

Bruk av lipasen *Candida antarctica*
(Novozym 435) som biokatalysator for
etanololyse av sild- og selolje, analysert
ved ¹³C NMR spektroskopi,
gasskromatografi og
tynnsjikt-kromatografi med
flammeioniseringsdetektor

Espen Sveine Ytredal

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: Mai 2013

Hovedveileder: Marit Aursand, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Først vil jeg takke Marit Aursand og SINTEF Fiskeri og Havbruk for at jeg fikk muligheten til å arbeide hos dere med denne oppgaven. Jeg vil også rette en stor takk til Dr. Revililija Mozuraityte og seniorforsker Ivar Storrø for god veiledning gjennom hele oppgavens utførelse.

Jeg vil takke Dr. Inger Beate Standal som gav instruksjon og oppfølging ved bruk av NMR spektroskopi. Takk til Merethe Selnes for opplæring på gasskromatografi og Iatroscan.

En spesiell takk til Ana Karina Carvajal for all den tid, oppmuntring og tålmodighet du har viet til min oppgave.

Avslutningsvis vil jeg takke min familie, venner og medstudenter som alle har bidratt med støtte og oppmuntring.

Trondheim 11. Mai 2013

Espen Sveine Ytredal

Sammendrag

De flerumettede omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) har fått økt oppmerksomhet på grunn av dokumenterte helseeffekter mot hjerte- og karsykdommer. Fettsyrene finnes normalt som etylestere eller triasylglyseroler i oppkonsentrerte fiskeolje produkter. Industrielt produseres fiskeolje produkter ved kjemisk transesterifisering, en prosess som krever høy temperatur og bruk av kjemikalier. Lipaser har i nyere tid fått gradvis økt oppmerksomhet på grunn av deres milde betingelser og spesifisitet ved bruk som biokatalysator under lipid modifikasjon.

Denne oppgaven har som hovedformål å studere muligheten for å benytte lipase som biokatalysator ved transesterifiseringsreaksjon av sild- og selolje for produksjon av etylester. Den ikke-spesifikke immobiliserte lipasen *Candida antarctica* (Novozym 435) er benyttet som biokatalysator for reaksjonen. Reaksjonens progresjon er studert ved bruk av kjernemagnetisk resonans (^{13}C NMR) som etter min beste kjennskap ikke er benyttet i stor grad for studie av etanollyse. Fettsyresammensetningen og fettsyreposisjoneringen på glyserolmolekylet til sild- og selolje er bestemt ved gasskromatografi (GC) og ^{13}C NMR. Temperatur og etanolmengdens innvirkning og optimale betingelser er bestemt ved tynnsjikt-kromatografi med flammeioniseringsdetektor (TLC-FID).

I sild- og selolje utgjør enumettede fettsyrer den største andelen fettsyrer med henholdsvis 59 og 59% av totale mengde fettsyrer. De flerumettede omega-3 fettsyrene utgjør henholdsvis 16 og 23% for sild- og selolje. Selolje har fettsyrene EPA og DHA esterifisert til sn-1,3 posisjon ved >95%. Sildeolje har DHA esterifisert til sn-2 posisjon ved >95% og EPA esterifisert 49% til posisjon sn-1,3 og 51% til posisjon sn-2.

Optimale reaksjonsbetingelser er funnet for etanollysereaksjonen med hensyn til temperatur og etanolmengde. Ved bruk av sildolje under støkiometrisk molarforhold etanol til olje er økende temperatur funnet å øke etylester

dannelseshastigheten. Det er vist at 60°C gir en lavere reaksjonshastighet enn optimaltemperaturen 50°C. Dette kan forklares av redusert lipaseaktivitet som resultat av massetransportbegrensninger.

Etanolmengdens innvirkning på etanollyse reaksjonen er funnet å gi økt etylester dannelseshastighet, ved økt mengde av etanol i systemet. Ved overskudd av etanol er det funnet at temperaturen ikke har samme innvirkning, som under støkiometrisk molarforhold etanol til olje. På bakgrunn av disse resultatene er 50°C funnet å være optimaltemperatur ved støkiometrisk molarforhold etanol. Ved overskudd av etanol er funnet at 30°C er den mest passende temperatur.

¹³C NMR er den eneste analysemetoden som gir multi-komponent informasjon i et steg. I denne oppgaven er teknikken benyttet for analyse av reaksjonsprogresjonen til etanollysereaksjonen under de optimaliserte betingelsene. Ved støkiometrisk molarforhold etanol til olje viser lipasen spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet i sild- og selolje. For selolje viser lipasen høyere aktivitet mot fettsyren EPA enn DHA. Undersøkelsen gjort ved 50°C viser endring i sammensetningen asylglyserol gjennom reaksjonsforløpet fra 2MAG og 1,2DAG til 1MAG og 1,3DAG som kan forklares av intramolekylær asylmigrering.

Analyse av reaksjonsprogresjonen til etanollysereaksjonen utført med overskudd av etanol og 30°C viser at lipasen fortsatt uttrykker spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet. For selolje viser lipasen også økt aktivitet mot fettsyren EPA sammenlignet med DHA. Analysen viser imidlertid ikke endring i sammensetning asylglyseroler over reaksjonsforløpet noe som tilsier at det ved lavere temperatur ikke forekommer intramolekylær asylmigrering.

Summary

Polyunsaturated omega-3 fatty acids have recently received increased attention for their documented effect towards cardiovascular diseases. The fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are present as either ethyl ester or triacylglycerol in concentrated fish oil product. In the industry these products are produced through chemical transesterification, a process that requires high temperature and chemicals. Lipases are biocatalysts that recently have received increased attention for their mild operation conditions and specificity, when used as biocatalyst under lipid modifications.

The aim of this thesis is to study the ability to use lipase as a biocatalyst in a transesterification reaction for the production of ethyl esters from herring and seal oil. Non-specific immobilized lipase *Candida Antarctica* (Novozym 435) is used as the biocatalyst. The progression of the reaction has been studied through nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR), a technique that in my best knowledge has not been used widely in the progression study of ethanolysis reaction. Gas chromatography (GC) and ^{13}C NMR have been used to determine both fatty acid composition and fatty acid position on the glycerol molecule of herring and seal oil. Impact and optimal conditions are determined for temperature and ethanol amount in the ethanolysis reaction by thin layer chromatography with flame ionization detector (TLC-FID).

Monounsaturated fatty acids constitute the largest proportion of fatty acids, 59% and 59% of the total amount of fatty acids in both herring and seal oil, respectively. The polyunsaturated omega-3 fatty acids make up 16% and 23% for herring and seal oil, respectively. Seal oil has the EPA and DHA fatty acid esterified to the sn-1, 3 position by >95%. While herring has DHA esterified to the sn-2 position of >95% and EPA 49% esterified at position sn-1, 3, and 51% at position sn-2.

Optimal reaction conditions are found for ethanolysis in terms of temperature and ethanol amount using herring oil. Under stoichiometric molar ratio of

ethanol to oil, increasing temperature is found to increase the rate of ethyl ester formation. It is shown that 60°C gives a lower formation rate than the optimal temperature, 50°C. This can be explained by reduced lipase activity as a result of mass transport limitation.

Increased amount of ethanol in the system is found to increase the rate of ethyl ester formation. In excess of ethanol, the temperature is found not to have the same impact as temperature have under stoichiometric molar ratio of ethanol to oil. Based on these results 50°C is found to be the optimum temperature at a stoichiometric molar ratio of ethanol to oil, while in excess of ethanol 30°C is found to be the most preferable temperature.

¹³C NMR is the only available technique that provides multi-component information in one step. In this thesis, the technique is used to follow the progress of the ethanolysis reaction under optimized conditions. The lipase show specificity towards sn-1,3 positions of glycerol molecule in herring and seal oil under stoichiometric molar ratio of ethanol to oil. For seal oil the lipase show higher activity towards EPA than DHA. The acylglycerol composition changes from 2MAG and 1,2DAG to 1MAG and 1,3DAG during the ethanolysis reaction at 50°C, this can be explained by intermolecular acyl migration.

Progress analysis of the ethanolysis reaction with an excess of ethanol at 30°C show that the lipase still expressed specificity towards the sn-1,3 positions of the glycerol molecule. For seal oil the lipase show higher activity towards EPA than DHA. The analysis shows no change in the acylglycerol composition during the reaction, suggesting that intermolecular acyl migration do not occur at lower temperatures.

1	INTRODUKSJON	1
1.1	LIPIDER	3
1.1.1	FETTSYRER	3
1.1.2	ACYLGLYSEROLER	4
1.1.3	OMEGA FETTSYRENE	4
1.1.4	MARINE LIPIDER	6
1.1.5	OPPKONSENTRERING AV OMEGA-3 FETTSYRER	7
1.2	ENZYMATISK MODIFIKASJON	8
1.2.1	LIPASER	8
1.2.1.1	Struktur og karakteristikk	8
1.2.1.2	Lipase katalyserte reaksjoner	10
1.2.1.2.1	Hydrolyse	10
1.2.1.2.2	Transesterifisering	10
1.2.1.2.3	Direkte esterifisering	11
1.2.1.3	Spesifisitet og selektivitet	12
1.2.1.4	Immobiliserte lipaser	13
1.2.1.4.1	Massetransporteffekter	13
1.2.2	TEMPERATUR	14
1.2.2.1	Arrheniuslikningen	15
1.2.3	PH	15
1.3	ANALYTISKE METODER	16
1.3.1	IATROSCAN TLC-FID	16
1.3.2	GASSKROMATOGRAFI	18
1.3.3	KJERNEMAGNETISK RESONANS	19
1.3.3.1	¹³ C NMR	20
1.4	OPPGAVENS FORMÅL	21
2	MATERIALER OG METODER	22
2.1	MATERIALER	22
2.2	LIPASE KATALYSERT ETANOLLYSE	23
2.3	ETANOLLYSE OPTIMALISERING	24
2.4	FETTSYRESAMMENSETNING, GC	25
2.5	LIPIDKLASSE ANALYSE, IATROSCAN TLC-FID	26
2.6	FETTSYRE POSISJONERING OG REAKSJONS PROGRESJON, NMR	27
2.7	STATISTISKE ANALYSER/STATISTIKK	28
3	RESULTAT OG DISKUSJON	29
3.1	FETTSYRESAMMENSETNING, GC	30
3.2	FETTSYRENE POSISJONERING PÅ GLYSEROLMOLEKYLET, ¹³ C NMR	32
3.3	ENZYMATISK ETANOLLYSE AV SILDEOLJE, TLC-FID	34
3.3.1	TEMPERATURENS INNVIRKNING PÅ ETANOLLYSE AV SILDEOLJE	34
3.3.1.1	Temperatures innvirkning, Arrheniuslikningen	38
3.3.2	ETANOL MENGDENS INNVIRKNING PÅ ETANOLLYSE AV SILDEOLJE, TLC-FID	41
3.3.3	EFFEKT AV TEMPERATUR OG ETANOLMENGDENS PÅ ETANOLLYSE AV SILDEOLJE	44
3.4	ENZYMATISK ETANOLLYSE AV SELOLJE, TLC-FID	45
3.4.1	ETANOLLYSE AV SELOLJE VED STØKIOMETRISK ETANOL FORHOLD OG 50°C	45
3.4.2	ETANOLLYSE AV SELOLJE VED OVERSKUDD AV ETANOL VED 30 OG 50°C	46
3.5	ENZYMATISK ETANOLLYSE AV SILD- OG SELOLJE, ¹³ C NMR	49
3.5.1	ETANOLLYSE AV SILDEOLJE VED STØKIOMETRISK ETANOL FORHOLD OG 50°C	50
3.5.1.1	Glyserolkarbonspekteret	50
3.5.1.2	Karbonylkarbonspekteret	53
3.5.2	ETANOLLYSE AV SELOLJE VED STØKIOMETRISKE ETANOL FORHOLD OG 50°C	55

3.5.2.1	Glyserolkarbon spekteret.....	55
3.5.2.2	Karbonylkarbonspekteret.....	57
3.5.3	OPPSUMMERING: ETANOLYSE AV SILD- OG SELOLJE VED STØKIOMETRISK FORHOLD ETANOL OG 50°C.....	59
3.5.4	ETANOLYSE AV SILDEOLJE VED OVERSKUDD ETANOL OG 30°C.....	60
3.5.4.1	Glyserolkarbonspekteret.....	60
3.5.4.2	Karbonylkarbonspekteret.....	62
3.5.5	ETANOLYSE AV SELOLJE VED OVERSKUDD ETANOL OG 30°C.....	64
3.5.5.1	Glyserolkarbonspekteret.....	64
3.5.5.2	Karbonylkarbonspekteret.....	66
3.5.6	OPPSUMMERING: ETANOLYSE AV SILD- OG SELOLJE VED OVERSKUDD ETANOL OG 30°C	68
4	FREMTIDIG ARBEID	70
5	KONKLUSJON.....	71
APPENDIKS A.....	72
APPENDIKS B.....	75
APPENDIKS C	79
APPENDIKS D.....	83
APPENDIKS E	87
APPENDIKS F	92
REFERANSER.....	97

1 Introduksjon

Flerumettede omega-3 fettsyrer har over de siste årene fått gradvis økt oppmerksomhet som følge av de positive helseeffektene. Størst oppmerksomhet har fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) fått på bakgrunn av deres dokumenterte helseeffekter mot hjerte- og karsykdommer (Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011). Hovedkilden til flerumettede omega-3 fettsyrer i dagens kosthold kommer enten fra fet fisk, fiskeolje tilskudd eller mat som er tilsatt fiskeolje (Breivik 2007). Som et resultat av den økte bevisstheten rundt flerumettede omega-3 fettsyrers positive helseeffekter, er det globale markedet for fiskeolje produkter i sterk vekst (Breivik, Haraldsson et al. 1997; Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011). Den Norske fiskeoljeindustrien er verdensledende, samtidig som Norske forbrukere er i verdenstoppen når det kommer til inntak av både fiskeolje tilskudd og fisk (Vitenskapskomiteen for 2011).

Tradisjonelt har industrien benyttet kjemiske teknikker ved modifikasjon av fiskeolje (Breivik 2007). Økende etterspørsel etter fiskeolje med oppkonsentrerte mengder flerumettede fettsyrer har ført til at industrien har startet kartleggingen av alternative lipid modifikasjons teknikker for å oppkonsentrere oljen. En av de mest lovende teknikkene er enzymatisk lipid modifikasjon. Lipase katalyserte reaksjoner kan utføres under milde forhold med hensyn til temperatur, pH og trykk. Dette er av stor viktighet ettersom flerumettede fettsyrer er ekstra utsatte for oksidasjon på grunn av sine mange dobbeltbindinger (Vitenskapskomiteen for 2011). Bruk av lipaser ved lipid modifikasjon har flere fordeler;

1. Spesifisiteten til lipasene.
2. Effektivitet under milde betingelser.
3. Redusert miljøforurensning.
4. Utbredt tilgjengelighet.
5. Lipasene kan forbedres genetisk.
6. Muligheten for å benytte lipasen til å produsere spesifikke produkt.

