Grakse 1	Våt grakse	GC-16-0301, 20/01-16
Grakse 2	Tørket grakse/pulver	LOT nr. i.o. 16/08-16
Grakse 3	Våt grakse	GC-16-3301 16/08-16
Hydrolysat 1	Våt hydrolysat	CLH-17-0601, produksjonsdato i.o.

For identifisering av fettsyrer ble fettsyrestandarder fra Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland) benyttet: PUFA-1, PUFA-2, PUFA-3 og Supelco 37 (tabell 4). Graksene ble oppbevart ved - 44 °C og hydrolysatet lageret i kjøleskap (3 °C) i påvente av analysene.

Tabell 4. Fettsyresammensetningen i ulike fettsyrestandarder benyttet for identifisering av fettsyrer i prøvene. Bare fettsyrene som ble benyttet til identifiseringen av fettsyrer i oppgaven er listet opp. x = tilstede i standarden.

Fettsyrer	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3	Supelco 37
14:0	x	x	x	x
16:0	x	x	x	x
16:1 n-7	x	x	x	x
18:0	x	x	x	x
18:1 n-9	x	x	x	x
18:1 n-7	x	x	x	
18:2 n-6	x	x	x	x
18:3 n-3	x	x	x	x
18:4 n-3	x		x	
20:1 n-9	x	x	x	x
20:2 n-6				x
20:4 n-6		x	x	x
20:4 n-3			x	
20:5 n-3	x	x	x	
22:0				x
22:1 n-11	x			
22:1 n-9				x
22:5 n-3	x		x	
22:6 n-3	x	x	x	x
24:1 n-9	x			x

For identifisering av fettklasser ble en kjent standard 16:1 som inneholdt monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG), TAG, FFA, kolesterol, kolesterolester og lecithin fra Nu chek prep (Elysian, MN, USA) benyttet.

Bakteriestammer

Bakterier benyttet til antibakteriell testing (tabell 5) tilhørte forskningsgruppen marin bioprospektering ved Norges fiskerihøgskole.

Tabell 5. Bakteriestammene som ble benyttet ved antibakteriell testing av grakse og væskefasen (supernatanten) av enzymbehandlet grakse.

Gram	Bakterie	Stamme
Positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032
Negativ	<i>Esherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Kjemikalier

Følgende kjemikalier var fra Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland): Bovine Serum Albumin (BSA) ≥ 98 %, Butylated hydroxytoluene $\geq 99,0$ %, Dietyleter $\geq 99,8$ %, Diklormetan (DCM) $\geq 99,9$ %, Eddiksyre $\geq 99,8$ %, Fosforsyre ≥ 85 %, Heptan ≥ 99 %, Isoporpanol (2-Propanol) $\geq 99,8$ %, Kaliumklorid $\geq 99,5$ %, Kloroform 99,0-99,4 %, Meta-cresol-purpur 90 %, Metanol $\geq 99,8$ %, Metansulfonsyre $\geq 99,5$ %, Natriumhydroksid (NaOH) ≥ 98 %, Natriumklorid $\geq 99,5$ %, Propylgallat (renhet ikke spesifisert), Saltsyre (HCl) 37 %, Sulfosalisylyren (SSA) 95-97 %, Svovelsyre 95-97 %, Thiobarbitursyre ≥ 98 %, Tryptamin 98 %, Tryptofan (renhet ikke spesifisert).

Følgende kjemikalier var fra Merck KGaA (Dramstadt, Tyskland): Etylendiamintetraeddiksyre, Kobber(II)sulfat-pentahydrat ≥ 98 %, Malondialdehyd-bis (diethylacetal) > 95 %, Maursyre 98-100 %, Trikloreddiksyre $\geq 99,5$ % (Pro analysis). Oksytetracyklinhydroklorin ≥ 95 % var fra Calbiochem (California, USA) og maursyre 80 % var fra VWR Chemicals (Leuven, Belgium).

Medium benyttet i oppgaven var tillaget ved Norges Fiskerihøgskole. Mueller Hinton agar bestod av 21 g/l Mueller Hinton (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, Frankrike) og 20 g/l agar (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i Milli-Q vann. Mueller Hinton medium bestod av 21 g/l Mueller Hinton (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, Frankrike) i Milli-Q vann. Luria Medium bestod av 10 g/l pepton (trypton) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), 5 g/l gjær (gjærekstrakt for mikrobiologi) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland), 10 g/l NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,

Tyskland), 1 ml/l 1 M NaOH og 15 g/l agar (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i destillert vann (d.H₂O).

Loading buffer benyttet for aminosyreanalyse, laget av lithium citrate buffer (pH 2,2), var fra Biochrom Co. (Cambridge, UK). Standarder benyttet for aminosyreanalyse; A6407, A6282, glutamin og Norleucine (Nle) var alle fra Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland). Milli-Q vann og d.H₂O ble benyttet (Millipore Corp, Massachusetts, USA). Alcalase[®] var fra Novozymes (København, Danmark).

3.2 Metoder

3.2.1 Mikrobiologisk stabilitet

Det ble blandet tre vandige maursyreløsninger som bestod av ulike konsentrasjoner av 98-100% maursyre: 0,5, 1,0 og 1,5 %. Deretter ble 10 g grakse (grakse 1) blandet med 40 ml av maursyreløsningene, slik at graksene fikk en pH på 3,6, 3,1 og 2,9 ved starten av forsøket. pH ble målt med Metrohm 744 pH meter (Herisau, Sveits). Graksen med maursyre ble lagret i fire måneder ved - 44 °C i påvente av analysene. I en stomacerpose ble 10 g grakse med ulike konsentrasjoner av maursyre og 90 ml steril 0,9 % NaCl tilsatt. Dette ble homogenisert med Stomacer 400 (Seward, London, UK) i 60 sekunder. Løsningene ble fortynnet med steril 0,9 % NaCl til fortynningene 1:10, 1:100 og 1:1000 og platet ut på agarplater laget av Luria medium. Det ble laget to paralleller av hver fortynning, hvor en av parallellene ble lagret ved romtemperatur og den andre ved 37 °C. Etter fem dager ble antall kolonier på hver av platene telt.

3.2.2 Oksidativ stabilitet

Våt grakse

Grakse (grakse 1) som var maursyrestabilisert med 1,5 % maursyre, ble satt opp i et parallelt lagringsforsøk i totalt 12 uker. Graksen som ikke var maursyrestabilisert, ble lagret ved - 44°C med N₂-gass (nullprøve). Luft- og lystette 500 ml bokser ble tilsatt grakse slik at den fylte omtrent halve beholderen. Beholderne med og uten tilsatt N₂-gass (AGA, Oslo) ble plassert i romtemperatur (cirka 22 °C). Ved lagringsforsøkets start og ved de aktuelle uttakene ble det tatt ut prøver fra det øvre og midterste laget fra hver av beholderne. Prøvene ble lagret ved - 44 °C med N₂-gass i påvente av de ulike analysene. De aktuelle beholderne hvor oksygenet var erstattet med N₂-gass ved starttidspunktet, ble fylt med N₂-gass etter uttakene for videre lagring. Graden av oksidasjon ble undersøkt ved å måle mengden thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS) og ved å analysere fettsyresammensetningen med direkte metylering. Mengden frie fettsyrer ble også målt ved noen av uttakene.

Tørket grakse

Tørket grakse (grakse 2) ble satt opp i et parallelt lagringsforsøk. Det ble tilsatt 10 g grakse til luft- og lystette 100 ml bokser, og disse ble fordelt på to områder: mørkt i kjøleskap (3 °C) med åpent lokk, og mørkt i romtemperatur (22 °C) med lukket lokk. For prøvene som ble lagret ved romtemperatur, ble det satt opp to paralleller, lagret med N₂-gass og uten N₂-gass. Det ble satt

opp tre paralleller for hver av lagringsbetingelsene og som nullprøve ble det lagret en grakseprøve ved - 44 °C med N₂-gass ved lagringsforsøket start. Uttakene ble gjort etter lagring av graksen i 0, 2, 4 og 6 uker. De aktuelle beholderne hvor oksygenet var erstattet med N₂-gass ved starttidspunktet, ble fylt med N₂-gass etter uttakene for videre lagring. Uttakene ble lagret med N₂-gass ved - 44 °C i påvente av de ulike analysene. Graden av oksidasjon ble undersøkt ved å måle TBARS.

3.2.3 Vanninnhold

Vanninnhold ble bestemt for alle graksene som ble benyttet. Det ble tilsatt 2 g grakse i en forhåndveid aluminiumskål og vekten ble notert. For hver av graksene ble det satt opp tre paralleller. Skålene ble inkubert i varmeskap ved 105 °C i 48 timer. Totalt vanninnhold ble beregnet ut fra differansen mellom vekten før og etter tørking. Vanninnholdet (%) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{våtvekt (g)} - \text{tørrvekt (g)}}{\text{våtvekt (g)}} * 100 \%$$

3.2.4 Askeinnhold

Ved bestemmelse av askeinnhold ble de vannfrie prøvene satt i en forbrenningsovn ved 540 °C i 16 timer, før de på nytt ble veid. For hver av graksene ble det satt opp tre paralleller. Askeinnholdet ble beregnet ved bruk av følgende formel:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{våtvekt(g)} - \text{vekt etter tørking og forbrenning(g)}}{\text{våtvekt(g)}} * 100 \%$$

3.2.5 Fettekstraksjon

Fettekstraksjonen ble utført med en modifisert metode opprinnelig beskrevet av Folch *et al.* (1957). I et teflonrør ble 1 del grakse og 20 deler diklorometan:methanol (DCM:MeOH) (2:1) tilsatt, som oftest 1 g grakse og 20 ml DCM:MeOH (2:1). Prøvene ble blandet i 30 minutter med en automatisk Multi Reax homogenisator (Heidolph Instruments GmbH & Co, KG; Schwabach, Tyskland). Løsningen ble filtrert med Whatman[®] foldefilter (125 mm diamenter, 597 1/2) (GE healthcare, England) som var fuktet med DCM:MeOH (2:1), over i nye teflonrør. Filtratet ble vasket med 0,2 ganger mengden løsning med 0,9 % NaCl, som oftest 4 ml, og deretter godt blandet med VF2 vortex (IKA-WERKE GmbH & Co. HG, Staufen, Tyskland).

Løsningen ble så sentrifugert i en Heraeus Multifuge 1 S-R sentrifuge (Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) ved 2000 x g i 10 minutter. Den øverste fasen ble fjernet, og den nederste fasen (organisk fase) ble overført til et forhåndsveid glass og dampet til tørrhet med N₂-gass.

Følgende formel ble benyttet til å beregne fettprosent:

$$\text{Fettprosent (\%)} = \frac{(\text{vekt A} - \text{vekt 0})}{\text{innveid mengde prøve (g)}} \times 100 \%$$

Hvor:

Vekt A = vekt av rundkolbe etter at løsemiddel er dampet av.

Vekt 0 = vekt av tom rundkolbe.

3.2.6 Metylering

Ekstrahert fett fra grakse ble metylert som beskrevet av Stoffel *et al.* (1959). Fettprøven ble løst til 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1) og 100 µl av løsningen ble overført til Duran GL18 Kimaxrør (Fisher Scientific, USA). Deretter ble 0,9 ml DCM og 2 ml 2 % H₂SO₄ i metanol tilsatt. Prøvene ble satt i varmeblokk ved 100 °C i en time. Til løsningen ble det tilført 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl og prøvene ble blandet i 30 sekunder med VF2 vortex. Den øverste fasen (heptanfasen) ble overført til dramsglass og dampet til tørrhet med N₂-gass. Prøvene ble resuspendert i 100 µl heptan og overført til GC-rør før analyse av fettsyresammensetningen ble bestemt med en gasskromatograf.

3.2.7 Direkte metylering

Direkte metylering baseres på metoden av Stoffel *et al.* (1959), beskrevet av Viga & Grahl-Nielsen (1990) og modifisert av Dulavik *et al.* (1998). I Duran GL18 Kimax-rør ble det veid ut 60 mg grakse og tilsatt 2,4 ml 2 M HCl i metanol med 0,05 % BHT. Prøvene ble varmet opp i en varmeblokk ved 100 °C i 2 timer og så ble 2,4 ml vann og 12 ml heptan tilsatt. Den øverste fasen ble pipettert over i dramsglass og dampet til tørrhet med N₂-gass. Fettet ble resuspendert i 50 µl heptan og overført til GC-rør før analyse av fettsyresammensetningen ble bestemt med en gasskromatograf.

3.2.8 Fettsyresammensetning

Metylerte fettsyrer ble separert med en Agilent 6890N gasskromatograf (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med 7683 autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor. Det ble brukt en Varian CP7419 kapillærkolonne (50 m x 250 µm nominal, Varian Inc., Middelburg, Nederland) med helium (AGA, Oslo) som bæregass. Temperaturen på injektoren ble satt til 240 °C, og

temperaturen på detektoren ble satt til 250 °C. Kjente fettsyrestandarder (PUFA-1, PUFA-2, PUFA-3 og Supelco 37) ble brukt for å identifisere fettsyrene i de ulike prøvene. Fettsyrer med en areal % under 0,5 %, ble ekskludert fra kromatogrammet.

3.2.9 Fettklassesammensetning

Lipidklasser i ekstrahert fett fra graksen og i Calanus[®] Oil, ble separert med tynnsljikt-kromatografi (TLC). Ekstrahert fett ble fortynt i DCM:MeOH (2:1) til ønsket fortykning. På en High performance thin layer chromatography (HP-TLC) Silica gel 60 (10 x 10 cm) plate ble 2 µl av prøven avsatt. Det ble tilsatt en elueringsløsning som bestod av heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) til et elueringskar. Deretter ble platen satt på skrå i elueringskarre, og karret ble lukket. Når mobilfasen var omentrent 1 cm fra toppen av platen, ble den tatt ut og tørket. Som beskrevet av Vaghela & Kilara (1995), ble platen sprayet med 10 % kobbersulfat i 8 % fosforsyre. Når platen hadde lufttørket ble den satt i varmeskap og fremkalt med oppvarming til varmeskapet hadde oppnådd 180 °C. Fettklassene ble identifisert ved å sammenligne båndmønstret en kjent TLC-standarder (16:1).

3.2.10 Frie fettsyrer

Andelen FFA i fett ekstrahert fra grakse og i Calanus[®] Oil ble målt ved å benytte titreringsmetoden beskrevet av Ke *et al.* (1976). Det ble veid ut 0,1 g fett ekstrahert fra graksen med Folchs metode og 0,1 g Calanus[®] Oil. Dette ble løst opp i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol (2:1:2). Det ble tilsatt 4 dråper 0,5 % meta-cresolpurpur indikator og titrert med 0,05 M NaOH til det ble observert et omslag til fiolett farge. På samme måte ble en blindprøve med løsemiddel og indikator titrert. For hver prøve ble det analysert minimum to paralleller.

Andelen FFA (%) ble beregnet med følgende formel:

$$\text{FFA (\%)} = \frac{(pr-bl) \times M \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right) \times 282 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{m(\text{g}) \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{l}}\right)} \times 100 \%$$

Hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml).

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml).

M = molaritet av NaOH (0,05 mol/l).

282 = molekylvekt av oljesyre (g/mol).

m = vekt av prøve (g).

