

Egenskaper til fett i proteinkonsentrat framstilt ved ensilering av biprodukter fra oppdrettet laks og ørret

av

Renate Birgitte Pedersen

Masteroppgave i fiskerifag
Studieretning marine næringsmidler
(60 stp)

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
Universitetet i Tromsø



Januar 2010

Forord

Oppgaven ble utført i samarbeid med Hordafor AS og jeg vil takke for et flott samarbeid og interessante problemstillinger. En spesiell takk til kvalitetssjef Jørgen Seliussen som har vært medveileder på oppgaven. Jeg vil også takke de ansatte ved Hordafor AS, avd. Bekkjarvik, Austevoll for et hyggelig og lærerikt opphold da jeg jobbet der i sommer.

Det begynner å bli mange år siden jeg satt meg som mål å ta en master i fiskerifag og det er vemodig, men samtidig veldig godt å se at det nå går mot slutten. Takk til alle som har bidratt til å gjøre studietiden min i Tromsø og ved Norges fiskerihøgskole uforglemmelig.

Året som masterstudent ved BFE har vært utrolig lærerikt og jeg har hatt gleden av å jobbe i et positivt og inkluderende arbeidsmiljø. Tusen takk til veileder Ragnar L. Olsen som alltid sørger for at skipet styres i riktig retning. Takk for et smittende engasjement og for at du tar deg tid til å gi grundig og tålmodig veiledning.

Takk til kontormakker Ida som har krydret tilværelsen min med godt humør, hyggelige spaserturer til universitetet og koselige kaffepauser med en sporadisk vaffel. Takk til alle på laben som har stilt opp med godt humør og alltid hjelper til om det trengs. Birthe for gode råd og pedagogiske forklaringer, Ida for velvilje og gode samtaler, og Hanne for hjelp med praktisk arbeid og utførelse av forsøk.

Til slutt vil jeg takke familien min som har vært fantastiske støttespillere i alle mine år som student. Mamma og Pappa for omsorg, støttende ord og finansielle bidrag som har gitt meg mulighet til å fordype meg i studiene. Dere er uvurderlige og jeg er utrolig takknemlig. Min søster Linda som alltid stiller opp, du er fantastisk og får meg bestandig i godt humør med din omsorg og forståelse.

Og til alle dere andre som har heiet meg fram, tusen takk!

Renate Birgitte Pedersen
Tromsø, januar 2010

Sammendrag

Norge er verdens største produsent av oppdrettet laks (*Salmo salar*) og som følge av dette genereres årlig store mengder biprodukter. Mesteparten av biproduktene fra oppdrett konserveres i dag ved hjelp av maursyreensilering. Fra ensilasjen produseres det proteinkonsentrat og olje som utnyttes i fôr til husdyr, fisk og kjæledyr. Hordafors AS er ledende i Norge på håndtering av biprodukter fra oppdrettet laks og ørret. Formålet med denne oppgaven har vært å studere kvalitetsegenskaper til fett ekstrahert fra Hordafors proteinkonsentrat (H-pro).

H-pro hadde et tørrstoffinnhold på 44,9 % og et fettinnhold på 9,5 %. Fettsyresammensetningen i H-pro fett var ganske lik sammensetningen i oljen (H-oil) som utvinnes fra ensilasjen. Innholdet av linolsyre (18:2n-6) varierte mellom 6,7 og 9,7 %. Dette viser at oppdrettsfisken har fått fôr tilsatt planteoljer. De langkjedede omega-3 fettsyrene (LC – n-3; 20:5n-3, 22:5n-3 og 22:6n-3) utgjorde 12,1 % av fettsyrene i H-pro fett og 14,4 % av fettsyrene i H-oil. Fettet ekstrahert fra H-pro hadde et innhold av frie fettsyrer (FFA) på gjennomsnittlig 40 %. Dette er svært høyt og kan begrense anvendelsesmulighetene fordi fiskefôrindustrien har en øvre grense på 5 % FFA i oljer som skal brukes i fôr. Oljeproduktet (H-oil) fra ensilasjen hadde bare 1,9 % FFA. FFA dannes under ensileringen som følge av at det fins fettspaltende enzymer (lipaser og fosfolipaser) men et surt pH-optimum (lysosomale enzymer) i bi-produktene. Sammensetningen av FFA i H-pro fett tyder på at det er fosfolipidspaltende enzymer som dominerer under ensileringen.

Fettet ekstrahert fra H-pro kunne separeres i to noenlunde like store fraksjoner; en oljefase med nøytrale lipider (NL) hvor triacylglycerol (TAG) dominerte, og en fraksjon som i tillegg til NL inneholdt fosfolipider og mesteparten av de frie fettsyrene. En måte å forbedre kvaliteten til H-pro vil kunne være å fjerne fett. Dette kan kanskje gjøres ved å hydrolysere proteinkonsentratet mer ved hjelp å bruke proteolytiske enzymer og deretter foreta en sentrifugering for å fjerne frigjorte fettstoffer.

Summary

Norway is the world's largest producer of farmed salmon (*Salmo salar*) and processing annually generates large quantities of by-products. Most of the by-products from this farming are preserved by using formic acid to produce silage. The silage is used to produce protein concentrate and oil used in feed for livestock, fish and pets. Hordafor AS is a leading company in the handling of by-products from farmed salmon and trout. The purpose of this study has been to study the quality characteristics of fat extracted from Hordafor's protein concentrate (H-pro).

H-pro had a dry matter content of 44,9 % and a fat content of 9,5 %. Fatty acid composition in the fat from H-pro was quite similar to the composition seen in oil (H-oil) extracted from the silage. The content of linoleic acid (18:2 n-6) ranged between 6,7 and 9,7 %. This shows that farmed fish had been given feed containing vegetable oils. The long-chain omega-3 fatty acids (LC - n-3, 20:5 n-3, 22:5 n-3 and 22:6 n-3) accounted for 12,1 % of fatty acids in fat from H pro and 14,4 % of fatty acids in the H-oil. Fat extracted from H-pro had an average of free fatty acids (FFA) content of 40 %. This is very high and may limit the application possibilities because the fish feed industry has an upper limit of 5 % FFA in oils used in feed. The oil product (H-oil) obtained from the silage had only 1,9 % FFA. FFA are formed during the silage process by enzymes (lipase and phospholipase) with an acidic pH optimum (lysosomal enzymes) in the by-products. The composition of FFA in the fat from H-pro suggests that phospholipases are dominating during the silage process.

The fat extracted from the H-pro could be separated in two roughly equal fractions: an oil phase with neutral lipids (NL) dominated by triacylglycerol (TAG), and a fraction that in addition to the NL, contained phospholipids and most of the FFA. One way to improve the quality of H-pro would be to remove the fat. This could perhaps be done by hydrolyzing the protein concentrate more by using proteolytic enzymes and then remove released lipids by a centrifugation step.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Summary.....	III
Innholdsfortegnelse.....	IV
Forkortelser.....	V
1. Innledning.....	1
1.1 Produksjon av laksefisk.....	1
1.2 Ensilering.....	2
1.3 Generell bakgrunn.....	5
1.3.1 Nøytrale lipider.....	5
1.3.2 Polare lipider.....	8
1.4 Kvalitet av lipider.....	9
1.4.1 Hydrolyse av fett.....	10
1.4.2 Oksidasjon av lipider.....	11
2. Materialer og metoder.....	13
2.1 Materialer.....	13
2.2 Metoder.....	14
2.2.1 Fettekstraksjon.....	14
2.2.2 Frie fettsyrer.....	14
2.2.3 Fettsyresammensetning.....	15
2.2.4 Fettklasseanalyse.....	15
2.2.5 Fast fase ekstraksjon (SPE).....	16
2.2.6 Tørrstoff.....	17
3. Resultater.....	18
3.1 Egenskaper til fett i H-pro og i lignende produkter.....	18
3.1.1 Fettinnhold.....	18
3.1.2 Fettsyresammensetning.....	19
3.1.3 Frie fettsyrer.....	20
3.1.4 Fettklasser i H-pro.....	20
3.2 Separasjon av fett fra H-pro i to faser.....	23
3.2.1 Fettklasser i topp – og bunnfasen.....	24
3.2.2 Fast fase ekstraksjon av fett fra H-pro, toppfase og bunnfase.....	25
3.2.3 Fettsyresammensetning i fraksjonerte fettklasser fra topp- og bunnfasen.....	28
3.2.4 Fett ekstrahert fra fiskemel.....	29
3.2.5 Sammenligning av toppfasen og bunnfasen i H-pro og fiskemel.....	30
3.2.6 Sammenligning av fett ekstrahert fra H-pro og lignende proteinprodukter.....	32
4. Diskusjon.....	34
4.1 Konklusjoner og videre arbeider.....	38
5. Referanser.....	40

Forkortelser

ALA	α -linolensyre
ARA	Arakidonsyre
C	Kolesterol
CE	Kolesterylester
DAG	Diacylglycerol
DHA	Docosahekaensyre
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DPA	Docosapentaensyre
EPA	Eicosapentaensyre
FA	Fettsyre
FFA	Frie fettsyrer
FPC	Fiskeproteinkonsentrat (fish protein concentrate)
IO	Ikke opplyst
LA	Linolsyre
LC – n-3	Langkjedede n-3 fettsyrer
LPC	Lysofosfatidylkolin
MAG	Monoacylglycerol
NL	Nøytrale lipider
p.a	Pro analysis
PC	Fosfatidylkolin
PE	Fosfatidyletanolamin
pers. med	Personlig meddelelse
PI	Fosfatidylinositol
PL	Fosfolipid
PLA1	Fosfolipase A1
PLA2	Fosfolipase A2
PLB	Fosfolipase B
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PS	Fosfatidylserin
S	Standard 18-5A brukt i tynnsjiktskromatografi
SPE	Fast fase ekstraksjon (solid phase extraction)
SSB	Statistisk sentralbyrå
TAG	Triacylglycerol
TLC	Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography)

1. INNLEDNING

1.1 Produksjon av laksefisk

Norge er verdens største produsent av atlantisk laks (*Salmo salar*). Helt siden 1990-tallet har det vært en tilnærmet eksponentiell vekst innen oppdrett av laks. Det ble ifølge Fiskeridirektoratet solgt over 820 000 tonn rundvekt laks/regnbueørret/ørret i 2008, hvorav laks utgjorde i overkant av 730 000 tonn. Hele 95 % av den totale produksjonen av laks og ørret blir eksportert. Det eksporteres hovedsaklig hel sløyd fisk (90 %), men i de siste årene har det vært en økning av filetproduksjonen innenlands, og det antas at denne vil øke ytterligere (Eksportutvalget for fisk, SSB, 2009).

Under sløyning og videreforedling av fisk oppstår det store mengder biprodukter som normalt ikke utnyttes til humant konsum (innvoller, buklister, hoder og rygger med spor). Biproduktene deles inn i 3 ulike kategorier i henhold til biproduktforskriften som ble innført i 2007 i Norge. Biproduktforskriften følger EUs biproduktforordning som kategoriserer biprodukter. Kategori 1 omhandler særlig dyr med zoonotiske sykdommer. For biprodukter fra fisk gjelder spesielt kategori 2 (dødfisk, gulvfisk fra slakteri, dødfisk i ventemerde og fisk med kliniske tegn til sykdom) og kategori 3 (biprodukter fra levende fisk slaktet til humant konsum). Biprodukter under kategori 2 går til ensilasjeproduksjon og forbrenning. Kategori 2 produkter kan også benyttes ubearbeidet som pelsdyrfôr innad i Norge. Kategori 3 slakteavfall går hovedsakelig til ensilasje, men noe håndteres også ferskt. Anslagsvis 75-80 % av biproduktene fra oppdrett (både kategori 2 og 3) går til ensilering (RUBIN, 2008). Ensilerede biprodukter fra kategori 3 slakteavfall brukes til produksjon av proteinkonsentrat og olje. Disse utnyttes hovedsakelig som ingrediens i fôr til svin, fjørfe, fisk og kjæledyr.

Ved sløyning av oppdrettslaks utgjør innvoller ca. 17 %, hvilket gir et konstant utbytte på ca. 83 %. Industriell filetering av laks gir et filetutbytte på 56 % av rundvekt (pers. med. Stine Ervik, 2009), og avskjær som hode, buk og rygg m/spor utgjør 27 %. Hvert tonn renskåret filet produsert fra oppdrettslaks vil derfor generere 170 kg innvoller og 270 kg hoder, buk og rygg m/spor.

Biprodukter fra laksefisk som ensileres, har høy ferskhetsgrad og god kvalitet ettersom utgangspunkt er ferskt råstoff produsert til humant konsum. At fisken er sultet i 50 °C før slakting (pers. med. Katrine Bones Enger, 2009) vil bidra til den gode kvaliteten på biproduktene fordi mage – tarmsystemet i praksis er tømt for fôr og fôrrester. Råstoff fra oppdrettet fisk har i tillegg en mer stabil kvalitet og mindre sesongvariasjoner enn råstoff fra

villfisk.

Hordafor AS er ledende i Norge på utnyttelse av biprodukter fra oppdrettet laks og ørret. I 2008 håndterte Hordafor AS 80 000 tonn kategori 3 slakteavfall og tok imot 13 000 tonn kategori 2 oppdrettsensilasje. Bedriften er også involvert i selskaper som driver foredling av sild og bearbeiding av biprodukter fra pelagisk fisk.

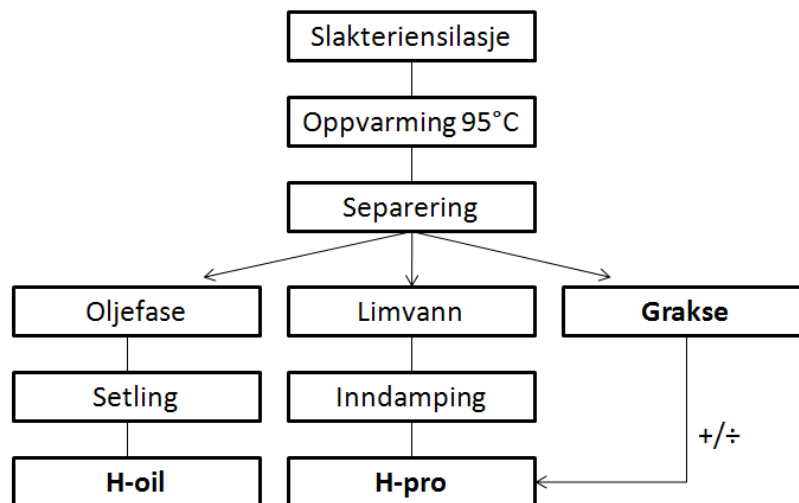
1.2 Ensilering

Ensilering er en gammel konserveringsmetode, tradisjonelt mest brukt ved konservering av grøntfôr i silo til husdyr. Under anaerobe forhold ved lagring av fôr i silo, vil bakterier naturlig tilstede i fôret konvertere sukker til melkesyre. Melkesyren fører til fall i pH og forhindrer derfor forråtnelse (Raa et al., 1983). Metoden slik vi kjenner den i dag ble utviklet på 1920-tallet av den finske forskeren A.I. Virtanen som ble tildelt Nobelprisen i kjemi i 1945. Virtanen viste at man, ved å tilsette syre i fôret i forkant av lagring, kunne oppnå konserverende effekt. Ensilering ved bruk av syre viste seg å være svært gunstig fordi proteinmengden og kvaliteten på fôret ble ivaretatt. Metoden var i tillegg mer pålitelig enn andre kjente konserveringsmetoder basert på fermentering. Syrekonservering ble i 1940 tilpasset av Edin for konservering av fiskeavfall (Edin H., 1940).