Som er noen av de mange fordelene enzymatisk lipid modifikasjon tilbyr. Likevel er det fortsatt et langt steg frem til at kjemisk lipid modifikasjon byttes ut med enzymatisk lipid modifikasjon i industrien (Xu 2003).

Enzymatisk alkohollyse er en transesterifiseringsreaksjon mellom en ester og et alkohol (Xu 2003), som kan benyttes til oppkonsentrering av flerumettede omega-3 fettsyrer. Teknikken har store fortrinn sammenlignet med kjemisk transesterifisering ved at reaksjonen kan foregå under løsemiddelfrie forhold. Dette er en fordel ettersom man unngår problemer knyttet til separasjon, giftighet og anteneligheten til organiske løsemidler (Xu 2003). Hovedproblemet knyttet til enzymatisk alkohollyse er lipase kostnadene, noe som delvis kan løses ved bruk av immobiliserte lipaser (Akoh and Min 2008). Flere studier (Breivik, Haraldsson et al. 1997; Haraldsson, Kristinsson et al. 1997; Irimescu, Furihata et al. 2001) viser at det ved bruk av enzymatisk alkohollyse med en spesifikk lipase, kan dannes spesifikke asylglyserol og alkylester blandinger. Ved bruk av tilpassede separasjonsteknikker oppkonsentreres blandingen med de flerumettede omega-3 fettsyrene (Wanasundara and Shahidi 1998; Breivik 2007).

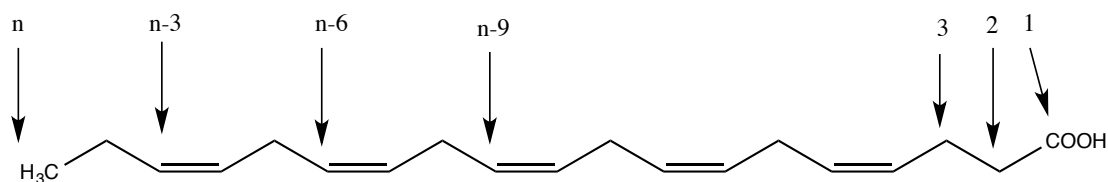
1.1 Lipider

Lipider er en fellesbetegnelse for fettsyrer og derivater med ulik grad av løselighet i organiske løsemidler (Akoh and Min 2008). Lipider deles inn i to hovedgrupper, lipider i fast form (fett) og lipider i flytende form (oljer) ved romtemperatur. Lipider har ulik polaritet som benyttes til klassifisering, eksempelvis er triasyglyserol og kolesterol upolare lipider, mens fosfolipider er polare. (Damodaran, Parkin et al. 2008).

1.1.1 Fettsyrer

Fettsyrer er essensielle komponenter i lipider, bestående av en alifatisk hydrokarbonkjede, en karboksyl gruppe og en metylgruppe på terminal enden (Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011). De fleste naturlige fettsyrer har par-antall karboner, ettersom fettsyre syntesen tilfører to karbonatomer ved hver forlengelse. Fettsyrer består normalt av 14-24 karbonatom og kan klassifiseres etter grad av metning. Mettet, enumettet og flerumettet fettsyrer angir henholdsvis ingen, en eller flere dobbelt bindinger i karbonatomkjeden (Akoh and Min 2008; Damodaran, Parkin et al. 2008; Vitenskapskomiteen for 2011).

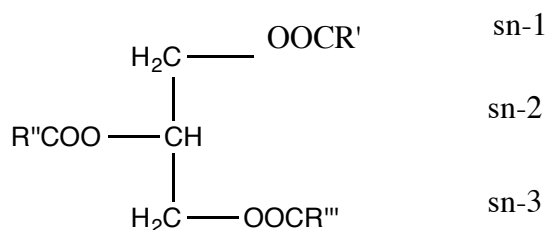
Karbonatomene i fettsyrene nummereres fra karboksylgruppen (COOH), som vist i figur 1. Eksempel: Fettsyren eikosapentaensyre, EPA som består av 20 karboner og 5 dobbeltbindinger. Den første dobbeltbindingen er karbonatom tre fra metyl gruppen og benevnes omega (ω) eller n-3. Dermed kan EPA skrives 20:5 n-3 numerisk (Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011; Vitenskapskomiteen for 2011).



Figur 1. Viser strukturen og nomenklaturen til den flerumettete n-3 fettsyren EPA (20:5 n-3).

1.1.2 Acylglyseroler

Asylglyserol er et glyserolmolekyl esterifisert med henholdsvis en, to eller tre fettsyrer, derav navnene monoacylglyserol (MAG), diacylglyserol (DAG) og triacylglyserol (TAG) (Akoh and Min 2008). Over 99 % av alle fettsyrene funnet naturlig i planter og dyr er esterifisert til et glyserolmolekyl. Konformasjonen til acylglyserolene er bestemt ut i fra hvilken posisjon på glyserolen fettsyren er festet. Figur 2 illustrerer de tre posisjonene hvor fettsyrene kan bindes til glyserol. Eksempelvis har et diacylglyserol med sn-1,3 konfigurasjon, fettsyrene bundet til posisjon en (sn-1) og tre (sn-3) (Schäfer 1997; Damodaran, Parkin et al. 2008).



Figur 2. Viser de tre posisjonene fettsyrene kan binde til et glyserolmolekyl. Posisjonene er angitt som sn-1, sn-2 og sn-3.

1.1.3 Omega fettsyrene

Fettsyrene i omega-3 (ω -3) og omega-6 (ω -6) familien betegnes som essensielle fettsyrer (Akoh and Min 2008). Linolsyre (LA, 18:2n-6), α -linolensyre (ALA, 18:3n-3), eikosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) utgjør de essensielle fettsyrene. LA og ALA kan ikke syntetiseres av mennesket og må tilføres via kostholdet. Derimot kan EPA og DHA syntetiseres fra LA og ALA. Syntesehastigheten til EPA og DHA er imidlertid så lav at disse må

tilføres via daglig diett (Breivik 2007; Akoh and Min 2008; Vitenskapskomiteen for 2011).

Omega-3 fettsyrer har tre viktige fysiologiske funksjoner; (i) hovedkomponenter i biologiske membraner, DHA finnes i høye konsentrasjoner i retina, hjernen og sperma. (ii) kan endre gen uttrykk og (iii) EPA bidrar til regulering av eikosanoidproduksjon fra arakidonsyre (ARA). Generelt har EPA en viktig funksjon gjennom metabolittene, mens DHA har en strukturell rolle (Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011). Sosial- og helsedirektoratet anbefaler et inntak på 0,5 E% (energi prosent) omega-3 fettsyrer for barn fra to år og voksne, og minst 1 E% for nyfødte (6-11 mnd), gravide og ammende kvinner (Helsedirektoratet 2005).

Studier utført på flere enn 43,000 pasienter med hjerte- og karsykdommer viste reduserte kardiovaskulære hendelser ved inntak av omega-3 tilskudd (Vitenskapskomiteen for 2011). Studien bestod av fem randomiserte forsøk, hvor pasientene enten ble gitt 0,8 gram EPA og DHA per dag eller 1,8 gram EPA. Studier som benyttet 1,6-7,1 gram EPA og DHA per dag, har vist reduserte symptomer for pasienter med reumatoid artritt, noe som kan gi redusert bruk av anti-inflammatoriske medisiner (Vitenskapskomiteen for 2011).

Det er observert økt blødningstendens hos pasienter med hjerte- karsykdommer som har fått 6,9 gram EPA og DHA per dag. Disse pasientene har i tillegg fått blodfortynnende medisiner. Det ikke rapportert om tilfeller av økt blødningstendens kun knyttet til tilskudd av EPA og DHA (Vitenskapskomiteen for 2011).

1.1.4 Marine lipider

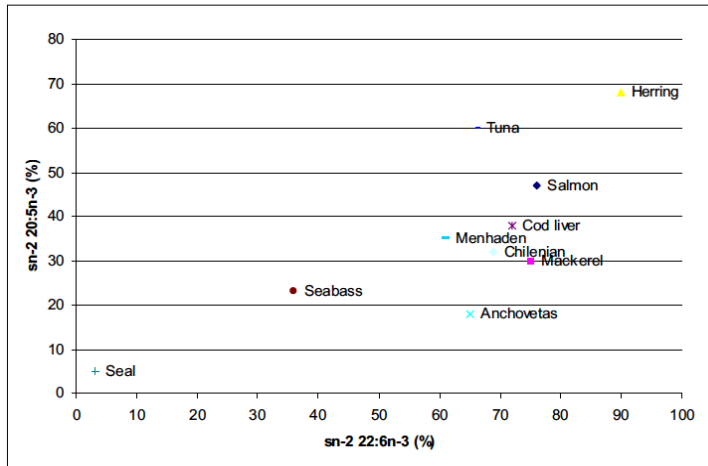
Marine lipider består av en kompleks sammensetning av fettsyrer, tabell 1. Omega-3 fettsyrene utgjør normalt 10-35 % av den totale mengden fettsyrer (Breivik 2007). Artene har varierende sammensetning fettsyrer. Det kan være ulike årsaker til dette, som variasjoner mellom fiskeartene, men også innbyrdes mellom enkelt individer av samme art. Variasjonene reflekterer biologiske ulikheter som kjønn, reproduksjonsstatus, lipidmetabolisme eller miljøpåvirkninger som vanntemperatur og sesong (Haraldsson 1999; Breivik 2007; Standal 2009). Etersom omega-3 fettsyrene ikke syntetiseres av fisken selv, men av fytoplankton som fisken spiser (Haraldsson 1999) er det viktig å påpeke at mengden omega-3 fettsyrer i oppdrettsfisk er redusert. Dette er et resultat av gradvis mindre tilsatt fiskemel i foret til oppdrettsfisk (Marine Harvest, Realfagsdagen 2013).

Tabell 1. Prosentvis sammensetning av hoved fettsyrene til utvalgte arter.

Fettsyre	Atlantehavs laks (oppdrett) ^a	Sild ^a	Sel ^a	Torskelever ^b	Menhaden (sildefisk, ikke i Norge) ^b
14:0	4,2	7,0	5,0	3,33	8,32
16:0	15,7	16	11,3	11,01	17,4
18:0	4,2	-	1,1	3,89	3,33
16:1 n-7	5,1	6,0	14,3	7,85	11,4
18:1 n-9	16,5	13,0	22,3	21,2	12,1
20:1 n-9	3,3	12,0	7,0	10,4	1,44
20:5 n-3 (EPA)	7,1	5,0	6,6	11,2	13,2
22:5 n-3 (DPA)	3,9	-	4,4	1,14	2,40
22:6 n-3 (DHA)	15,7	6,0	8,7	14,8	10,1
Totalt n-3	26,7	11,0	19,7	27,14	25,7

^aData hentet fra (Breivik 2007). ^bData hentet fra (Shi, Ho et al. 2005).

Gjennom analyse av triacylglycerolstrukturen til ulike arter har vist seg at posisjonen til fettsyrene EPA og DHA på glyserolmolekylet er karakteristisk for hver art (Standal 2009). Posisjonen til fettsyrene er et parameter som inntil nylig har vært lite undersøkt, men som kan benyttes ved strukturering av triacylglyceroler. Analyser utført med NMR har vist følgende posisjonering av omega-3 fettsyrene EPA og DHA på glyserolmolekylet, figur 3.



Figur 3. Viser sn-2 regiospesifisiteten til et utvalg marine lipider(Standal 2009).

1.1.5 Oppkonsentrering av omega-3 fettsyrer

Marine lipider har en kompleks fettsyresammensetning og artsspesifikk posisjonering av fettsyrene. Produksjon av omega-3 konsentrat er derfor en krevende prosess, hvor det normalt benyttes flere ulike teknikker (Breivik 2007). Metodene som brukes i dag inkluderer preparativ kromatografi, fraksjon eller molekylær destillasjon, enzymatisk modifisering, winterisering, superkritisk væskeekstraksjon og urea kompleksering (Shahidi and Wanasundara 1998). Tabell 2 illustrerer et utvalg metoder og hva de påvirkes av.

Tabell 2. Utvalg fraksjonerings teknikker som benyttes for å separere fettsyrer ved oppkonsentrering (Breivik 2007).

Fraksjonerings teknikk	Påvirkes av	
	Molekylær størrelse	Grad umettethet
Molekylær destillasjon	++	-
Urea fraksjonering	+	++
Superkritisk væske ekstraksjon	++	+
Preparativ kromatografi	++	++
Enzymatisk reaksjon	+	++

+Påvirker fraksjonering. ++Påvirker fraksjonering sterkt. - Påvirker ikke fraksjonering.

Ved produksjon av konsentrater benyttes vanligvis transesterifisering eller hydrolyse. Det produseres estere eller frie fettsyrer, som separeres ved en av de ulike separasjons teknikkene gitt i tabell 2 (Shahidi and Wanasundara 1998; Breivik 2007).

1.2 Enzymatisk modifikasjon

1.2.1 Lipaser

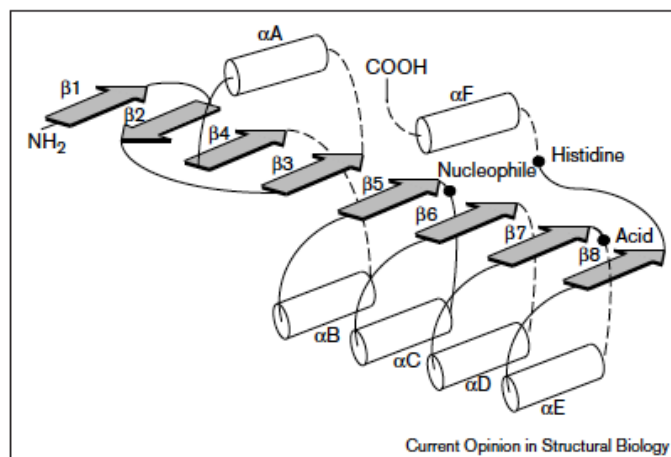
Lipaser (hydrolaser E.C. 3.1.1.3) er enzymer som katalyserer tre typer reaksjoner; hydrolyse, transesterifisering og direkte esterifisering (Uppenberg, Hansen et al. 1994; Breivik 2007; Akoh and Min 2008; Rajendran, Palanisamy et al. 2009). Lipaser er en undergruppe av hydrolaseenzymene og skiller seg fra andre undergrupper med høy aktivitet mot vann-uløselige substrater og forsterket aktivitet på substrat(olje)-vann grenseflaten (Akoh and Min 2008). Lipaser er et alternativ til kjemisk esterifisering fordi lipaser utfører tilsvarende reaksjoner under mildere forhold, lavere temperatur og trykk enn forholdene som benyttes ved tradisjonelle kjemiske prosessene (Rajendran, Palanisamy et al. 2009). Lipaser er stabile i organiske løsemidler, krever ingen kofaktorer, har stor substratspesifisitet og viser stor enantioselektivitet¹ (Jaeger and Reetz 1998).