3.2.11 Måling av TBARS

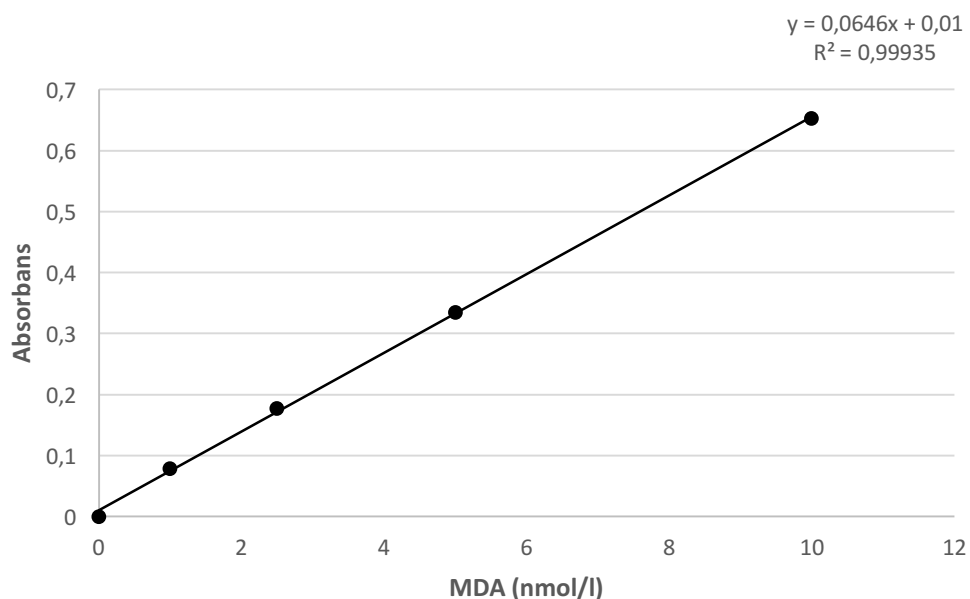
Utviklingen av sekundære oksidasjonsprodukter i løpet av lagringsforsøket av grakse (grakse 1 og 2) ble analysert ved å måle mengden thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS) etter metoden som beskrevet av Witte *et al.* (1970) og Dulavik *et al.* (1998). Det ble tilsatt grakse (4 g av våt grakse og 2 g av tørket grakse) i et 50 ml sentrifugerør. MDA ble ekstrahert ved å tilsette ekstraksjonsløsning (15 ml til våt grakse og 20 ml til tørket grakse) som bestod av 10 % trikloreddiksyre (TCA), 0,1 % propylgallat og 0,1 % etylendiamintetraeddiksyre (EDTA). Rørene ble inkubert i vannbad ved 100 °C i 30 minutter. Etter varmebehandlingen ble prøvene filtrert med Whatman® foldefilter (125 mm diamenter, 597 1/2) over i nye sentrifugerør. I et eppendorfrør ble det tilsatt 1 ml ekstrakt og 1 ml thiobarbitursyrereagens-reagens som bestod av 0,6 % thiobarbitursyre. Det ble stukket hull i lokket til eppendorfrørene før prøvene ble oppvarmet i en varmblokk i 30 minutter ved 100 °C. Deretter ble absorpsjonen målt med GENESYS™ 20 spektrofotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) ved 532 nm. Det ble laget en nullprøve (0 nmol/L MDA) som var behandlet på samme måte som de andre prøvene, som ble brukt til å nullstille spektrofotometeret. Prøvene ble fortynnet med ekstraksjonsløsning dersom det var nødvendig som følge av for høy absorpsjon.

Det ble laget en standardkurve som senere skulle benyttes for beregning av TBARS i de aktuelle prøvene. Til standardkurven ble standardløsning MDA som inneholdt 100 µl stamløsning MDA (1 µmol/L MDA løst i ekstraksjonsløsning) tilsatt i 9,9 mL ekstraksjonsløsning benyttet. Denne ble fortynnet til ulike konsentrasjoner for å lage en standardkurve (0-10 nmol/L MDA) (tabell 6 og figur 15). Det ble laget to paralleller av hver konsentrasjon, sett bort fra nullprøven (0 nmol/L MDA).

Tabell 6. Innholdet i de ulike prøvene med ulike konsentrasjon av MDA, benyttet for å lage en standardkurve for beregning av TBARS i prøvene.

TBA-reagens (ml)	Ekstraksjonsløsning (TCA) (ml)	Standardløsning MDA (ml)	Konsentrasjon MDA (nmol/L)
1	0	1	10
1	0,5	0,5	5
1	0,75	2,5	2,5
1	0,9	0,1	1
1	0	0	0

Absorpsjonen i prøvene til standardkurven ble målt med GENESYS™ 20 spektrofotometer ved 532 nm. Standarden med en konsentrasjon på 0 nmol/L MDA (nullprøven), som var behandlet på samme måte som de andre prøvene, ble benyttet for å nullstille spektrofotometeret.



Figur 15. Standardkurve for absorpsjon av MDA (nmol/ml) mål ved 532 nm.

Deretter ble ligningen til standardkurven brukt for å beregne nmol MDA-eq/ml ekstrakt i graksen:

$$\text{nmol MDA-eq/l ekstrakt} = \frac{(\text{avlest absorbans} - \text{b-leddet i ligningen})}{\text{a-leddet i ligningen}}$$

nmol MDA-eq/g prøve ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{nmol MDA-eq/l ekstrakt} = \frac{(\text{nmol MDA-eq/l ekstrakt} * 15\text{ml})}{4 \text{ g muskel} * 1000 \text{ ml/l}}$$

3.2.12 Måling av pH

Et Metrohm 744 pH-meter ble benyttet for å måle pH ved romtemperatur i en suspensjon av 1 del grakse og 1 del 0,15 M KCl. Instrument ble også brukt for måling av pH i andre løsninger.

3.3 Eksperimenter

3.3.1 Enzymbehandling av grakse

En del grakse ble tilsatt tre deler d.H₂O, og Alcalase[®] slik at enzymet utgjorde 0,5 % av vekten til blandingen. Blandingen ble satt på omrøring i 10 minutter med magnetrører, og fordelt på to rør. Et av rørene ble inkubert i 2 timer, mens det andre ble inkubert i 20 timer i vannbad ved 50 °C med omrøring. De siste 10 minuttene av inkubasjonen ble rørene varmet opp til 95 °C. Prøven som ble inkubert i 2 timer ble lagret i kjøleskap over natten. Prøvene ble så sentrifugert med en Heraeus Multifuge 1 S-R sentrifuge ved 3700 x g i 30 minutter ved 40 °C. Tilsvarende prøver hvor det ikke var tilsatt Alcalase[®] ble behandlet på samme måte (kontroll). Væskefasen (supernatant) og pelleten ble fryselagret hver for seg ved - 44 °C for senere testing av antibakteriell aktivitet av væskefasen, i tillegg til måling av fettinnhold og fettklassesammensetning i fett ekstrahert fra pelleten.

3.3.2 Antibakteriell testing

Det ble gjort en antibakteriell test av tørket grakse (grakse 2) (20 mg/ml) og av væskefasen (supernatanten) (fortynnet til 20 mg/ml protein) fra grakse (grakse 3) som var inkubert med Alcalase[®] i 20 timer. Dette ble gjort med et MIC-assay.

Bakteriesuspensjonene ble forberedt ved at en rendyrket bakteriekoloni fra hver av stammene ble inokulert med 5 ml Mueller Hinton medium. Bakterieløsningen ble inkubert over natten med risting i romtemperatur (cirka 22 °C). Neste dag ble 20 µl bakteriekultur overført til 5 ml Mueller Hinton medium og satt på risting i 2 timer. Bakteriekonsentrasjonen i suspensjonen ble målt med optical density (OD) 600 nm med BioMate 3 spektrofotometer (Thermo Spectronic, New York, USA). Bakteriesuspensjonene ble så fortynnet med Mueller Hinton medium til en konsentrasjon på $2,5-3,0 \times 10^4$ bakterier/ml. I en 96 brønners mikrotiter plate (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark) ble testløsningene (50 µl) tilsatt i en fortynningsrekke. Konsentrasjonen av testmaterialet (av grakse og væskefasen) i fortynningsrekka var 5,00, 2,50, 1,25, 0,63, 0,31, 0,16, 0,08 og 0,04 mg/ml. Det ble satt opp to paralleller for hver av testsubstansene. Det ble så tilsatt 50 µl av de aktuelle bakteriesuspensjonene ($2,5-3,0 \times 10^4$ celler/ml) til alle brønnene. Det ble bare tilsatt en type bakterie pr. plate. Bakteriene som ble benyttet i dette forsøket var; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus*. Milli-Q vann ble benyttet som negativ vekstkontroll og som positiv kontroll ble oksytetracyklin (40µM) benyttet.

Platene ble dekket med forseglingsfilm (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark) og det ble stukket i et hull i forseglingsfilmen over hver av brønnene. En EnVision Multilabel Reader plateleser (Perkin Elmer, Turku, Finland) ble brukt for å måle absorbansen ved 595 nm i hver av brønnene. Prøvene ble automatisk ristet i 15 sekunder før avlesning ved dag 0 og dag 1.

MIC ble vurdert ved å benytte vekstkontrollene for å sammenligne OD-verdiene i prøvemateriale ved forskjellige konsentrasjoner. Prøvematerialet ble ansett som aktivt i tilfeller hvor OD-verdiene ikke hadde økt i løpet av inkuberingen. Platene ble også avlest visuelt etter inkuberingen. Prøven ble betegnet som ikke aktivt i brønner hvor bakterieveksten hadde ført til et grumset innhold, og ble betegnet som aktiv i brønner hvor væsken var gjennomsiktig matt. En eventuell vurdering av MIC i prøvematerialet, ble satt der hvor den laveste konsentrasjonen av prøvemateriale var tilsatt og bakterievekst ikke var synlig.

3.3.3 Tryptofaninnhold

3.3.3.1 Stabiliteten av tryptofan ved svak sur pH

Stabiliteten av ren tryptofan ble undersøkt ved ulike lagringsbetingelser. Det ble tilsatt 1 ml 20 mM tryptofan i to Falconrør. Til et av rørene ble 19 ml d.H₂O tilsatt og til det andre røret ble 18,9 ml d.H₂O og 100 µl 80 % maursyre tilsatt slik at pH ble 2,7. Innholdet i rørene ble fordelt i to nye rør, det ene ble inkubert i romtemperatur (22 °C) og det andre ved 50 °C. Det ble gjort uttak fra prøvene ved dag 1, 4, 8, 11, 15, 18 og 22. Prøvene ble oppbevart ved -44 °C i påvente av analysen. En Nle-løsning ble laget ved å tilsette 1 ml 20 mM norleucine til 19 ml d.H₂O. Til et eppendorfrør ble det tilsatt 100 µl norleucineløsning, sammen med 100 µl av den aktuelle tryptofanprøven og 200 µl loading buffer. Til et analyserør ble 200 µl av denne løsningen tilsatt og analysert med en aminosyreanalysator. Mengden tryptofan ble regnet ut på følgende måte:

$$\frac{\text{Mengde Trp}}{\text{Mengde Nle}} * (\text{Nle tilsatt (ml)} * \text{konsentrasjon Nle } (\mu\text{mol/ml})) = \frac{\text{Mengde Trp } (\mu\text{mol})}{\text{Trp tilsatt (ml)}}$$

3.3.3.2 Måling av frie aminosyrer

Det ble veid ut 1 g hydrolysat i et sentrifugerør og tilsatt 1 ml 20 mM norleucine og 9 ml d.H₂O. Løsningen ble godt blandet med VF2 vortex, og videre ble 1 ml 35 % SSA ble tilsatt. Prøven ble så sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter. Til et analyserør ble 200 µl supernatant hatt sammen med 800 µl loadingbuffer. Prøven ble så analysert med en aminosyreanalysator. Det ble også målt frie aminosyrer i hydrolysatet, tilsatt 1 ml 20 mM tryptofan, 1 ml 20 mM norleucine og 8 ml d.H₂O.

3.3.3.3 Analyse av total aminosyresammensetning etter hydrolyse med HCl

For å undersøke mengden tryptofan i hydrolysatet (se punkt 3.1) ble det forsøkt å gjøre en standard hydrolyse med 6 M HCl (Moore & Stein, 1963). Det ble satt opp to paralleller for hver av prøvene. Den ene bestod av 200 mg hydrolysat og 500 µl d.H₂O, og den andre av 500 mg hydrolysat og 200 µl d.H₂O. Oppsettet for innholdet av de ulike løsningene i hver av prøvene er presentert i tabell 7.

Tabell 7. Innhold av løsninger i prøver for analyse av tryptofan etter hydrolyse med HCl.

	Hydrolysat	20 mM norleucine	d.H ₂ O	HCl
1	200 mg	500 µl	500 µl	1,2 ml
2	500 mg	500 µl	200 µl	1,2 ml

Når alle løsningene var tilsatt ble beholderen flushet med N₂-gass i 15 sekunder. Lokket ble skrudd på og prøvene ble satt i varmeskap ved 110°C i ett døgn. Prøvene ble avkjølt og deretter ble 50 µl av prøven overført til analyserør og dampet til tørrhet med N₂-gass. Det ble tilsatt 1 ml loadingbuffer til hver av prøvene og de ble analysert med en aminosyreanalysator.

3.3.3.4 Analyse av total aminosyresammensetning etter hydrolyse med MSA-metoden

Det ble så utført en MSA-hydrolyse av proteinene i hydrolysatet (Chiou & Wang, 1988), og det ble satt opp to paralleller for hver av prøvene. Den ene bestod av hydrolysat og den andre av vann, og begge ble tilsatt norleucine. Disse ble fordelt i fire rør, hvor kun to av rørene ble tilsatt 20 mM tryptofan. Til et av disse rørene ble det tilsatt 4 M MSA + 0,2 % tryptamin og til det andre 4 M MSA + 0,4 % tryptamin. Oppsettet for innholdet av de ulike løsningene i hver av prøvene er presentert i tabell 8.

Tabell 8. Innhold av løsninger i prøver for analyse av tryptofan med MSA-metoden. MSA = metansulfonsyre. TRP = tryptofan. - = ikke tilsatt.

	Testmateriale (200 mg)	20 mM norleucine	4 M MSA + 0,2 % tryptamin	4 M MSA + 0,4 % tryptamin	20 mM TRP
1	d.H ₂ O	100 µl	1,6 ml	-	-
2	d.H ₂ O	100 µl	-	1,6 ml	-
3	Hydrolysat	100 µl	1,6 ml	-	-
4	Hydrolysat	100 µl	-	1,6 ml	-
5	Hydrolysat	100 µl	1,6 ml	-	100 µl
6	Hydrolysat	100 µl	-	1,6 ml	100 µl
7	d.H ₂ O	100 µl	1,6 ml	-	100 µl
8	d.H ₂ O	100 µl	-	1,6 ml	100 µl

I en forhåndsvarmet varmeblokk ble hydrolysen utført i et varmeskap ved 150 °C i 2 timer. Deretter ble prøvene avkjølt før pH ble målt med et Metrohm 744 pH-meter og den ble justert til pH 2. For pH-justering ble det benyttet 4,2 M NaOH til grovjustering, og 1 M NaOH til finjustering. Hvis pH ble for høy, ble den justert tilbake med 3 M HCl. I et analyserør ble 100 µl av prøven tilsatt til 900 µl loadingbuffer. Prøvene ble analysert med en aminosyreanalysator.

3.3.3.5 MSA-hydrolyse av BSA

MSA-hydrolysen ble også utført ved å benytte BSA. Det ble satt opp to prøver med BSA, 20 mM norleucine og 4 M MSA + 0,2 % tryptamin, hvor kun den ene ble tilsatt 20 mM tryptofan. Oppsettet for innholdet av de ulike løsningene i hver av prøvene er presentert i tabell 9.

Tabell 9. Innhold av løsninger i prøver for analyse av tryptofan med MSA-metoden tilsatt BSA. BSA = bovine serum albumin. x = ikke tilsatt

	Testmateriale (200 mg)	20 mM norleucine	4 M MSA + 0,2 % tryptamin	20 mM tryptofan
1	200 µl BSA	100 µl	1,6 ml	x
2	200 µl BSA	100 µl	1,6 ml	100 µl

Hydrolysen ble gjennomført som beskrevet under punkt 3.3.3.4.