Ensilering av fiskeråstoff gjøres ved at kvernet fiskeråstoff tilsettes syre. I dag er det vanlig å bruke maursyre sammen med antioksidant (ethoxyquin). Syren vil trekke inn i råstoffet og føre til nedgang i pH. For at ensileringen skal være vellykket må pH være lavere enn 4,0. Det er i tillegg viktig at råstoffet som skal ensileres er godt kvernet før tilsetting av syre, slik at syren raskt kan trekke inn i råstoffet. Kontinuerlig omrøring i ensilasjetanken sørger for at syren fordeles jevnt i råstoffet. Jevn fordeling av syre er viktig fordi det forhindrer dannelsen av "lommer" med råstoff uten syre som kan føre til forråtnelse og dermed ødeleggelse av hele ensilasjen. Biprodukter fra produksjon ensileres lokalt ved slakteriene og transporteres deretter til sentralanlegg hvor olje og proteinkonsentrat blir produsert. Figur 1 gir en skjematisk oversikt hvordan olje (H-oil) og proteinkonsentrat (H-pro) blir produsert ved Hordafor AS.

Når sentralanlegget mottar ensilasje, vil den enten mellomlagres eller varmes direkte til 95 °C før sentrifugering med en tri-kanter sentrifuge (Flottweg trikanter, Tyskland). Ensilasjen skilles i tre faser: olje, limvann (ca. 17 % tørrstoff) og grakse. Oljefasen inneholder noe vann og går derfor til setling på tank der vannet etter hvert tappes ut. Den resterende oljen utgjør produktet H-oil. Omkring 75 % av vannet i limvannsfasen dampes bort. Graksefasen

tilsettes det inndampede limvannet, forutsatt at det er en graksefase fra produksjonen. Prosessen resulterer i proteinkonsentratet H-pro.



Figur 1 Flytskjema over prosessering av H-pro og H-oil ved Hordafor AS. I noen tilfeller blir graksefasen tilført H-pro (+), og andre ganger ikke (-).

Prosentvis fordeling av de tre fasene er ofte: limvann ca. 75 %, oljefase ca. 23-24 % og grakse ca. 1-2 %. Mengde grakse vil i betydelig grad være avhengig av mengden bein tilstede i råstoffet. Ved dagens produksjon er det ofte så lite grakse tilstede at det ikke tilsettes i det inndampede limvannet.

Under ensileringsprosessen vil fiskens egne enzymer, bl. a. pepsin fra magesekk og lysosomale enzymer inkludert proteaser, gradvis bryte ned råstoffet. Det er vist i forsøk at innvoller hydrolyseres raskere enn andre fiskematerialer (Espe & Lied, 1999). Ensilasjen vil få en mer flytende konsistens ettersom hydrolysen går sin gang. Hastigheten av hydrolysen påvirkes av mengden enzymer tilstede i råstoffet, pH og temperatur. Hydrolyse av protein er en fordel dersom fett skal fjernes fra råstoffet. Et fettfritt eller fettfattig hydrolysat vil gi et proteinkonsentrat av høyere kvalitet (Raa & Gildberg, 1982).

Foredling av biprodukter fra fisk ved hjelp av syreensilering har vært studert gjennom flere tiår (Freeman & Hoogland, 1956; Tatterson & Windsor, 1974; Backhoff, 1976; Wignall & Tatterson, 1976; Gildberg & Raa, 1977; Reece, 1980; Tatterson, 1982; Raa & Gildberg, 1982; Stone & Hardy, 1986; Jackson et al., 1984; Haaland et al., 1990; Gao et al., 1992; Espe & Lied, 1999; Bower & Hietala, 2008). Forskningen inkluderer både egenskaper og utnyttelse av ensilerte produkter. Ved hydrolysering vil proteinene brytes ned til mindre peptider og aminosyrer. Hydrolyseringsgrad kan bestemmes ved å måle mengden frie aminogrupeer i

forhold til totale aminogrunder. Den etablerte metoden for å måle hydrolyseringsgrad er å bruke trinitrobenzensulphonsyre som binder seg til frie aminogrunder (Adler-Nissen, 1979). I dag er OPA-metoden, beskrevet av Nielsen et al. (2001), den mest brukte. Hydrolysegraden i ensilert fiskeråstoff viser at mengde frie aminogrunder etter 3-10 dager er avhengig av lagringstemperatur, og varierer fra 20-70 % (Espe & Lied, 1999).

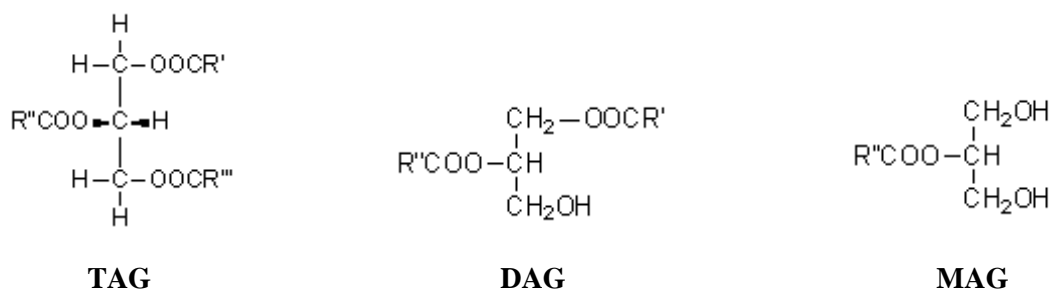
Hovedmålet med denne oppgaven har vært å undersøke kvalitetsegenskaper av i fett fra proteinkonsentrat framstilt ved ensilering av biprodukter fra laks og ørret. Spesielt fokuseres det på innhold av frie fettsyrer og fettklasser.

1.3 Generell bakgrunn

Lipider er biologiske stoffer som kjennetegnes ved at de er løselig i organiske væsker og tilnærmet uløselige i vann. Noen lipider, f. eks. triglycider (i dag er den vanlige benevnelsen triacylglycerol (TAG)) er upolare og løses i organiske løsemiddel som kloroform, eter og benzen, mens polare lipider også løses i væsker hvor metanol og etanol er blandet med organiske løsemidler. Det finnes mange ulike lipider og disse kan deles inn i grupper basert på felles egenskaper. En måte å dele lipider inn i er: nøytrale lipider og polare lipider. Det er imidlertid ingen skarp grense mellom disse. Inndelingen er basert på definisjoner hentet fra Gunstone & Herslöf, "Lipid glossary 2" (2000) og er som følger: "Nøytrale lipider regnes som upolare lipider sammenlignet med polare lipider. Eksempel på nøytrale lipider er triacylglycerol, steroler og sterolester. Polare lipider er lipider med polare "hodegrupper", eksempler på disse er fosfolipider og glykolipider".

1.3.1 Nøytrale lipider

Nøytrale lipider er, sammenlignet med polare lipider, upolare. Et av de mest kjente nøytrale lipidene er TAG som utgjør mesteparten av fettklassene i planteoljer og animalsk fett. Lipidet består av den treverdige alkoholen glyserol forestret med tre fettsyrer (figur 2). Fettsyrene kan være forskjellige eller like. Andre eksempler på nøytrale lipider er diacylglycerol (DAG) og monoacylglycerol (MAG). Disse kan dannes ved enzymatisk hydrolyse av TAG og har kun to (DAG) og en (MAG) fettsyre forestret til glycerol (figur 2). Fordi DAG og MAG har henholdsvis to og en hydroksylgruppe vil de være noe mer polar enn TAG.



Figur 2 Eksempel på tre nøytrale lipider: Triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG) og monoacylglycerol (MAG). R', R'' og R''' markerer posisjon for fettsyrer.

Dersom fettsyrer ikke er bundet i andre molekyler, slik som i for eksempel TAG, kalles de frie fettsyrer (FFA). FFA er nesten ikke-eksisterende i levende dyr og fisk, men dannes først etter døden har inntruffet. Dette skjer blant annet som følge av nedbrytning av TAG og fosfolipider (PL) i mindre komponenter. I modne plantefrø eller frukt som benyttes til oljeproduksjon kan innholdet av FFA være høyt.

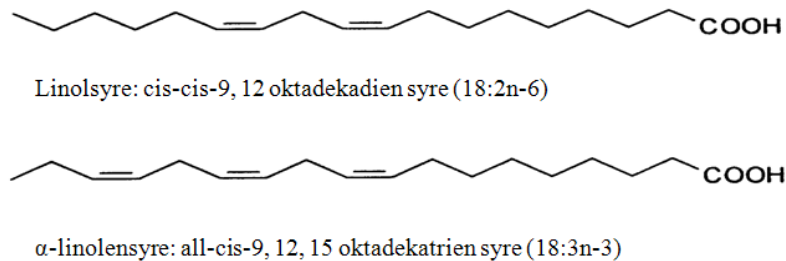
Fettsyrer er bygd opp av en karboksylgruppe og en lang hydrokarbonkjede. De fleste fettsyrer i levende organismer består av 12 til 22 karbonatomer. Karboksylgruppa er polar, mens hydrokarbonkjeden er upolar. Graden av upolaritet i hydrokarbonkjeden vil tilta ved økende lengde. Fettsyrer kan være mettede (uten dobbelbinding), enumettede (en dobbelbinding) eller flerumettede (to eller flere dobbelbindinger). Mettede fettsyrer har høyere smeltepunkt enn umettede fettsyrer. Fett som inneholder mye umettede fettsyrer vil derfor være flytende ved romtemperatur og kalles da olje. Mettede fettsyrer med 16 – 18 C-atomer (f. eks stearinsyre 18:0) er vanligst i plante - og dyrefett. Oljesyre (18:1n-9) er eksempel på en enumettet fettsyre og har en dobbelbinding plassert i det niende C-atomet fra metylenden. Eksempel på en flerumettet fettsyre er linolsyre (LA; 18:2n-6) som har to dobbelbindinger. Fordelingen av mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer i fett og oljer vil variere avhengig av om det kommer fra planter, animalsk, eller marint fett. Dette er oppsummert i tabell 1. Fettsyresammensetningen i animalsk og marint fett vil være påvirket av kosten.

Tabell 1 Generell fettsyresammensetning (%) inndelt i mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer i vegetabiliske oljer, animalsk fett og marint fett.

	Generell fettsyresammensetning (%) i fett/oljer		
	Mettede	Enumettede	Flerumettede
Vegetabiliske oljer	< 20	20-75	10-70
Animalsk fett	40-50	40-50	< 10
Marint fett	15-30	40-60	15-30

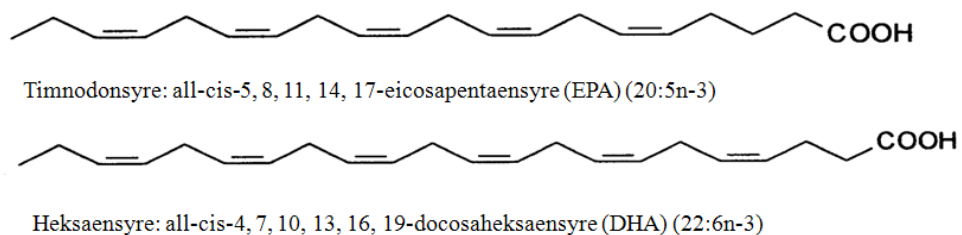
Fisk og marine dyr har et stort innslag langkjedede flerumettede fettsyrer med 20 – 22 C-atomer og 5 – 6 dobbelbindinger, f. eks Eicosapentaensyre (EPA, 20:5n-3). De flerumettede fettsyrene i vegetabiliske oljer er i all hovedsak LA og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3). Tilsvarende i animalsk fett. I marint fett er de flerumettede fettsyrene hovedsakelig EPA, docosapentaensyre (DPA; 22:5n-3) og docosahexaensyre (DHA; 22:6n-3).

Verken mennesker, dyr eller fisk kan syntetisere fettsyrer med dobbeltbinding nærmere metylendel enn C-atom nummer 9 og må derfor få tilførsel av slike essensielle fettsyrer gjennom kosten. LA og ALA skissert i figur 3 er essensielle fettsyrer for mennesker, dyr og fisk.



Figur 3 Essensielle fettsyrer; Linolsyre (18:2n-6), α -linolensyre (18:3n-3),

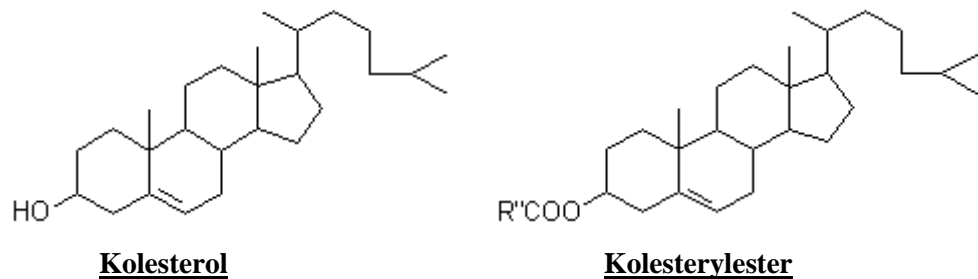
Med utgangspunkt i de samme enzymene syntetiseres det fra LA arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) og fra ALA, EPA og DHA. Både ARA, EPA og DHA er utgangspunkt for dannelsen av fettsyrehormoner. Fettsyrehormoner med utgangspunkt i ARA fører blant annet til økt aggregering av blodplater og betennelsesreaksjoner, mens fettsyrehormoner med utgangspunkt i EPA fører til mindre aggregering av blodplater og betennelsesreaksjoner. Omdannelsen av LA og ALA til lengre og mer umettede fettsyrer er generelt lite effektiv hos de fleste dyr og mennesker. Marin fisk slik som torsk har mistet evnen til slik omdannelse fordi det i den marine næringskjeden er fullt av EPA og DHA (figur 4). Dagens vestlige kosthold med et stort innslag av LA gjennom bruk av planteoljer vil favorisere dannelsen av ARA. Det er derfor viktig å inkludere EPA og DHA i kosten for å balansere virkningen av den høye dannelsen av ARA.



Figur 4 Langkjedede umettede fettsyrer; Eicosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og docosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3).

Kolesterol (figur 5) klassifiseres under gruppen nøytrale lipider. Lipidet har ringstruktur med fire ringer og en fri hydroksylgruppe. Hydroksylgruppen gjør at kolesterol vil ha en svak polaritet og derfor være noe mer polar sammenlignet med f. eks. TAG. I

membraner foreligger kolesterol i fri form mens den ellers i organismen er bundet til en fettsyre ved ester-binding (kolesterylester). Fordi fettsyren bindes til hydroksylgruppen i kolesterol vil polariteten reduseres mye. Kolesterylester betegnes derfor som et svært upolart fettmolekyl. Voksesterer er også svært upolare lipider. Disse består av en langkjedet alkohol foresteret til en fettsyre.



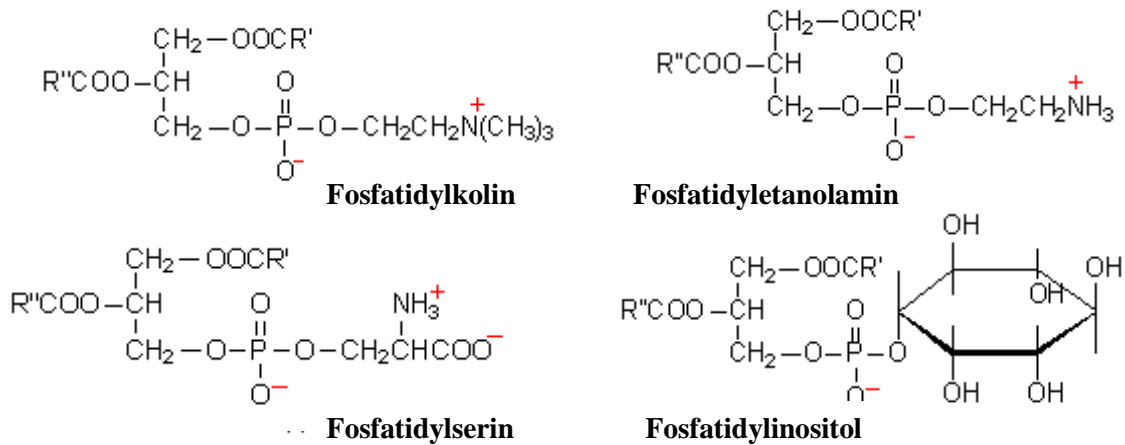
Figur 5 Struktur av kolesterol og kolesterylester. R'' markerer posisjon for fettsyren.