1.2.1.1 Struktur og karakteristikk

Felles for lipaser er en tredimensjonal struktur som kalles α/β - folding (Suplatov, Besenmatter et al. 2012). α/β - foldingen består av åtte β -flak omgitt av α - helikser på begge sider, med unntak av det andre β -flaket som er antiparallellt til de øvrige, figur 4 (Nardini and Dijkstra 1999).

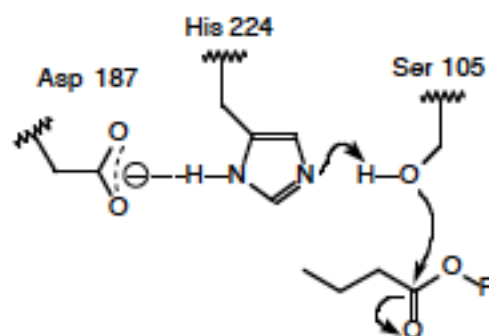
¹ Enantioselektivitet er at lipasen danner cis og ikke trans fettsyrer.

Figur 4. Viser en oversikt av tertierstrukturen til lipaser (Nardini and Dijkstra 1999).



Aminosyrene serin, asparagin (eller glutamat) og histidin utgjør det aktive setet i lipaser, også referert til som den katalytiske triaden (Uppenberg, Hansen et al. 1994; Nardini and Dijkstra 1999; Jacobsen 2004; Akoh and Min 2008). Plasseringen til aminosyrene i det aktive setet gir hydroksylgruppen på serin redusert pKa-verdi og dermed nukleofile egenskaper mot karbonylkarbonet til substratet, figur 5 (Jacobsen 2004).

Figur 5. Plasseringen til aminosyrene i det aktive setet. Aminosyren serin viser nukleofile egenskaper mot karbonylkarbonet til et substrat (Jacobsen 2004).



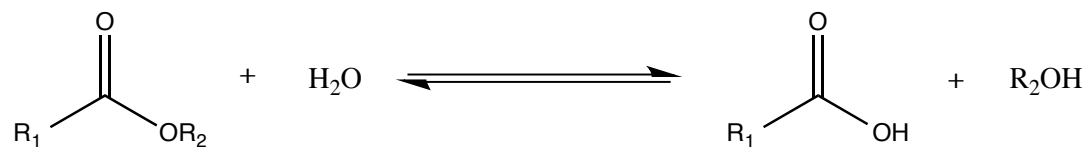
Krystallografisk røntgenstudie av tertierstrukturen til flere lipaser viser at lipasene har et lite lokk, laget av en kort α-heliks som dekker det aktive setet. Begrenset tilgang til det aktive setet og mangelen på et aktiverende sete for lokket er årsakene til høy grad av substratselektivitet for lipaser (Uppenberg, Hansen et al. 1994; Uppenberg, Oehrner et al. 1995; Jacobsen 2004; Rajendran, Palanisamy et al. 2009). Lipaser aktiveres ved adsorpsjon av olje-vann grenseflaten som gir reorientering av lokket, og gjør det aktive setet tilgjengelig for substratene (Maruyama, Nakajima et al. 2000).

1.2.1.2 Lipase katalyserte reaksjoner

Tre typer reaksjoner; hydrolyse, transesterifisering og direkte esterifisering katalyseres av lipaser (Akoh and Min 2008; Rajendran, Palanisamy et al. 2009). Hydrolyse utføres i et system med overskudd av vann, mens direkte esterifisering utføres i et system med liten mengde vann. Transesterifisering katalyseres effektivt i en løsning uten vann og bruk av immobilisert enzym (Akoh 2006).

1.2.1.2.1 Hydrolyse

Lipasenes naturlige rolle er å katalysere hydrolyse av lipider, som gir en blanding av frie fettsyrer, glyserol, MAG og DAG. Reaksjonen (figur 6) foregår på olje-vann grenseflaten og mengden vann i systemet påvirker ikke reaksjonen (Hou 2005).

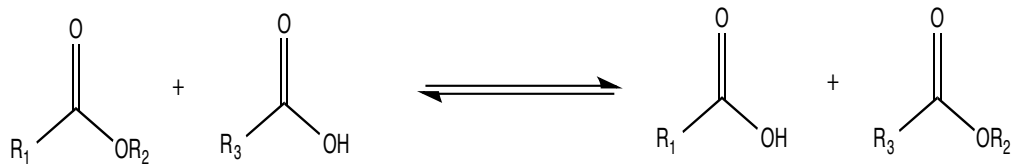


Figur 6. Hydrolyse katalysert av lipase med overskudd vann.

1.2.1.2.2 Transesterifisering

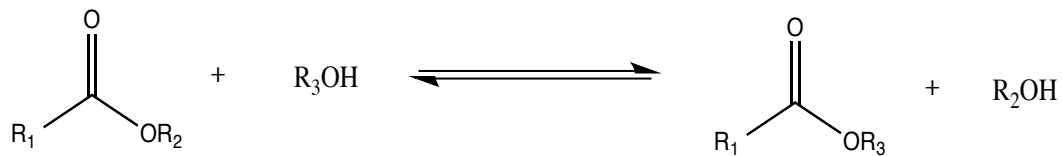
Transesterifisering deles inn i tre hovedgrupper; syrehydrolyse, alkohollyse og interesterifisering, hvor en ester gruppe reagerer med en syre, et alkohol eller en annen ester-gruppe, respektivt (Gunstone 2001). Sammenlignet med direkte esterifisering hvor vann dannes kontinuerlig og må fjernes, kreves det kun en liten mengde vann for å opprettholde lipaseaktiviteten (Hou 2005). Enzymstabiliteten er normalt høyere ved lav mengde vann i systemet (Rajendran, Palanisamy et al. 2009).

Syrehydrolyse inkorporerer asylgrupper fra en syre til en ester (figur 7). Reaksjonen kan benyttes for å inkorporere essensielle fettsyrer til et triacylglyserol for å øke ernæringsegenskapene (Akoh and Min 2008).



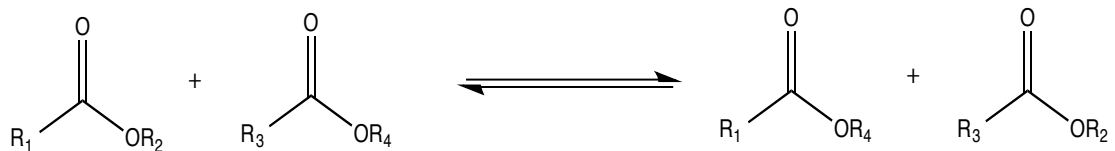
Figur 7. Syrehydrolyse, inkorporering av asylgruppe fra en syre til en ester.

Alkohollyse benyttes for å produsere metyl- og etylestere fra triacylglycerol (figur 8) (Akoh and Min 2008). Etanollyse kan benyttes for å lage etylestere som ved fraksjonering gir en høykonsentrert omega-3 olje (Haraldsson, Kristinsson et al. 1997).



Figur 8. Alkohollyse, reaksjon med alkohol for å danne estere.

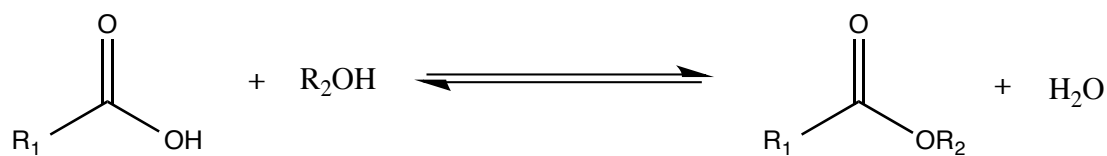
Interesterifisering kan benyttes for å endre de fysiske egenskapene til et triacylglycerol (figur 9). Fettsyrene bytter posisjon på glyserolene internt mellom triacylglycerolene som inngår i reaksjonen (Akoh and Min 2008).



Figur 9. Interesterifisering, intern bytting av fettsyrer mellom glyserolene.

1.2.1.2.3 Direkte esterifisering

Direkte esterifisering er reversibel hydrolyse, figur 10. Glyserol reagerer med fettsyrer og danner triacylglycerol og vann. Vann er et produkt ved direkte esterifisering, det er derfor nødvendig å benytte teknikker som vakuum (Haraldsson, Gudmundsson et al. 1995), molekyl sil eller mettede salt løsninger for å kontinuerlig fjerne overskuddsvann (Hou 2005). Det er ved bruk av CAL-B lipase og direkte esterifisering rapportert blandinger triacylglycerol med 100% EPA eller DHA (Haraldsson, Gudmundsson et al. 1995; Haraldsson 1999).



Figur 10. Direkte esterifisering, reversibel hydrolyse hvor fettsyre tilføres glyserolmolekylet.

1.2.1.3 Spesifisitet og selektivitet

Spesifisitet og selektivitet beskriver lipasenes ulikheter. Substrater med spesielle kjemiske bindinger kan favoriseres av enzymene og dermed gi enzymet spesifisitet mot grupper som inneholder disse kjemiske bindingene. Selektivitet beskriver prioriteten og reaktiviteten til substratene innad i gruppen som er gitt av enzymets spesifisitet. (Damodaran, Parkin et al. 2008).

Lipaser deles inn i tre selektivitetsklasser, (i) ikke selektive lipaser som ikke viser spesifisitet til asylgruppens posisjonering på glyserolet og som gir en fullstendig nedbrytning av triacylglyseridet til glyserol og fettsyrer (Akoh and Min 2008). (ii) Lipaser med spesifisitet mot sn-1 og 3 posisjonene på triacylglyseridet og danner en blanding av DAG og MAG som produkt. Asylmigrering² kan imidlertid medføre fullstendig nedbrytning av triacylglyserolet til glyserol og fettsyrer. Majoriteten av lipaser inngår i denne kategorien, ettersom steriske hindringer hindrer lipasen å binde sn-2 fettsyren. (Akoh and Min 2008). (iii) Lipaser som viser spesifisitet mot fettsyrenes grad av mettetet og/eller fettsyrelengde (Akoh and Min 2008).

Stereospesifisitet er uvanlig, men ved forekomster vil stereospesifisiteten gi ulik hydrolysehastighet for sn-1 og sn-3 posisjonene på triacylglyserolet. Stereospesifisitet er en direkte årsak av type lipase og ulike acyl grupper (Akoh and Min 2008).

² Asylmigrering er en prosess hvor en asylgruppe endrer posisjon intramolekylært fra en hydroksylgruppe til en annen på glyserolmolekylet (Fureby et al. 1996).

1.2.1.4 Immobiliserte lipaser

Immobiliserte lipaser er pakket og lokalisert slik at de kan gjenbrukes kontinuerlig. De kan dermed inngå i en kontinuerlig storskala industriell prosess. Immobiliserte lipaser gir redusert kontaminering. Det medfører redusert bruk av foredlingsprosesser sammenlignet med kjemiske katalysatorer. Immobilisering gir lipasen flere bruksområder og øker ofte termisk og kjemisk stabilitet, noe som gir forutsigbar lipaseaktivitet (Murty, Bhat et al. 2002; Akoh and Min 2008). Immobilisering medfører imidlertid noen ulemper som redusert substratdiffusjon og muligheter for lipaselekkasje fra bærematerialet (Murty, Bhat et al. 2002). Det finnes et bredt spekter av immobiliseringsmetoder. Et utvalg metoder og krefter som virker er gjengitt i tabell 3.

Tabell 3. Viser de vanligste immobiliserings metodene og kreftene som virker (Murty, Bhat et al. 2002).

Metode	Krefter som virker mellom lipasen og bærematerialet
Adsorpsjon	Hydrofobiske interaksjoner mellom lipase og bærematerialet.
Ionisk binding	Elektrostatisk interaksjoner mellom ioniske grupper på bærematerialet og lipasen.
Kovalent binding	Kovalente bindinger mellom bærematerialet og funksjonelle grupper på lipasen.
Kryss-binding	Kobler lipaser sammen til tredimensjonale strukturer uten bærematerialer via multifunksjonelle reagenser.

1.2.1.4.1 Massetransporteffekter

Lipasekatalyserte reaksjoner kan påvirkes av massetransportbegrensninger. Bruk av immobiliserte enzymer involverer et heterogent system, hvor substratens diffusjon påvirker reaksjonshastigheten. I et slikt system må substratet diffundere fra bulkfasen inn til bærematerialet (ekstern diffusjon) og fra bærematerialet inn i porestrukturen hvor det katalytiske setet befinner seg (intern diffusjon) (Akoh and Min 2008). Massetransport av substrat til det katalytiske setet drives av konsentrasjonsforskjellen mellom bulkfasen og enzymet (Doran 2012).

Intern massetransport påvirkes av størrelse, dybde og glattheten til porene i enzymet. Når hastigheten inn i porene er lavere enn omdannelseshastigheten er reaksjonen diffusjonsbegrenset, noe som skyldes at det ikke er nok substrat tilgjengelig for mengde og kapasitet til enzymet (Akoh and Min 2008).

Massetransporthastighet avhenger av konsentrasjonsgradienten i systemet. Konsentrasjonsgradienten avhenger av transporten produkt fra lipasen som igjen avhenger av reaksjonshastigheten. Dette tilsier at massetransporthastighet og reaksjonshastigheten er avhengige av hverandre i heterogene system (Doran 2012). Faktorer som økt rørehastighet og substratkonsentrasjon i bulkfasen kan benyttes for å minimere ekstern og intern diffusjon (Tischer and Wedekind 1999; Akoh and Min 2008; Doran 2012).

1.2.2 Temperatur

Temperatur har forutsigbar påvirkning på enzymkatalyserte reaksjoner. Den vil enten virke aktiverende eller deaktivere på enzymaktiviteten. Økt temperatur gir økt fri energi i systemet, som resulterer i senket energibarriere og høyere reaksjonshastighet (Damodaran, Parkin et al. 2008). Optimaltemperatur er temperaturen hvor reaksjonshastigheten når sitt maksimum (Damodaran, Parkin et al. 2008).

Ved økt temperatur vil lipaser øke esterifiseringshastigheten, men for høye temperaturer resulterer i denaturering og redusert esterifiseringshastighet (Akoh and Min 2008). Lipaser har hovedsaklig optimaltemperatur i intervallet 30-60°C (Damodaran, Parkin et al. 2008). Høye temperaturer kan redusere halveringstiden til lipaser (Akoh and Min 2008).

1.2.2.1 Arrheniuslikningen

Arrheniuslikningen (1) viser sammenhengen mellom reaksjonshastigheten og temperaturen til en enzymkatalysert reaksjon. Fra denne sammenhengen kan aktiveringsenergien, E_a til reaksjonen bestemmes (McNaught and Wilkinson 1997; Damodaran, Parkin et al. 2008).

$$k = A * e^{-\frac{E_A}{RT}} \leftrightarrow \ln k = \ln A + \frac{-E_A}{RT} \quad (1)$$

k =Hastighetskonstant A =Pre eksponential faktor
 e =Matematisk kvantitet E_A =Aktiveringsenergi
 R =Gass konstant T =Kalvin temperatur

Arrheniuslikningen viser eksponentiell økning i hastighetskonstanten ved økt T . Et Arrhenius plot gir sammenhengen mellom $\ln k$ og $1/T$ som gir stigningstallet $-E_a/R$. Økt aktiveringsenergi tilsier at reaksjonen viser større temperaturavhengighet (Damodaran, Parkin et al. 2008).