3.3.4 Aminosyreanalyse

Det ble benyttet kromatografisk separasjon med ionebyttekolonne for å analysere det preparerte materialet. Lithium citratbuffer med pH 2,2 ble benyttet for å skille ut aminosyrene med hensyn til ionestyrken. For å kvantifisere mengden av de ulike aminosyrene ble aminosyrene utsatt for et varmeprogram som var forhåndsbestemt, for å føre til en reaksjon med ninhydrin. En Biochrom 30 aminosyreanalysator (Biochrom Co, Cambridge, UK) ble benyttet for å gjennomføre analysene. Chromeleon software (Dionex, Sunnyvale, California, USA) ble brukt for å måle UV-absorbansen. Deretter ble ulike standardkurver benyttet for å kvantifisere resultatene. Til dette ble A6407 og A6268 som henholdsvis er sure nøytrale og basiske aminosyrer, i tillegg til glutamin og Nle benyttet. For å finne mengden av hver enkelt aminosyre ble følgende formel benyttet:

$$\text{Mengde AS } (\mu\text{mol/g}) = \frac{\frac{\text{Mengde AS}}{\text{Mengde Nle}} \times (\text{Tilsatt mengde Nle (ml)} \times \text{konsentrasjon Nle } (\mu\text{mol/ml}))}{\text{Mengde prøve (g)}}$$

Hvor:

Mengde AS = Mengde aminosyre som ble detektert ut fra absorbansen med hensyn til standardkurven.

Mengde Nle = Mengde norleucine som ble detektert ut fra absorbansen med hensyn til standardkurven.

Tilsatt mengde Nle = Mengde tilsatt norleucine (internstandard), som ble tilsatt i forkant av analysen.

Konsentrasjon Nle = Konsentrasjon av norleucine (internstandard) som ble tilsatt i forkant av analysen.

Mengde prøve (g) = Mengden utveid materiale benyttet i analysen.

Mengden av hver av aminosyrene ($\mu\text{mol/g}$) ble omregnet til mg/g prøve med følgende ligning:

$$\frac{\text{Mengde AS } (\mu\text{ mol/g}) \times \text{Molekylvekten til AS}}{1000} = \text{mg AS/g prøve}$$

4 Resultater

4.1 Sammensetning av graksene

Analysene viste at grakse 1 hadde et vann- og fettinnhold på henholdsvis 51,9 % og 10,6 % (tørrvekstbasis) og ekstrahert fett fra grakse 1 inneholdt 28,4 % FFA. Grakse 2 hadde et vann-, fett- og askeinnhold på henholdsvis 3,3, 21,7 og 5,9 %. Innholdet av FFA i fett ekstrahert fra grakse 2 var 13,2 %. Grakse 3 hadde et vann-, fett- og askeinnhold på henholdsvis 70,0 % 22,8 % og 9,9 % (tabell 10).

Tabell 10. Innhold av fett, vann, aske og FFA i grakse 1, 2 og 3 undersøkt i oppgaven. IA = ikke analysert. TS = Tørrvekstbasis. FFA = Frie fettsyrer. Standardavvik er basert på analyser av 2 til 9 paralleller av samme prøve.

Grakser	Vann (%)	Fett (% TS)	Aske (% TS)	FFA (%)
1	51,9 (n=2)	10,6 ± 1,2 (n=3)	IA	28,4 ± 4,9 (n=3)
2	3,3 ± 0,0 (n=3)	21,7 ± 2,5 (n=9)	5,9 ± 0,1 (n=3)	13,2 (n=2)
3	70,0 ± 0,2 (n=3)	22,8 ± 0,7 (n=3)	9,9 ± 0,0 (n=3)	IA

4.2 Fettsyresammensetning av grakse

Fett ekstrahert fra graksen (grakse 1) med Folchs metode viste et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $6,2 \pm 0,5$, $16,1 \pm 1,2$ og $17,0 \pm 1,3$ %. Totalt LC n-3 (DHA, dokosapentaensyre; DPA og EPA) var på 34,7 (tabell 11, kolonne A). Etter direkte metylering av graksen, ble SDA, EPA og DHA bestemt til henholdsvis $10,4 \pm 0,2$, $21,9 \pm 0,3$ og $19,4 \pm 0,3$ %. Totalt LC n-3 ble funnet å være 41,3 % (kolonne C). Ved direkte metylering av restproduktet etter ekstraksjonen med Folchs metode var innholdet $6,9 \pm 0,2$ % SDA, $19,2 \pm 0,1$ % EPA og $24,8 \pm 0,5$ % DHA. Totalt LC n-3 var på 45,6 % (kolonne B).

Tabell 11. Fettsyresammensetningen (areal %) i fett ekstrahert fra grakse (grakse 1) med Folchs metode (A), i restproduktet etter ekstrahering med folchs metode, analysert med direkte metylering (B) og i direkte metylert grakse (C). ID=ikke detektert. Standardavvik er basert på analyser av 9 (A), og 3 (B og C) paralleller av samme prøve.

Fettsyrer	A	B	C
14:0	$12,7 \pm 0,9$	$8,6 \pm 0,7$	$14,2 \pm 0,2$
16:0	$12,2 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,2$	$11,3 \pm 0,1$
16:1 n-7	$5,2 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,1$
18:0	$1,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,2$
18:1 n-9	$5,1 \pm 3,5$	$2,9 \pm 0,0$	$2,4 \pm 0,2$
18:1 n-7	ID	$1,2 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,1$
18:2 n-6	$1,6 \pm 1,0$	$1,1 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,1$
18:3 n-3	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,0$
18:4 n-3	$6,2 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,2$	$10,4 \pm 0,2$
20:1 n-9	$1,5 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$
20:4 n-6	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,0$
20:4 n-3	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
20:5 n-3	$16,1 \pm 1,2$	$19,2 \pm 0,1$	$21,9 \pm 0,3$
22:1 n-11	$2,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,0$
22:5 n-3	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,0$	ID
22:6 n-3	$17,0 \pm 1,3$	$24,8 \pm 0,5$	$19,4 \pm 0,3$
24:1 n-9	$1,8 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,0$
Total FA	87,2	92,6	93,7
Total n-3	42	53,4	52,6
Total LC n-3	34,7	45,6	41,3

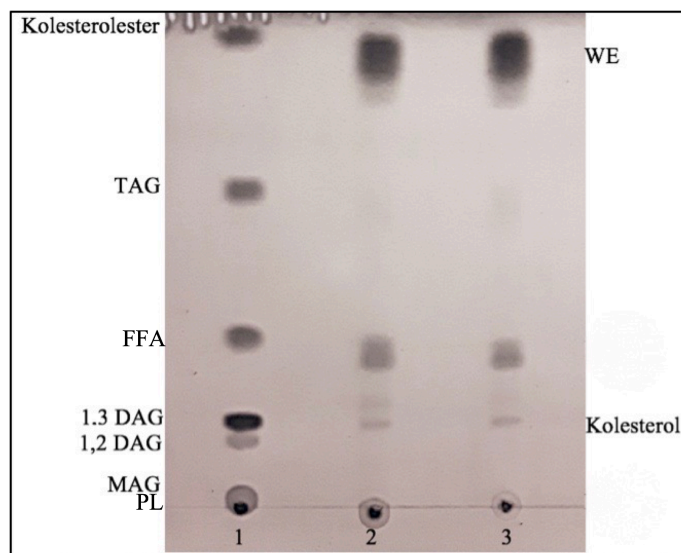
Fettsyresammensetningen i tørket grakse (grakse 2) ble målt med direkte metylering (A), som resulterte i en fettsyresammensetning hvor totalt LC n-3 (DHA, DPA og EPA) utgjorde 29,2 % av fettsyrene og SDA $16,3 \pm 0,6$ %. Fett ekstrahert med Folchs metode og metylert (B) resulterte i et innhold på 27,3 % av totalt LC-PUFA og $13,9 \pm 0,3$ % SDA. Fettsyresammensetningen av metylert Calanus[®] Oil (C), viste et innhold av totalt LC-PUFA på 28,7 %. SDA utgjorde 14,7 %.

Tabell 12. Fettsyresammensetningen (areal %) i fett fra tørket grakse (grakse 2) målt etter direkte metylering (A), i fett etter ekstraksjon med Folchs metode (B) og i Calanus[®] Oil (C). Standardavvik er basert på analyser av 4 (A), 3 (B) og 2 (C) paralleller av samme prøve.

Fettsyrer	A	B	C
14:0	13,4 ± 0,7	13,0 ± 1,2	18,6
16:0	12,8 ± 0,3	14,4 ± 0,9	12,2
16:1 n-7	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,4
18:0	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9
18:1 n-9	3,0 ± 0,1	8,5 ± 2,1	5,1
18:2 n-6	1,4 ± 0,0	2,6 ± 0,7	1,6
18:3 n-3	2,6 ± 0,0	2,9 ± 0,2	1,9
18:4 n-3	16,3 ± 0,6	13,9 ± 0,3	14,7
20:1n-9	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1	2,7
20:4 n-3	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2
20:5 n-3	13,9 ± 0,2	12,9 ± 0,3	14,0
22:1n-11	5,4 ± 0,5	5,0 ± 0,2	4,9
22:5 n-3	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6
22:6 n-3	13,2 ± 0,1	12,5 ± 0,3	12,9
24:1 n-9	2,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,8
Total FA	93,7	96,4	95,5
Total n-3	48,1	44,1	45,3
Total LC n-3	29,2	27,3	28,7

4.3 Fettklasser i fett fra grakse

Fettklassesammensetning i fett ekstrahert med Folchs metode fra grakse (grakse 2) og i Calanus[®] Oil ble analysert med TLC. Evaluering av denne semikvantitative analysen (figur 16), viste at voksester (WE) var den dominerende fettklassen både i graksefettet (spor 2) og i Calanus[®] Oil (spor 3). Når den relative intensiteten på flekkene for WE, FFA og PL ble vurdert, synes det å være relativt mer av de to sistnevnte i graksefettet enn i Calanus[®] Oil og at det motsatte var tilfellet for WE.



Figur 16. Fettklassesammensetningen i fett (5 mg/ml) ekstrahert fra grakse med Folchs metode (spor 2) og i Calanus[®] Oil (5 g/ml) (spor 3). Spor 1 er 16:1 standard (5 mg/ml) som inneholder kolesterolester, TAG (triacylglycerol), FFA (frie fettsyrer), DAG (diacylglycerol), kolesterol, MAG (monoacylglycerol), og lecithin/PL (fosfolipider). WE = voksester.

4.4 Lagringsstabilitet av grakse

4.4.1 Mikrobiologisk stabilitet

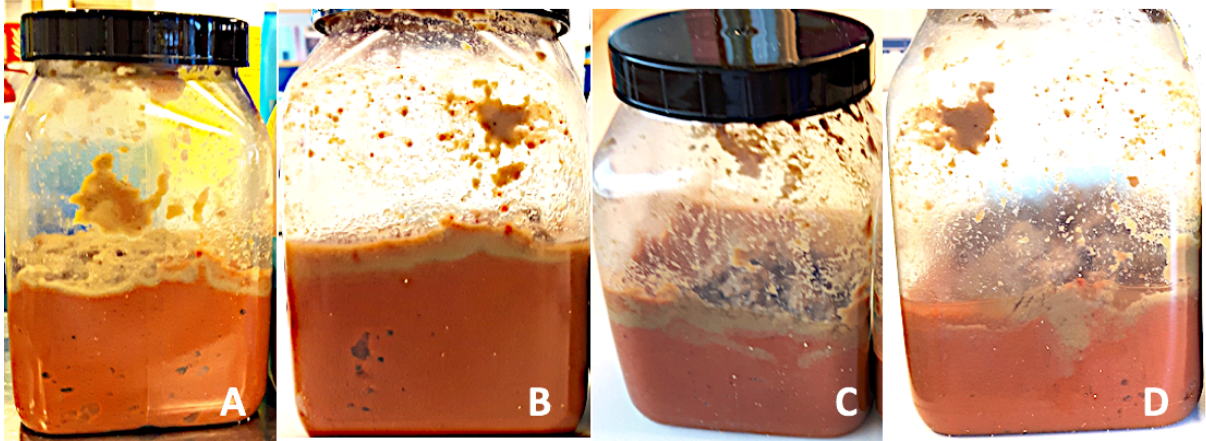
Bruk av maursyre er et vanlig alternativ til tørking, eller frysetørking for å konservere biomasse med høyt vanninnhold. Resultatene i tabell 13 viser at det ikke var tilstrekkelig å senke pH til 3,6, den måtte senkes til minimum 3,1 for å hindre vekst av bakterier.

Tabell 13. Mikrobiologisk stabilitet i grakse (grakse 1). Graksen ble lagret i fire måneder med ulike konsentrasjoner av maursyre (%). Agarplatene ble lagret i romtemperatur og ved 37 °C i fem dager. Vekst = synlig vekst, ikke mulig å telle kolonier. 0 = ingen synlig vekst.

Maursyrekonsentrasjon (%)	pH	Romtemperatur			37 °C		
		1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
0,5	3,6	Vekst	832	Vekst	Vekst	Vekst	Vekst
1	3,1	0	0	0	0	0	0
1,5	2,9	0	0	0	0	0	0

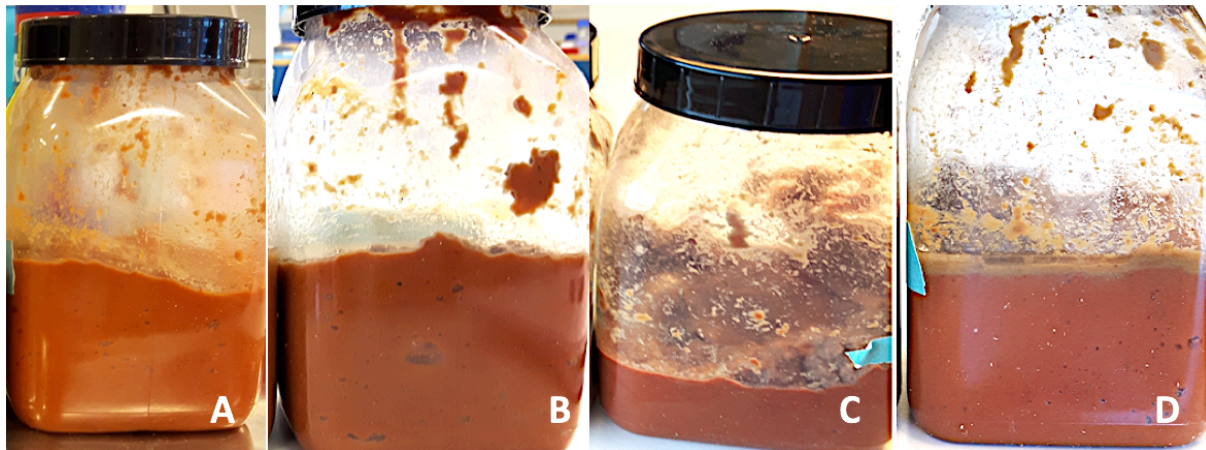
4.4.2 Oksidativ stabilitet av langtidslagret grakse

Visuelle bedømmelser viste at graksen som var lagret uten N₂-gass fikk en grå/brun væske i overflaten etter lagring i 2 uker. Etter lagring i 4 uker var det blitt dannet et olje/vann-lignende lag i det øvre laget av graksen (figur 17).



Figur 17. Grakse (grakse 1) stabilisert med 1.5 % maursyre, lagret mørkt ved romtemperatur (22 °C), uten N₂-gass. Graksene hadde vært lagret i 2 (A), 4 (B), 9 (C) og i 12 uker (D).