1.3.2 Polare lipider

Polare lipider kjennetegnes ved at de har et polart ”hodeparti” og en lang upolar ”hale”. Den amfipatiske oppbyggingen til polare lipider gjør at de kan inngå i oppbyggingen av biologiske membraner og mange kalles derfor ofte membranlipider. I et vandig miljø vil membranlipidene danne et dobbeltlag med de upolare ”halene” mot hverandre og de polare ”hodene” ut mot det vandige miljøet.

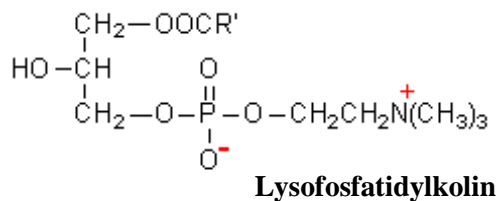
Fosfolipider (PL) og glycolipider er begge eksempler på polare lipider. Den kvantitativt viktigste gruppen av PL er glycerofosfolipider. Glycerofosfolipider er bygd opp av glycerol, to fettsyrer og et fosforylert alkohol. I figur 6 er det vist noen eksempler på de vanligste glycerofosfolipidene: fosfatidylkolin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) og fosfatidylinositol (PI). Et annet PL er sphingomyelin, som istedenfor glycerol er bygget opp av sphingosin. Glykolipider inneholder ikke fosfat, men har et eller flere sukker som polar del.

PC er det mest utbredte glycerofosfolipidet i biologiske membraner. Dette glycerofosfolipidet kalles ofte lecithin. Benevnelsen bør for øvrig brukes med forsiktighet da lecithin egentlig består av en rekke andre komponenter i tillegg til PC. Lecithin kan for eksempel utvinnes fra eggeplomme og soyabønner.



Figur 6 Glycerofosfolipider foretret til ulike alkoholer.

Lysofosfatidylkolin (LPC) er et degraderingsprodukt av PC og inneholder bare en fettsyre. LPC er mer løselig i vann enn de fleste andre lipider og vil derfor lett gå tapt ved en ekstraksjon av fett.



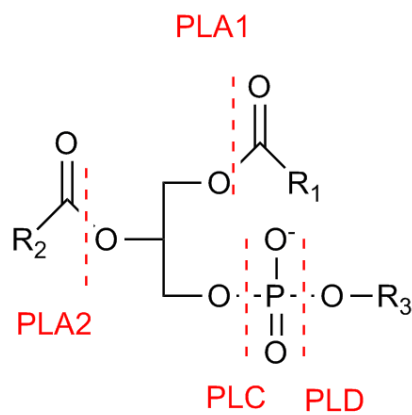
Figur 7 Lysofosfatidylkolin. R' markerer posisjonen for fettsyren.

1.4 Kvalitet av lipider

Ved lagring kan forringelse av fett skje ved at lipider, som for eksempel TAG brytes ned til FFA (hydrolyse) eller ved at oksygen bindes til fettsyrene (oksidasjon). Forringelseshastigheten vil for øvrig være avhengig av mange faktorer. For eksempel vil de aktuelle lagringsforholdene (temperatur, tilgang på luft, lys, pH, mikrobiell vekst osv.) være av stor betydning. I tillegg vil fettsyresammensetning i produktet ha stor innflytelse på oksidasjonshastigheten. Langkjedede umettede fettsyrer vil for eksempel være mer utsatt for oksidasjon enn mettede fettsyrer. Tilstedeværelse av antioksidanter eller prooksidanter vil også være essensiell for hvor raskt oksidasjonen kommer i gang.

1.4.1 Hydrolyse av fett

Hydrolyse av fett (dannelsen av FFA) kan foregå enzymatisk eller kjemisk. Ved enzymatisk hydrolyse er det enzymer fra mikroorganismer eller enzymer naturlig tilstede i produktet som fører til dannelsen av FFA. Enzymet lipase spalter fettsyrer fra TAG, mens fosfolipaser spalter fosfolipider til FFA og andre hydrofobe komponenter. Fosfolipasene klassifiseres ofte i fire typer (A, B, C og D) etter hvilken binding de hydrolyserer i fosfolipidet (figur 8). Fosfolipase A deles inn i A1 og A2 som spalter acylgruppen i henholdsvis posisjon 1 og 2 i glycerol. Gruppe B spalter både posisjon 1 og 2. Fosfolipase C spalter fosforylert alkohol, mens fosfolipase D spalter alkohol.



Figur 8 Ulike grupper fosfolipaser og hvor de ulike spalter bindingene i fosfolipidet. Fosfolipase A1 (PLA1) og A2 (PLA2) frigjør henholdsvis fettsyrene R₁ og R₂ mens fosfolipase B (PLB) spalter både R₁ og R₂. Fosfolipase C (PLC) spalter fosforylert alkohol mens fosfolipase D (PLD) frigjør alkohol.

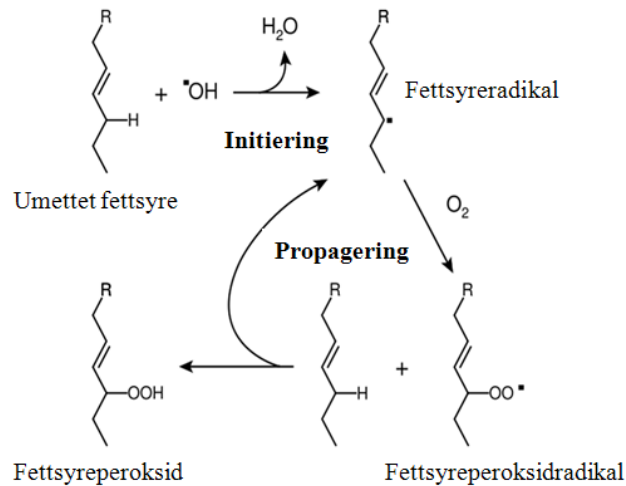
Dersom det dannes kortkjedede (4 – 8 C-atomer) FFA som følge av hydrolyseringen vil dette føre til direkte harskning i produktet. Årsaken er at kortkjedede fettsyrer er flyktige og har såpeaktig lukt og smak. Medium eller lange FFA (14 – 22 C-atomer) derimot, har ikke uønsket lukt eller smak og vil derfor ikke føre til direkte harskning. De vil derimot være mer utsatt for oksidasjon enn om de hadde vært forestret i TAG. Generelt er tilstedeværelsen av FFA i et produkt uheldig da de kan aktivere enzymer som er med i nedbrytningsprosesser og på den måten føre til nedbrytning av proteiner. Denaturering av proteiner kan igjen føre til at vannbindingsevnen i proteinene reduseres. Dersom det er Na⁺ eller K⁺ tilstede vil FFA bindes til disse og danne fettsyresalter (såpe). Fettsyresaltene er ikke løselige og vil felle ut. Mengden FFA brukes ofte som et kvalitetsmål, spesielt i fôr – og næringsmiddelindustrien.

Ved lagring av et produkt under svært sure betingelser som for eksempel i en fiskeensilasje hvor pH er ca. 4,0 vil den mikrobielle veksten være minimal. Det vil derfor være enzymer tilstede i fisken som er ansvarlig for den hydrolytiske nedbrytningen av lipidene. Slike enzymer har opprinnelse fra lysosomer i cellene (lysosomale enzymer). Lysosomene er normalt ansvarlig for den intracellulære fordøyelsen i celler og inneholder i overkant av 40 ulike enzymer. Disse er alle hydrolaser og har optimal aktivitet ved pH nær 5. Ved død vil membranen som omslutter lysosomene etter hvert sprekke og enzymerne lekker ut. Slike enzymer kan være aktiv ved fryselagring ned til - 30 °C (Dulavik et al., 1998).

Dannelse av FFA kan også skje kjemisk ved koking av fett i sterk lut (såpekoking) eller ved koking av fett ved høy temperatur (180 – 200 °C) over lengre tid (frityrkoking).

1.4.2 Oksidasjon av lipider

Oksidasjon er en kjedereaksjon hvor oksygen bindes til fettsyrer. Dette gir en påfølgende nedbrytning av fettsyrene til flyktige forbindelser som gir opphav til ubehagelig lukt og smak. I flere tilfeller kan resultatet bli svært reaktive forbindelser som kan redusere næringsverdien ved at de ødelegger aminosyrer, karbohydrater, vitaminer og DNA. Det er de langkjedede flerumettede fettsyrene som er mest utsatt for oksidasjon og jo flere dobbeltbindinger jo raskere vil de oksidere. Ved oksidasjon av EPA og DHA vil mengden av disse reduseres og næringsverdien i produktet går ned. Oksidasjon kan skje enzymatisk (enzymatisk oksidasjon) eller ikke – enzymatisk (autooksidasjon). Den siste er for øvrig viktigst i fisk og produkter av fiskeråstoff. De to første stegene i autooksidasjon (initiering og propagering) er skissert i figur 9.



Figur 9 Oksidasjon av en umettet fettsyre, de to første stegene i autooksidasjonen: initiering og propagering.

I initieringsfasen vil et hydrogenatom i den umettede fettsyren reagere med et radikal, for eksempel hydroxyradikal ($\cdot\text{OH}$) og det dannes et fettsyreradikal. Også transisjonsmetaller vil kunne føre til dannelsen et fettsyreradikal. Fettsyreradikalet er særlig reaktivt og vil i reaksjon med oksygen danne et fettsyreperoksidradikal. I reaksjon med en ny fettsyre vil fettsyreperoksidradikalet danne et fettsyreperoksid. Propageringen er et faktum. Fettsyreperoksider er primære harskningsprodukter uten lukt og smak. De vil for øvrig være svært ustabile og lett brytes ned til fettsyrealkylradikaler og fettsyrehydroksyradikaler. Fettsyrealkylradikaler kan også fragmenteres i mindre molekyler som alkoholer, aldehyder og ketoner. Disse betegnes som sekundære harskningsprodukter og gir harsk smak og lukt. Mengden fettsyreperoksider og oksidasjonsprodukter vil øke eksponentielt inntil de begynner å reagere med seg selv. Dette er slutfasen i oksidasjon og kalles termineringsfasen.

2. MATERIALER OG METODER

2.1 Materialer

Proteinkonsentrat (H-pro og P-pro), olje (H-oil) samt grakse-fasen fra produksjon av H-pro ble levert av Hordafør AS (Bekkjær, Austevoll, Norge). Produksjonsmetoden innebar oppvarming (95 °C) av råensilasje fra biprodukter fra laks og ørret. Råensilasjen ble separert i tre faser slik som beskrevet innledningsvis. Proteinkonsentrat (H-pro) fra fem produksjoner som til dels var lagret på ulike tanker (K) og fire produksjoner olje (H-oil) ble benyttet:

Tabell 2 Oversikt over proteinkonsentrat og oljer benyttet i analysene.

Proteinkonsentrat		Olje	
	Produksjonsperiode/tank		Produksjonsperiode
H-pro 1	03.02.09	H-oil 1	03.11.08
H-pro 2	03.05.09 - 08.05.09/K1	H-oil 2	03.02.09
H-pro 3	09.03.09 - 08.05.09/K3	H-oil 3	15.03.09
H-pro 4	15.03.09 - 06.05.09/K4	H-oil 4	18.08.09
H-pro 5	18.08.09		

Et proteinkonsentrat med utgangspunkt i oppdrettsensilasje kategori 2 (P-pro, produksjonsdato 17.10.08) samt grakse produsert 03.11.09 ble studert. Fiskeproteinkonsentrat fra laks (FPC) og lakseolje (uttak 26.06.08) ble produsert ved bedriften Aquarius (Lovvund, Norge). Fiskemel (makrell), solsikkemel, fiskeolje (sild) og rapsolje ble gitt av EWOS AS (Bergneset, Troms, Norge). Proteinkonsentrat, mel og olje ble lagret mørkt og kjølig (4 °C) under hele forsøksperioden.

Løsemidler og kjemikalier benyttet var av p.a. kvalitet. Kloroform, metanol (British Drug Houses (BDH), Poole, Dorset UK). Heptan, fosforsyre, svovelsyre, natriumklorid, natriumhydroksyl, etylacetat, eddiksyre, dietyleter, m-Cresol purple og kopparsulfat (Merck, Darmstadt, Tyskland). Isopropanol (Arcus kjemi, Vestby, Norge).

2.2 Metoder

2.2.1 Fettekstraksjon

Fett ble ekstrahert fra proteinkonsentrat og mel ved hjelp av Folchs metode (Folch et al., 1957). Proteinkonsentratet/mel ble tilsatt 20 deler kloroform:methanol (2:1). Proteinkonsentrat/mel (40 g) tilsatt løsemiddel (800 ml) ble satt til røring ved romtemperatur i en time med magnetrører. Løsningen ble deretter filtrert gjennom en porselenstrakt med et Whatman papirfilter nr. 3, porestørrelse 6 μm , 90 mm (Whatman International Ltd, Maidstone, England) ved hjelp av undertrykk. Prosedyren ble gjentatt tre ganger. Filtratet ble vasket med 0,2 ganger mengden løsning med 0,9 % NaCl og deretter sentrifugert i en multifuge (1 S-R, Kendro Laboratory Products, GmbH, Osterode, Tyskland) ved 4000 rpm, 23° C i 15 min. Løsningen delte seg i to faser og den øverste fasen ble fjernet med vannsug. Resterende fase ble så dampet inn til fullstendig tørrhet i rotavapor (Heidolph Laborata 4000, Büchi Vacuum Controller B-721, Flawil, Sveits) ved 80 mbar og 30° C. Fettinnhold ble bestemt gravimetrisk ved å bruke tarerte rundkolber. I noen tilfeller (FPC, P-pro) ble bare 1 gram ekstrahert med 20 volum løsemiddel. Etter inndamping ble fett løst i 1 ml heptan og overført til tarerte rør og dampet inn under nitrogengass til fullstendig tørrhet i en N-EVAP (Organomation Assoc. Inc., Berlin, Tyskland).

Fettet ble i etterkant av ekstrahering frosset ned ved -55 °C og så benyttet til de ulike analysene. Ekstrahert fett fra H-pro og fiskemel ble sentrifugert i en 5417 R, Eppendorf AG, 22331 sentrifuge (Hamburg, Tyskland) ved romtemperatur (23 °C), 14 000 rpm i 15 minutter og delte seg i to faser.

2.2.2 Frie fettsyrer

Mengden FFA ble målt ved en metode beskrevet av Ke et al. (1976). Olje eller ekstrahert fett (0,1-1 g) ble løst i 75ml kloroform:methanol:isopropanol (2:1:2) og tilsatt 4 dråper indikator (0,5 % m-Cresol purple). Blandingen ble titrert mot 0,05 M NaOH til fargeomslag. En blindprøve med løsemiddel og indikator ble titrert på samme måte. Det ble analysert tre paralleller av hver prøve. Mengden FFA i % ble regnet ut etter følgende formel:

$$\text{Frie fettsyrer}(\%) = \frac{(pr - bl) \times M(\text{mol/l}) \times 282(\text{g/mol})}{m(\text{g}) \times 1000(\text{ml/l})} \times 100\%$$

Hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

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

282 = molekylevekt til oljesyre (g/mol)

m = vekt av prøve (g)

2.2.3 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning ble bestemt ved gasskromatografi, ved hjelp av en modifisert variant av metoden beskrevet av Stoffel et al. (1959). Oljen eller det ekstraherte fett ble tilsatt kloroform:methanol (2:1) til en endelig konsentrasjon på 20 mg/ml. Løsningen (100µl) ble tilsatt 2 ml 2 % H₂SO₄ i metanol og kokt på vannbad i en time. Prøven ble deretter tilsatt 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl og ristet godt. Heptanfasen ble overført til egne rør og deretter dampet inn under nitrogengass til fullstendig tørrhet. De tørkede prøvene ble tilsatt 100µl heptan og overført til testrør. De metylerte fettsyrene ble separert i en gasskromatograf (Agilent 6890N med en 7638B autoinjektor, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med en kapillærkolonne (CP7419 50 m x 25 µm, Varian Inc., Middelburg Nederland). Helium ble brukt som bæregass under separasjon. Fettsyrene ble identifisert ved sammenligning av retensjonstid mot kjente fettsyrestandarder: PUFA no. 1, PUFA no. 2, PUFA no. 3 fra Sigma (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA.). Prosentvis fordeling av fettsyrer ble bestemt ved arealprosent av totalareal. Fettsyrer under 0,5 arealprosent ble utelatt fra analysen. Det ble analysert tre paralleller av hver olje/ekstrahert fettprøve.