1.2.3 pH

Lipaser er proteiner bygget opp av aminosyrer, som kan ha nøytrale, basiske og sure side-grupper. Endring av pH i omgivelsene kan medføre ionisering av aminosyrene (Damodaran, Parkin et al. 2008). Dersom det katalytiske setet til lipasen ioniseres vil dette kunne medføre en sterk reduksjon av lipasens katalytiske egenskaper (Akoh and Min 2008).

pH optimum er normalt mellom pH 7 og 9. Dersom lipasen er immobilisert vil fordelingen av protoner mellom bulkfasen og mikromiljøet rundt bærematerialet påvirke pH. Hvis bærematerialet eksempelvis er anionisk vil man få en høyere konsentrasjon protoner nær bærematerialet enn i bulkfasen, noe som vil redusere pH rundt lipasen sammenlignet med pH i bulkfasen (Akoh and Min 2008).

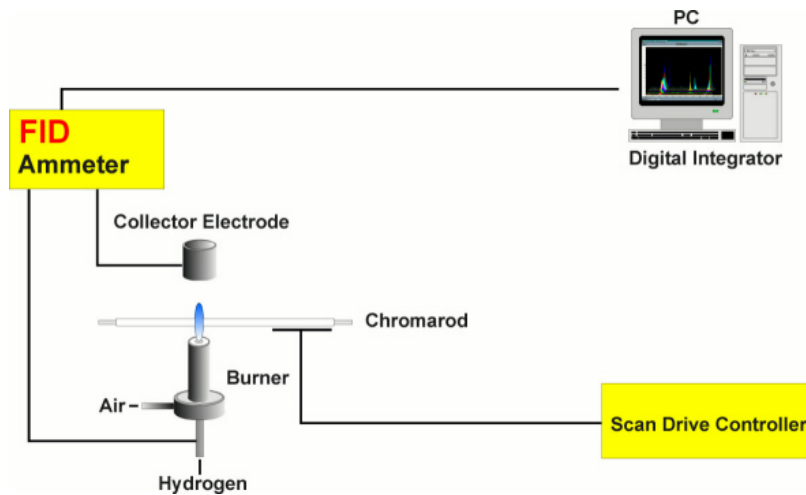
1.3 Analytiske metoder

Denne studiens hovedformål er oppnådd ved bruk av tre analyse teknikker; tynnsjikt kromatografi med flammeioniseringsdetektor (Iatroscan, TLC-FID), gasskromatografi (GC) og kjernemagnetisk resonans (NMR).

1.3.1 Iatroscan TLC-FID

Iatroscan TLC-FID er en analyseteknikk som baseres på separasjon ved tynnsjikt kromatografi, TLC og deteksjon ved flammeioniseringsdetektor, FID (Crane, Goheen et al. 1983; Shantha 1992; Indrasena, Henneberry et al. 2005).

Den generelle TLC prosedyren består i at prøve appliseres på stasjonærfasen (SF) som er bundet til bærematerialet, en kvartsstav. Deretter tørkes og kondisjoneres kvartsstavene i et konstant fuktighetskammer før kvartsstavene overføres til et elueringskammer med mettet atmosfære mobilfase, MF. Kapillær krefter transporterer prøvens ulike komponenter oppover SF og separerer komponentene i prøven basert på komponentenes ulike retensjonstider. Optimal separasjon er et resultat av komponentenes løselighet i MF og komponentenes retensjonstid i SF (Greibrokk, Lundanes et al. 2005). Komponentenes vandring detekteres av FID, en massesensitiv og destruerende detektor, som består av en flammespiss og kollektorelektrode, figur 11. Mellom flammespissen som er negativt ladet og kollektorelektroden som er positivt ladet er det et spenningsfelt. Forbrenning av kun oksygen- og hydrogengass gir lav og konstant strøm over spenningsfeltet, noe som genererer en rett linje på kromatogrammet, kalt baselinjen. Når komponentene i prøven forbrennes dannes det ioner og frie elektroner som genererer strøm proporsjonalt med mengden prøve som forbrennes, uttrykt som en topp i kromatogrammet. (Shantha 1992; Greibrokk, Lundanes et al. 2005).

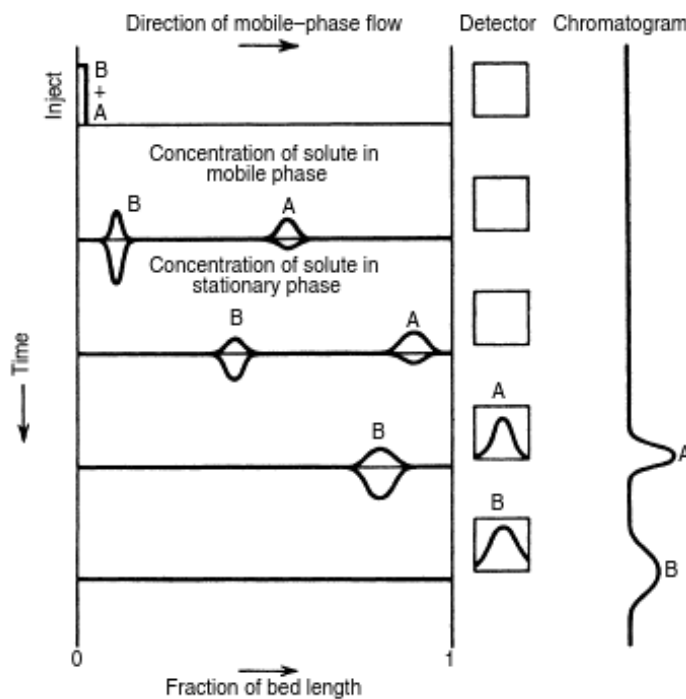


Figur 11. Viser hvordan SF (chromarod) plasseres mellom flammespissen og kollektorelektroden under analyse. Et amperemeter (ammeter) registrerer strømindring og sender et signal som digitaliseres av programvaren og vises som en topp på kromatogrammet (Analysesysteme).

Nøyaktigheten til TLC-FID avhenger av responsfaktoren, det er derfor nødvendig å undersøke faktorene som kan påvirke responsen til flammeioniseringsdetektoren (Shantha 1992). Sensitiviteten til FID varierer med oksygen- og hydrogenstrømning, skanningshastighet, prøvemengde og prøvens sammensetning (Indrasena, Henneberry et al. 2005). En kvantitativ metode for å analysere en blanding fettsyreester og asylglyseroler viste et relativt standardavvik på 1-2% for hovedkomponentene i 90-100vekt% området og 6-83% for mindre komponenter i 1-2vekt% området (Freedman, Pryde et al. 1984). (Greibrokk, Lundanes et al. 2005) viser til et relativt standardavvik på 2-10% som er et resultat av fordamping og delvis pyrolyse som medfører at responsen ikke korrelerer med teoretisk mengde ioniserbart karbon. Dette underbygges av en studie (Lu, Ludsins et al. 2008) som viser at TLC-FID underestimerer totalmengde lipider relativt til andre fremgangsmåter for enkeltklasser med høye lipidnivå. Dette forklares av ikke-lineær respons fra FID (Lu, Ludsins et al. 2008).

1.3.2 Gasskromatografi

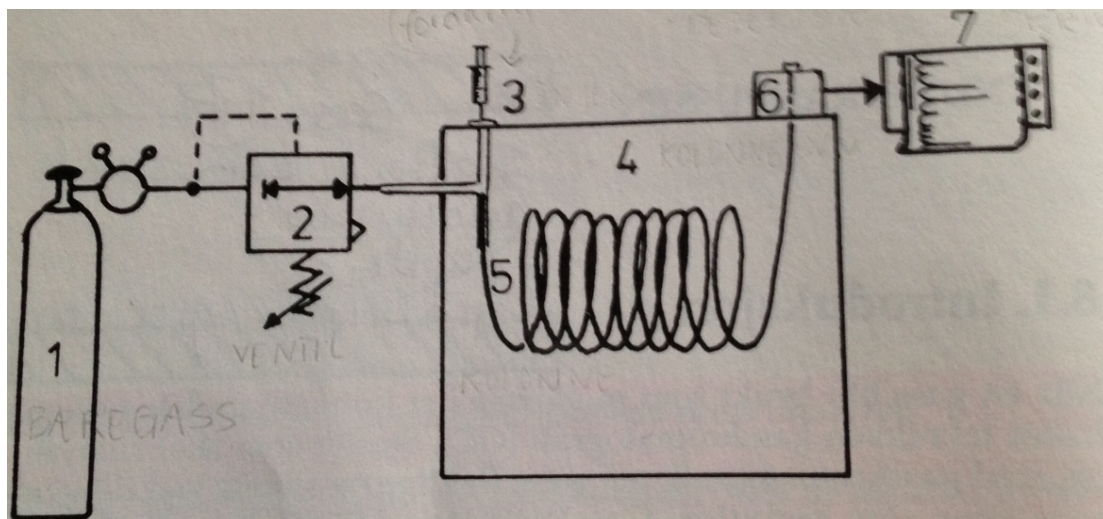
Gasskromatografi (GC) er et kromatografisk system som benytter mobilfase (MF) i gassform og stasjonærfase (SF) i enten væskeform (GLC) eller fastform (GSC) (Greibrokk, Lundanes et al. 2005; McNair and Miller 2009; Poole 2012). GC utføres alltid som kolonnekromatografi og komponentene i prøven separeres ved ulike kokepunkt. Ved kvantitative analyser benyttes det intern standard som referanseverdi (Greibrokk, Lundanes et al. 2005). Figur 12, illustrerer hvordan to komponenter med ulikt kokepunkt har ulik retensjonstid og dermed elueres og detekteres på ulike tidspunkt (McNair and Miller 2009).



Figur 12. Flytskjema for analyse av prøve med to komponenter (Miller 2005).

Et generelt GC system består av en injektor, kolonneovn, kolonne, detektor og skriver, illustrert i figur 13. Prøven injiseres i injektoren, her fordampes prøven umiddelbart og fraktes med MF inn i kolonnen. Etersom gass opptar et høyere volum per mol sammenlignet med væsker, sørger injektoren for at kun en liten fraksjon av prøven går inn i kolonnen (McNair and Miller 2009). Ulike kolonner har forskjellige bruksområdet, den mest brukte typen er ikke-polar WCOT kapillær kolonne (McNair and Miller 2009). Kolonnen er plassert inne i kolonneovnen, avhengig av prøven kan temperaturen til ovnen reguleres

isotermisk eller ved et temperaturprogram. Når prøven har passert kolonnen kommer den til en detektor. Den mest brukte er FID (kapitel 1.3.1). Signalet fra FID digitaliseres og presenteres som funksjon av tid i et kromatogram (Greibrokk, Lundanes et al. 2005).



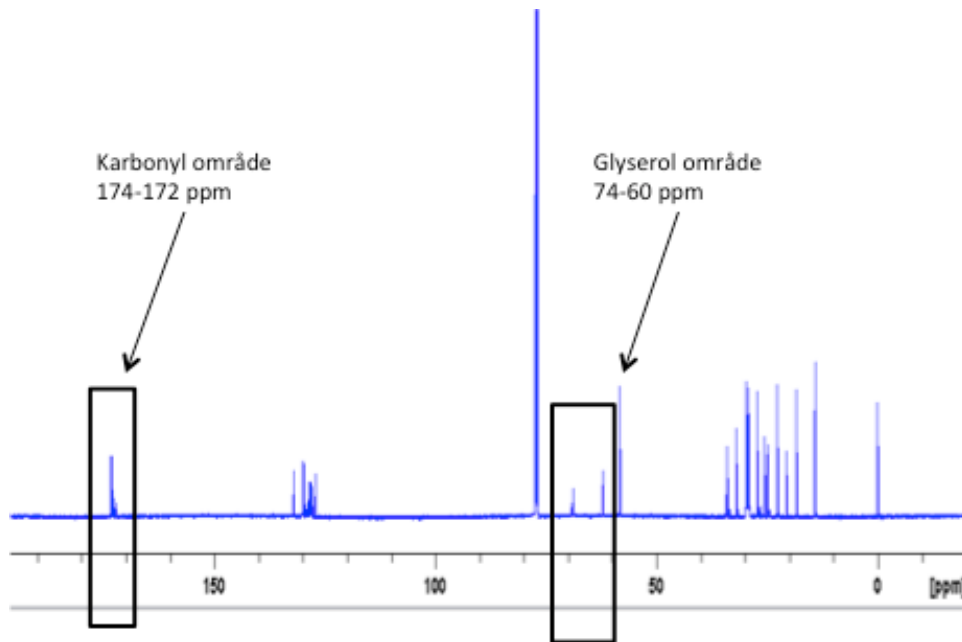
Figur 13. Viser blokkdiagram av et kromatografisk system. 1 – bæregass (MF), 2 – reduksjonsventil, 3 – injektor, 4 – kolonneovn, 5 – kolonne, 6 – detektor og 7 – skriver (Greibrokk, Lundanes et al. 2005).

1.3.3 Kjernemagnetisk resonans

Kjernemagnetisk resonans, NMR er en teknikk som benyttes for å analysere organiske forbindelser. NMR benytter seg av atomkjernens magnetiske egenskaper til å absorbere og re-emitere radiofrekvent energi i et magnetisk felt. Avhengig av radiofrekvensen vil atomelektronene eksiteres, noe som blir registrert som kjemisk skiftverdi (Standal 2009). Skiftverdien avhenger av molekylstrukturen, elektronbevegelsen til nærliggende atomer og konsentrasjonen til løsningen. De mest brukte metodene er ^1H , ^{13}C og ^{31}P NMR (Silverstein, Webster et al. 2005; Breivik 2007). NMR har fordeler ved at den er ikke-destruktiv, gir innsikt i stereokjemien og krever ikke forbehandling av prøven (Breivik 2007). Svake sider ved NMR teknikken er lav sensitivitet og høye kostnader (Silverstein, Webster et al. 2005; Breivik 2007)

1.3.3.1 ^{13}C NMR

^{13}C kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi er en metode som gir detaljert informasjon om lipidklassene og posisjonsfordelingen til fettsyrer på glyserolmolekylet (Aursand, Jørgensen et al. 1995; Belton, Engelsen et al. 2005). Figur 14, viser et ^{13}C NMR spekter hvor karbonylkarbon og glyserolkarbon områdene er uthevet.



Figur 14. ^{13}C NMR spekter hvor karbonylkarbon og glyserolkarbon områdene er angitt.

Karbonylkarbonspekteret er mellom 174-172 ppm og har verdier som korresponderer til karbonylkarbonene til de ulike fettsyrene som finnes i prøven. Kjemiske skiftene i denne gruppen avhenger av type ester (TAG, DAG eller MAG), den stereospesifikke posisjonen og avstanden til nærmeste dobbeltbinding (Aursand, Standal et al. 2007; Standal 2009). Marine oljer har normalt åtte store resonanser innenfor karbonylkarbonspekteret som korresponderer til fire par, sn-1(3) og sn-2 asylgrupper. Vanligvis med dobbeltbinding i C4 (DHA), C5 (EPA), C6 (stearidonsyre) og et fjerde par resonanser som utgjør de resterende asylgruppene. Denne informasjonen gjør det mulig å bestemme forholdet mellom fettsyrene i sn-1(3) og sn-2 posisjon på glyserolmolekylet (Breivik 2007).