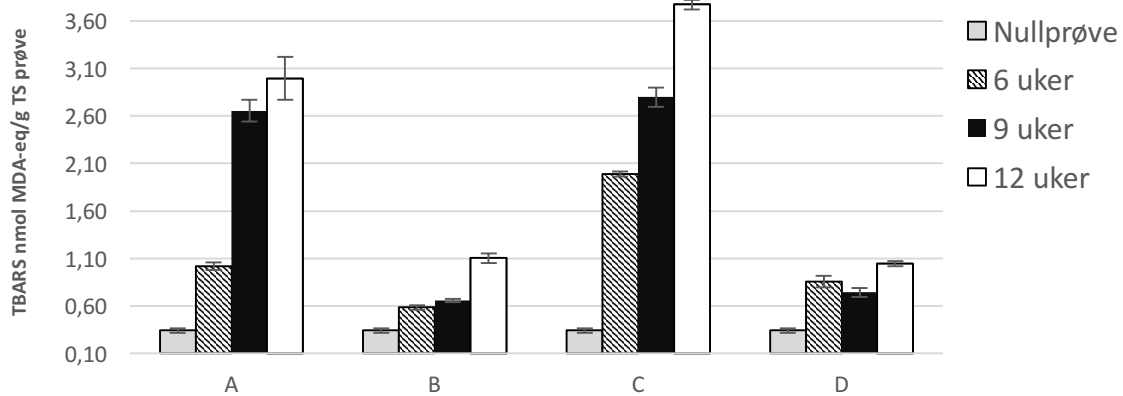
Visuelle bedømmelser viste at graksen som hadde vært lagret med N₂-gass fikk en grå/brun væske i det øvre laget, etter den hadde vært lagret i 12 uker (figur 18).



Figur 18. Grakse (grakse 1) stabilisert med 1.5 % maursyre, lagret mørkt ved romtemperatur (22 °C) med N₂-gass. Graksene hadde vært lagret i 2 (A), 4 (B), 9 (C) og i 12 uker (D).

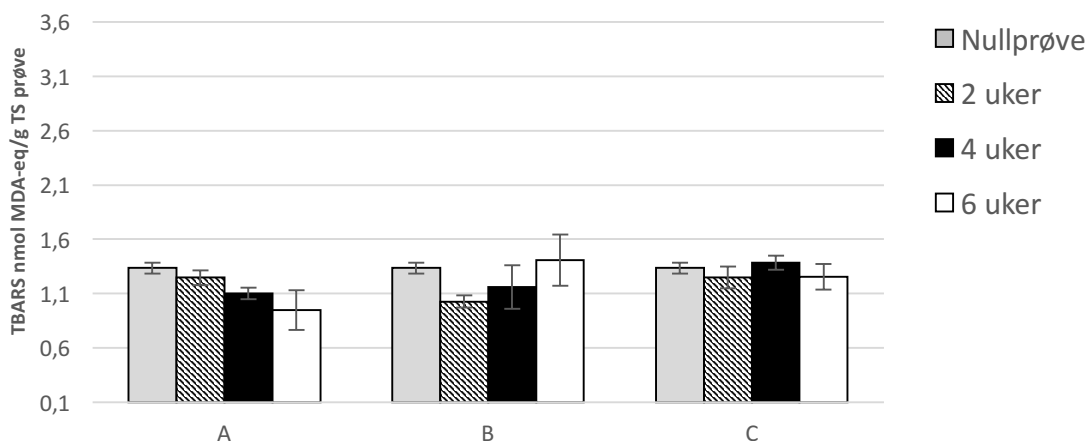
TBARS-verdiene målt i den våte graksen (grakse 1) ved ulike uttak fra lagringsforsøket (figur 19) viste for prøven som var tatt ut fra det øvre laget, et innhold på henholdsvis 1,0 nmol MDA-eq/g TS prøve etter lagring i 6 uker med N₂-gass (A) og 2,0 nmol MDA-eq/g TS prøve lagret uten N₂-gass (C). Etter lagring i 9 uker viste prøvene 2,7 nmol MDA-eq/g TS prøve etter lagring med N₂-gass (A) og 2,8 MDA-eq/g TS prøve etter lagring uten N₂-gass. Prøven som var tatt ut fra det midtre laget, viste henholdsvis 0,6 nmol MDA-eq/g TS prøve etter lagring i 6 uker med N₂-gass (A) og 0,9 nmol MDA-eq/g TS prøve, lagret uten N₂-gass (C). Etter lagring i 9 uker viste prøvene 0,7 nmol MDA-eq/g TS prøve etter lagring med N₂-gass (A) og 0,7 MDA-eq/g TS prøve etter lagring uten N₂-gass. Den høyeste TBARS-verdien ved lagringsforsøket slutt, ble målt i prøven som var tatt ut fra det øvre laget av lagringsbeholderen og lagret uten N₂-gass

(C), med et innhold på 3,8 nmol MDA-eq/g TS prøve. Den laveste verdien ved lagringsforsøket slutt, ble målt i prøven som ble tatt ut fra det midtre laget av beholderen og lagret uten N₂-gass (D), med et innhold på 1,0 nmol MDA-eq/g TS prøve. For de fleste prøvene skjedde den største økningen i TBARS i løpet av de første 6 og 9 ukene.



Figur 19. Endringen i mengde thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS) i grakse (grakse 1) lagret opptil 12 uker, ved ulike lagringsbetingelser. A: prøver fra øvre lag av graksen, lagret med N₂-gass. B: prøver fra midtre lag av graksen, lagret med N₂-gass. C: prøver fra øvre lag av graksen, lagret uten N₂-gass. D = prøver fra midtre lag av graksen, lagret uten N₂-gass. TS = tørrstoffbasis. Standardavvik er basert på analyser av tre paralleller av samme prøve.

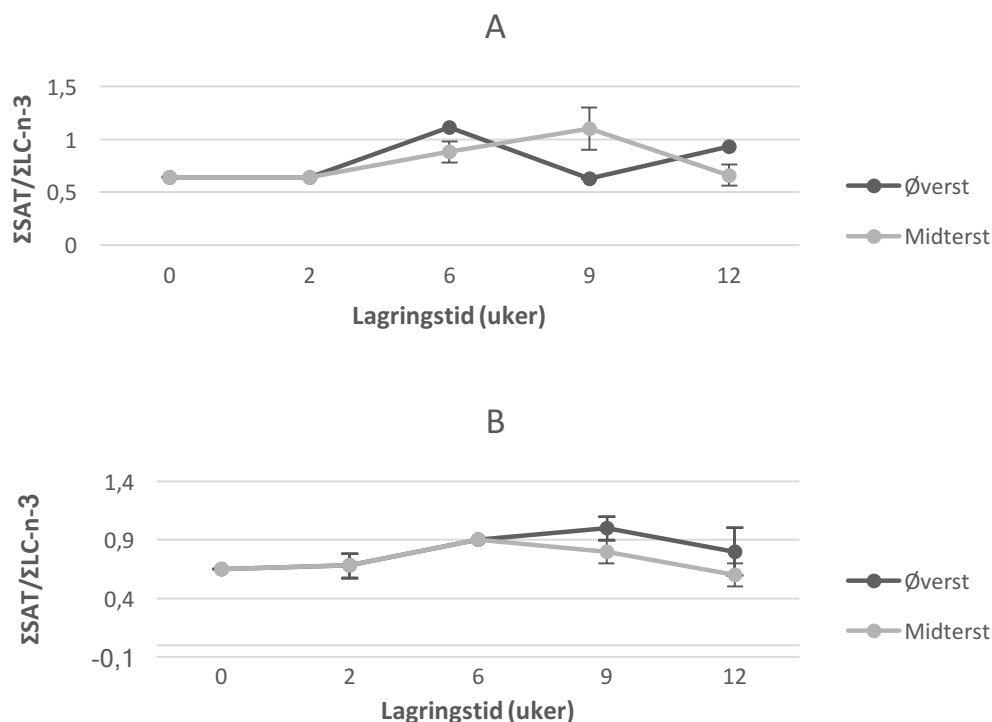
TBARS-verdiene målt i den tørkede graksen (grakse 2) lagret i ulike varighet ved forskjellige lagringsbetingelser viste små endringer i TBARS med en variasjon på 0,9-1,4 nmol MDA-eq/g TS prøve (figur 20). Variasjon var liten mellom de ulike lagringsbetingelsene.



Figur 20. Endringen i mengde thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS) i grakse (grakse 2), lagret opptil 6 uker ved ulike lagringsbetingelser. A: Mørkt i kjøleskap uten N₂-gass uten lokket skrudd helt igjen. B: Mørkt i romtemperatur med N₂-gass. C: Mørkt i romtemperatur uten N₂-gass. TS=tørrstoffbasis. Standardavvik er basert på analyser av tre paralleller av samme prøve.

Resultatene av fettsyresammensetningen ved de ulike uttakene av lagringsforsøket av våt grakse (grakse 1), ble satt opp ved å beregne forholdet mellom summen av mettede fettsyrer (14:0, 16:0 og 18:0) og LC-n-3 (EPA og DHA) (figur 21).

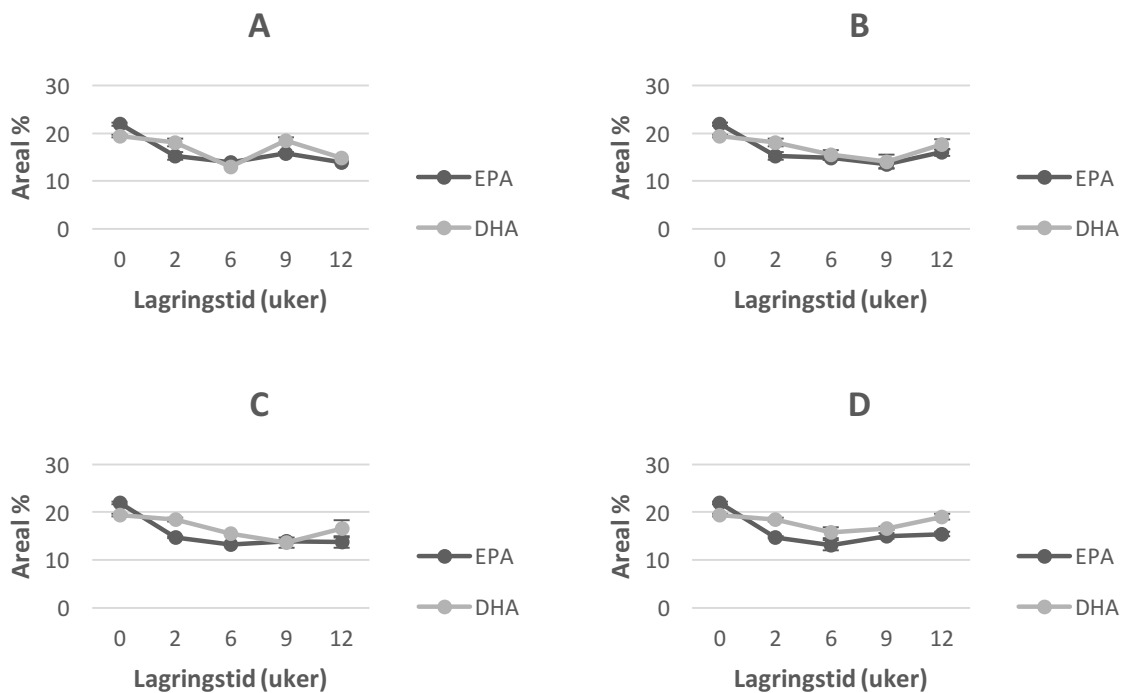
Analysene viste at fett ekstrahert fra nullprøven hadde et $\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{LC-n-3}$ forhold på omtrent 0,7. Prøvene lagret uten (A) og med N_2 -gass (B), viste en økning i forholdet av $\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{LC-n-3}$ frem til seks uker. Økningen var høyest i prøven som var tatt ut fra det øverste laget av beholderen og laget uten N_2 -gass (A). Etter lagring i 6 uker sank forholdet for prøvene tatt ut fra det øverste laget og laget uten N_2 -gass (A). Dette var også tilfellet for prøven som var fra det midterste laget og lagret med N_2 -gass (B). Prøvene som var tatt ut fra det øvre laget og lagret uten (A) og med N_2 -gass, viste en økning frem til de hadde vært lagret i ni uker. Etter økningen, etterfulgte en minking i forholdet av $\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{LC-n-3}$. For prøven tatt ut fra det midtre laget, lagret uten N_2 -gass, var det en økning i forholdet mellom 9 og 12 ukers lagring.



Figur 21. Endringen i forholdet mellom $\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{LC-n-3}$ i grakse (grakse 1) under lagringsforsøket. Graksen ble lagret mørkt, uten (A) og med N_2 -gass (B) ved 24 °C. Prøvene ble tatt ut fra det midtre- og øvre laget av graksen. ΣSAT = summen av C14:0, C16:0 og C18:0. $\Sigma\text{LC-n-3}$ = summen av C20:5n-3 og C22:6n-3. Prøvene hvor standardavvik er beregnet, er basert på analyser av tre paralleller av samme prøve.

Arealprosentene av EPA og DHA ved de ulike uttakene og lagringsforholdene ble også sammenlignet (figur 22). Areal % for EPA og DHA var omtrent 20 % ved lagringsforsøkets start. Generelt viste resultatene at det var en liten nedgang i mengden EPA og DHA fra start til

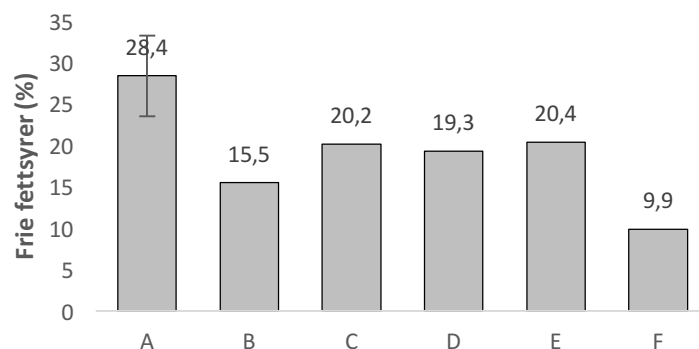
lagringsperiodens slutt. Areal % av EPA sank mest i prøvene som var tatt ut fra det øvre laget av lagringsbeholderen og lagret uten (A) og med N₂-gass (C), og denne nedgangen var omtrent 8 % for begge prøvene. Nedgangen var minst i prøven fra det midtre laget, som var lagret uten N₂-gass (D), med en nedgang på omtrent 6 %. Areal % av DHA sank mest i prøven fra det øvre laget av beholderen, lagret uten N₂-gass (A), med en nedgang på omtrent 4,5 %. Nedgangen var minst i prøven som var tatt ut fra det midtre laget av lagringsbeholderen og lagret med N₂-gass (B), med en nedgang på omtrent 0,5 %.



Figur 22. Endringer i areal % av EPA og DHA i fra grakse (grakse 1) under lagringsforsøket. Prøvene ble tatt ut fra det øvre laget av lagringsbeholderen lagret uten N₂-gass (A), fra det midtre laget av lagringsbeholderen lagret uten N₂-gass (B), fra det øvre laget av lagringsbeholderen lagret med N₂-gass (C) og fra det midtre laget av lagringsbeholderen lagret med N₂-gass (D). Prøvene hvor standardavvik er beregnet er basert på analyser av tre paralleller av samme prøve.

Innholdet av frie fettsyrer (%) ble analysert i fett ekstrahert med Folchs metode fra ulike uttak av maursyrestabilisert (1,5 %) grakse (grakse 1) fra lagringsforsøket og i Calanus[®] Oil (figur 23). I nullprøven var innholdet 28,4 % FFA (A). Innholdet i graksene lagret i to uker med N₂-gass var 15,5 % FFA (B), og 20,2 % FFA lagret uten N₂-gass (C). Graksen lagret i 12 uker

med N₂-gass inneholdt 19,3 % FFA (D) og 20,4 % FFA lagret uten N₂-gass (E). Innholdet av FFA i Calanus[®] Oil var 9,9 % (F).