2.2.4 Fettklasseanalyse

Fettklassene ble separert ved tynnsjikt-kromatografi (TLC). Ekstrahert fett eller olje ble løst i kloroform:metanol (2:1) til en konsentrasjon på 25-100 mg/ml og applisert på en HP-TLC plate (Silica gel 60, 10 x 10 cm, Merck). Mengde prøve avsatt på platene varierte fra 0,6-1,2µl avhengig av konsentrasjon på prøven. Platen ble satt i elueringskar med løpemiddel i mettet

atmosfære og tatt ut når løpemiddelet (væskefronten), var ca. 1 cm fra toppen. Platene ble satt til lufttørking i 10 min. og deretter sprayet med 10 % kobbersulfat løst i metanolisk 8 % fosforsyre beskrevet av Vaghela et al. (1995), før de ble fremkalt ved oppvarming til 175 °C. Fettklassene kunne da sees som sorte bånd/flekker på platene. Resultatet ble dokumentert av en GelDoc plateleser (BioRad GelDoc XR, Hercules, CA, USA). Fettklassene ble identifisert ved hjelp av kjente TLC-standarder: 18-5A (NuChek Prep. Inc., Elysian, MN, USA) som inneholdt polare og upolare fettklasser basert på oljesyre: lecithin, kolesterol, fri oljesyre, triolein og kolesteryloleat. Disse benevnes heretter som: fosfolipider (PL), kolesterol (C), frie fettsyrer (FFA), triacylglycerol (TAG) og kolesteryllester (CE). Fosfolipidstandarden (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA) inneholdt fosfolipider fra soyabønner: lysosofosfatidylkolin (LPC), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylkolin (PC) og fosfatidyletanolamin (PE). Standard PS (Sigma Chemicals Co) inneholdt kun fosfatidylserin (PS) isolert fra storfehjerne. Som standard for isolert fri fettsyre (FFA) ble det brukt fettsyre 17:0 (Sigma Chemicals Co). Det ble i tillegg brukt lecithin isolert fra egg som standard (BDH). Både upolart løpemiddel med heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1) og polart løpemiddel med kloroform:methanol:vann (65:25:1) ble brukt i TLC-analysen.

2.2.5 Fast fase ekstraksjon (SPE)

Fettklassene i det ekstraherte fett og i oljeprøvene ble isolert med utgangspunkt i metoden beskrevet av Vaghela et al. (1995). Det ble brukt en noe modifisert variant av denne og det ble gjort justeringer på type og mengde elueringsmiddel. Engangskolonner av typen Mega Bond Elut (5 g) aminopropyl SPE fra Varian Inc. (Middelburg, Nederland) ble benyttet. Det ble brukt to kolonner per analyse og disse ble plassert på en Visiprep vakuum manifold (Supelco, bellafonte, PA, USA). Løsningene eluerte gjennom kolonnen med undertrykk. Selve fraksjoneringen ble utført i to trinn. Den første kolonnen ble vasket med 20 ml kloroform før den ble tilsatt 100 mg fett i 2 ml kloroform. Lipidene ble bundet i kolonnen mens kloroformen fikk eluere ut. Kolonnen ble fortløpende tilsatt de tre første elueringsmidlene som eluerte ut NL, FFA, og PL som vist i tabell 3. I etterkant av separasjon ble hver fraksjon dampet til fullstendig tørrhet i en rotavapor ved 100 - 300 mbar og 30 °C. Den første fraksjonen som inneholdt NL, ble løst i 1ml heptan og tilsatt kolonne 2 etter den hadde blitt vasket med 20 ml heptan. Kolonnen ble fortløpende tilsatt de fem siste elueringsmidlene som eluerte ut CE,

TAG, C, DAG og MAG. Alle fraksjonene ble dampet tørr og deretter løst i 1ml kloroform:methanol (2:1). Løsningene ble frosset ned ved - 55 °C i påvente av videre analyser.

Tabell 3 Løsninger brukt ved separasjon av fettklasser ved SPE. Eluerte lipidklasser i kolonne 1: NL, FFA og PL. NL fraksjonen ble inndampet og løst i 1 ml heptan og deretter fraksjonert på kolonne 2. NL ble fraksjonert i rekkefølge: CE, TAG, C, DAG og MAG.

Kolonne 1, Elueringsmiddel	Volum (ml)	Lipidklasser eluert
Kloroform:isopropanol (2:1)	30	NL
Kloroform:isopropanol (2:1) 1,25 % eddiksyre	40	FFA
Metanol	30	PL
Kolonne 2, Elueringsmiddel		
Heptan	50	CE
1 % dietyleter, 10 % diklormetan i heptan	50	TAG
5 % etylacetat i heptan	50	C
15 % etylacetat i heptan	50	DAG
Kloroform:metanol (2:1)	50	MAG

2.2.6 Tørrstoff

Tørrstoffinnhold i proteinproduktene ble bestemt gravimetrisk av tørket produkt. Prøvene ble veid ut (ca. 2 g) og deretter tørket til konstant vekt i varmeskap ved 105 °C.

3. RESULTATER

Resultatet blir presentert i to deler. Første del er en undersøkelse av egenskaper til fettene i Hordafors proteinkonsentrat (H-pro) og lignende produkter. Herunder er også Hordafors oljeprodukt (H-oil) analysert opp mot lignende produkter. I andre del er det sett nærmere på fasedelingen i det ekstraherte fettene fra H-pro og i ekstrahert fett fra lignende produkter. De to fasene ble studert med hensyn på innhold av frie fettsyrer, fettsyresammensetning og fettklasser.

3.1 Egenskaper til fett i H-pro og i lignende produkter

Ekstrahert fett fra tre typer proteinkonsentrat (H-pro, P-pro og FPC), grakse, fiskemel og solsikkemel ble brukt som utgangspunkt for analysene. I tillegg ble H-oil og lakseolje fra en annen produsent (Aquarius) analysert.

3.1.1 Fettinnhold

Fettinnhold i proteinkonsentrat fra Hordafors ble målt til 9,5 % både i H-pro og P-pro (tabell 4). De oppgitte verdiene var henholdsvis 5,4 og 10 %. Fettinnholdet i graksen fra produksjon av H-pro og H-oil ble funnet å være 5,6 %. Fiskeproteinkonsentrat (FPC) fra en annen bedrift som også ensilerer laksebiprodukter, hadde 5,9 % fett. Fiskemel av makrell og solsikkemel ble målt til å ha henholdsvis 13,2 og 0,5 % fett. Tørrstoffinnholdet i proteinkonsentratene varierende fra 31,5 til 44,9 %. I melproduktene var tørrstoffinnholdet 90 – 91 %.

Tabell 4 Fettinnhold i H-pro og lignende proteinprodukter. Verdiene viser oppgitt fettinnhold fra leverandør, målt fettinnhold, tørrstoff og fettinnhold beregnet på tørrstoffbasis.

	Oppgitt fettinnhold (%)	Målt fettinnhold (%)	Tørrstoff (%)	Fettinnhold % (TS)***
H-pro	5,4*	9,5**	44,9	21,2
P-pro	10*	9,5	39,7	23,9
Grakse	IO	5,6	50,4	11,1
FPC	7*	5,9	31,5	18,8
Fiskemel	9	13,2	91,2	14,5
Solsikkemel	1,5	0,5	90,1	0,6

* Målt ved Soxtec

** Gjennomsnitt av 9 separate ekstraksjoner.

*** På tørrstoffbasis

IO Ikke opplyst

3.1.2 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning i fett ekstrahert fra tre proteinkonsentrat (H-pro, P-pro og FPC) og to H-oil produkter med ulik produksjonsdato, ble bestemt (tabell 5). H-pro inneholdt 33,1 % mettede fettsyrer, 37,9 % enumettede fettsyrer og 25,3 % flerumettede fettsyrer. Innhold av 18:2n-6 og n-3 fettsyrer var på henholdsvis 6,7 % og 18,7 %. De langkjedede n-3 fettsyrene (LC – n-3; 20:5n-3, 22:5n-3 og 22:6n-3) utgjorde 12,1 %. P-pro inneholdt 23,1 % mettede fettsyrer, 36,7 % enumettede fettsyrer og 33,6 % flerumettede fettsyrer. Innhold av 18:2n-6 var 8,1 % og n-3 fettsyrer utgjorde 25,4 %. Innhold av LC – n-3 fettsyrer utgjorde 18 %. FPC inneholdt 22,5 % mettede, 32,9 % enumettede og 33,5 % flerumettede fettsyrer. Innhold av n-3 og 18:2n-6 fettsyrer var på henholdsvis 26 og 7,5 %. LC – n-3 fettsyrer utgjorde 19 %.

H-oil og lakseolje inneholdt 20,1 – 22,4 % mettede fettsyrer, 37,1 – 40 % enumettede og 31,4 – 32,9 % flerumettede fettsyrer. Innholdet av n-3 fettsyrer varierte fra 22 – 25 % og innholdet av 18:2n-6 var fra 6,7 – 9,7 %. LC – n-3 fettsyrer utgjorde 14,4 – 16,3 %. Det var altså liten variasjon mellom de to produsentene, Hordafør AS og Aquarius. Det ble identifisert fra 89 – 96 % av fettsyrene i prøvene hvor FPC hadde lavest og H-pro høyest andel identifiserte fettsyrer.

Tabell 5 Fettsyresammensetning (arealprosent) i fett fra proteinkonsentrat; H-pro, P-pro og FPC og oljeprøver; H-oil 1, H-oil 2 og lakseolje. FA = fettsyrer, LC – n-3 = Langkjedede n-3 FA.

	Fett ekstrahert fra proteinkonsentrat			Olje		
	H-pro	P-pro	FPC	H-oil 1	H-oil 2	Lakseolje
14:0	5,7	5,0	4,0	5,0	4,8	5,4
16:0	21,0	14,7	14,4	13,7	12,5	13,9
18:0	6,4	3,3	4,2	3,0	2,8	3,1
∑ mettede FA	33,1	23,1	22,5	21,6	20,1	22,4
16:1n-4	6,1	5,2	3,4	4,7	5,1	5,2
18:1n-9	26,5	26,5	25,0	28,0	30,0	18,8
18:1n-7	4,0	3,2	2,9	3,1	3,1	11,2
22:1n-9	1,3	1,8	1,5	1,7	1,8	1,8
∑ enumettede FA	37,9	36,7	32,9	37,5	40,0	37,1
18:2n-6	6,7	8,1	7,5	9,1	9,7	6,7
18:3n-3	2,1	3,0	2,7	3,3	3,6	4,6
18:4n-3	4,4	4,5	4,4	4,6	4,5	3,7
20:5n-3	4,3	6,5	5,7	5,4	5,7	6,4
22:5n-3	2,3	2,9	2,7	2,5	2,7	3,0
22:6n-3	5,5	8,6	10,6	6,5	6,7	6,9
∑ flerumettede FA	25,3	33,6	33,5	31,4	32,9	31,4
∑ LC - n-3 FA	12,1	18,0	19,0	14,4	15,1	16,3
∑ totale FA	96,4	93,4	88,9	90,5	93,0	90,8

3.1.3 Frie fettsyrer

Mengde FFA ble målt i ekstrahert fett fra H-pro (fem produksjoner), P-pro, FPC, fiskemel og grakse (tabell 6). I tillegg ble mengden FFA undersøkt i fire H-oil produksjoner og i lakseolje, rapsolje og fiskeolje. Det ble målt 32 – 50 % FFA i fett ekstrahert fra H-pro. Gjennomsnittet var $40,9 \% \pm 9,1$. Fett i P-pro hadde 8,7 % FFA og fett fra grakse 71,6 % FFA. Fett fra FPC hadde 44,7 % FFA. Ekstrahert fett fra fiskemel hadde 9 % FFA.

H-oil og lakseolje hadde henholdsvis 1,9 og 12,7 % FFA mens rapsolje og fiskeolje hadde henholdsvis 12,4 og 1,1 %.

Tabell 6 Innhold av frie fettsyrer i fett ekstrahert fra proteinprodukt og oljeprøver målt ved titrering.

% Frie fettsyrer			
Fett fra proteinprodukt		Olje	
H-pro	$40,9 \pm 9,1^*$	H-oil	$1,9 \pm 0,3^{**}$
P-pro	8,7	Lakseolje	12,7
Grakse	71,6	Rapsolje	12,4
FPC	44,7	Fiskeolje	1,1
Fiskemel	9,0		

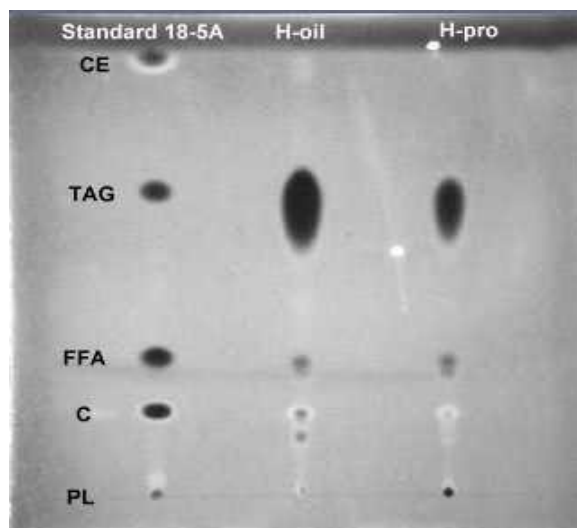
* Gj. snitt 5 batcher H-pro

** Gj. snitt 4 batcher H-oil

3.1.4 Fettklasser i H-pro

Fettklasser i H-pro og H-oil ble separert og vurdert kvalitativt og semikvantitativt ved tynnsjiktskromatografi (TLC) med et upolart løpemiddel (figur 10). Det ble totalt identifisert tre fettklasser i H-oil og fire fettklasser i H-pro. Triacylglycerol (TAG) var den dominerende fettklassen i begge prøvene, særlig i H-oil. I tillegg ble det identifisert frie fettsyrer (FFA) og kolesterol (C) i begge prøver. De frie fettsyrene så ut til å bestå av to nærliggende flekker. I H-oil var det en ikke-identifisert komponent med litt kortere mobilitet enn C.

H-pro inneholdt PL som ikke bevæget seg i det upolare løpemiddelet. Spor av PL kunne også sees i H-oil.