Området 74-60 ppm i spekteret svarer til glyserolkarbonene på asylgruppene. Skiftverdiene kan gi informasjon om den modifikasjon råoljen har gjennomgått. Dette fordi magnetisk resonans påvirkes av stereospesifikk posisjonering, naturen til fettsyren og avstand til nærmeste dobbeltbinding (Aursand, Standal et al. 2007). En kombinasjon av informasjon hentet fra karbonyl- og glyserolkarbonspekteret gir en beskrivelse av fettsyrenes regiospesifisitet. Informasjonen kan også benyttes for å gi et oversiktsbilde av en modifieringsreaksjon.

1.4 Oppgavens formål

Denne oppgaven er utført med hovedformål å studere muligheten for å benytte lipase som biokatalysator for produksjon av etylester fra sild- og selolje. Reaksjonens progresjon er studert ved bruk av analyseteknikkene ^{13}C NMR og Iatroscan TLC-FID. Etter min beste kjennskap er ^{13}C NMR ikke benyttet i stor grad for studien av etanollyse. Dette er for øvrig den eneste metoden som gir multi-komponent informasjon i et steg.

Sild- og selolje viser ulik fettsyresammensetning og fettsyreposisjonering av flerumettede omega-3 fettsyrene på triasylglyserolet. Dette er studert ved bruk av væskegasskromatografi og ^{13}C NMR spektroskopi.

Temperatur og etanol mengde er reaksjonsparametere som påvirker reaksjonshastigheten og utbytte etylestere. Ved bruk av iatroscan TLC-FID er optimale betingelser for etanollyse reaksjonen av sildolje studert. De optimale betingelsene er så studert ved bruk av selolje.

Lipaser viser variasjon i biokatalysator egenskaper avhengig av kjemiske og fysiske betingelser. I denne studien er reaksjonsforløpet til etanollyse av sild- og selolje studert under optimale betingelser ved hjelp av ^{13}C NMR og Iatroscan TLC-FID.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Gjennom denne studien er polert sildeolje (SINTEF Fiskeri og havbruk, Norge) og selolje (Fortuna Oils, Kristiansund, Norge) benyttet. Ren sild- og selolje er lagret ved -20°C , mens prøver fra forsøkene er flushet med nitrogen og lagret ved -80°C . Immobilisert lipase *Candida antarctica* (Novozyme 435, Novo-Nordisk, Danmark) er benyttet som biokatalysator under etanollyse reaksjonen. Øvrige kjemikalier er presentert i tabell 4, hvorav de brukt under analyse er av analytisk grad.

Tabell 4. Beskrivelse av alle kjemikaliene brukt ved denne studien.

Kjemikalie	Produsent	Molaritet (g/mol)	Renhet	Kjemisk formel	Analyse	Sporing (lot/batch nr)
Kloroform	Merck, Tyskland	119,38	99,0-99,4	CHCl_3	Iatroscan TLC-FID	K4396044524 3
Dietyl eter	Merck, Tyskland	74,12	99,7	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	Iatroscan TLC-FID	K4173812104 9
Heksan	Merck, Tyskland	88,18	98,0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	GC	K4109606704 2
Absolutt etanol	Kemetyl, Norge	46,07	99,5	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Etanollyse	SE10019667
Maursyre	VWR	46,03	80	CH_2O_2	Iatroscan, TLC-FID	20.315.366
Kloroform-d	Aldrich	120,38	-	CDCl_3	NMR	06306HJ
BF_3 -metanol	Supelco	136,90	-	BF_3 CH_3OH	GC	LB78448
Metanol	Merck, Tyskland	32,04	99,9	CH_3OH	GC	-

2.2 Lipase katalysert etanolyse

Modifiserte versjoner av metodene foreslått av (Haraldsson, Kristinsson et al. 1997; Irimescu, Furihata et al. 2001) er benyttet som utgangspunkt for etanollysereaksjonen. Olje løst i absolutt etanol er tilsatt lipase ved reaksjonsstart. Løsningen er oppbevart i varmeskap under konstant temperatur og røring.

Molar forholdet mellom olje og etanol er beregnet fra molekylvekten til substratene funnet i kapitel 3.1. Tabell 5, viser vekt- og molarforholdet mellom olje og etanol, og mengde lipase benyttet ved de respektive forsøkene. Det ble utført tre ulike typer forsøk, oppsummert i tabell 5, for fire temperaturer 30, 40, 50 og 60°C og to ulike oljer, sild og sel. Totalt er det kjørt 18 ulike forsøk. Under forsøk 3 ble etanol tilsatt stegvis tre ganger, 1/3 del av etanolemengden ved tid 0, 2 og 4 timer.

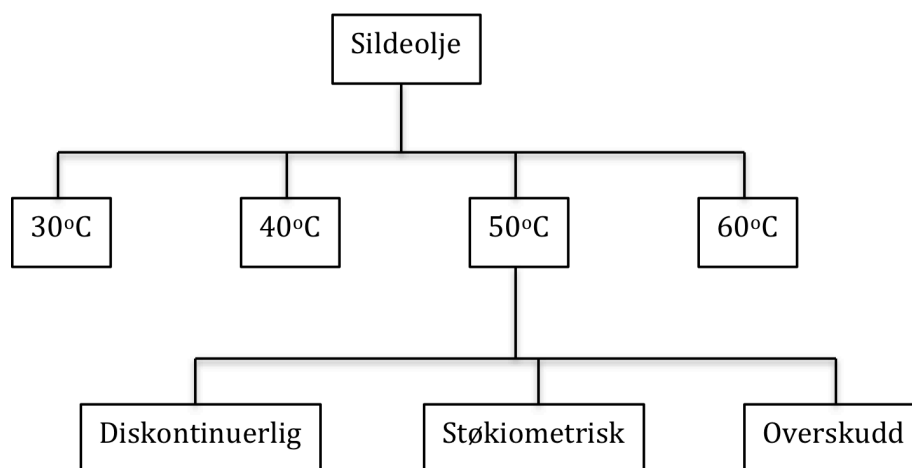
Tabell 5. Molarforholdet mellom olje og etanol, og mengde lipase benyttet ved de respektive forsøkene.

Forsøksnavn	Etanol (g/mol)	Sildeolje (g)/(mol)	Sel olje (g)/(mol)	Lipase (mg)	Kommentar
Støkiometrisk	0,8 / 0,017	5,0 / 0,005	5,0 / 0,005	250	Støkiometrisk molarforhold (olje:etanol, mol:mol)
Overskudd	3,0 / 0,065	1,0 / 0,001	1,0 / 0,001	200	Overskudd etanol (3:1, vekt:vekt)
Diskontinuerlig	0,8 / 0,017	5,0 / 0,005	5,0 / 0,005	250	Diskontinuerlig tilsats etanol (støkiometrisk molarforhold)

Etanolyse reaksjonene er utført over 24 timer med prøveuttak etter 0 (kontroll, ikke tilsatt lipase), 0.5, 1, 2, 4, 6 og 24 timer. Det er ved hvert tidspunkt tatt ut prøve (200 µl).

2.3 Etanollyse optimalisering

I henhold til oppgavens formål kapittel 1.4 er det utført en optimalisering av etanollyse reaksjonen med hensyn til temperatur og etanolmengde. Et flytdiagram (figur 15) viser fremgangen for optimalisering av etanollysereaksjonen. Sildeolje er benyttet under optimaliseringen. Ved temperaturoptimalisering er støkiometriske betingelser benyttet (tabell 5). Analyse av optimaliseringsforsøk er utført med TLC-FID.



Figur 15. Flytdiagram som viser optimalisering av forsøk.

Fra optimalisering av sild er det funnet optimale reaksjonsbetingelser som er benyttet ved etanollyse av selolje.

2.4 Fettsyresammensetning, GC

Fettsyresammensetningen til sild- og selolje er bestemt ved bruk av GC. Metyleringen er utført i henhold til (Metcalf, Schmitz et al. 1966; Society and Firestone 2009) og SINTEF prosedyre (ikke publisert). En gasskromatograf (Agilent Technologies, 7890A) med på-kolonne injektor, en silika glass kapillær kolonne (Agilent Technologies, CP7713) og FID er benyttet ved analysene. Temperaturprogrammet er gitt i tabell 6, total flow 84,5 mL/min med hydrogen som bæregass og helium som makeupgass. Temperaturen til injektoren og detektoren var henholdsvis 250 og 270°C. Fettsyre toppene ble positivt identifisert ved sammenligning mot referanse standard (Nu-Check Prep. Inc., USA, 68D) og mengde er bestemt ved bruk av intern standard (Nu-Check Prep. Inc., USA, Metyl Henicosanoate). Hver prøve er analysert to ganger og resultatene er bearbeidet i softwaren EZChrom (Agilent Technologies, OpenLAB EZChrom Edition).

Tabell 6. Temperaturprogram benyttet ved GC analyse.

Temperatur økning (°C/min)	Temperatur (°C)	Hold tid (min)
	80	1
25	180	2
2,5	205	6
2,5	215	4

2.5 Lipidklasse analyse, Iatroscan TLC-FID

Lipidklasse analyse er utført med TLC-FID (TLC-FID analyser TH-10 MK-IV, Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan). Detektoren er operert under oksygenflow (2000 mL/min) og hydrogenflow (160 mL/min). I forkant av hver analyse er kvartsstavene (Chromarods SIII, Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan) brent av 2-3 ganger i iatroscan systemet. Til kvartsstavene er prøve (2,0 µl) fortynnet med kloroform (6,0 mg prøve/1,0 mL kloroform) applisert med Hamilton sprøyte (10 µl). Kvartsstavene kondisjoneres i kammer med mettet vandig kalsiumklorid ($CaCl_2$) i 8 minutter før de utvikles i lukket elueringskammer med en løsning heksan, dietyl eter og maursyre (85:15:0.04, v:v:v) i 27 minutter beskrevet av (Fraser, Tocher et al. 1985). Etterfulgt av tørking i varmeskap (Termaks, 100°C, 3 min), før analyse. Softwaren Spectra Physics (Mountain View, CA. USA) integrerte toppene og beregnet arealprosenten (areal%) til hver topp automatisk. Lipidklassene er positivt identifisert ved bruk av retensjonstidene til referanse standard (Nu-Check Prep. Inc., USA, 18-5)

2.6 Fettsyre posisjonering og reaksjons progresjon, NMR

Fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet og informasjon om asyglyserolene dannet over reaksjonsforløpet er funnet ved ^{13}C NMR. Prøve (60 mg) er fortynnet med deuterium kloroform (300 μl) og overført til NMR rør (5 mm). Ved bruk av Bruker Avance 600 MHz spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Tyskland) er kvantitative ^{13}C NMR spektre tatt opp. Følgende innsamlingsparametere er benyttet: Pulsprogram zgig30, spekterbredde 220 ppm, innsamlingstid 1,85 s, avspenningsforsinkelse 10,3 s, antall skanninger 512 og dummy skanninger 4. En eksponentiell forbredning på 1 Hz ble utført før Fourier transformasjon. Kjemisk skiftskala er referert til TMS ved tripletten til deuterium kloroform (CDCl_3) etter 77,06 ppm. Gitt pulsrepetisjons tiden i dette forsøket (12,1 s) er kvantitative betingelser for toppene i glyserol spekteret fullt respektert.

Tolkningen av skift verdier er basert på studier av (Gunstone 1991; Aursand and Grasdalen 1992; Aursand, Grasdalen et al. 1993; Sacchi, Medina et al. 1993; Gunstone and Seth 1994; Aursand, Jørgensen et al. 1995; Gottlieb, Kotlyar et al. 1997; Aursand, Standal et al. 2007; Standal 2009; Suárez, Mugford et al. 2010).

2.7 Statistiske analyser/Statistikk

I denne oppgaven er Excel (Microsoft, USA, versjon 14.0.0) benyttet for beregning av gjennomsnitt (Gj.snitt), standardavvik (STD avvik) og standard feilen til gjennomsnittet (STD feil) (Helbæk and Godejord 2001; Løvås 2004) som er gitt i grafer og tabeller i appendiks.

For iatrosan TLC-FID analyser er det tatt utgangspunkt i formel for beregning av utvalgsstørrelse (Helbæk and Godejord 2001) hvor det er funnet at 3,8 målinger er minste antallet når standardavvik fra 16 forsøk legges til grunn. Det er på bakgrunn av denne beregningen utført 4 analyser av hver prøve.

Chauvenets kriterie er benyttet for å teste dataene mot utliggere (Taylor 1997). Avhengig av avviket fra gjennomsnittet benyttes normal fordelingen til å teste sannsynligheten for at punktet er korrekt. Dersom sannsynligheten til det avvikende punktet er mindre enn 0,5 forkastes punktet (Taylor 1997).

Usikkerheten til den lineære regressjonslinjen benyttet for å finne reaksjonshastigheten med Arrheniuslikningen er beregnet med usikkerheten til lineær regresjonslinje (Helbæk and Godejord 2001).

3 Resultat og diskusjon

Resultatene og diskusjonen som følger belyser oppgavens formål (kapitel 1.4). Innledningsvis presenteres resultatene fra fettsyresammensetningen analysert ved GC og fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet ved ^{13}C NMR. Deretter følger optimalisering av etanolyse på sildeolje, hvor parameterne temperatur og etanolmengde observeres. Fulgt av etanolyse av selolje under optimaliserte betingelser. Begge analysert ved TLC-FID. Avslutningsvis presenteres ^{13}C NMR analyse av progresjonen til etanollysen av sild- og selolje under optimaliserte betingelser.

3.1 Fettsyresammensetning, GC

Fettsyreprofilene til sild- og selolje er funnet ved gasskromatografi av korresponderende metylerte fettsyrer beskrevet i kapitel 2.4. Tabell 7 og 8 viser den kalkulerte prosentvise fettsyresammensetningen. Rådata er gitt i appendiks A.

Tabell 7. Fettsyresammensetningen presentert som prosentvis mengde av total mengde fettsyrer for sild- og selolje.