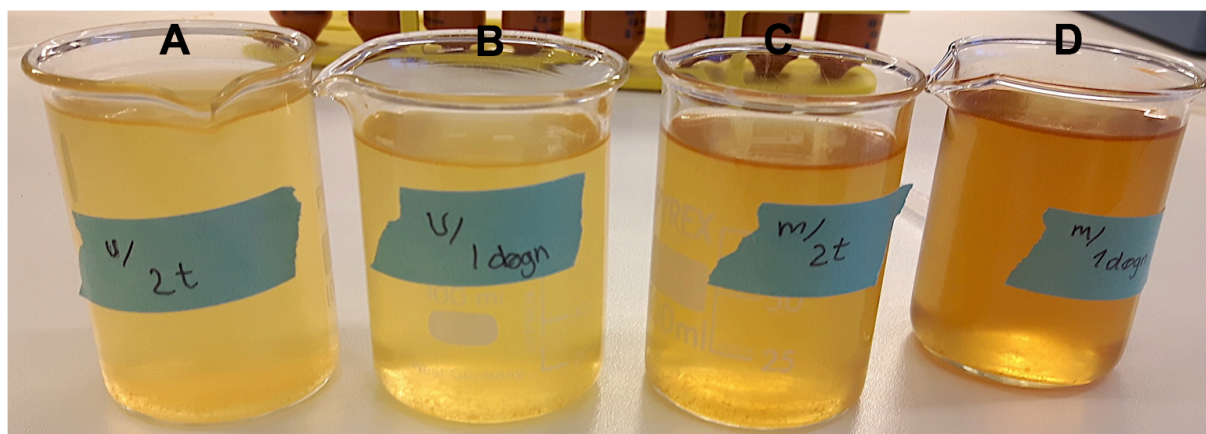
Figur 23. Prosent frie fettsyrer (FFA) i fett ekstrahert med Folchs metode fra nullprøven av våt grakse (grakse 1) (n=3) (A), lagret i to uker med N₂-gass (n=2) (B), i to uker uten N₂-gass (n=2) (C), i 12 uker med N₂-gass (n=2) (D), og lagret i 12 uker uten N₂-gass (n=2). FFA ble også målt i Calanus[®] Oil (n=2) (F).

4.5 Enzymatisk hydrolyse av grakse

Før den enzymatiske hydrolysen ble pH-verdien i graksen målt til pH 6,6.

4.5.1 Visuelle observasjoner

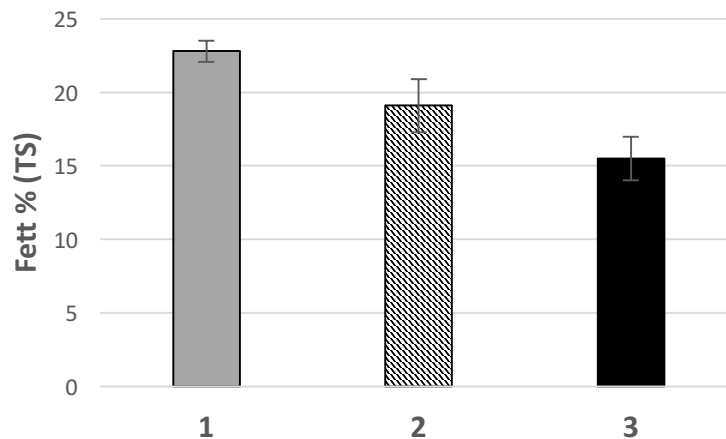
Prøven som var behandlet med Alcalase[®] i 2 timer (figur 24, C) hadde en svak orange farge og det var en del fett i det øvre laget av væskefasen (supernatanten). Prøven som var behandlet med Alcalase[®] i 1 døgn så ut til å være mest farget og inneholde mest fett i det øvre laget (figur 24, D). Kontrollprøvene (figur 24 A og B) uten tilsatt enzym hadde en gulaktig væskefase uten synlig fett på toppen.



Figur 24. Ulike væskefaser fra enzymatisk hydrolyse av grakse (grakse 3) med Alcalase[®]. De ulike prøvene var behandlet i 2 timer uten Alcalase[®] (A), i 1 døgn uten Alcalase[®] (B), i 2 timer med Alcalase[®] (C) og i 1 døgn med Alcalase[®] (D).

4.5.2 Fettinnholdet i grakse etter enzymatisk hydrolyse

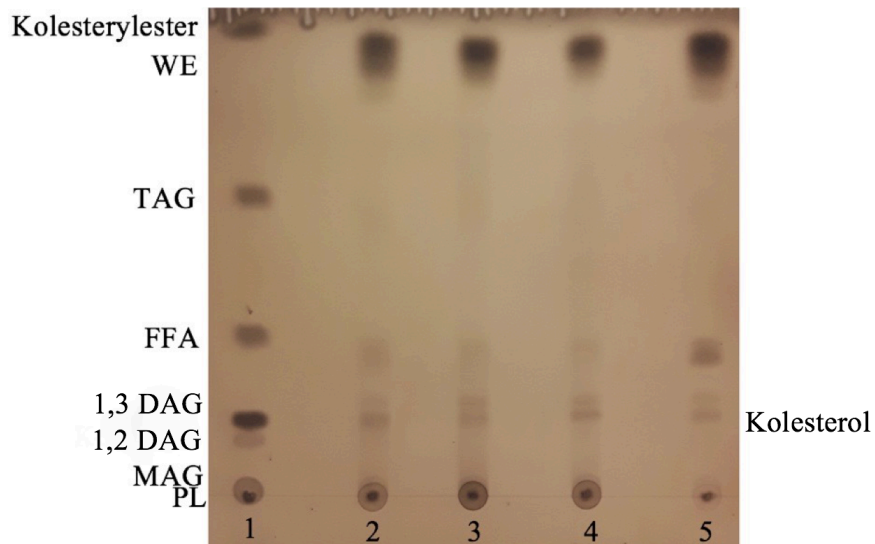
Fettinnholdet i industrielt produsert grakse (grakse 3, prøve 1) og i pellet fra hydrolysert grakse (grakse 3) med Alcalase[®] (prøve 2) og i pellet behandlet på samme måte som prøve 2, men uten inkludering av Alcalase[®] (prøve 3) viste et varierende fettinnhold (figur 25). Etter hydrolysen av graksen var fettinnholdet i pelleten fra graksen som var behandlet med Alcalase[®] 19,1 %. Pelleten fra graksen som var behandlet uten enzym hadde et fettinnhold på 15,5 %. Fettinnholdet var høyest i ubehandlet grakse med et innhold på 22,8 % fett.



Figur 25. Fettinnholdet i industrielt produsert grakse (grakse 3) (1), i pellet fra grakse (grakse 3) som var enzymatisk hydrolysert med Alcalase[®] (2) og i pellet fra grakse (grakse 3) behandlet på samme måte som prøve 2, men uten inkludering av Alcalase[®] (kontroll) (3). Fettet ble ekstrahert med Folchs metode. TS = Tørrstoffbasis. Standardavvik er basert på analyser av tre paralleller av samme prøve.

4.5.3 TLC av fett ekstrahert fra enzymatisk hydrolysert grakse

Fettklassesammensetning i fett ekstrahert med Folchs metode fra grakse (grakse 3), i pellet fra hydrolysert grakse (grakse 3) med Alcalase[®] (prøve 2) og i pellet behandlet på samme måte som prøve 2, men uten inkludering av Alcalase[®] (prøve 3) ble analysert med TLC. Evaluering av denne semikvantitative analysen (figur 26), viste at voksester (WE) var den dominerende fettklassen, både i ekstrahert fett fra grakse (spor 4), i pelleten fra varmebehandlet grakse uten (spor 3) og med Alcalase[®] (spor 2), og i Calanus[®] Oil (spor 5). Når den relative intensiteten på flekkene for WE, FFA og PL ble vurdert, synes det å være relativt mer WE og FFA i Calanus[®] Oil enn i de andre prøvene. Flekkene for PL synes å være mer intens for fettprøvene fra grakse og i pelletene etter hydrolyse av grakse, enn Calanus[®] Oil.



Figur 26. Fettklassesammensetningen i fett (5 mg/ml) ekstrahert fra pellet av grakse hydrolysert med Alcalase[®] (spor 2), i fett (5 mg/ml) ekstrahert fra pellet av grakse behandlet på samme måte som prøve 2, men uten inkludering av Alcalase[®] (spor 3), i fett (5 mg/ml) ekstrahert fra industrielt produsert grakse (spor 4) og i Calanus[®] Oil (5 mg/ml) (spor 5). Spor 1 er 16:1 standard (5 mg/ml) som inneholder kolesterylester, TAG (triacylglyserol), FFA (frie fettsyrer), DAG (diacylglyserol), kolesterol, MAG (monoacylglyserol), og lecithin/PL (fosfolipider). WE = voksester.

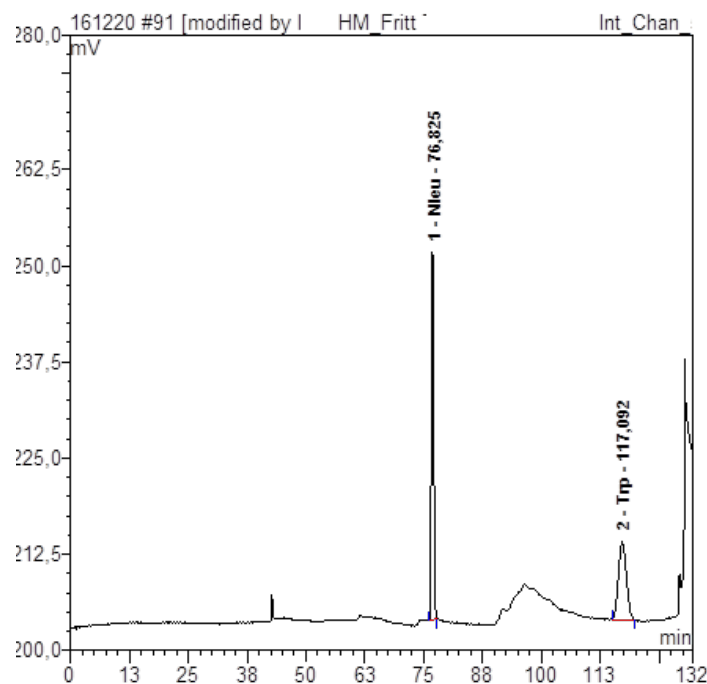
4.6 Antibakteriell aktivitet i grakse og proteinfase fra enzymatisk behandlet grakse

På grunn av teknisk feil med plateleseren (EnVision Multilabel Reader), måtte platene fra MIC-assay avleses visuelt etter inkubering. Det ble ikke observert aktivitet ved noen av konsentrasjonene for de ulike prøvematerialene av tørket grakse (grakse 2) og væskefasen av enzymbehandlet grakse når de ble testet mot *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus*.

4.7 Tryptofan

4.7.1 Analyse av tryptofan med aminosyreanalysator

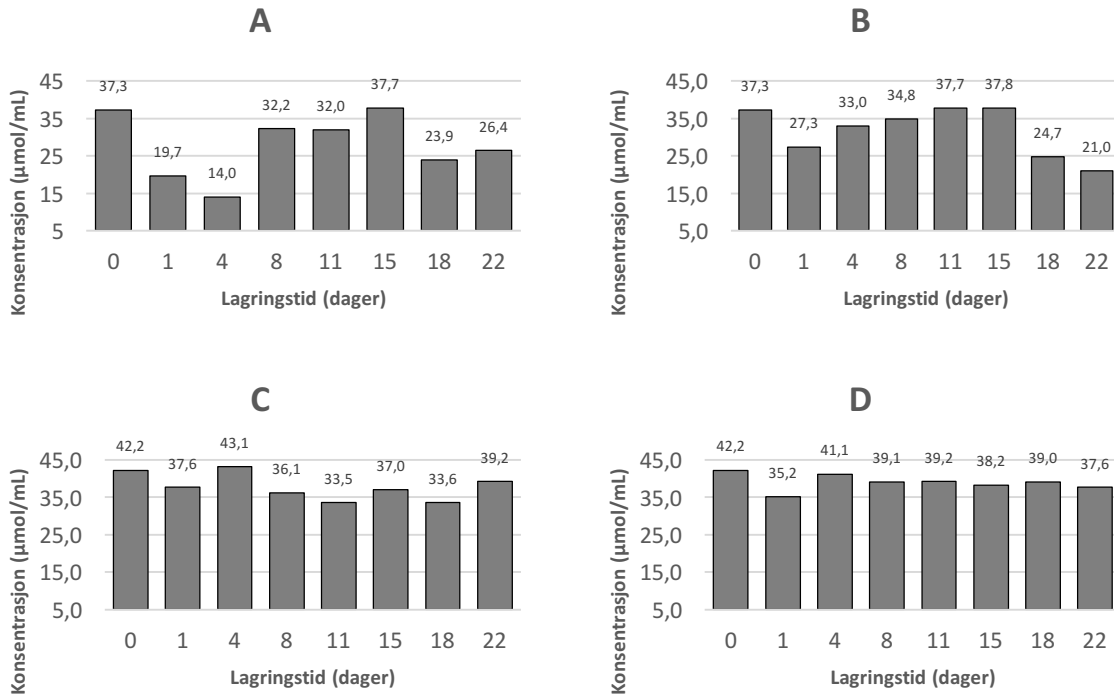
For å detektere hvor i kromatogrammet en kunne forvente en eluering av tryptofan og norleucine, ble det først kjørt en aminosyreanalyse av fritt tryptofan og norleucine. Kromatogrammet viste en topp for norleucine etter 78 minutter og tryptofan etter 117 minutter (figur 27).



Figur 27. Aminosyretopp for rent norleucine eluert ut etter 78 minutter og rent tryptofan eluert ut etter 117 minutter (fra Mæhre, H. K., NFH).

4.7.2 Stabilitet av rent tryptofan

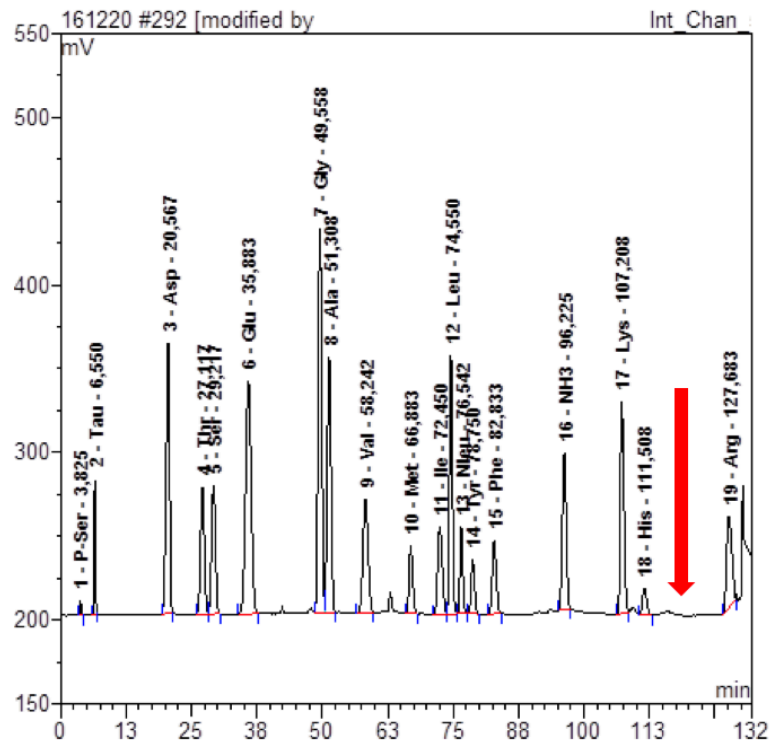
Stabiliteten av ren tryptofan ble målt ved de ulike lagringsbetingelsene ved dag 0, 1, 4, 8, 11, 15, 18 og 22 (figur 28). Tryptofan lagret med vann med romtemperatur (A) viste en reduksjon av tryptofaninnhold i underkant av en tredel. Prøven lagret med vann ved 50 °C (B) viste en reduksjon på i overkant av en tredel. Prøven lagret med maursyre i romtemperatur (C) viste en reduksjon på 3 % og prøven lagret med maursyre ved 50 °C (D) viste en reduksjon på 4,6 %.