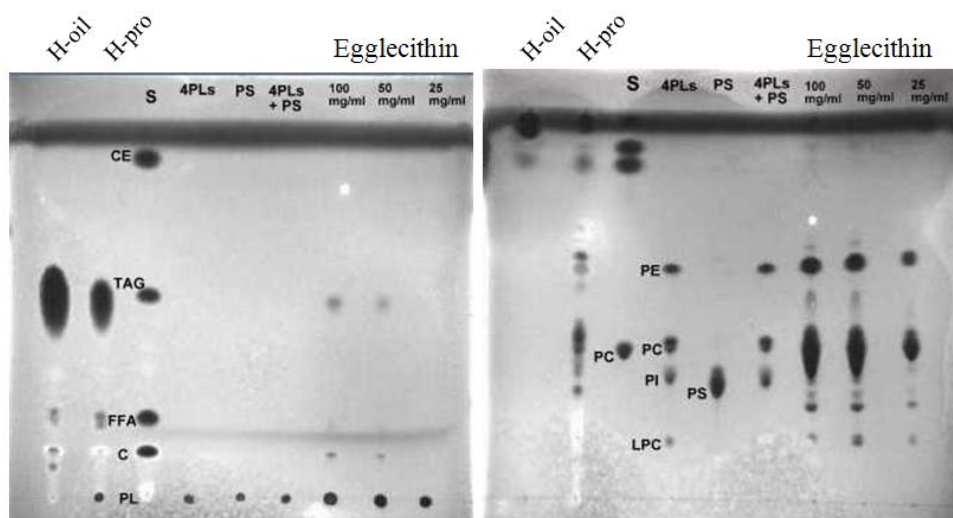


Figur 10 TLC av H-oil og av fett fra H-pro med et upolart løpemiddel. Standard 18-5A inneholdt; PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester.

For å få bekreftet resultatene ble H-oil og fett fra H-pro analysert på TLC med både upolart og polart løpemiddel (figur 11). I denne analysen ble flere fosfolipidstandarder benyttet. På platen som ble kjørt med upolart løpemiddel var det kun de upolare fettklassene (C, FFA, TAG og CE) i standard 18-5A (S) som bevegde seg mens de polare fettklassene (LPC, PI, PC, PE og PS) i standardene 4PLs, PS og 4PLs + PS, (PL) i standard S og egglecithin ble stående på appliseringspunktet. Egglecithin inneholdt i tillegg til de polare fettklassene små mengder upolare forbindelser som ble observert ved konsentrasjon 50 mg/ml eller mer. Disse ble forsøksvis identifisert som TAG og C. Prøver fra H-oil og H-pro ga samme resultat som i figur 10.

Med polart løpemiddel så resultatet annerledes ut. De upolare fettklassene i H-oil vandret nært eller helt opp i væskefronten. Den kraftige sorte flekken ved væskefronten i H-oil sporet ble identifisert som TAG mens den svakere flekken som beveget seg litt saktere ble antatt å være FFA (se senere, figur 20). De samme flekkene kunne sees i sporet med H-pro. Fett fra H-pro hadde flere polare fettklasser som vandret oppover på plata. Det ble forsøksvis identifisert noe PC og PE i fett fra H-pro. I tillegg er PS og antakelig PI tilstede. En ukjent flekk med litt raskere mobilitet enn PE kan også sees. Denne flekken sees også i egglecithin ved konsentrasjon 50 mg/ml eller mer. I standard S kan PL identifiseres som PC. To flekker nær væskefronten i S ble også observert. Den nederste av de to flekkene ble forsøksvis identifisert som FFA. Det ble observert fire fettklasser i standard 4PLs; LPC, PI, PC og PE. I standard PS ble det identifisert en fettklasse; PS. I standardblandingen (4PLs + PS) var det

forventet å observere fem fettklasser (LPC, PI, PC, PE og PS). Det ble imidlertid bare identifisert tre fettklasser i denne (PI/PS PC og PE). PI og PS flyter antakelig over i hverandre og LPC har sannsynligvis for lav konsentrasjon. I de to høyeste konsentrasjonene (100 og 50 mg/ml) av egglecithin ble fettklassene LPC, PC og PE identifisert. Disse ble også sett ved mindre konsentrasjon (25 mg/ml), men da i form av mindre intense flekker. PC ble observert som den dominerende fettklassen i egglecithin.

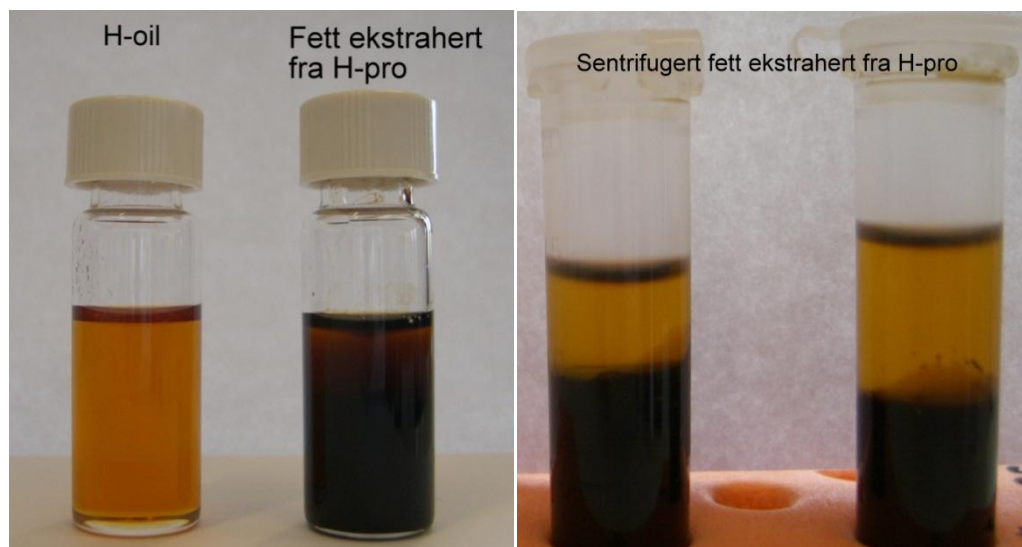


Figur 11 TLC analyse av standarder samt ulike konsentrasjoner av egglecithin. H-oil og fett fra H-pro er også inkludert. Upolart løpemiddel til venstre og polart løpemiddel til høyre. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester), 4PLs: (LPC; Lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidyletanolamin), PS; (PS; fosfatidylserin).

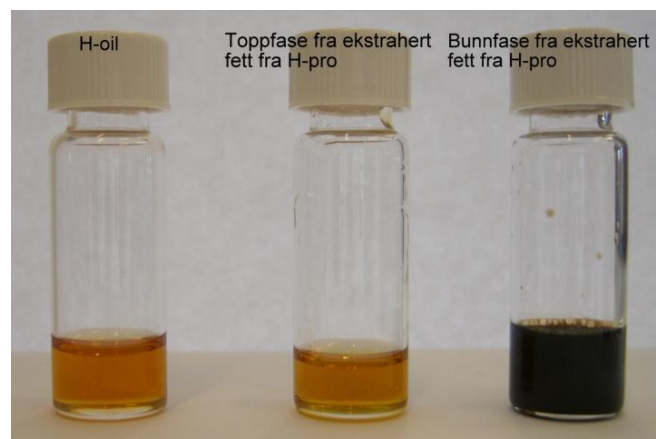
3.2 Separasjon av fett fra H-pro i to faser

Det ekstraherte fett fra H-pro var betydelig mørkere enn H-oil og hadde en mer seigtflytende konsistens ved romtemperatur. Når H-pro fett ble stående en stund på laboratoriebenken begynte det å skille seg i to faser (figur 12). Etter sentrifugering delte fettene seg i omtrent to like faser; en toppfase og en bunnfase. Toppfasen hadde en lys farge som H-oil mens bunnfasen var omtrent svart (figur 13) og hadde en seigtflytende konsistens.

Fett ekstrahert fra fiskemel skilte seg også i to tilsvarende faser som fett fra H-pro (se senere, figur 19).



Figur 12 Bildet til venstre viser H-oil (til venstre) og ekstrahert fett fra H-pro (til høyre), mens bildet til høyre viser sentrifugert fett fra H-pro.

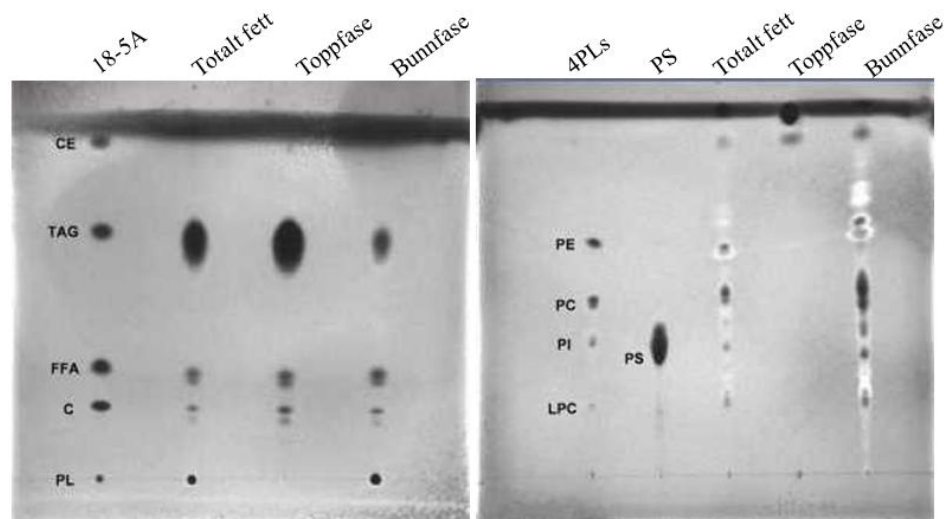


Figur 13 Bilde av H-oil (til venstre) og ekstrahert fett fra H-pro adskilt i toppfase (midten) og bunnfase (til høyre).

3.2.1 Fettklasser i topp – og bunnfasen

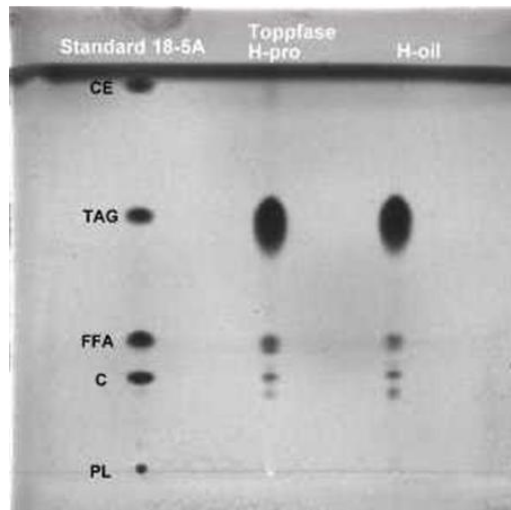
Fettklasser i totalt ekstrahert fett fra H-pro, toppfasen og bunnfasen ble undersøkt ved hjelp av TLC (figur 14). Prøvene ble kjørt både med upolart og polart løpemiddel. Undersøkelsen viste forskjeller i sammensetning av fettklasser i toppfasen og bunnfasen. Med upolart løpemiddel ga totalt ekstrahert fett fra H-pro likt resultat som vist i ved TLC i figur 10. I toppfasen ble det identifisert tre fettklasser (TAG, FFA og C) hvorav TAG utgjorde mesteparten. I bunnfasen ble det i tillegg til TAG, FFA og C, påvist en del PL. Toppfasen inneholdt mer TAG enn bunnfasen. Fettklassene FFA og C så ut til å være tilstede i omtrent lik mengde i toppfasen og bunnfasen. Det var kanskje noe mer C i toppfasen.

Med polart løpemiddel ga det totale fett fra H-pro likt resultat som vist tidligere (figur 11). Toppfasen var svært lik tidligere TLC av H-oil kjørt på polart løpemiddel (figur 11). De to flekkene i toppfasen ble forsøksvis identifisert som TAG og FFA. FFA ble også forsøksvis identifisert i bunnfasen. Bunnfasen så ut til å inneholde mye av de samme fettklassene som i totalt fett. Disse kom for øvrig tydeligere fram i bunnfasen. To fettklasser i bunnfasen ble identifisert som LPC og PC. I tillegg inneholdt fettene i bunnfasen PS og andre vanskelig identifiserbare polare lipider



Figur 14 TLC analyse av fett ekstrahert fra H-pro (totalt fett) og av toppfasen og bunnfasen. Upolart løpemiddel til venstre og polart løpemiddel til høyre. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). 4PLs; (LPC; Lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidyletanolamin), PS; (PS; fosfatidylserin)

Det ble kjørt en TLC av toppfasen og H-oil (figur 15) som bekreftet store likheter mellom disse to. De identifiserte fettklassene var de samme som funnet ved tidligere TLC analyser (figur 11, figur 14).



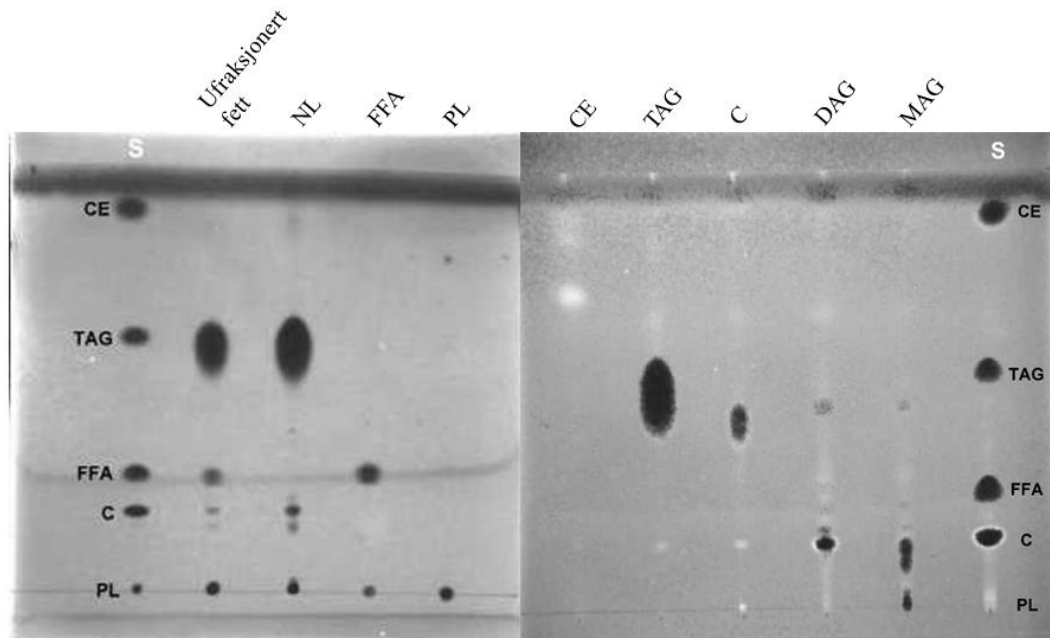
Figur 15 TLC analyse av toppfasen fra ekstrahert fett i H-pro og av H-oil. Kjørt med upolart løpemiddel.

3.2.2 Fast fase ekstraksjon av fett fra H-pro, toppfase og bunnfase

Fettet ekstrahert fra H-pro ble fraksjonert ved fast fase ekstraksjon (SPE) i en 2-trinns prosess. Resultatet fra SPE ble dokumentert ved TLC kjørt på upolart løpemiddel (figur 16) Ufraksjonert fettprøve ble også kjørt som kontroll. Den første SPE kolonna (trinn 1) skulle separere fett i NL, FFA og PL. Kolonne 2 (trinn 2) skulle fraksjonere de nøytrale lipidene fra trinn 1 i CE, TAG, C, DAG og MAG. Separasjon av fettklassene stemte ikke helt overens med forventede resultater fra metodebeskrivelsen (se materialer og metoder, avsnitt 2.2.5 Fast Fase ekstraksjon (SPE)). Med unntak av fraksjon TAG og PL var det ingen fullstendig isolering av fettklassene.

I fraksjon NL ble det ved TLC identifisert TAG, C og PL. En flekk like under C ble også observert, men ikke identifisert. Fraksjon FFA inneholdt FFA og noe PL. Fraksjon PL var tilsynelatende ren. Fraksjonen med NL ble påsatt kolonne 2 og separert videre. Ingen fettklasser ble identifisert som CE. TAG fraksjonen ga tilsynelatende ren TAG. Noen rester av TAG så også ut til å være tilstede i fraksjon C. Små spor av C kunne sees i TAG og C fraksjonen. C skulle i følge metoden isoleres i C fraksjonen, men så likevel ut til å gi sterkest flekk i DAG fraksjonen. Rester av C kunne også sees i MAG. MAG fraksjonen så ut til å inneholde noen polare fettklasser som hadde lav mobilitet i det upolare løpemiddelet. Flekken

nærmest appliseringspunktet ble forsøksvis identifisert som PL. Flekkene gikk for øvrig i hverandre og var vanskelige å identifisere. Det er trolig at noen av disse flekkene kan være MAG. Dette ble for øvrig ikke bekreftet da platen ikke ble kjørt med standard for MAG.