Fettsyre	Sildeolje		Sel olje	
	% av total mengde fettsyrer	Std. avvik	% av total mengde fettsyrer	Std. avvik
C12:0	0,000	0,000	0,061	0,004
C12:1	0,000	0,000	0,000	0,000
C14:0	8,304	0,080	4,792	0,004
C14:1	0,099	0,001	0,903	0,001
C16:0	12,724	0,032	8,673	0,018
C16:1n-9	5,041	0,012	0,000	0,000
C16:1n7	0,290	0,008	12,805	0,048
C18:0	1,091	0,013	1,133	0,020
C18:1n-9	11,565	0,080	23,144	0,103
C18:1n-7	1,652	0,056	4,823	0,002
C18:2n-6	1,401	0,047	1,867	0,000
C18:3n-6	0,148	0,003	0,127	0,000
C18:3n-3	0,999	0,022	0,561	0,005
C18:4n-3	0,053	0,008	1,527	0,014
C20:0	0,225	0,013	0,097	0,000
C20:1n-11	15,190	0,084	0,000	0,000
C20:1n-9	0,384	0,008	13,796	0,077
C20:1n-7	0,000	0,000	0,592	0,002
C20:2n-6	0,317	0,011	0,152	0,005
C20:3n-6	0,142	0,014	0,052	0,005
C20:4n-6	0,397	0,029	0,428	0,001
C20:3n-3	0,183	0,007	0,068	0,001
C20:4n-3	0,672	0,036	0,424	0,005
C20:5n-3	6,802	0,025	7,392	0,000
C22:0	0,086	0,014	0,077	0,001
C22:1n-11	22,493	0,012	2,178	0,001
C22:1n-9	1,289	0,024	0,580	0,005
C22:5n-6	0,000	0,000	0,097	0,000
C22:5n-3	0,730	0,010	4,254	0,008
C24:0	0,023	0,004	0,076	0,002
C22:6n-3	6,738	0,003	9,111	0,079
C24:1n-9	0,962	0,018	0,209	0,007

Tabell 8. Prosentvis mengde og mengde mettede, en-umettede, flerumettede og omega-3 fettsyrer i sild- og selolje.

	Sildeolje (%)	Sildeolje (mg/g)	Sel olje (%)	Selolje (mg/g)
Mettede fettsyrer	22,45	184,67	14,91	124,67
Enumettede fettsyrer	58,96	484,99	59,03	493,0
Flerumettede fettsyrer	18,58	152,84	26,06	217,64
Omega-3 fettsyrer	16,17	133,06	23,33	194,90

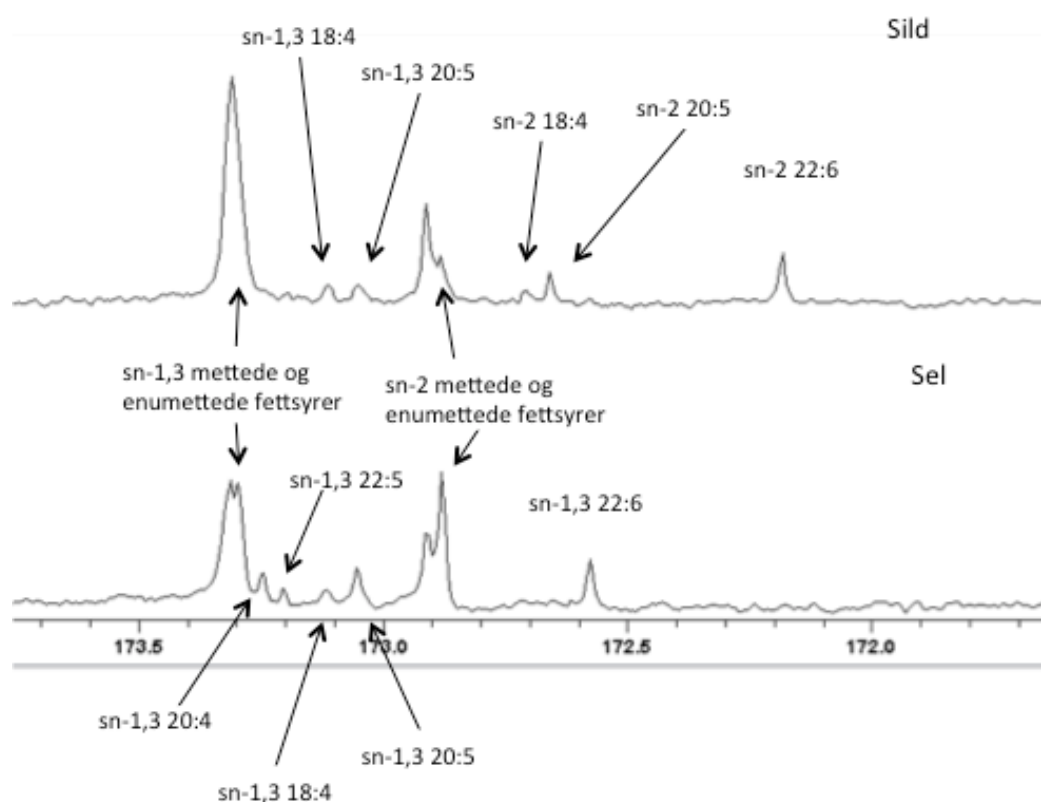
En-umettede fettsyrer utgjør hoved andelen fettsyrer i sild og sel olje, henholdsvis 59 og 59%. Det er imidlertid store variasjoner i fettsyresammensetningen til sel og sildeolje. Den største ulikheten er mengdene oljesyre (18:1n-9) og cetoleic syre (22:1n-11), førstnevnte utgjør 11,6% i sildeolje og 23,1% i sel olje, en dobling av den prosentvise andelen. Cetoleic syre (22:1n-11) utgjør 22,5% i sildeolje mot 2,2% i sel olje, noe som tilsvarer over ti ganger høyere prosentvis andel. Variasjonene og de høye observerte verdiene for spesifikke en-umettede fettsyrer er karakteristisk for sild og sel olje, rapportert i flere studier (Ratnayake and Ackman 1979a; Aidos, van der Padt et al. 2001; Ando, Kobayashi et al. 2004).

Omega-3 fettsyrene utgjør 16,2 og 23,3% av total mengde fettsyrer i sild og sel olje. Andelen til essensielle fettsyrene EPA og DHA, 6,8 og 6,7% i sildeolje og 7,4 og 9,1% i sel olje. Observasjonene samsvarer med verdier funnet i flere studier (Aidos, van der Padt et al. 2002; Ando, Kobayashi et al. 2004; Breivik 2007). Imidlertid registreres det at artenes fettsyresammensetning varierer mellom individer av samme art, samtidig som biologiske ulikheter og miljø påvirker fettsyresammensetningen (Haraldsson 1999; Breivik 2007; Standal 2009).

Gjennomsnittlig molekylvekt er beregnet til 917,8 g/mol og 898,6 g/mol for et sild- og seltriasylglyserol. Som nevnt i foregående avsnitt er det variasjoner i fettsyresammensetningen til artene, det påpekes derfor at gitte molekylmasser kun gjelder analysert olje.

3.2 Fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet, ^{13}C NMR

Posisjoneringen til fettsyrene på glyserolmolekylet er karakteristisk for hver art. Ved bruk av karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR er fettsyrenes fordeling på glyserolmolekylet til sild- og selolje bestemt. Kjemiske skiftverdier funnet i spekteret 174-172 ppm gir informasjon om posisjonsfordelingen til fettsyrene på glyserolmolekylet (Aursand, Jørgensen et al. 1995) som illustrert i figur 16.



Figur 16. Karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR for sild- og selolje. Spekteret viser posisjoneringen, angitt enten som sn-1,3 eller sn-2 til fettsyrene.

Arealet under toppene til fettsyrene stearidonsyre ($18:4n-3$), EPA ($20:5n-3$) og DHA ($22:6n-3$) er funnet ved integrasjon og benyttet for å kalkulere den prosentvise mengden fettsyren i sn-1,3 eller sn-2 posisjon på glyserolmolekylet. Resultatene er presentert i tabell 9.

Tabell 9. Prosentvis fettsyre posisjonering i enten sn-1,3 eller sn-2 posisjon på glyserolmolekylet for fettsyrene stearidonsyre (18:4n-3), EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3).

Art	Fettsyre	DHA (22:6n-3)		EPA (20:5n-3)		Stearidonsyre (18:4n-3)	
	Posisjon	sn-1,3	sn-2	sn-1,3	sn-2	sn-1,3	sn-2
Sildeolje		-	>95	49	51	64	36
Selolje		>95	-	>95	-	>95	-

Resultatene fra tabell 9 viser at >95% av fettsyren DHA er plassert i sn-2 posisjonen til sildeolje og >95% i sn-1,3 posisjonene til selolje. Et resultat som tilsier at fettsyren ikke er tilfeldig plassert på glyserolmolekylet. Tilfeldig fettsyre plassering på glyserolmolekylet defineres som 67% i sn-1,3 posisjon og 33 % i sn-2 posisjon (Aursand, Jørgensen et al. 1995; Breivik 2007). Fettsyren EPA er likt fordelt med 49 og 51% i sn-1,3 og sn-2 posisjonene på sildeolje og >95% i sn-1,3 posisjon til selolje, en observasjon i samsvar med verdier fra studiene (Shi, Ho et al. 2005; Standal 2009). Stearidonsyre er tilfeldig fordelt på glyserolmolekylet med 64% i sn-1,3 posisjon og 36% i sn-2 posisjon på sildeolje, mens selolje har stearidonsyre >95% i sn-1,3 posisjon.

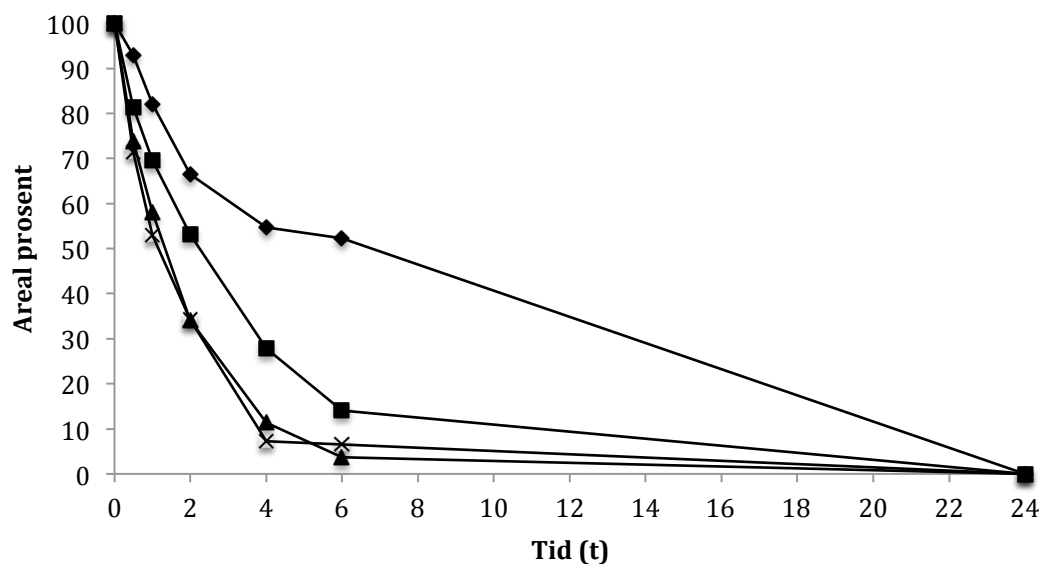
Flere studier påpeker at flerumettede fettsyrer ikke er tilfeldig plassert på glyserolmolekylet (Brockerhoff, Hoyle et al. 1968; Shi, Ho et al. 2005; Standal 2009), noe som er i overenstemmelse med EPA og DHAs plassering på henholdsvis sn-2 posisjon i sild og sn-1,3 i sel olje, det er imidlertid ikke observert for stearidonsyre i sildeolje. En studie (Ando, Nishimura et al. 1992) viser at posisjoneringen til DHA i sildeolje kan relateres til mengden fettsyre eicosenoic syre (20:1) og erusinsyre (22:1). Når fettsyrene 20:1 og 22:1 utgjorde en stor andel av den totale mengden fettsyrer var 70-80% av total mengde DHA lokalisert i sn-2 posisjonen. Fettsyrene 20:1 og 22:1 er i kapittel 3.1 funnet til å utgjøre 15,6 og 22,8% av total mengde fettsyrer, respektivt. Dette funnet underbygger studien utført av (Ando, Nishimura et al. 1992) ettersom tabell 9 viser at >95% DHA befinner seg i sn-2 posisjonen.

3.3 Enzymatisk etanolyse av sildeolje, TLC-FID

Temperatur og etanolmengde er reaksjonsparametere som påvirker reaksjonshastigheten og utbytte etylestere. Ved bruk av TLC-FID er optimaltemperatur og optimalmengde etanol ved etanolyse av sildolje bestemt.

3.3.1 Temperaturens innvirkning på etanolyse av sildeolje

Temperaturens innvirkning på etanolysereaksjonen med sildeolje er studert i temperaturintervallet 30 til 60°C, med støkiometriske betingelser beskrevet i kapittel 2.2. Resultatene presentert i figur 17-19, viser arealprosent asylglyserol og etylester gjennom reaksjonsforløpet. Arealprosent er funnet ved integrasjon av TLC-FID kromatogram. Rådata finnes i appendiks B.



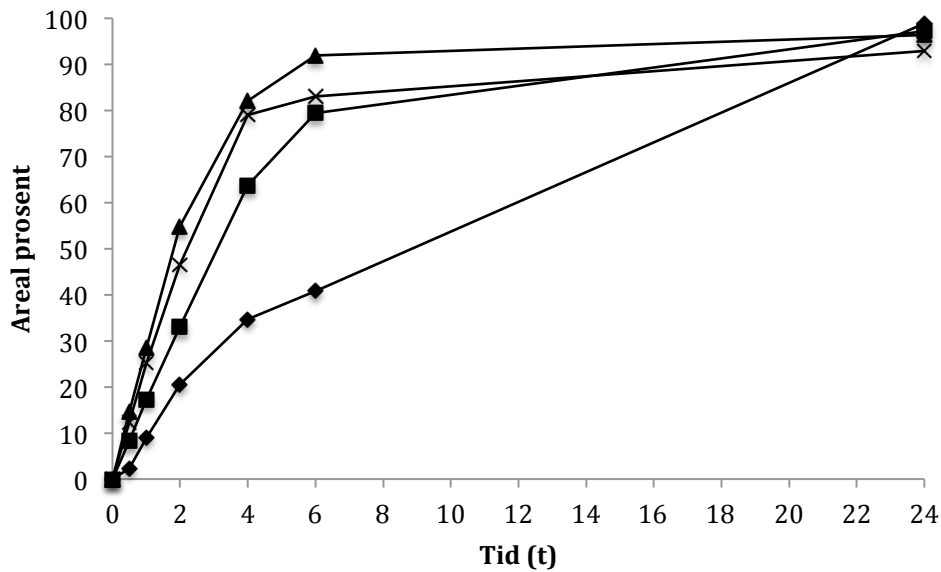
Figur 17. Hydrolyse av triacylglycerol under støkiometrisk etanol forhold i temperaturintervallet 30 til 60 °C. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C), firkant (■, 40°C), trekant (▲, 50°C) og kryss (×, 60°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Triacylglycerol mengden reduseres til 54.7, 27.9, 11.3 og 7.3 areal% etter 4 timer med hensyn til stigende temperatur. Reduksjonen av triacylglycerol viser temperaturens forutsigbare innvirkning på enzymkatalyserte reaksjoner, hvor økt temperatur senker reaksjonens energibarriere og øker reaksjonshastigheten (Damodaran, Parkin et al. 2008). Tilnærmet identisk hydrolysehastighet er observert for 50 og 60°C gjennom reaksjonen. Imidlertid oppnår 50°C høyere

hydrolysehastighet gjennom intervallet fire til seks timer, en observasjon som indikerer at lipasen har optimaltemperatur lavere enn 60°C under de gitte betingelser. Dette er en temperatur lavere enn optimumstemperaturer rapportert i flere studier (Yadav and Trivedi 2003; Xin, Chen et al. 2011; Chesterfield, Rogers et al. 2012). Eksakt temperatur er bekreftet av en uavhengig måling gjort med termometer i et begerglass fylt med vann, plassert i varmeskapet under forsøket. Temperaturkontrollen viste ingen avvik fra oppgitte temperaturverdier.