Figur 28. Lagringsstabilitet av tryptofan lagret i 22 dager. Tryptofan løst i vann lagret ved romtemperatur (A) og ved 50 °C (B). Tryptofan løst i maursyre (pH 2,7) lagret ved romtemperatur (C) og ved 50 °C (D).

4.7.3 Frie aminosyrer og totale aminosyrer i hydrolysat etter 6 M HCl hydrolyse

Prøven med hydrolysat som ble hydrolysert med 6 M HCl, viste ikke en aminosyretopp for tryptofan i området rundt 117 minutter i kromatogrammet (rød pil, figur 29).



Figur 29. Kromatogram av prøven som var hydrolysert med 6 M HCl. Den røde pilen illustrerer hvor tryptofan ble forventet å være i kromatogrammet.

Resultatene fra forsøket (tabell 14) med 6 M HCl-hydrolyse, viser at tryptofan (Trp) ikke ble detekteret i prøven (A). Prøven for analyse av frie aminosyrer (FAS), viste et tryptofaninnhold på 0,6 mg/g hydrolysat (B) og prøven hvor det var analysert frie aminosyrer og tilsatt tryptofan viste et tryptofaninnhold på 5,15 mg/g hydrolysat (C).

Tabell 14. Aminosyresammensetning i hydrolysatet. A: Total aminosyresammensetning i hydrolysatet ble analysert etter 6 M HCl hydrolyse. B: Frie aminosyrer ble målt i hydrolysatet uten tilsatt tryptofan. C: Frie aminosyrer ble målt i hydrolysatet med tilsatt tryptofan. AS: Aminosyrer.

AS	mg/g hydrolysat (våtvekt)		
	A	B	C
Asp	18,6	1,1	1,1
Thr	10,3	2,9	2,9
Ser	9,0	2,5	2,5
Glu	25,3	1,4	1,2
Pro	10,0	2,8	2,7
Gly	16,7	7,0	6,9
Ala	16,5	6,4	6,3
Val	13,6	5,4	5,4
Cys	-	-	0,3
Met	6,6	3,2	3,2
Lie	11,0	4,0	4,0
Leu	18,2	11,0	11,0
Tyr	6,4	6,5	6,3
Phe	9,3	5,9	5,7
Lys	20,3	10,8	10,9
His	3,3	0,2	0,2
Trp	-	0,6	5,15
Arg	21,9	18,5	16,0
Sum	216,9	92,5	93,9

4.7.4 Totale aminosyrer i hydrolysat etter MSA-hydrolyse

Resultatene av MSA-hydrolysen (tabell 15), viste at ingen av hydrolysene med ulike mengder av tryptamin (D og E) og med tilsatt tryptamin og tryptofan (F og G), detekterte tryptofan i prøven.

Tabell 15. Aminosyresammensetning i hydrolysatet. Den totale aminosyresammensetningen i hydrolysatet etter MSA-hydrolyse: I hydrolysat med 0,2 % (D) og 0,4 % tryptamin (E), og i hydrolysat tilsatt tryptofan med 0,2 % (F) og 0,4 % tryptamin (G). AS: Aminosyrer.

AS	mg/g hydrolysat (våtvekt)			
	D	E	F	G
Asp	17,4	18,1	13,3	16,1
Thr	9,3	9,7	7,0	8,6
Ser	7,8	8,1	5,4	7,0
Glu	20,6	21,5	15,4	19,0
Pro	9,4	9,8	7,3	8,6
Gly	15,6	16,3	12,0	14,4
Ala	15,5	16,2	12,1	14,3
Val	12,8	13,3	10,0	11,8
Cys	1,6	1,6	1,4	1,4
Met	6,6	6,9	4,9	6,0
Lle	10,3	10,7	8,0	9,5
Leu	17,1	17,8	13,4	15,9
Tyr	10,0	10,8	7,1	9,6
Phe	8,7	9,0	6,7	8,1
Lys	19,4	20,1	15,0	17,8
His	3,1	3,2	2,4	2,8
Trp	-	-	-	-
Arg	19,3	20,3	15,2	18,2
Sum	204,4	213,2	156,5	189,2

MSA-hydrolyse av bovine serum albumin (BSA) tilsatt 0,2 % tryptamin ga ikke utslag på tryptofan (figur 16, J). Tilsatt tryptofan til BSA kunne detekteres etter MSA-hydrolyse, med et innhold på 1,8 mg tryptofan (K). MSA-hydrolyse av rent tryptofan tilsatt 0,2 % og 0,4 % tryptamin ga henholdsvis 1,3 mg tryptofan (H) og 1,1 mg tryptofan (I)

Tabell 16. Aminosyresammensetning etter MSA-hydrolyse av rent tryptofan (10,16 µg/ml) tilsatt 0,2 % (H) og 0,4 % tryptamin (I). Aminosyresammensetning etter MSA-hydrolyse av BSA tilsatt 0,2 % tryptamin (J) og BSA tilsatt tryptofan (10,16 µg/ml) og 0,2 % tryptamin (K). AS: Aminosyrer.

AS	H	I	J	K
Asp	-	-	0,7	0,6
Thr	-	-	0,4	0,4
Ser	-	-	0,2	0,2
Glu	-	-	0,8	0,8
Pro	-	-	0,3	0,3
Gly	-	-	0,1	0,1
Ala	-	-	0,4	0,4
Val	-	-	0,4	0,4
Cys	-	-	0,4	0,4
Met	-	-	0,1	0,0
Lle	-	-	0,1	0,1
Leu	-	-	1,0	0,9
Tyr	-	-	0,4	0,4
Phe	-	-	0,5	0,5
Lys	-	-	1,0	0,9
His	-	-	0,2	0,3
Trp	1,3	1,1	-	1,8
Arg	-	-	0,4	0,4
Sum	1,3	1,1	7,5	9,1

5 Diskusjon

Tre grakser med ulikt vanninnhold ble levert av Calanus AS. Tørking er kanskje den vanligste måten å konservere næringsrike biologiske materialer. For eksempel inneholder fiskemel fra 5-10 % vann (Mundheim & Nortvedt, 2001). En av graksene var stabilisert ved inndamping og tørking til et vanninnhold på bare 3,3 %, mens en annen ikke var inndampet og med 70 % vann. Sistnevnte vil nok derfor kunne være et godt mikrobiologisk vekstmedium.

Det høye fettinnholdet på over 20 % i to av graksene (grakse 2 og 3) tyder på at utvinningen av fett (olje) fra *Calanus finmarchicus* ikke er fullstendig. Fiskemel har til sammenligning ofte mindre enn 11 % fett (Mundheim & Nortvedt, 2001). En årsak kan være at graksen har et høyere innhold av polare lipider, inkludert frie fettsyrer sammenlignet med fiskemel fra pelagiske fiskearter. Polare lipider er vanskeligere å utvinne fra et råstoff enn nøytrale lipider som TAG og voksester. Både fett ekstrahert fra graksen og Calanus[®] Oil ble funnet å ha et høyt innhold av frie fettsyrer. Dette er tidligere rapportert av flere (Parrish, 1988; Marker *et al.*, 2003) og man tror at det primært er fosfolipidene som hydrolyseres av fosfolipaser (Sargent & Falk-Petersen, 1981; Parrish, 1988; Scott *et al.*, 2000; Marker *et al.*, 2003) og resulterer i det høye innholdet av FFA. I studier av ensilasjeprodukter fra lakseslo er det tidligere vist at proteinhydrolysat har et mye høyere innhold av FFA enn ensilasjeolje (Pedersen, 2010).

For å undersøke fettsyresammensetningen av fett i graksen, ble to ulike metoder sammenlignet. I det ene tilfellet ble fett i graksen ekstrahert før metylering, mens i det andre tilfellet ble fettsyrene direkte metylert i graksen. Direkte metylering resulterte i en større prosentandel av SDA (18:4 n-3), EPA (20:5 n-3), DHA (22:6 n-3) og totale LC n-3, sammenlignet med metylering av fett ekstrahert med Folchs metode. Det er velkjent at fosfolipider har et høyere innhold EPA og DHA enn nøytrale lipider (Addison *et al.*, 1969; Fraser *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 2002). Ved direkte metylering av graksen vil fettsyrene i alle forsåpbare lipidklasser metyleres. Folchs metode gir ikke en full kvantitativ ekstraksjon av polare lipider. Det er også rapportert at Folchs metode kan ha et problem med at fosfolipider kan tapes under vaskingen med vann, og at ikke alle lipidene blir overført til den organiske fasen (Shahidi & Wanasundara, 2008). Dette ble bekreftet ved direkte metylering av restproduktet etter ekstraksjon av fett med Folchs metode. Det kan derfor antas at direkte metylering er en mer presis metode for å bestemme fettsyresammensetning i prøver med et relativt høyt innhold av fosfolipider, slik som graksen. Innholdet av LC n-3 bestemt ved direkte metylering av tørket grakse (grakse 2) ble funnet å være bare 29 %, tilsvarende det som

ble funnet i Calanus[®] Oil (tabell 12). Dette er lavere enn hva som ble funnet ved direkte metylering av grakse 1, hvor det ble funnet 41 % LC n-3 (tabell 11). Årsaken til denne forskjellen kan kanskje være at det lave vanninnholdet i grakse 2 påvirker metyleringsprosessen negativt.

Generelt viste fettsyresammensetningen at graksen trolig kan være en god kilde for n-3 PUFA, siden EPA og DHA utgjorde over 40 % av det totale fettsyreinholdet i våt grakse (tabell 11). Det er vel kjent at Calanus[®] Oil inneholder mye stearidonsyre (Fraser *et al.*, 1989; Vang *et al.*, 2013), noe som gjenspeilte seg i resultatene av fettsyresammensetningen med et innhold på 10,4 % (tabell 11) og 16,3 % SDA (tabell 12) av det totale fettsyreinholdet i den våte og den tørre graksen. Dette skiller den som tidligere nevnt, fra klassiske fiskeoljer som ikke inneholder like høye nivåer av SDA (McGill & Moffat, 1992). Mennesker og andre virveldyr kan i noe grad (lite effektivt) omdanne 18:2 n-6 og 18:3n-3 til langkjedede flerumettede fettsyrer (Olsen, 2017). Omdannelsen skjer ved katalyse med enzymet $\Delta 6$ -desaturase til henholdsvis 18:3 n-6 og 18:4n-3 (SDA). Dette enzymet er det hastighetsbegrensende trinnet i syntesen av høyt flerumettede fettsyrer (se oversiktsartikkel: Vagner & Santigosa, 2011). Dersom 18:4n-3 er tilstede i større mengder vil egensyntesen av EPA og DHA i virveldyr antakelig bli større.

Fettklassene i det ekstraherte fett og i Calanus[®] Oil ble bestemt med TLC og semikvantitativ analyse av resultatene viste at den dominerende fettklassen i fett ekstrahert fra graksen og i Calanus[®] Oil var voksester. Dette var forventet da det er vist at voksester, som tidligere nevnt, kan utgjøre mer enn 86 % av det totale lipidinnholdet i raudåta (Cook *et al.*, 2016). I motsetning til typiske fiskeoljer, som hovedsakelig inneholder TAG, var det i fett fra graksen kun spor av TAG på TLC-platen. Når den relative intensiteten på flekkene ble vurdert, så graksen ut til å inneholde mer PL enn Calanus[®] Oil. Dette kan forklare resultatene fra analysene av fettsyresammensetningen som viste at det var en høyere andel av DHA i fett ekstrahert fra graksen målt etter direkte metylering, sammenlignet med Calanus[®] Oil, på grunn av et høyere innhold av fosfolipider i førstnevnte.

Konservering av biologisk materiale ved hjelp av inndamping og tørking er energikrevende og krever gjerne store volumer råstoff. Et alternativ er syrekonservering med maursyre som ofte blir benyttet for å ta vare på biprodukter fra lakseslakteri (se oversiktsartikkel: Olsen *et al.*, 2014).

I litteraturen står det at det er få næringsmiddelpatogener som kan vokse i produkter med en pH lavere enn 4,5 (Granum, 2015) og at det generelt er få bakterier som kan vokse ved en pH lavere enn 3 (Madigan *et al.*, 2012). Ofte sies det at når fiskeslo konserveres med maursyre, så må pH senkes til under 4 (se oversiktsartikler: Raa *et al.*, 1982; Tatterson, 1982). Resultatene

i denne oppgaven viser av grakse ved romtemperatur og ved 37 °C måtte ha en pH på 2,9-3,1 for å hindre bakterievekst.

En tilsats av maursyre, vil ikke bare være positivt for å forhindre den mikrobielle veksten. Tidligere studier har vist at en inkludering av slike svake organiske syrer i proteinhydrolysat benyttet i fôr, kan gi økt vekst og bedre helse hos husdyr. Kortkjedete organiske syrer ser ut til å kunne erstatte ikke-terapeutisk antibiotika i fôr til fjærkre og griser (se oversiktsartikler: Dibner & Buttin, 2002; Defoirdt *et al.*, 2009; Khan & Iqbal, 2016). I tillegg har studier vist at svake organiske syrer i fôr til organismer i akvakultur kan beskytte mot patogene bakterier og i noen tilfeller føre til lavere dødelighet (Chuchird *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2015; Koh *et al.*, 2016; Reda *et al.*, 2016). I fôr til gris har kortkjedete organiske syrer allerede vært benyttet i flere år (se oversiktsartikkel: Dibner & Buttin, 2002), og hovedmekanismen bak den vekstfremmende effekten er syrenes antimikrobielle effekt i den øvre delen av fordøyelsessystemet hos dyrene (Dibner & Buttin, 2002; Eisemann & van Heugten, 2007; Opheim *et al.*, 2016). På denne måten kan en inkludering av maursyre i graksen antas å øke verdien av produktet ved utnyttelse til dyrefôr.

Oljer som er rike på LC-PUFA er som nevnt særlig utsatt for oksidasjon. Graksene ble lagret i halvfulle bokser lukket med et skrulokk. Atmosfæren i boksen var enten luft eller N₂-gass. Visuelle observasjoner tydet på at fasen fra overflaten av graksen forandret seg raskere fra lys rød til grå/brun væske når luft utgjorde atmosfæren, enn når N₂-gass var tilstede i boksen. Denne fargeforandringen kan være en følge av at astaxanthin i graksen oksideres (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Oksidasjonsutviklingen i det øvre og det midtre grakselaget ble kjemisk analysert ved å bestemme innholdet av malondialdehyd, et sekundært harskningsprodukt. Ikke uventet og i overensstemmelse med den observerte fargeforandringen, var det en rask økning av MDA i øvre lag av graksen lagret uten N₂-gass. Med N₂-gass var det en forsinket MDA-utvikling. I det midtre lag av graksen, hvor det var en begrenset oksygentilgang, var det bare en svak MDA-økning under begge atmosfærene.

Resultatene for måling av TBARS i den tørkede graksen (grakse 2) viste at den var mer stabil (figur 20) og hadde lavere TBARS-verdier sammenlignet med den våte graksen (grakse 1) (figur 19). Dette ved at det ikke var noen nevneverdig forskjell i TBARS-verdiene ved de ulike lagringsbetingelsene og ved de ulike uttakene i den tørkede graksen. Resultatene antyder av det vil være en fordel å tørke graksen, med tanke på oksidasjon. Årsakene til at det ikke ble en økning i MDA-verdiene ved lagring av denne tørkede graksen er ikke kjent, men det er rapportert at lipidoksidasjon blir redusert ved nedgang i vanninnholdet (Padley, 1994).