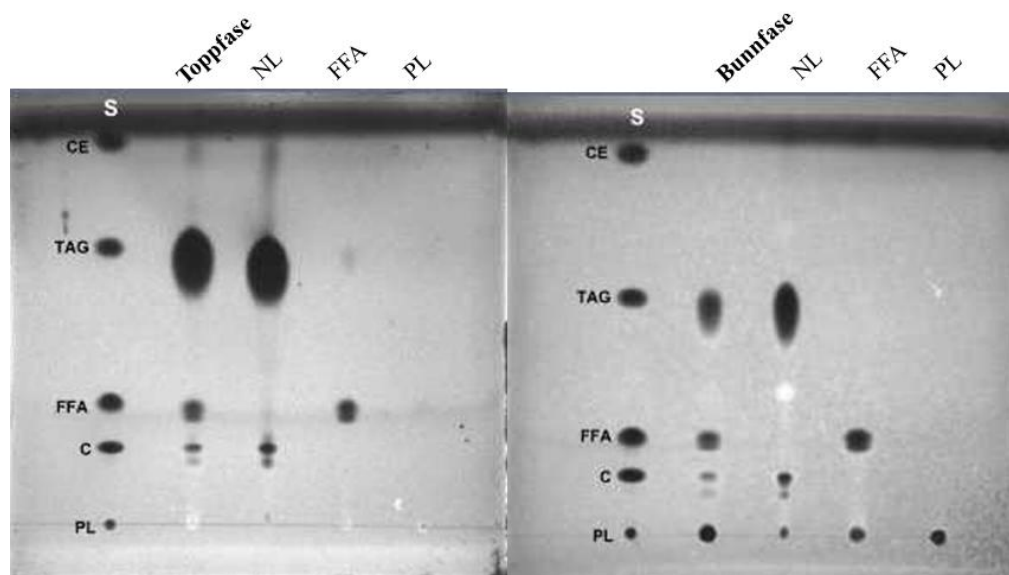


Figur 16 TLC analyse av SPE fraksjonert fett ekstrahert fra H-pro. Fraksjoner fra kolonne 1 er vist på platen til venstre mens fraksjoner fra kolonne 2 er vist på platen til høyre. Begge plater er kjørt med upolart løpemiddel. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). NL; nøytrale lipider, FFA; frie fettsyrer, PL; fosfolipider, CE; kolesterylester, TAG; triacylglycerol, C; kolesterol, DAG; diacylglycerol, MAG; monoacylglycerol.

Fettklasser i toppfasen og bunnfasen fra ekstrahert fett i H-pro ble fraksjonert i kolonne 1 ved SPE. Følgende fettklasser ble utvunnet; NL, FFA og PL. Fraksjonene fra toppfasen og bunnfasen ble analysert ved TLC med et upolart løpemiddel (figur 17). Det var ved tidligere TLC analyser registrert at toppfasen inneholdt tre upolare fettklasser; TAG, FFA og C (figur 14, figur 15). Ved fraksjonering av toppfasen kom TAG, C og en ukjent forbindelse ut i fraksjon NL. Det var også en ren fraksjonering av FFA som ga en dobbelflekk. Det ble ikke identifisert noen fettklasser i PL fraksjonen fra toppfasen. Fettsyresammensetningen i NL fraksjonen og FFA fraksjonen fra SPE ble analysert senere (se 3.2.3, tabell 7).

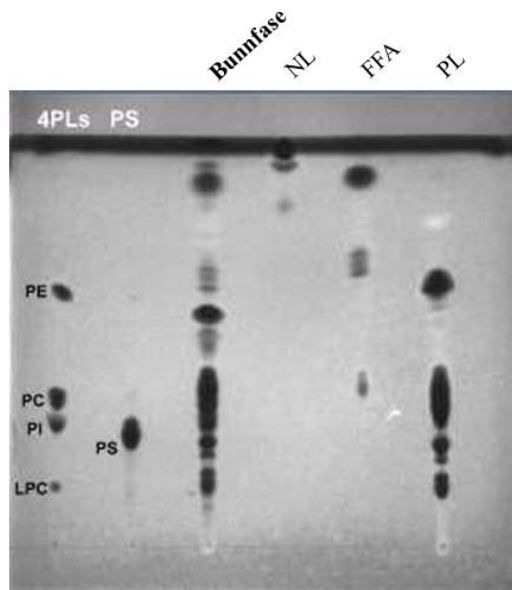
Ufraksjonert bunnfase viste samme resultat som ved tidligere kjørte TLC analyser (figur 14). Det ble det identifisert fire fettklasser i bunnfasen; TAG, FFA, C og PL (figur 17).

I NL fraksjonen som inneholdt TAG og C, ble det observert mindre mengder PL og en uidentifisert flekk med litt kortere mobilitet enn C. FFA ble registrert i riktig fraksjon, men her var det også spor av PL. PL fraksjonen var for øvrig tilsynelatende ren og det ble ikke påvist andre fettklasser i denne. Fettsyresammensetningen i NL, FFA og PL fraksjonen fra SPE fraksjonering av fett i bunnfasen ble analysert senere (se 3.2.3, tabell 7).



Figur 17 TLC analyse av SPE (kolonne 1) fraksjonert toppfase og bunnfase fra fett ekstrahert fra H-pro. Begge plater er kjørt med upolart løpemiddel. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). NL; nøytrale lipider, FFA; frie fettsyrer, PL; fosfolipider.

Fett i bunnfasen fraksjonert med SPE kolonne 1 ble også analysert på TLC med polart løpemiddel (figur 18). I NL fraksjonen ble det i tillegg til TAG i væskefronten observert en del svakt polare forbindelser. Disse var for øvrig vanskelig å identifisere ut fra de forhåndsvalgte standardene. Tidligere identifisering av den mørke flekken like under væskefronten som FFA ser ut til å være korrekt i følge denne TLC kjøringen. FFA fraksjonen så i tillegg ut til å inneholde en del polare forbindelser. Flekken med kortest avstand fra appliseringspunktet ble forsøksvis identifisert som PC. PL fraksjonen inneholdt bare påvisbare polare lipider. Tre fettklasser ble forsøksvis identifisert som LPC, PC og PE. Konsentrasjonen til den appliserte prøven av PL fraksjonen så for øvrig ut til å være for høy og det var vanskelig å gi en klar identifisering av fettklassene.



Figur 18 TLC analyse av SPE (kolonne 1) fraksjonert bunnfase fra fett ekstrahert fra H-pro. Platen er kjørt med polart løpemiddel. 4PLs; (LPC; lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidylethanolamin). PS (PS; fosfatidylserin). NL; nøytrale lipider, FFA; frie fettsyrer, PL; fosfolipider.

3.2.3 Fettsyresammensetning i fraksjonerte fettklasser fra topp- og bunnfasen

Fettsyresammensetningen i to fraksjonerte fettklasser (NL og FFA) i toppfasen og tre fraksjonerte fettklasser (NL, FFA og PL) i bunnfasen, analysert i figur 17, ble bestemt (tabell 7). Fraksjon NL i toppfasen inneholdt 16,1 % mettede fettsyrer, 43,5 % enumettede fettsyrer og 27,5 % flerumettede fettsyrer. Av de flerumettede fettsyrene utgjorde n-3 16,8 %, hvorav 11,7 % var LC – n-3 fettsyrer. Det var 10,7 % 18:2n-6 i NL fraksjonen. Fraksjon FFA i toppfasen inneholdt 24,4 % mettede fettsyrer, 28,1 % umettede fettsyrer og 36,2 % flerumettede fettsyrer. Av flerumettede fettsyrer utgjorde n-3 fettsyrer og 18:2n-6 henholdsvis 29,2 og 7 %. LC – n-3 fettsyrer utgjorde 26 %.

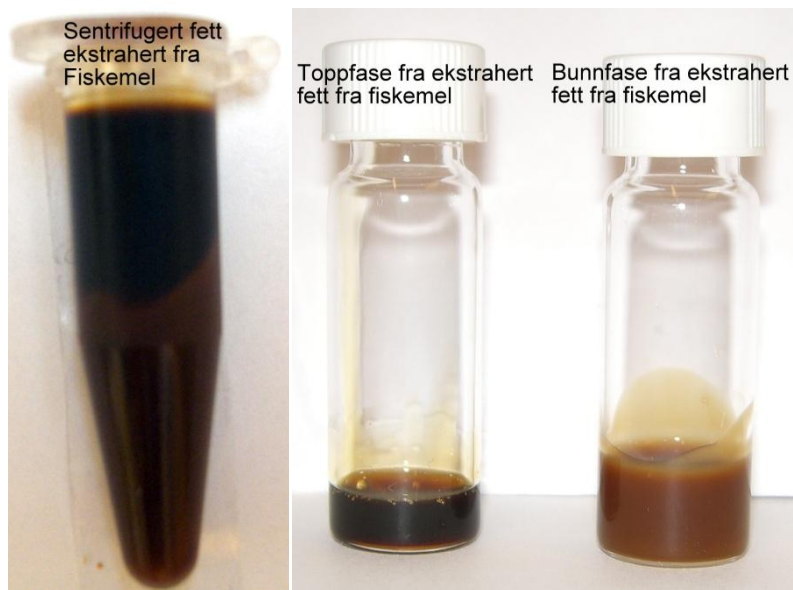
I NL fraksjonen i bunnfasen ble det målt 18,5 % mettede fettsyrer, 41,7 % enumettede fettsyrer og 26,1 % flerumettede fettsyrer. n-3 fettsyrer utgjorde 15,6 % og av disse var 10,8 % LC – n-3 fettsyrer. Innholdet av 18:2n-6 var 10,5 %. I fraksjon FFA var det 26,7 % mettede fettsyrer, 26,6 % enumettede fettsyrer og 34,2 % flerumettede fettsyrer. Av flerumettede fettsyrer utgjorde n-3 og 18:2n-6 henholdsvis 28,5 og 5,7 %. LC – n-3 fettsyrer utgjorde 25,8 %. Det ble i fraksjon PL målt 25,7 % mettede fettsyrer, 19,5 % enumettede fettsyrer og 42,1 % flerumettede fettsyrer. Av flerumettede fettsyrer utgjorde n-3 fettsyrer 38,8 %, av disse var 37,8 % LC – n-3 fettsyrer. Innholdet av 18:2n-6 var 3,3 %.

Tabell 7 Fettsyresammensetning (arealprosent) i NL og FFA fraksjonen i toppfasen og NL, FFA og PL fraksjonen i bunnfasen. Fettklassene ble separert ved SPE. FA = fettsyrer, LC - n-3 = langkjedede n-3 fettsyrer.

	Toppfase		Bunnfase		
	NL	FFA	NL	FFA	PL
14:0	3,3	2,2	3,5	2,1	1,6
16:0	10,4	15,2	11,9	17,1	18,9
18:0	2,4	7,0	3,0	7,5	5,1
∑ mettede FA	16,1	24,4	18,5	26,7	25,7
16:1n-4	4,0	2,3	3,9	2,1	1,1
18:1n-9	31,8	20,9	30,9	19,1	14,7
18:1n-7	3,3	2,5	2,9	2,9	2,3
20:1n-9	4,4	2,3	4,1	2,4	1,4
∑ enumettede FA	43,5	28,1	41,7	26,6	19,5
18:2n-6	10,7	7,0	10,5	5,7	3,3
18:3n-3	4,1	2,6	4,0	2,2	1,1
18:4n-3	1,0	0,6	0,9	0,5	
20:5n-3	4,0	7,1	3,7	6,8	8,8
22:5n-3	2,0	2,9	1,8	2,6	3,3
22:6n-3	5,7	16,0	5,2	16,3	25,7
∑ flerumettede FA	27,5	36,2	26,1	34,2	42,1
∑ LC - n-3 FA	11,7	26,0	10,8	25,8	37,8
∑ totale FA	87,1	88,8	86,3	87,5	87,3

3.2.4 Fett ekstrahert fra fiskemel

Ekstrahert fett fra fiskemel ble sentrifugert og skilte seg i to faser: toppfase og bunnfase (figur 19). Tendensen til fasedeling i det ekstraherte fett fra fiskemel var lik den som tidligere ble observert i ekstrahert fett fra H-pro (figur 12, figur 13). Toppfasen fra ekstrahert fett fra fiskemel var for øvrig mye mørkere enn den samme fra H-pro. I tillegg hadde bunnfasen en lysere farge enn toppfasen.



Figur 19 Bildet til venstre viser ekstrahert fett fra fiskemel etter sentrifugering og bildet til høyre viser den separerte toppfasen og bunnfasen.

3.2.5 Sammenligning av toppfasen og bunnfasen i H-pro og fiskemel

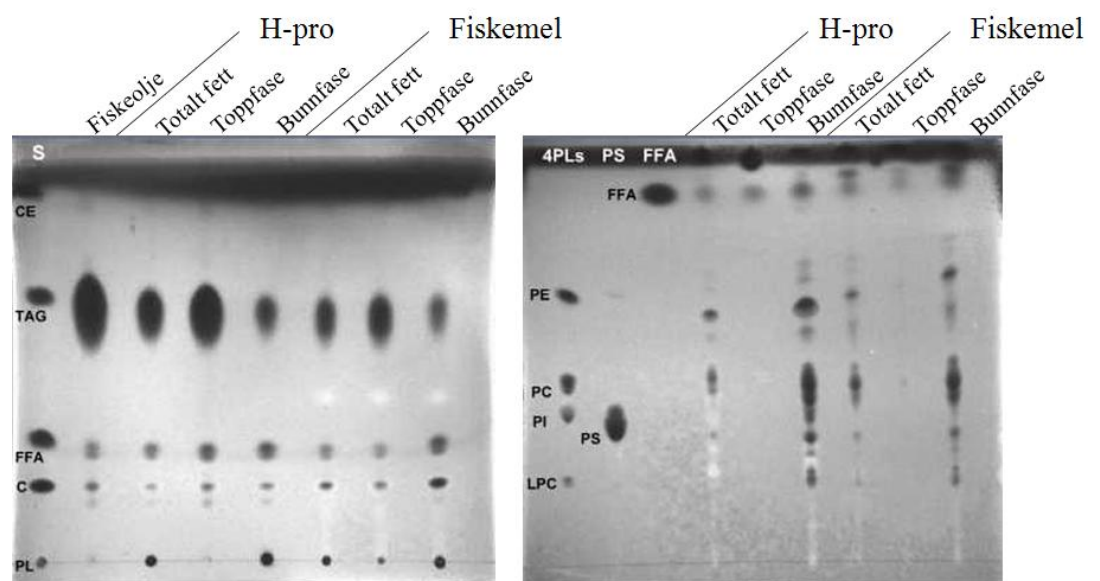
Mengden FFA i ekstrahert fett fra H-pro og fiskemel, samt toppfasen og bunnfasen ble bestemt (tabell 8). Det ble målt 46,9 % FFA i totalt fett ekstrahert fra H-pro. Tilsvarende tall for fiskemel var 7,3 %. I toppfasen i H-pro var det 4,2 % FFA mens det i bunnfasen var 68,4 %. Mengden FFA i toppfasen og bunnfasen i fett fra fiskemel ble målt til henholdsvis 5,4 og 6,6 %.

Tabell 8 Prosent frie fettsyrer målt ved titrering av fett ekstrahert fra H-pro og fiskemel.