Temperaturer som overstiger lipasens optimaltemperatur resulterer i denaturering og redusert hydrolysehastighet (Akoh and Min 2008). Dette kan forklare den høyere observerte hydrolysehastighet til 50°C sammenlignet med 60°C i tidsintervallet 4 til 6 timer. En studie påpeker imidlertid at lipasen (Novozym 435) er termisk stabil ved 60°C (Xin, Chen et al. 2011), noe som indikerer at redusert hydrolysehastighet ikke er et resultat av termisk denaturering. Immobilisering av lipaser gir økt termisk og kjemisk stabilitet, men medfører også en ulempe i redusert substratdiffusjon (Malcata, Reyes et al. 1992; Murty, Bhat et al. 2002), som er en massetransportbegrensning avhengig av konsentrasjonsforskjeller i bulkfasen og i lipasen (Doran 2012). Dersom transporthastigheten av substrat til lipasen er lavere enn lipasens reaksjonshastighet er reaksjonen massetransportbegrenset (Akoh and Min 2008). Antas det at lipasen ikke denatureres, kan tilnærmet identisk reaksjonshastighet for 50 og 60°C forklares av massetransportbegrensninger.

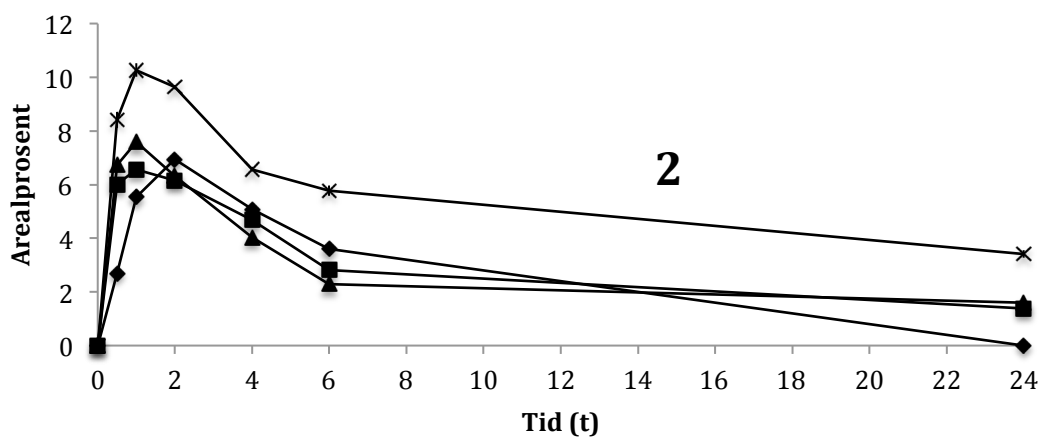
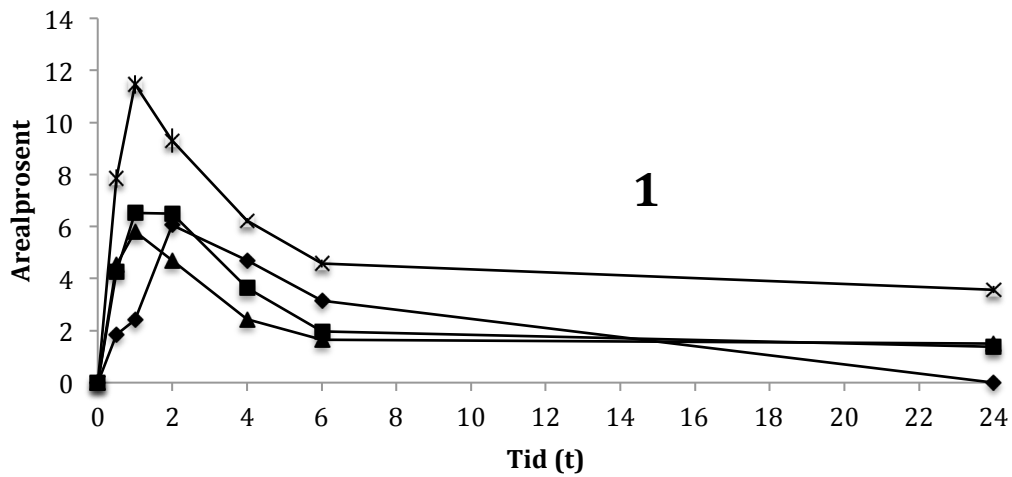
Alle temperaturene viser etter 24 timer fullstendig hydrolyse av triacylglyserolene. For (40, 50 og 60°C) er denne hydrolysen tilnærmet fullstendig etter 6 timer (TAG<14%), mens det ved 30°C ikke oppnås fullstendig hydrolyse før etter 24 timer.



Figur 18. Dannelse av etylestere under støkiometrisk etanol forhold i temperaturintervallet 30 til 60°C. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C), firkant (■, 40°C), trekant (▲, 50°C) og kryss (×, 60°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Etter 24 timer er etylestermengden 98.9, 97.2, 96.5 og 92.9 areal% med hensyn til økende temperatur. Som er en tilnærmet fullstendig dannelse av etylestere, i samsvar med studiene (Watanabe, Shimada et al. 1999; Irimescu, Furihata et al. 2001). Studien (Watanabe, Shimada et al. 1999) viser at 35°C ikke gir fullstendig dannelse av etylester før etter 15 timer, mens 50 og 60°C oppnår tilnærmet fullstendig etylester dannelse etter 5 timer.

Figur 19 viser en stigende mengde monoasylglyserol frem til tidsintervallet 1 til 2 timer. Temperaturene 40, 50 og 60°C har høyeste mengde monoasylglyserol etter 1 time, med henholdsvis 6.5, 5.8 og 11.5 areal%, fra hvor mengden synker ut reaksjonstiden. Mens 30°C oppnår 6,1 areal% etter 2 timer. Etter 24 timer viser ikke 30°C signal for monoasylglyserol, imidlertid viser 40, 50 og 60°C signal for monoasylglyserol.

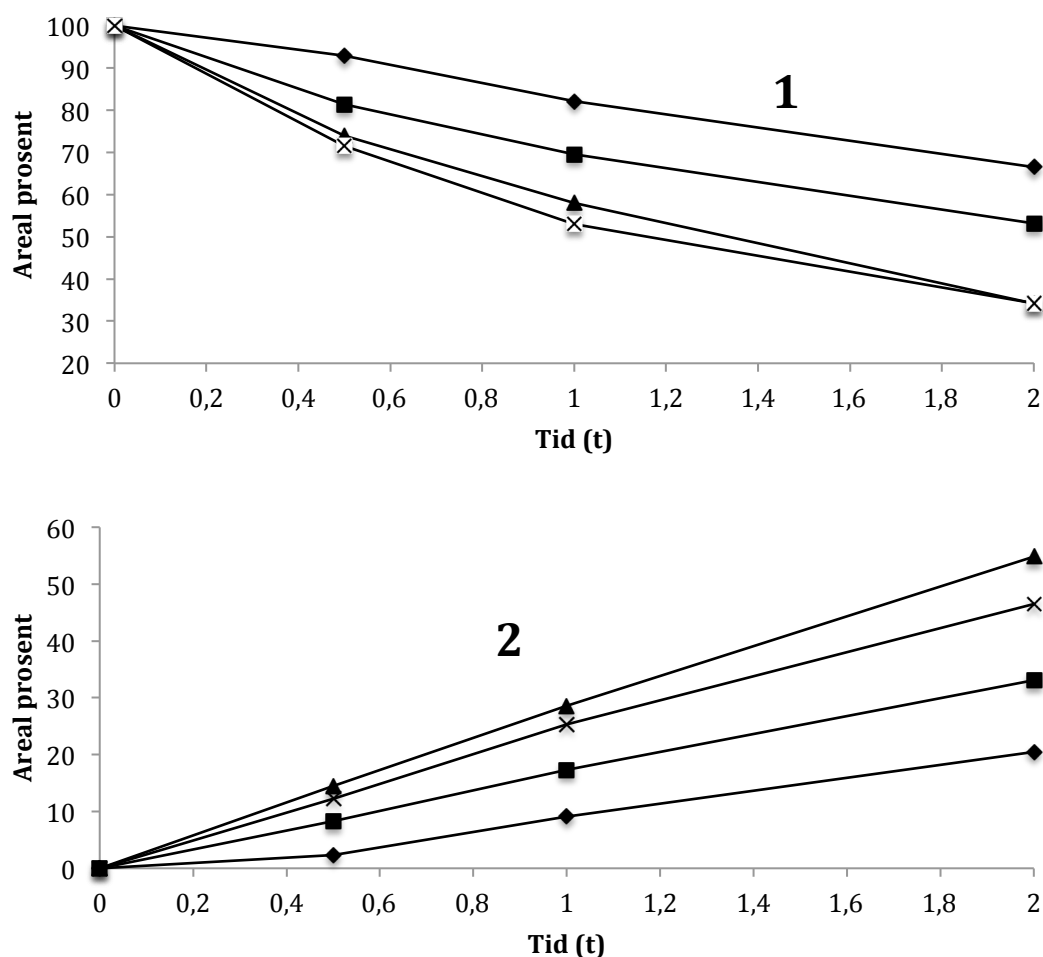


Figur 19. Viser dannelse av (1) monoacylglycerol og (2) diacylglycerol ved støkiometrisk etanol forhold i temperaturintervallet 30 til 60°C. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C), firkant (■, 40°C), trekant (▲, 50°C) og kryss (×, 60°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Endring i mengde diacylglycerol er illustrert i figur 19, som viser tilsvarende trender som dannelse av monoacylglycerol. Ved temperaturene 40, 50 og 60°C dannes det henholdsvis 6.6, 7.6 og 10.3 areal% etter 1 time, mens det dannes 7 areal% etter 2 timer ved 30°C. Etter 24 timer viser ikke 30°C signal for diacylglycerol, imidlertid viser 40, 50 og 60°C signal for diacylglycerol henholdsvis 1.4, 1.6 og 3.4 areal%.

3.3.1.1 Temperaturens innvirkning, Arrheniuslikningen

Arrheniuslikningen beskrevet i kapitel 1.2.2.1 gir sammenhengen mellom reaksjonshastigheten og temperaturen. Hastigheten til hydrolyse av triacylglyserol og dannelse av etylestere er funnet i lineært området (0 til 2 timer) fra figur 17 og 18, illustrert i figur 20.



Figur 20. Lineært område (0 til 2 timer) til (1) hydrolysen triacylglyserol og (2) dannelsen av etylestere. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C), firkant (■, 40°C), trekant (▲, 50°C) og kryss (×, 60°C).

Hastigheten til hydrolyse av triacylglyserol og dannelse av etylester er presentert i tabell 10, sammen med usikkerheten. Hydrolyse av triacylglyserol viser økning i reaksjonshastighet fra 30 til 50°C, mens det i temperaturintervallet 50 til 60°C observeres en tilnærmet identisk reaksjons hastighet.

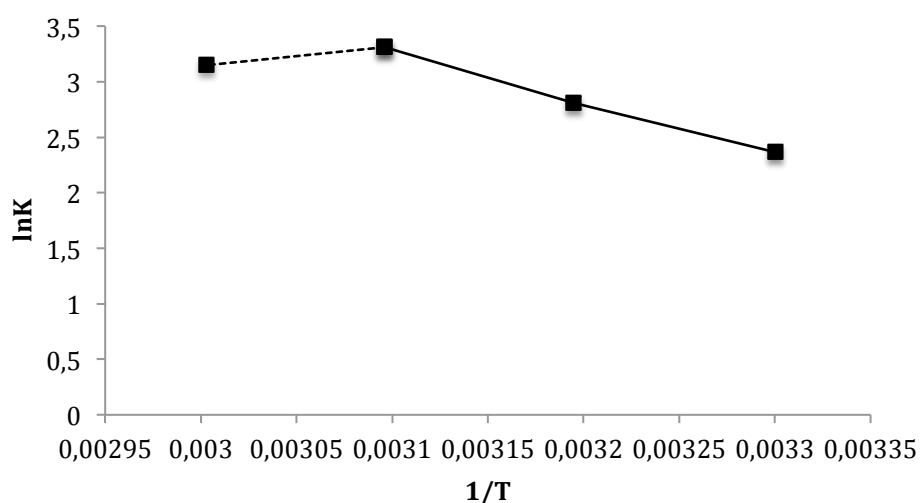
Reaksjonshastigheten for dannelse av etylestere øker fra 10,6 til 27,3 areal%/time i temperaturintervallet 30 til 50°C. Endringen i reaksjonshastighet for temperaturintervallet 50 til 60°C viser en nedgang fra 27,4 til 23,3 areal%/time.

Tabell 10. Reaksjonshastigheten til hydrolyse av triasylglyseroler og dannelse av etylestere ved 30, 40, 50 og 60°C.

Temperatur (°C)	Reaksjonshastighet hydrolyse triasylglyserol (areal%/time ± usikkerhet)	Reaksjonshastighet etylester dannelse (areal%/time ± usikkerhet)
30	17,04 ± 0,037	10,64 ± 0,101
40	22,646 ± 0,47	16,57 ± 0,006
50	31,798 ± 0,60	27,345 ± 0,031
60	31,627 ± 1,23	23,282 ± 0,006

Arrheniuslikningen tilsier at økt temperatur gir en eksponentiell økning av reaksjonshastigheten. Dette observeres ikke for resultatene presentert i tabell 10.

Et plot av logaritmen til reaksjonshastigheten ($\ln K$) som funksjon av den inverse temperaturen ($1/T$, kelvin) er benyttet for å finne reaksjonens aktiveringsenergi (E_A), figur 21.