Resultatene fra analysene av endringer i Σ SAT/ Σ LC-n-3 og areal % EPA og DHA viste ingen tydelige endringer i løpet av lagringsforsøket (figur 21 og 22). Dersom graden av oksidasjon hadde vært høy, kunne man forventet at det totale innhold av LC-n-3 hadde blitt redusert. Resultatene viste også en neglisjerbar nedgang i % EPA og DHA i løpet av lagringsforsøket (figur 22). Ved noen av uttakene var det en økning i % EPA og DHA, noe som trolig ikke er realistisk. Resultatene for DHA var som forventet, da den største nedgangen var ventet å bli funnet i prøven som var mest utsatt for oksygen og den minste nedgangen i prøven hvor det var minst oksygen tilgjengelig. Derfor var ikke resultatene for EPA som forventet. Disse resultatene kan også tenkes å være grunnet at prøvene ikke ble tatt ut fra de samme beholderne ved hver av uttakene. Et alternativ kan også være at prøvene ikke ble tatt ut presist fra hvert av lagene ved hvert av uttakene og kan dermed ha ført til uventede resultater. For å optimalisere disse forsøkene kunne det vært fordelaktig å ha hyppigere uttak av prøver fra lagringsforsøket, i tillegg til at hver av uttakene burde blitt tatt ut fra den samme beholderen for hver av lagringsbetingelsene.

Resultatene for måling av FFA-innhold i fett ekstrahert fra grakse (grakse 1) viste et innhold på mellom 15,5-28,4 %, ved de ulike uttakene fra lagringsforsøket, lagret med og uten N₂-gass. FFA-innholdet i den syrestabiliserte graksen forandret seg ikke under ulike lagringsbetingelser i 2 og 12 uker. Det kunne faktisk tyde på at innholdet var blitt redusert i forhold til utgangspunktet. At FFA-forholdet er uforandret er ikke overraskende siden endogene fettsyrespaltende enzymer blir inaktivert ved industriell utvinning av oljen og at maursyren hindrer oppvekst av mikroorganismer.

Grenseverdien for innholdet av FFA i oljer som skal benyttes til fiskefôr, er i følge fiskefôrprodusenter satt til 5 %. Publikasjoner har vist at *Calanus*-artene kan inneholde 5-15 % FFA (Ward *et al.*, 1996; Marker *et al.*, 2003). Det bør også nevnes at metoden for målingen av FFA, ikke er optimal for oljer som har en sterk farge, som oljer fra *Calanus finmarchicus*, siden metoden baseres på titrering til et fargeomslag (Ke *et al.*, 1976). Fargeomslaget var i noen tilfeller vanskelig å vurdere presist, da oljen var mørk i utgangspunktet. Studier har vist at et innhold på 15 % FFA i fôr til laks og ørret yngel ikke påvirket veksten eller dødeligheten hos fisken (Austreng & Gjefsen, 1981). Et annet studie har vist at en diett til larver av atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) hvor 29 % av fettklassekomposisjonen bestod av FFA, ga en høy dødelighet hos larvene (Sæle *et al.*, 2013). Den økte dødeligheten ble foreslått å være forårsaket av FFA, som kan føre til destabilisering av enterocytene i tarmen (Sæle *et al.*, 2013). Det er anbefalt en rask innfrysing og lagring ved temperaturer under -70 °C, når en umiddelbar ekstraksjon av fett ikke er mulig, for å forhindre endogen enzymatisk hydrolyse av lipidene i

Calanus-arter (Ohman, 1996). Studier av Bergvik *et al.* (2012b) viste at fosfolipidene i *Calanus finmarchicus* kan bevares ved fryselagring i opptil ett år ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, gitt at råstoffet av raudåten fikk en rask varmebehandling etter den ble høstet. Studiet viste også at lagring av ubehandlet raudåte under de samme forholdene føre til tap av alle fosfolipidene innen 4 måneders lagring. Det ble konkludert med at det først og fremst er hydrolyse av fosfolipidene som forårsaket de høye FFA-nivåene.

Det ble gjort en enzymatisk hydrolyse med Alcalase[®] for å undersøke om en slik behandling kunne gi et økt utbytte av fett fra graksen. Væskefasen fra enzymatisk hydrolysert grakse hadde et tydelig rødfarget oljelag på toppen. Alcalase[®] bryter gjenværende vev og proteiner i graksen slik at fett i graksen kan frigjøres. Innholdet av proteiner (aminosyrer) i væsken ble ikke analysert, men det kan antas at innholdet har økt sammenlignet med kontrollforsøket uten enzym. Fargeforskjellen på væskefasen indikerte dette. Oljeslipet fra enzymatisk behandlet grakse ble observert etter 2 timer og det er usikkert om en langtidshydrolyse er formålstjenlig, også på grunn av energikostnader. Det kunne vært interessant å studere effekten av kommersielle enzymer med annen spesifisitet enn Alcalase[®]. Undersøkelser til Vang *et al.* (2013) viste at hydrolyse med de to protolytiske enzymene, Alcalase[®] og Flavourzyme[®], økte utbyttet av fett fra raudåte i en industrilignende prosess, sammenlignet med bruk av bare et enzym.

Resultatene viste generelt at en varmebehandling av graksen, både med og uten Alcalase[®], førte til et redusert innhold av fett i pelleten på tørrstoffbasis, sammenlignet med utgangspunktet. Total mengde pellet ble imidlertid ikke kvantifisert, men antakelig er det blitt redusert etter varmebehandlingen både med og uten enzym. Med enzym frigjøres mer fett, og i tillegg vil protein (aminosyrer) og andre stoffer (salter) havne i væskefasen i begge varmebehandlingene (med og uten enzym). Det var overraskende at fettinnholdet i pelleten ved kontrollforsøket ble funnet å være lavere enn i forsøket med enzym. For å kvantifisere fettmengden i pellet ble Folchs metode brukt og en årsak kan være at det er vanskeligere å ekstrahere gjenværende fett i kontrollpelleten enn i pelleten etter enzymbehandling.

Fettklasser i fett ekstrahert fra pelletene av varmebehandlet grakse, enzymatisk hydrolysert grakse, ubehandlet grakse og Calanus[®] Oil, ble bestemt med TLC (figur 26). I alle prøvene var voksester (WE) den dominerende fettklassen og den relative intensiteten på flekken for WE var som forventet høyest i prøven av Calanus[®] Oil. I tillegg var også den relative intensiteten for FFA sterkest i denne prøven. Det var uventet at intensiteten på flekken av FFA var større i Calanus[®] Oil, enn i graksen og pelletene fra behandlet grakse. Dette fordi målingene av FFA (figur 23) viste at det var et høyere innhold av FFA i graksen enn i Calanus[®] Oil. En

sannsynlig årsak til at det tilsynelatende var mer FFA i Calanus[®] Oil, kan være at mer Calanus[®] Oil var påsatt TLC-platen. Innholdet av fettklassene i fett ekstrahert fra de to pelletene av behandlet graksene med og uten enzym, i tillegg til ubehandlet grakse var ganske like. Den største forskjellen fra Calanus[®] Oil var innholdet av fosfolipider. Fosfolipider ekstraheres når organiske løsemidler brukes (Folchs metode), men ikke ved industriell utvinning av oljen. Dette dokumenterer at organiske løsemidler ikke blir brukt i den industrielle produksjonen.

Tørket grakse (grakse 2) og væskefasen (supernatanten) fra grakse (grakse 3) som var inkubert med Alcalase[®] i 20 timer ved varmebehandling, ble testet for antibakteriell aktivitet i et MIC-assay. Det ble ikke observert aktivitet ved noen av konsentrasjonene i de ulike prøvematerialene, for de ulike testbakteriene *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus*. Dette kan trolig forklares ved at testmaterialene ikke inneholdt antibakterielle stoffer, for eksempel antibakterielle peptider, eller at konsentrasjonen av eventuelle slike var for lave.

Tryptofan er en essensiell aminosyre som er vanskelig å analysere i biologisk materiale, fordi den ødelegges ved en standard 6 M HCl-hydrolyse ved høy temperatur. I denne oppgaven ble det derfor gjort noen innledende undersøkelser om kvantifisering av aminosyren kan utføres etter kjemisk hydrolyse av proteinene.

Siden ensilering med maursyre er en vanlig måte å konservere marint restråstoff, ble det først undersøkt om sur pH og forhøyet temperatur ødelegger ren tryptofan. Resultatene viste at aminosyren var stabil når det var lagret ved 50 °C og pH 2,7 i 3 uker. En oppfølging av forsøket bør være å ensilere et biologisk materiale, for eksempel et biprodukt fra foredling av fisk, ved pH 3,0 i noen uker og deretter gjøre fullstendig hydrolyse med proteolytiske enzymer før aminosyreanalyse (analyse av frie aminosyrer).

Standard HCl-hydrolyse av total aminosyresammensetning i proteinhydrolysatet utvunnet ved produksjon av Calanus[®] Oil, ga ikke utslag for tryptofan. For å bekrefte at det var tryptofan i proteinhydrolysatet ble aminosyreanalyse gjennomført uten foregående saltsyrehydrolyse ved 110 °C. Analysen viste at tryptofan var tilstede i hydrolysatet i fri form. Ved tilsats av rent tryptofan til proteinhydrolysatet økte utslaget i kromatogrammet. Det gjenstår imidlertid å studere nærmere en kvantitativ analyse.

Chiou & Wang (1988) har rapportert at dersom proteinhydrolyse utføres med 4 M metansulfonsyre (MSA) ved 110 °C eller 160 °C så ødelegges ikke tryptofan. Andre har foreslått at tilsats av tryptamin før syrehydrolyse beskytter tryptofan (Simpson *et al.*, 1976).

Resultatene viste at når hydrolysatet ble behandlet med 4 M MSA og 150 °C i 2 timer, ble det ikke detektert tryptofan, og heller ikke når proteinhydrolysat var tilsatt ekstra tryptofan.

MSA-hydrolyse ble gjennomført med 0,2 % og 0,4 % tryptamin. Hydrolysatet ble erstattet med det rent tryptofan og det rene proteinet BSA, for å forsøke og undersøke om testmaterialets kompleksitet kunne ha innvirkning på resultatene for deteksjon av tryptofan med MSA-hydrolysen. Denne metoden så ut til å fungere for prøvene hvor det kun var tilsatt BSA, tryptofan og tryptamin, da det ble detektert tryptofan i prøvene. Det ble ikke detektert tryptofan i prøven hvor kun BSA og tryptamin ble tilsatt. Resultatene kan være grunnet i at BSA inneholder lite tryptofan, ettersom tryptofan ble detektert i prøven hvor BSA ble tilsatt rent tryptofan og tryptamin. Undersøkelser av aminosyresammensetningen i BSA utført av Hirayama *et al.* (1990), viste at bare 2/583 aminosyrer i BSA var tryptofan, noe som kan tenkes å forklare resultatet.

Generelt sett kan resultatene indikere at tryptofan tåler hydrolysen alene når det ikke er tilsatt eller tilstede i et komplekst materiale, men at de ikke fungerer for mer komplekse prøver, som hydrolysatet. Det kan tenkes at de positive resultatene i undersøkelsen av metoden utført av Chiou & Wang (1988), kan ha en sammenheng med at de hydrolyserte rene proteiner. Resultatene fra disse innledende forsøkene tyder på at kanskje den enkleste måten å analysere for tryptofan i et komplekst biologisk materiale, er å gjennomføre en fullstendig enzymatisk hydrolyse av protein, slik at syrehydrolyse ved høy temperatur blir unødvendig.

6 Konklusjon

Det ble funnet et høyt fettinnhold i graksene, som betyr at olje-utvinningen fra *Calanus finmarchicus* ikke er fullstendig. Det kan forklares med at den har et høyt innhold av polare lipider som kan være vanskelig å utvinne. Det ble funnet et høyt innhold av frie fettsyrer i fett ekstrahert fra graksen (13,2-28,4 %) og i Calanus[®] Oil (9,9 %), som kan skyldes fosfolipaseaktivitet. Fett ekstrahert fra graksen inneholdt 16,3 % stearidonsyre (18:4n-3), 13,9 % EPA (20:5n-3) og 13,2 % DHA (22:6n-3). Voksester var den dominerende fettklassen både i fett ekstrahert fra graksen og i Calanus[®] Oil.

For bestemmelse av fettsyresammensetningen i relativt fosfolipidrike prøver, så direkte metylering ut til å være en mer presis enn metylering av ekstrahert fett. Semikvantitative analyser med tynnsjikt-kromatografi viste at fett ekstrahert fra graksen inneholdt mer PL enn Calanus[®] Oil. For å forhindre bakterievekst ved romtemperatur og ved 37 °C måtte graksen ha en pH på minimum 2,9-3,1. Under lagringsforsøket av våt grakse var det en rask økning av MDA i øvre lag av graksen lagret uten N₂-gass. Lagring av den våte graksen med N₂-gass resulterte i en forsinket MDA-utvikling og det var en svak MDA-økning i det midtre laget hvor det var en begrenset oksygentilgang. Tørket grakse var mer oksidativt stabil enn våt grakse og kan trolig forklares ved at et lavere vanninnhold reduserer lipidoksidasjon. I løpet av lagringsforsøket var det ingen tydelige endringer av Σ SAT/ Σ LC-n-3 og areal % EPA og DHA og FFA-innholdet var uforandret.

Fett i graksen ble frigjort ved enzymbehandling med Alcalase[®]. Det ble et redusert innhold av fett i graksen ved en varmebehandling av graksen både med og uten enzymet. Det var uventet at fettinnholdet i pellet fra kontrollforsøket var lavere enn i forsøket med enzym, men det kan kanskje forklares ved at det var vanskeligere å ekstrahere gjenværende fett i kontrollpelletten med Folchs metode enn i pelletten etter enzymbehandlingen.

Når rent tryptofan ble lagret i 3 uker ved 50 °C og pH 2,7 var det stabilt. Når det ble utført en standard HCl-metode i hydrolysatet, ble ikke tryptofan detektert, men ved analyse av frie aminosyrer ble det detektert tryptofan. Det ble heller ikke detektert tryptofan med 4 M MSA-hydrolyse. Når hydrolysatet ble erstattet med rent tryptofan, ble det detektert, også i prøver tilsatt BSA og tryptofan. Resultatene indikerte at tryptofan tåler hydrolysen alene, men ikke når det er tilsatt eller tilstede i et komplekst materiale.

Referanser

- Abeywardena, M. Y., & Belobrajdic, D. P. (2016). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and obesity. In S. I. Ahmad & S. K. Imam (eds.), *Obesity: A Practical Guide*, ch. 3, Sveits: Springer International Publishing.
- Addison, R. F., Ackman, R. G., & Hingley, J. (1969). Free fatty acids of herring oils - possible derivation from both phospholipids and triglycerides in fresh herring. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26, 1577-1583.
- Aksnes, D., & Blindheim, J. (1996). Circulation patterns in the North Atlantic and possible impact on population dynamics of *Calanus finmarchicus*. *Ophelia*, 44, 7-28.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell*, 5. ed., New York: Grandland Science.
- Andersson, M., Van Nieuwerburgh, L., & Snoeijs, P. (2003). Pigment transfer from phytoplankton to zooplankton with emphasis on astaxanthin production in the Baltic Sea food web. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 213-224.
- Austreng, E., & Gjefsen, T. (1981). Fish oils with different contents of free fatty acids in diets for rainbow trout fingerlings and salmon parr. *Aquaculture*, 25, 173-183.
- Bergvik, M., Leiknes, Ø., Altin, D., Dahl, K. R., & Olsen, Y. (2012a). Dynamics of the lipid content and biomass of *Calanus finmarchicus* (copepodite V) in a Norwegian fjord. *Lipids*, 47, 881-895.
- Bergvik, M., Overrein, I., Bantle, M., Evjemo, J. O., & Rustad, T. (2012b). Properties of *Calanus finmarchicus* biomass during frozen storage after heat inactivation of autolytic enzymes. *Food Chemistry*, 132, 209-215.
- Berstad, A., Raa, J., & Valeur, J. (2015). Indole—the scent of a healthy “inner soil”. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 27997.
- Burr, M. L., Gilbert, J., Holliday, R. a., Elwood, P., Fehily, A., Rogers, S., Sweetnam, P., & Deadman, N. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet*, 334, 757-761.
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevans. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851, 469-484.
- Chiou, S.-H., & Wang, K.-T. (1988). Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 448, 404-410.