% Frie fettsyrer i fett fra H-pro og fiskemel		
	H-pro	Fiskemel
Totalt	46,9	7,3
Toppfase	4,2	5,4
Bunnfase	68,4	6,6

For sammenligningens skyld ble det også kjørt TLC av totalt fett, toppfasen og bunnfasen i fett fra fiskemel på upolart og polart løpemiddel (figur 20). Fiskeolje så ut til å bestå hovedsakelig av TAG, men også FFA (dobbelflekk) og C ble identifisert. TAG utgjorde mesteparten av fettklassene i H-pro slik som sett ved tidligere TLC kjøring (figur 14). Fett ekstrahert fra fiskemel så ut til å inneholde mange av de samme fettklassene som fett fra H-pro. Med unntak av noe PL i toppfasen i fett fra fiskemel var resultatet tilnærmet likt H-pro prøvene. FFA ga den samme dobbelflekken i fiskemel som i H-pro. Det så ut til at det var mer C i fett fra fiskemel hvor mesteparten gikk i bunnfasen.

Med polart løpemiddel var det de polare fettklassene som bevegde seg. Prøvene av H-pro viste de samme resultatene som tidligere (figur 14). Både i fett fra H-pro og fiskemel samlet de polare fettklassene seg i bunnfasen. Fettklassene i bunnfasen til fett fra H-pro ble forsøksvis identifisert som LPC og PC. De samme fettklassene ble identifisert i fett fra fiskemel, men her i mindre konsentrasjon. Platen var også påsatt en standard for FFA. Mobiliteten til FFA i polart løpemiddel bekreftet korrekt identifisering av FFA utført tidligere.

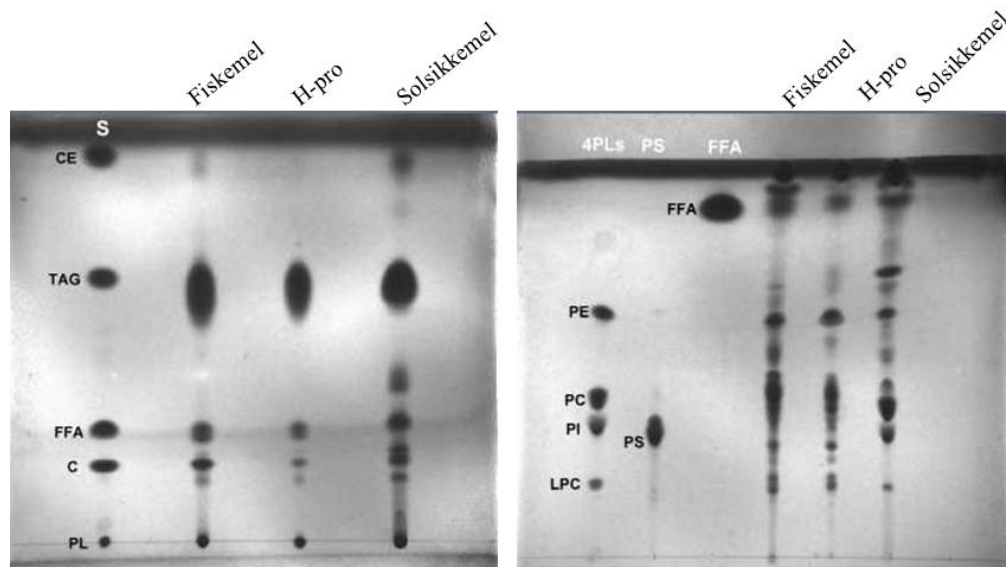


Figur 20 TLC analyse av fett ekstrahert fra fiskemel og H-pro. Totalt fett og toppfasen og bunnfasen i begge produktene. Upolart løpemiddel til venstre og polart løpemiddel til høyre. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). Standard; 4PLs (LPC; Lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidyl etanolamin), standard; PS (PS; fosfatidylserin), standard FFA (FFA; C-17 fettsyre).

3.2.6 Sammenligning av fett ekstrahert fra H-pro og lignende proteinprodukter

Fett ekstrahert fra solsikkemel ble også analysert med TLC og sammenlignet med fett fra fiskemel og H-pro (figur 21). Med det upolare løpemiddelet ble det registrert at alle prøvene hovedsakelig inneholdt TAG. FFA og PL ble også identifisert i alle prøver. Fett fra fiskemel så ut til å inneholde mye C i forhold til fett fra H-pro. Fett fra solsikkemel hadde en komponent med samme mobilitet som CE. I tillegg inneholdt solsikkemel en del andre upolare fettklasser som ikke kunne identifiseres opp mot standarden som var valgt til analysen.

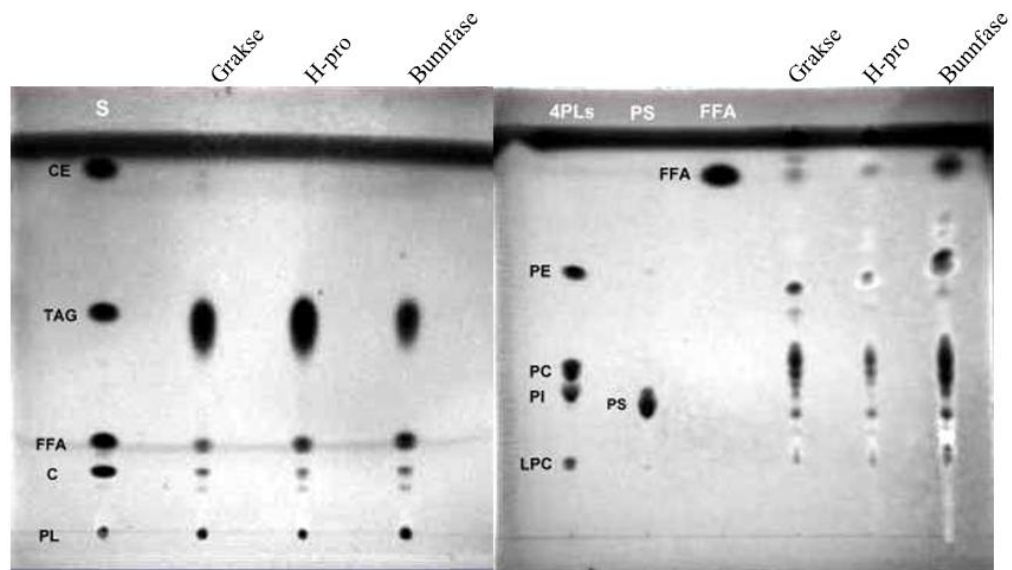
Med det polare løpemiddelet vandret de upolare fettklassene i front og avsatte flekker i væskefronten. Den mørke flekken nær væskefronten i fiskemel ble identifisert som FFA. Denne ble også identifisert i H-pro og solsikkemel. En ikke-identifisert flekk ble også observert mellom upolare fettklasser i væskefronten og FFA i fiskemel. Polare fettklasser i fiskemel ga ellers likt resultat som tidligere (figur 20). I fett fra solsikkemel var det tydelige flekker som kunne identifiseres som LPC, PI og PE. Den mindre flekken med noe mer mobilitet enn PI i solsikkemel ble forsøksvis identifisert som PC. Solsikkemel inneholdt i tillegg en ikke-identifisert fettklasse som hadde noe bedre mobilitet enn PE. Denne ble ikke registrert i H-pro og fiskemel.



Figur 21 TLC analyse av fett ekstrahert fra fiskemel, H-pro og solsikkemel. Upolart løpemiddel til venstre og polart løpemiddel til høyre. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). 4PLs (LPC; Lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidylethanolamin), PS (PS; fosfatidylserin), FFA (FFA; C-17 fettsyre).

Fett ekstrahert fra grakse ble sammenlignet med fett fra H-pro og bunnsfasen i fett fra H-pro ved TLC analyse (figur 22). H-pro og bunnsfasen var lik tidligere TLC-kjøringer på upolart og polart løpemiddel (figur 17, figur 18). Med upolart løpemiddel så de tre prøvene ut til å være identiske med tanke på identifiserte fettklasser (TAG, FFA, C og PL). Mengden FFA så ut til å være noe høyere i bunnsfasen og fett fra H-pro enn i grakse. Det var mindre TAG i bunnsfasen enn i fett fra H-pro.

Med det polare løpemiddelet så det ut til at bunnsfasen hadde den høyeste konsentrasjonen polare fettklasser i forhold til fett fra grakse og H-pro. Fettklassene så ut til å være ganske like i alle prøver, men alle var vanskelig å identifisere opp mot standard. Polare fettklasser tilstede i prøvene ble forsøksvis identifisert som LPC og PC. Det ble observert en flekk som hadde tilnærmet lik vandringsgrad som PE i standarden. Denne ble observert i alle prøver. Det er for øvrig usikkert om dette faktisk er den samme fettklassen grunnet ulik mobilitet i alle prøver. I bunnsfasen ble den forsøksvis identifisert som PE.



Figur 22 TLC analyse av fett ekstrahert fra grakse og H-pro, samt bunnsfasen av H-pro fett. Upolart løpemiddel til venstre og polart løpemiddel til høyre. S; standard 18-5A (PL; fosfolipider, C; kolesterol, FFA; frie fettsyrer, TAG; triacylglycerol, CE; kolesterylester). 4PLs (LPC; Lysofosfatidylkolin, PI; fosfatidylinositol, PC; fosfatidylkolin, PE; fosfatidylethanolamin). PS (PS; fosfatidylserin). FFA (FFA; C-17 fettsyre).

4. DISKUSJON

Den store veksten i produksjonen av laks og ørret i Norge de siste årene har ført til tilsvarende økning i mengden biprodukter etter sløying. Økende grad av videreforedling har også bidratt til dette. Tidligere ble biprodukter fra fiskerinæringen sett på som avfall eller solgt frosset til pelsdyrindustrien som var en relativt stor næring før. Generelle krav om etisk og bærekraftig håndtering av fiskeråstoff har bidratt både til en bedre utnyttelse og til en større verdiskapning. I dag utnyttes mesteparten av disse produktene til matproduksjon.

Biproduktene fra oppdrett blir nå i all hovedsak ensilert ved hjelp av maursyre tilsatt antioksidant. Ensileringen skaper et mikrobielt lagringsstabil produkt. Selve prosessen er relativt billig og baseres på enkelt utstyr som sørger for rask håndtering ettersom det kan plasseres lokalt ved slakteriene eller oppdrettsanlegget. Videreforedlingen av ensilasjen til proteinkonsentrat og olje er derimot mer kostbar og det vil normalt ikke være økonomisk for en slakteribedrift eller et oppdrettsanlegg å ha slik produksjon lokalt ved anlegget. Dette er fordi volumene lokalt ofte blir relativt små og energien og kostnadene som må til ikke er forsvarlig i forhold til produksjonsvolumet.

I denne oppgaven er det fokusert på kvalitet av fett. Kvaliteten av fett kan være flere ting. For eksempel er fettsyresammensetningen viktig for næringsverdien av fett/oljen. Marint fett er viktig i kostholdet til mennesker fordi det inneholder langkjedede n-3 fettsyrer. Innholdet av slike fettsyrer i oppdrettsfisk vil være avhengig av fettsyresammensetningen i fôret. Dersom det brukes mye vegetabiliske oljer i fôret vil fisken inneholde mye mellomlange flerumettede fettsyrer av n-6 (18:2n-6) og n-3 (18:3n-3) typen, som er typiske for planter.

Lavt oksidasjonsnivå i fett er også viktig for fettkvaliteten. Oksidasjonsgraden kan bestemmes ved å måle peroksidverdi (PV) eller anisidinverdi (AV). Ofte brukes PV i kombinasjon med AV for å beregne den totale oksidasjonsverdien (Totox). Maksimal Totoxverdi ($2 \times PV + AV$) på olje som brukes i fiskefôr bør ikke overstige 25. Mengden FFA i olje er også et viktig kvalitetskriterium, blant annet fordi FFA er mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer esterifisert i TAG eller PL (Labuza, 1971; Kinsella et al., 1978). For fiskeoljer og planteoljer til humant konsum er det satt en grenseverdi på 2 % FFA. Produsenter av fiskefôr opererer med en grenseverdi på 5 % FFA for fiskeolje som skal brukes i fiskefôr.

Til nå har man bare rapportert om kvalitetsegenskaper til oljer utvunnet fra ensilasje eller utvunnet fra ferskt råstoff. Få om noen studier har vært rapportert når det gjelder ”restefettet” man finner i proteinkonsentratet etter at oljen er separert fra ensilasjen eller i tradisjonelt fiskemel. Hovedformålet med denne oppgaven var derfor å undersøke kvalitetsegenskaper til fett i proteinkonsentratet (H-pro) produsert ved maursyreensilering av

biprodukter fra laks og ørret.

Fettinnholdet (på tørrstoffbasis) i proteinkonsentratene var noe høyere enn i fiskemel. Årsaken til dette kan være at det lettere dannes emulsjoner mellom fett og proteiner under ensilering og separering av ensilasjen. Slike emulsjoner kan ende i limvannsfasen og dermed bidra til å øke fettinnholdet i proteinkonsentratet. Det lave fettinnholdet i solsikkemel skyldes at fettene i solsikkene antakelig er ekstrahert med organiske løsemiddel, oftest heksan. Dersom fett hadde blitt ekstrahert fra fiskeråstoff eller ensilasje med organiske løsemidler, hadde en sannsynligvis oppnådd et mye lavere fettinnhold i proteinproduktene enn ved mekanisk separering av oljefasen. Proteinkonsentratene hadde et tørrstoffinnhold på 31,5 til 44,9 % mens melproduktene lå på 90 – 91 %. Forskjellene i tørrstoffinnhold skyldes at proteinkonsentratene kun har gjennomgått inndamping mens melproduktene har gjennomgått både inndamping og tørking. Med et ekstra inndampingstrinn er det mulig å oppnå 55 % tørrstoff i H-pro (pers. med. Jørgen Seliussen, 2009). Jo lavere vanninnhold som kan oppnås gjennom inndamping, jo større blir anvendeligheten for proteinkonsentratet. For eksempel så kan man øke tilsatsene til et fôr og samtidig holde vanninnholdet tilstrekkelig lavt. Energiforbruket ved eventuell tørking vil være mindre ved et høyt tørrstoffinnhold etter inndamping. I tillegg så kan et lavt vanninnhold bidra til å hindre mikrobiell vekst.

Fettsyresammensetningen i H-pro fett og H-oil var tilnærmet lik. Det relativt høye innholdet av 18:2n-6 (6,7 – 9,7 %) viser at laksen/ørreten har blitt gitt et fôr med høyt innslag av vegetabiliske oljer. Til sammenligning er innholdet av 18:2n-6 i olje fra villfisk bare 1 – 2 %. Selv om oppdrettsfisken har fått fôr med vegetabiliske oljer så er det de typiske marine flerumettede fettsyrene som dominerer. Forholdet mellom n-6/n-3 er 0,3 – 0,5, både i fett fra H-pro og i H-oil. Ofte sier man at forholdet mellom n-6/n-3 i kosten til mennesker bør være mindre enn 5 (Simopoulos, 2004; Shapira et al., 2009). Det betyr at dagens oppdrettslaks og ørret har ernæringsmessig god fettkvalitet av marin type, selv med planteoljer i fôret.

Generelt var innholdet av frie fettsyrer svært høyt i fett fra H-pro og lavt i H-oil. Under ensileringen vil endogene enzymer fra fisken hydrolysere TAG og PL tilstede i fiskeråstoffet og dermed føre til dannelsen av FFA. Sannsynligvis er fetthydrolysen under ensileringen forårsaket av lysosomale enzymer fordi disse har et aktivitetsoptimum ved sur pH. Også fett i et proteinkonsentrat (FPC) fra en annen produsent hadde et høyt innhold av FFA. Årsaken til at fett i P-pro hadde et relativt lavt innhold av FFA er vanskelig å forklare, men en mulighet er at produksjonstiden for denne ensilasjen hadde vært kort. FFA som dannes i ensilasjen vil trolig danne fettsyresalter med Na⁺. Fettsyresaltene er ikke løselige og vil derfor felle ut i graksen. Fettsyrene kan også bli emulgert i limvannet under sentrifugering.

Andre har observert at det dannes FFA under ensilering av fiskeråstoff. Tatterson & Windsor (1974) studerte maursyreensilasje av pelagiske fiskeslag og fant ut at olje ekstrahert med petroleumseter etter 12 måneders ensilering, hadde et FFA-innhold på opptil 25 %. Olje ekstrahert fra ensilasje lagret ved 2 °C hadde et lavere innhold av FFA enn når ensilasjen var lagret ved 23 °C. Gildberg & Raa (1977) undersøkte ensilering av torskeslo ved 2 og 6 °C. Etter ensilering i 27 dager ble ensilasjen separert ved sentrifugering til et sediment, en fettfattig vannfase og en emulsjon med 26 – 31 % fett. Fettet ekstrahert med dietyleter fra emulsjonen hadde 20 % FFA. Også i nyere arbeider er det publisert at olje utvunnet fra ensilasje har høyt innhold av FFA (Reece, 1980; Crexi et al., 2009). Det er derfor interessant å observere at FFA i H-oil (lakseolje) fra ensilerte biprodukter har et lavt FFA-nivå. Det er tydelig at FFA forblir i graksen som salt og er emulgert i limvannsfasen. Årsaken til dette gode resultatet med hensyn på FFA i oljen (H-oil) må ligge i selve separasjonsprosessen som benyttes av bedriften.

Fett ekstrahert fra fiskemel hadde en lav andel FFA i forhold til proteinkonsentratene. Dette skyldes nok at fiskemelet er produsert på ferskt fiskeråstoff. Fettet i det ferske råstoffet vil ikke bli hydrolysert på samme måte som i en ensilasje. Interessant er det også å se den høye andelen FFA i rapsolje i forhold til tilsvarende verdier for H-oil. Årsaken er sannsynligvis at alt fett blir ekstrahert i rapsoljen.

Ved nedbrytning av TAG i fordøyelsen vil det ved hjelp av pankreatisk lipase dannes to FFA og MAG som absorberes i enterocytene. Alternativt vil TAG også brytes ned til tre FFA og glycerol ved hjelp av gallesaltaktivert lipase. For at hydrolysen skal skje må fettdråpene på forhånd være emulgert av blant annet gallesalter og delt opp i mindre miceller som gir lipasene stor overflate til å virke på. Fordi FFA produseres naturlig ved fordøyelsen av fett skulle en nesten tro at inntak av FFA ville være fordelaktig med tanke på maksimal utnyttelse av fett. Årsaken til at dette ikke er tilfellet er at FFA vil felle ut i tarmen som salt og derfor være vanskeligere å absorbere. Ved naturlig fordøyelse av TAG vil FFA først frigjøres fra micellene på overflata av enterocytene og derved unngå å felle ut som salt. Det er vist at et høyt innhold av FFA i fôr kan redusere energiverdien og utnyttelsen av fett (Atteh & Leeson, 1985; Wiseman & Salvador, 1991; Blanch et al., 1995). Tilstedeværelsen av TAG og MAG i fordøyelsen bidrar til sekresjon av gallesalter. Derfor vil fett som inneholder mye FFA istedenfor TAG, redusere dannelsen av emulsjoner og påfølgende opptak av fett fra kosten (Sklan, 1979). Flere studier har vært gjennomført når det gjelder effekten av FFA i fôr til dyr og fisk. Resultatene er imidlertid ikke entydige. Austreng & Gjefsen (1981) fant at regnbueørret og laks fôret med høyt innhold av FFA ikke ga noen signifikant forskjell i vekst,

heller ikke Viola & Rappaport (1979) fant noen negative effekter av FFA i fôret til karper. Glenross & Smith (1997) derimot, fant redusert vekst hos reker gitt fôr med høyt innhold av FFA sammenlignet med fôr som inneholdt TAG. I kylling er også det påvist redusert absorpsjon av fett fra fôr som inneholder mye FFA sammenlignet med TAG (Sklan 1979). Det ble derimot ikke påvist noen negative effekter av FFA i fôr til gris (Gjefsen & Lysø, 1979). Årsaken til disse ulike resultatene kan være at mengden FFA i fôret har vært forskjellig i de ulike forsøkene.

Den dominerende fettklassen i H-oil og fett fra H-pro var TAG. Det ble observert PL i fett ekstrahert fra H-pro, men lite eller ingenting i H-oil. Årsaken til at PL kun ble sett i H-pro er at PL med sin amfipatiske struktur vil være mer polar/vannløslig enn TAG og derfor havne i de mest vannløselige av de tre fasene som oppstår under sentrifugeringen, altså limvannet og graksen som er utgangspunkt for H-pro. Også fett ekstrahert fra fiskemel og solsikkemel inneholdt PL. Mobilitet av de fettstoffene forestret med fettsyrer og til FFA var ikke helt lik mobiliteten til standardene. Både lengden og grad av umetthet kan ha innvirkning på mobiliteten. Samme argumentasjon kan brukes til å forklare for dobbeltflekken til FFA. Det er verdt å merke seg at FFA og TAG i fett fra solsikkemel har en litt annerledes mobilitet enn slike i fett fra H-pro og fiskemel. Fett i solsikker inneholder ikke langkjedede, flerumettede fettsyrer. En mulig forklaring kan være at den ene flekken er de lange flerumettede fettsyrene og den andre mettede eller enumettede fettsyrer. Dette gjenstår å undersøkes.

Fettklassene ble kun analysert kvalitativt og vurdert semikvantitativt. Det hadde vært interessant å kvantifisere fettklassene i H-oil og fett fra H-pro for å se hvor stor andel de forskjellige fettklassene utgjorde i det totale fett. Dette var ikke mulig med labutstyret tilgjengelig.

At fett ekstrahert fra H-pro skilte seg i to faser skyldes at det ekstraherte fett inneholder en del polare substanser. Toppfasen hadde lik sammensetning og farge som H-oil. Separasjonen av fettklassene bekreftet også at de polare fettklassene (hovedsakelig PL) som for eksempel PC samlet seg i bunnfasen. Bunnfasen er en emulsjon av flere stoffer og ikke rent fett. Måter å sjekke dette på kunne ha vært å måle vanninnhold i bunnfasen. Et høyt vanninnhold vil bidra til fasedelingen mellom den rene oljen og andre komponenter. Vann vil også løse opp mer polare lipider med amfipatisk struktur (f. eks. PL og FFA) og nedbrytningsprodukter av protein. Det var interessant å se at FFA først og fremst ble funnet i bunnfasen og ikke i toppfasen av H-pro fett. Selv om bunnfasen er en emulsjon så vil TAG utgjøre en stor andel. Det hadde også vært interessant å undersøke om det var noe salt tilstede i bunnfasen. En nærmere undersøkelse av bunnfasen ved for eksempel proteinanalyser, kunne

vært interessant. Den mørke fargen til bunnfasen i fett fra H-pro kan være forårsaket av pigmenter, eller polymere stoffer dannet ved enzymkatalyserte bruningsreaksjoner (polyfenoloksidereaksjoner). Slike bruningsreaksjoner kan forekomme i flere typer mat (Sapers, 1993).

Fettsyresammensetningen i bunnfasens FFA fraksjon bestod for det meste av flerumettede fettsyrer (34,2 %), hovedsakelig EPA, DPA og DHA (25,8 %). Det ble observert at andelen EPA, DPA og DHA var mye høyere i PL fraksjon enn i NL fraksjonen, henholdsvis 10,8 og 37,8 %. Dette betyr antakelig at det er fosfolipasene som dominerer under ensileringsprosessen, dvs. at FFA for det meste kommer fra hydrolyserte PL.

Det lyktes ikke i denne studien å få en ren fraksjonering av fettklassene i bunnfasen og det var spor av polare lipider både i NL og FFA fraksjonen. Årsaken til dette var nok at sammensetningen av elueringsmidlene som ble benyttet ikke var ideell for fettprøvene som skulle fraksjoneres.

I tynnsjiktanalyse av de polare fettklassene i fett fra H-pro ser det ut til at de for det meste bestod av PC. Et høyt innhold av PC er ganske vanlig i PL fra biologisk materiale. Bortsett fra PC var det svært vanskelig å identifisere andre fettklasser. Årsaken til dette var antakelig at konsentrasjonen av prøven var for høy. I tillegg var nok standardene som var valgt ut til analysen noe unøyaktige i forhold til analysing av marint fett fordi de tok utgangspunkt i fettsyrer ekstrahert fra plantematerial (soyabønner) og animalsk fett (storfe). Det kan også tenkes at emulsjoner i bunnfasen bidro til å gi en unøyaktig analyse.

4.1 Konklusjoner og videre arbeider

Konklusjoner av masteroppgaven kan oppsummeres med følgende; Fett ekstrahert fra H-pro framstilt ved ensilering av biprodukter fra laks og ørret hadde dårlig kvalitet med hensyn til innhold av FFA. Olje (H-oil) produsert fra ensilerte biprodukter hadde overraskende god kvalitet med hensyn på innhold av FFA. Både H-oil og fett fra H-pro hadde ernæringsmessig god fettkvalitet med tanke på innhold av langkjedede, flerumettede fettsyrer. Det er viktig å påpeke at fett kun utgjør ca. 9 % av det totale proteinkonsentratet (20 % på tørrvektsbasis). Vanligvis vil andelen proteinkonsentrat som benyttes i en fôrblending være relativt liten. Den reelle mengden FFA i det ferdige fôrproduktet vil derfor være tilsvarende lav. Dette må tas i betraktning når kvaliteten på selve proteinkonsentratet skal vurderes. Ved å fjerne mer av fett i H-pro med for eksempel løsemiddel, vil en få et proteinkonsentrat av bedre kvalitet. Alternativt kunne det undersøkes om behandling av proteinkonsentratet med kommersielle

proteolytiske enzymer kunne føre til oppløsning av fettstoffene slik at fettene kunne separeres fra vannfasen.

5. REFERANSER

- Adler-Nissen J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **27**, 1256-1262.
- Atteh J.O., Leeson S. (1985) Influence of age, dietary cholic-acid and calcium levels on performance, utilization of free fatty acids, and bone mineralization in broilers. *Poultry Science*. **64**, 1959-1971.
- 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.
- Backhoff H. (1976) Some chemical changes in fish silage. *Journal of Food Technology*. **11**, 353-363.
- Blanch A., Barroeta A. C., Baucells M. D., Puchal F. (1995). The nutritive-value of dietary fats in relation to their chemical-composition-apparent fat availability and metabolizable energy in 2-week-old chicks. *Poultry Science*. **74**, 1335-1340.
- Bower C.K., Hietala K.A. (2008) Acidification Methods for Stabilization and Storage of Salmon By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. **17**, 459-478.
- Crexi V.T., Souza-Soares L.A., Pinto L.A.A. (2009) Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal en ensilage processes: characteristics and lipid profiles. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1642-1648.
- Dulavik B., Sørensen N.K., Barstad H., Horvli O., Olsen R.L. (1998) Oxidative stability of frozen light and dark muscles of saith (*Pollachius virens* L.) *Journal of Food Lipids*, **5**, 233-245.
- Edin H., (1940) Undersøkingar angående importavstengningens äggviteproblem. Metoder för våtkonservering av animalsk avfall. *Nordisk Jordbruk Forskning*. **22**, 142-158.
- Eksportutvalget for fisk, SSB (2009) Eksportstatistikk fra Statistisk Sentralbyrå, utarbeidet av Eksportutvalget for fisk.
- Espe M., Lied E. (1999) Fish silage prepared from different cooked and uncooked raw materials: Chemical changes during storage at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **79**, 327-332.
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. S., (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. **226**, 497-509.
- Freeman H. C., Hoogland P.L. (1956) Processing of cod and haddock viscera, Laboratory experiments. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. **13**, 869-877.
- Gao Y., Lo K.V., Liao P.H. (1992) Utilization of Salmon Farm Mortalities - Fish Silage. *Bioresource Technology* **41**, 123-127.

- Gildberg A., Raa J. (1977) Properties of a propionic acid-formic acid preserved silage of cod viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **28**, 647-653.
- Gjefsen T., Lysø A. (1979) Hydrogenated marine fat with content of free fatty-acids in feed mixtures for growing-finishing pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*. **29**, 65-70.
- Glencross B. D., Smith D. M. (1997) Comparison of triacylglycerols, esterified and free fatty acid as neutral lipid sources in the diet of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. **159**, 67-85.
- Gunstone F. D., Herslöf B. (2000) *G. Lipid Glossary 2 The oily press*, Copyright PJ Barnes & Associates, Bridgwater, England.
- Haaland H., Espe M., Njaa L.R., Myklestad H., (1990) Chemical composition and variation in some parameters during storage of 8 formic acid silages prepared from capelin. *Fiskeridirektoratets skrifter. Serie ernæring*. **III** (2), 59-74.
- Jackson A.J., Kerr A.K., Cowey C.B. (1984) Fish silage as a dietary ingredient for salmon. 1. Nutritional and storage characteristics. *Aquaculture*. **38**, 211-220.
- Jørgen Seliussen (2009) Kvalitetssjef i Hordafor AS, november 2009.
- Katrine Bones Enger (2009) Kvalitetsleder Lerøy Aurora AS, november 2009.
- 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, Technology Branch, Halifax, Nova Scotia. New series circular no **61**, November.
- Kinsella J.E., Shimp J. L., Mai J. (1978) The proximate composition of several species of freshwater fishes. *Food Life Science. Bull* 1-20.
- Labuza T.P. (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2**, 355-405.
- Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. (2001) Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*. **66**, No. 5, 642-646.
- Raa J., Gildberg A. (1982) Fish silage - A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **16**, 383-419
- Raa J., Gildberg A., Strøm T. (1983) Silage production – theory and practice. In: *Upgrading Waste for feeds and food*. Ledward D.A., Taylor A.J., and Lawrie R.A. (eds.) Butterworths, London, 117-132.
- Reece P. (1980) Control and reduction of free fatty-acid concentration in oil recovered from fish silage prepared from sprat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **31**, 147-155.

RUBIN (2008) Årsrapport RUBIN 2008 Publikasjon nr. **171**

Sapers G.M. (1993) Browning of foods: Control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technology*. **47**, 75-84.

Shapira N., Weill P., Sharon O., Lowenbach R., Berzak O. (2009) n-3 PUFA Fortification of High n-6 PUFA Farmed Tilapia with Linseed Could Significantly Increase Dietary Contribution and Support Nutritional Expectations of Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 2249-2254.

Simopoulos A.P. (2004) Omega-6/ omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food reviews international*. **20**, 77-90.

Sklan D. (1979) Digestion and absorption of lipids in chicks fed triglycerides or free fatty acids - synthesis of monoglycerides in the intestine. *Poultry Science*. **58**, 885-889.

Stine Ervik (2009) Controller processing Salmar, april 2009.

Stoffel W., Chu F., Ahrens E. H. (1959) Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography – micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry*. **31**, 307-308.

Stone F.E., Hardy R.W. (1986) Nutritional-value of acid stabilized silage and liquefied fish protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **37**, 797-803.

Tatterson I.N., Windsor M.L. (1974) Fish silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **25**, 369-379.

Tatterson I.N. (1982) Fish silage – preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology*. **7**, 153-159.

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 (vol 72, pg 117, 1995). *Journal of the American Oil Chemists Society*. **72**, 1597-1597.

Viola S., Rappaport U. (1979) Acidulated soapstocks in intensive carp diets – Their effects on growth and body composition. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. Halver J.E., Tiews K. (eds.), Heeneman, Berlin, **11**, 51-62.

Wignall J., Tatterson I. (1976) Fish silage. *Process Biochemistry*. **11**, 17-19.

Wiseman J., Salvador F. (1991) The influence of free fatty-acid content and degree of saturation on the apparent metabolizable energy value of fats fed to broilers. *Poultry Science*. **70**, 573-582.