- Choe, E. (2008). Effects and mechanisms of minor compounds in oil on lipid oxidation. In C. C. Akoh & D. B. Min (eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3. ed., ch. 17, Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-186.
- Christie, W. W., & Han, X. (2010). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, 4. ed., Bridgewater, England: The Oily Press, PJ Barnes & Associates.
- Chuchird, N., Rorkwiree, P., & Rairat, T. (2015). Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *SpringerPlus*, 4, 1-12.
- Cook, C. M., Larsen, T. S., Derrig, L. D., Kelly, K. M., & Tande, K. S. (2016). Wax Ester Rich Oil From The Marine Crustacean, *Calanus finmarchicus*, is a Bioavailable Source of EPA and DHA for Human Consumption. *Lipids*, 51, 1137-1144.
- De Silva, S., Francis, D. S., & Tacon, A. G. (2011). Fish oil in aquaculture: in retrospect. In G. M. Turchini, W.-K. Ng, & D. R. Tocher (eds.), *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, ch. 1, Boca Raton, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27, 680-685.
- Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Miranda, J., & Perez-Jimenez, F. (2012). Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, 107, 201-213.
- Dibner, J., & Buttin, P. (2002). Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11, 453-463.
- Diel, S., & Tande, K. (1992). Does the spawning of *Calanus finmarchicus* in high latitudes follow a reproducible pattern? *Marine Biology*, 113, 21-31.
- Dulavik, B., Sørensen, N., Barstad, H., Horvli, O., & Olsen, R. L. (1998). Oxidative stability of frozen light and dark muscles of saithe (*Pollachius virens* L.). *Journal of Food Lipids*, 5, 233-245.

- Eilertsen, K.-E., Mæhre, H. K., Jensen, I. J., Devold, H., Olsen, J. O., Lie, R. K., Brox, J., Berg, V., Elvevoll, E. O., & Østerud, B. (2012). A Wax Ester and Astaxanthin-Rich Extract from the Marine Copepod *Calanus finmarchicus* Attenuates Atherogenesis in Female Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*, *142*, 508-512.
- Eisemann, J., & van Heugten, E. (2007). Response of pigs to dietary inclusion of formic acid and ammonium formate. *Journal of Animal Science*, *85*, 1530-1539.
- FAO. (2016). *The State of the World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to Food Security and Nutrition for all*. Hentet fra: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Nedlastet 12.04.16.
- FAO/WHO. (2003). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Geneva, World Health Organisation.
- Fiskeridirektoratet. (2016). *Forvaltningsplan for raudåte*. Bergen: Fiskeridirektoratet.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497-509.
- Foss, P., Renstrøm, B., & Liaaen-Jensen, S. (1987). Natural occurrence of enantiomeric and Meso astaxanthin 7*-crustaceans including zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *86*, 313-314.
- Fountoulakis, M., & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, *826*, 109-134.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation*, 2 ed., Bridgewater, UK: The Oily Press.
- Fraser, A. J., Sargent, J. R., & Gamble, J. C. (1989). Lipid class and fatty acid composition of *Calanus finmarchicus* (Gunnerus), *Pseudocalanus* sp. and *Temora longicornis* Muller from a nutrient-enriched seawater enclosure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *130*, 81-92.
- FRS. (2004). *Zooplankton and Climate Change – the Calanus Story*. Fisheries Research Services, Marine Laboratory., from Marine Scotland - Marine and Fisheries-related publications, reports and posters http://www.vliz.be/docs/Zeecijfers/zooplankton_and_climate_change.pdf, Nedlastet: 17.03.2017.

- Funk, V. A., & Hobson, L. A. (1991). Temporal variations in the carotenoid composition and content of *Euphausia pacifica* Hansen in Saanich Inlet, British Columbia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 148, 93-104.
- GE Healthcare. (2010). *Strategies for Protein Purification*. Uppsala: GE healthcare.
- Graeve, M., Hagen, W., & Kattner, G. (1994). Herbivorous or omnivorous? On the significance of lipid compositions as trophic markers in Antarctic copepods. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 41, 915-924.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning, smitte gjennom mat og vann*, 4 utg., Oslo: Cappelen Damm AS.
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21, 210-216.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hibbeln, J. R., Nieminen, L. R., Blasbalg, T. L., Riggs, J. A., & Lands, W. E. (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1483-1493.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., & Fukuhara, K.-i. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 639-646.
- Hirche, H.-J. (1991). Distribution of dominant calanoid copepod species in the Greenland Sea during late fall. *Polar Biology*, 11, 351-362.
- Hirche, H.-J. (1996). Diapause in the marine copepod, *Calanus finmarchicus* - a review. *Ophelia*, 44, 129-143.
- Hugli, T. E., & Moore, S. (1972). Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 2828-2834.
- Höper, A. C., Salma, W., Khalid, A. M., Hafstad, A. D., Sollie, S. J., Raa, J., Larsen, T. S., & Aasum, E. (2013). Oil from the marine zooplankton *Calanus finmarchicus* improves the cardiometabolic phenotype of diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, 110, 2186-2193.
- Höper, A. C., Salma, W., Sollie, S. J., Hafstad, A. D., Lund, J., Khalid, A. M., Raa, J., Aasum, E., & Larsen, T. S. (2014). Wax esters from the marine copepod *Calanus finmarchicus* reduce diet-induced obesity and obesity-related metabolic disorders in mice. *The Journal of Nutrition*, 144, 164-169.

- Jónasdóttir, S. H. (1999). Lipid content of *Calanus finmarchicus* during overwintering in the Faroe–Shetland Channel. *Fisheries Oceanography*, 8, 61-72.
- Jørstad, T. J. (2015). *Mikrobiell stabilitet og kjemisk sammensetning i hydrolysat fra Calanus finmarchicus*. (Masteroppgave i marin bioteknologi), UiT, Norges arktiske universitet, Tromsø.
- Kattner, G., & Hagen, W. (1995). Polar herbivorous copepods—different pathways in lipid biosynthesis. *International Council for the Exploration of the Sea - Journal of Marine Science*, 52, 329-335.
- Ke, P. J., Woyeboda, A. D., Regier, L. W., & Ackman, R. G. (1976). An improved titrimetric method for determination of free fatty acids in fish oils. *Environment Canada, Fisheries and Marine Service, Techn. Branch, Halifax, Nova Scotia*, 61, 1-4.
- Khan, S. H., & Iqbal, J. (2016). Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research*, 44, 359-369.
- Kinsella, J., Shimp, J., & Mai, J. (1978). The proximate and lipid composition of several species of freshwater fishes. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, 69, 1-20.
- Koh, C. B., Romano, N., Zahrah, A. S., & Ng, W. K. (2016). Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 47, 357-369.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81, 99-104.
- Le Floc'h, N., Otten, W., & Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*, 41, 1195-1205.
- Lee, R. F., Hirota, J., & Barnett, A. M. (1971). Distribution and importance of wax esters in marine copepods and other zooplankton. *Deep Sea Research*, 18, 1147-1165.
- Lotocka, M., & Styczynska-Jurewicz, E. (2001). Astaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin esters in the copepod *Acartia bifilosa* (Copepoda, Calanoida) during ontogenetic development. *Oceanologia*, 43, 487-497.
- Lotocka, M., Styczyńska-Jurewicz, E., & Błędzki, L. A. (2004). Changes in carotenoid composition in different developmental stages of copepods: *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht and *Acartia* spp. *Journal of Plankton Research*, 26, 159-166.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock, Biology of Microorganisms*, 13 ed., San Francisco: Pearson Education.

- Maehre, H., Hamre, K., & Elvevoll, E. (2013). Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, *19*, 301-311.
- Marker, T., Andreassen, P., Arashkewich, E., & Hansen, B. W. (2003). Lipid deposition and sexual maturation in cohorts of *Calanus finmarchicus* (Gunnerus) originating from Bergen (60 N) and Tromsø (69 N) reared in Tromsø, Norway. *Marine Biology*, *143*, 283-296.
- Marshall, S. M., & Orr, A. P. (1972). *The Biology of a Marine Copepod*. Berlin, New York: Springer-Verlag.
- McGill, A. S., & Moffat, C. F. (1992). A study of the composition of fish liver and body oil triglycerides. *Lipids*, *27*, 360-370.
- Melle, W., Ellertsen, B., & Skjoldal, H. R. (2004). Zooplankton: The link to higher trophic levels. In H. R. Skjoldal (eds.), *The Norwegian Sea Ecosystem*, ch. 6, Trondheim: Tapir Academic Press.
- Miljødirektoratet. (2015). *Klimatiltak og utslippsbaner mot 2030 - Kunnskapsgrunnlag for lavutslippsutvikling*. Trondheim: Miljødirektoratet.
- Miyashita, K., & Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *63*, 1380-1384.
- Moore, S., & Stein, W. H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, *6*, 819-831.
- Mundheim, H., & Nortvedt, R. (2001). Fôrproduksjon - Teknologi og fôrtyper. In R. waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (red). *Fiskeernæring*, kap. 22, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Nasjonalt råd for ernæring. (2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer*. Oslo: Helsedirektoratet.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Principles of biochemistry*, 5. ed., New York: W. H. Freeman and Company.
- Ng, W. K., Koh, C. B., Teoh, C. Y., & Romano, N. (2015). Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture*, *449*, 69-77.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2016). *Regjeringens bioøkonomistrategi, Kjente ressurser - uante muligheter*. Oslo: Nærings- og fiskeridepartementet.
- Ohman, M. (1996). Freezing and storage of copepod samples for the analysis of lipids. *Marine Ecology Progress Series*, *130*, 295-298.

- Olsen, R. L. (2017). *Lipidkjemi med vekt på fisk*, 4 utg., Norges Fiskerihøgskole, UiT, Norges arktiske universitet.
- Olsen, R. L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, *36*, 144-151.
- Opheim, M., Lenz Strube, M., Sterten, H., Øverland, M., & Kjos, N. P. (2016). Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate in diets for weaning piglets - effect on growth performance, intestinal morphometry and microbiota composition. *Archives of Animal Nutrition*, *70*, 44-56.
- Oulhaj, A., Jernerén, F., Refsum, H., Smith, A. D., & de Jager, C. A. (2016). Omega-3 fatty acid status enhances the prevention of cognitive decline by B vitamins in mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, *50*, 547-557.
- Padley, F. (1994). The control of rancidity in confectionery products. In J. C. Allen & R. J. Hamilton (eds.), *Rancidity in Foods*, 3. ed., ch. 14, Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Parrish, C. C. (1988). Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. *Marine Chemistry*, *23*, 17-40.
- Pedersen, A. M. (2007). *Olje fra raudåte (Calanus finmarchicus). Oksidativ stabilitet, fettklasser og karotenoidinnhold*. (Masteroppgave i marin bioteknologi), Universitetet i Tromsø.
- Pedersen, A. M., Salma, W., Höper, A. C., Larsen, T. S., & Olsen, R. L. (2014). Lipid profile of mice fed a high-fat diet supplemented with a wax ester-rich marine oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*, 1718-1726.
- Pedersen, R. B. (2010). *Egenskaper til fett i proteinkonsentrat fremstilt ved ensilering av biprodukter fra oppdrettet laks og ørret*. (Masteroppgave i fiskerifag), Universitetet i Tromsø.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American Journal of Cardiology*, *98*, 3-18.
- Reda, R. M., Mahmoud, R., Selim, K. M., & El-Araby, I. E. (2016). Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *50*, 255-262.
- Rizos, E. C., Ntzani, E. E., Bika, E., Kostapanos, M. S., & Elisaf, M. S. (2012). Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease

- events: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, *308*, 1024-1033.
- Ruxton, C., Calder, P., Reed, S. C., & Simpson, M. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutrition Research Reviews*, *18*, 113-129.
- Raa, J., Gildberg, A., & Olley, J. N. (1982). Fish silage: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *16*, 383-419.
- Sainio, E. L., Pulkki, K., & Young, S. N. (1996). L-tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids*, *10*, 21-47.
- Sargent, J., & Falk-Petersen, S. (1981). Ecological investigations on the zooplankton community in Balsfjorden, Northern Norway: lipids and fatty acids in *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa raschi* and *T. inermis* during mid-winter. *Marine Biology*, *62*, 131-137.
- Scott, C. L., Kwasniewski, S., Falk-Petersen, S., & Sargent, J. R. (2000). Lipids and life strategies of *Calanus finmarchicus*, *Calanus glacialis* and *Calanus hyperboreus* in late autumn, Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Biology*, *23*, 510-516.
- Scott, C. L., Kwasniewski, S., Falk-Petersen, S., & Sargent, J. R. (2002). Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus* from Arctic waters. *Marine Ecology Progress Series*, *235*, 127-134.
- Shahidi, F., & Finley, J. W. (2001). *Omega-3 Fatty Acids Chemistry, Nutrition, and Health Effects*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. (2008). Extraction and Analysis of Lipids. In C. C. Akoh & D. B. Min (eds.), *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3. ed., ch. 5, Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Simpson, R. J., Neuberger, M. R., & Liu, T. (1976). Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *Journal of Biological Chemistry*, *251*, 1936-1940.
- Sommer, F., Agurto, C., Henriksen, P., & Kiørboe, T. (2006). Astaxanthin in the calanoid copepod *Calanus helgolandicus*: dynamics of esterification and vertical distribution in the German Bight, North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, *319*, 167-173.
- Stoffel, W., Chu, F., & Ahrens Jr, E. H. (1959). Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. Micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry*, *31*, 307-308.

- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3, 1-7.
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P. A., Hjelle, J. I., Harboe, T., & Hamre, K. (2013). Toxic effects of dietary hydrolysed lipids: an in vivo study on fish larvae. *British Journal of Nutrition*, 109, 1071-1081.
- Tatterson, I. (1982). Fish silage—preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology*, 7, 153-159.
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107.
- Vaghela, M. N., & Kilara, A. (1995). A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1117-1121.
- Vagner, M., & Santigosa, E. (2011). Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture*, 315, 131-143.
- Vang, B. (2015). *Recovery and properties of oil from the copepod Calanus finmarchicus*. (Dr. oppgave), UiT, Norges arktiske universitet, Tromsø.
- Vang, B., Pedersen, A. M., & Olsen, R. L. (2013). Oil extraction From the Copepod *Calanus finmarchicus* Using Proteolytic Enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22, 619-628.
- Viga, A., & Grahl-Nielsen, O. (1990). Genotypic and phenotypic fatty acid composition in the tissues of salmon, *Salmo salar*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 96, 721-727.
- Ward, P., Shreeve, R. S., & Cripps, G. C. (1996). *Rhincalanus gigas* and *Calanus simillimus*: Lipid storage patterns of two species of copepod in the seasonally ice-free zone of the Southern Ocean. *Journal of Plankton Research*, 18, 1439-1454.
- Wiborg, K. F. (1955). Zooplankton in relation to hydrography in the Norwegian Sea. *Fiskeridirektoratets Skrifter Serie Havundersøkelser*, 11, 1-66.
- Widmaier, E. P., Raff, H., & Strang, K. T. (2011). *Vander's Human Physiology. The mechanisms of Body Function*, 12 ed., New York: The McGraw-Hill Companies.
- Wilson, R. P., & Halver, J. E. (1986). Protein and amino acid requirements of fishes. *Annual Review of Nutrition*, 6, 225-244.

- Witte, V. C., Krause, G. F., & Bailey, M. E. (1970). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, 35, 582-585.
- World Health Organization. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*.
- Waagbø, R., Espe, M., Hamre, K., & Lie, Ø. (2001). *Fiskeernæring*. Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S., & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374.
- Yurko-Mauro, K., Kralovec, J., Bailey-Hall, E., Smeberg, V., Stark, J. G., & Salem, N. (2015). Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids in Health and Disease*, 14, 99.