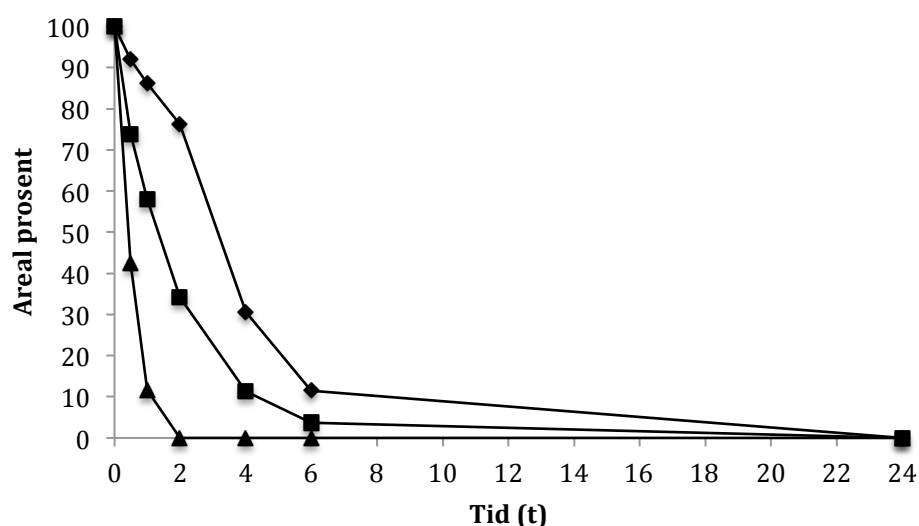
Figur 21. Viser Arrhenius plot av etylester dannelsen. Ettersom 60°C avviker fra de øvrige temperaturenes linearitet er den tilkoblet med stiptet linje.

Aktiveringsenergien til temperaturintervallet 30 til 60°C er beregnet til 21,9 kJ/areal og 38,4 kJ/areal for temperaturintervallet 30 til 50°C. Noe som tilsvarer nær dobling av aktiveringsenergien hvis reaksjonshastigheten til 60°C utelukkes. Aktiveringsenergien kan imidlertid forsvares for begge temperaturintervallene. En studie (Malcata, Reyes et al. 1992) viser til aktiveringsenergier mellom 0,97 til 74,9 kJ/mol for enzymkatalyserte reaksjoner. For tilsvarende lipase (Novozym 435), benyttet i en etanollysereaksjon er aktiveringsenergien funnet til 50 kJ/mol (Chesterfield, Rogers et al. 2012).

En studie (Han 1972) forklarer avvik fra linearitet i Arrhenius plottet enten skyldes (i) kinetiske faktorer eller (ii) termisk denaturering. Som tidligere nevnt, viser en studie (Xin, Chen et al. 2011) at lipasen (Novozym 435, *Candida antarctica*) er stabil ved temperaturer over 60°C. Legges dette til grunne kan avviket fra lineariteten observert ved 60°C forklares av kinetiske faktorer som underbygger forklaringen om at reaksjonen er massetransportbegrenset når temperaturen overskrider 50°C under gitte betingelser.

3.3.2 Etanol mengdens innvirkning på etanollyse av sildeolje, TLC-FID

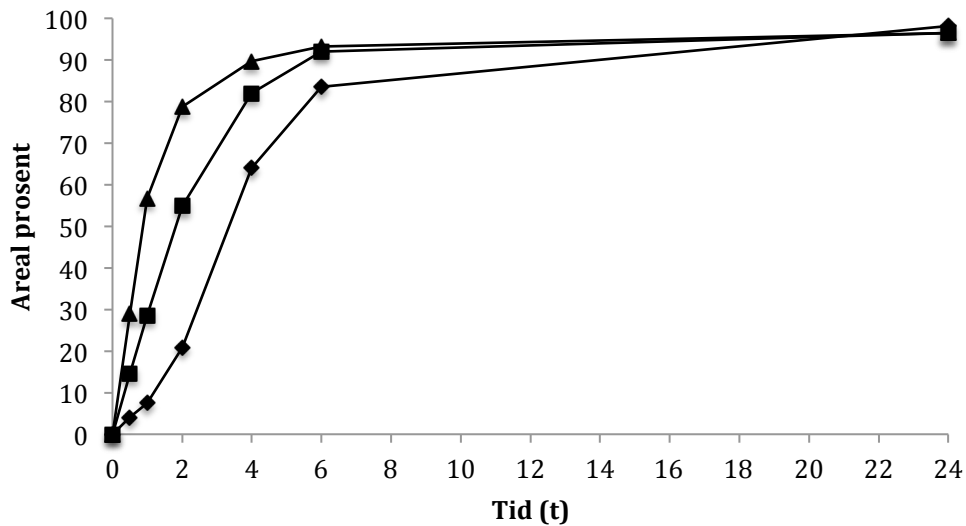
Etanol mengdens innvirkning på etanollysereaksjonen av sildeolje er studert. Diskontinuerlig tilsats, støkiometrisk forhold og overskudd etanol, beskrevet i kapitel 2.2. Resultatene er presentert i figur 21-23 som arealprosent asylglyseroler og etylester funnet ved integrasjon av TLC-FID kromatogram. Rådata finnes i appendiks C.



Figur 21. Hydrolyse av triacylglycerol. Etanolkonsentrasjonene er angitt av symbolene diamant (◆, diskontinuerlig tilsats), firkant (■, støkiometrisk) og trekant (▲, overskudd etanol) med standardfeil uttrykt for hver måling.

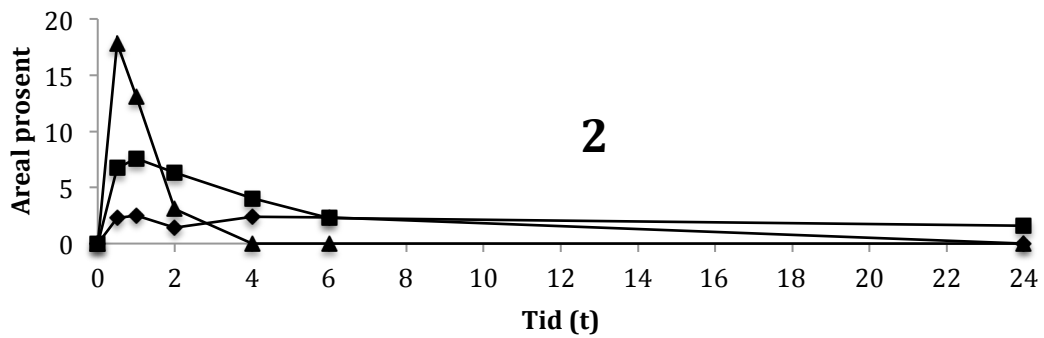
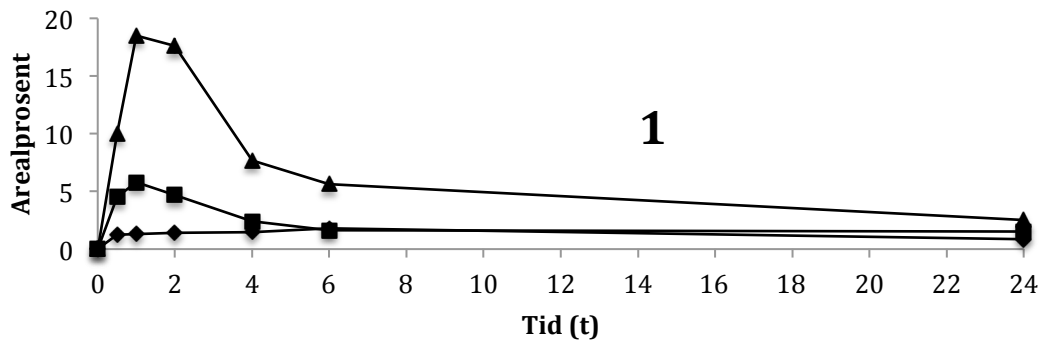
Hydrolysen av triacylglycerol viser høyest starthastighet når etanol foreligger i overskudd, fulgt av støkiometrisk forhold og diskontinuerlig tilsats etanol. Etter 2 timer observeres det ikke triacylglycerol i prøven med overskudd etanol, mens det observeres 34,1 areal% for støkiometrisk forhold og 76,2 areal% av diskontinuerlig tilsats. Fullstendig hydrolyse av triacylglycerolene for de tre ulike mengdene etanol er observert etter 24 timer.

Dannelsen av etylestere (figur 22) viser høyest reaksjonshastighet når etanol er i overskudd, dernest følger støkiometrisk forhold foran diskontinuerlig tilsats. Etter 24 timer har diskontinuerlig tilsats den største mengden etylestere, 98,22 areal%, etterfulgt av overskudd 96,5 areal% og støkiometrisk forhold 96,4 areal%.



Figur 22. Dannelse av etylestere. Etanolkonsentrasjonene er angitt av symbolene diamant (◆, diskontinuerlig tilsats), firkant (■, støkiometrisk) og trekant (▲, overskudd etanol) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Hydrolyse av triacylglyserol og dannelse av etylester viser høyest hastighet når etanol er i overskudd. Dette samsvarer ikke med en studie av Watanabe et al. som viser inaktivering av lipasen ved overskudd av etanol (Watanabe, Shimada et al. 1999). Studien underbygges av Chesterfield et al. hvor støkiometrisk forhold er vist å ha høyest reaksjonshastighet (Chesterfield, Rogers et al. 2012). Imidlertid viser flere studier (Irimescu, Iwasaki et al. 2002; Torres, Hill et al. 2004; Hernández-Martín and Otero 2008) at et overskudd av etanol gir høyere reaksjonshastighet.



Figur 23. Dannelse av (1) monoacylglycerol og (2) diacylglycerol. Etanol konsentrasjonene er angitt av symbolene diamant (◆, diskontinuerlig tilsats), firkant (■, støkiometrisk) og trekant (▲, overskudd etanol) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Overskudd av etanol oppnår sin høyeste mengde, 17,8 areal% diacylglyceroler etter 0,5 time. Diskontinuerlig og støkiometrisk viser sin høyeste mengde etter 1 time, med 2,2 og 7,6 areal%, respektivt. For overskudd og diskontinuerlig etanolmengde observeres det ikke diacylglycerol etter 24 timer, mens støkiometrisk inneholder 1,6 areal%.

Mengde monoacylglycerol for alle de tre etanolmengdene er høyest etter en time. Diskontinuerlig, støkiometrisk og overskudd utgjør henholdsvis 1,7, 5,8 og 18,5 areal%. Etter 24 timer utgjør mengden monoacylglyceroler 0,8, 1,5 og 2,5 areal% med stigende mengde etanol.

3.3.3 Effekt av temperatur og etanolmengdens på etanollyse av sildeolje

Et av oppgavens formål er å optimalisere en lipase katalysert etanollysereaksjon for dannelse av etylester. Graden av suksess måles av utbytte etylestere og reaksjonshastighet. Temperaturens innvirkning har vist at 50°C gir høyest hastighet for dannelse av etylester. Mens ved 30°C oppnås et høyere etylesterutbytte etter 24 timer, med en differanse på 2,4 areal%. Det registreres imidlertid at økt reaksjonstemperatur medfører en økt risiko for oksidasjon (Breivik 2007; Vitenskapskomiteen for 2011). Mildere reaksjonsbetingelser er blant hovedfordelene ved bruk av lipaser (Xu 2003).

Etanolens innvirkning på etanollysereaksjonen har vist at et overskudd av etanol øker reaksjonshastigheten. Oppnådde resultater er i overensstemmelse med studiene (Irimescu, Iwasaki et al. 2002; Torres, Hill et al. 2004; Hernández-Martín and Otero 2008) samtidig som studiene (Watanabe, Shimada et al. 1999; Chesterfield, Rogers et al. 2012) indikerer at lipasen inaktiveres ved overskudd av etanol.

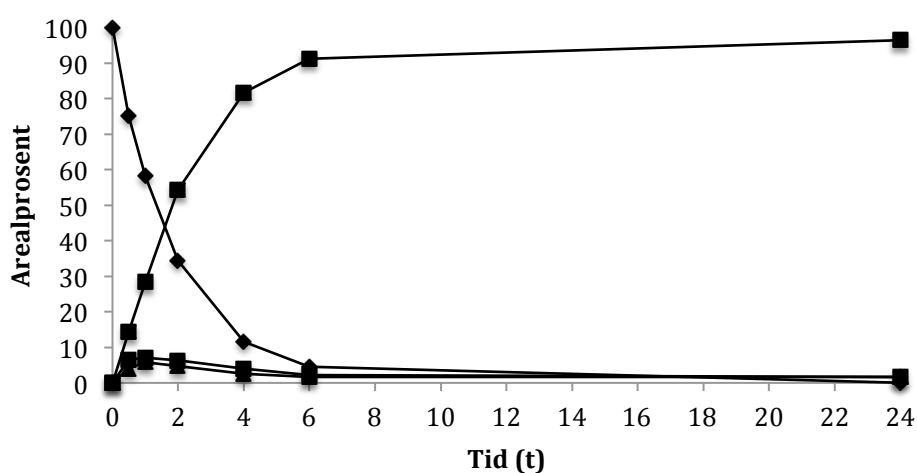
Det er på bakgrunn av oppnådde resultater valgt å analysere selolje ved støkiometrisk forhold etanol under 50°C. Samtidig er det også valgt å analysere selolje ved overskudd etanol under temperaturene 30 og 50°C.

3.4 Enzymatisk etanolyse av selolje, TLC-FID

Reaksjonsbetingelsene for etanolyse av selolje er valgt med bakgrunn i de optimale betingelsene for etanolyse av sildeolje. Resultatene er presentert i kapittel 3.4.1 og 3.4.2 for henholdsvis støkiometrisk forhold og overskudd av etanol.

3.4.1 Etanolyse av selolje ved støkiometrisk etanol forhold og 50°C

Resultatene fra etanolyse av selolje med støkiometrisk forhold av etanol for 50°C, optimaliseringssystem 1 er illustrert i figur 24 som areal% asylglyseroler og etylester funnet ved integrasjon av TLC-FID kromatogram. Rådata finnes i appendiks D.

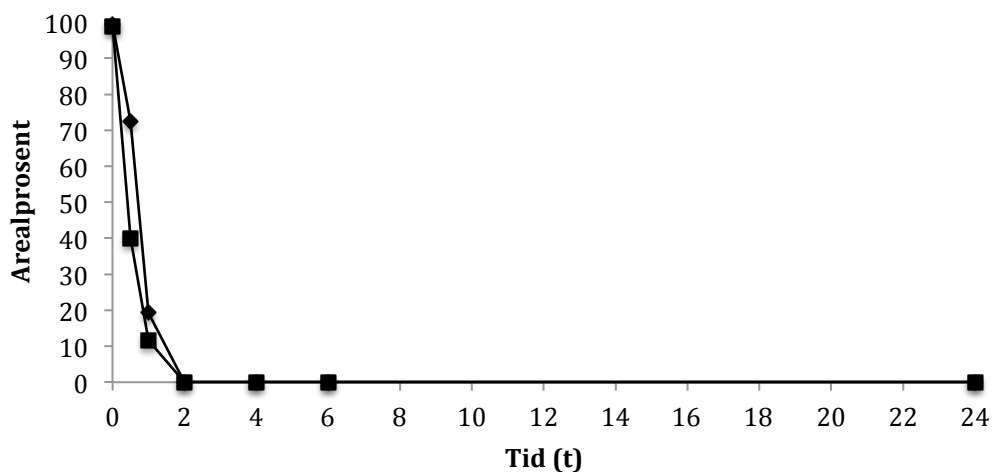


Figur 24. Viser asylglyserolenes reaksjonsforløp ved støkiometrisk forhold etanol og 50°C. Asylglyserolene har benevningene; diamant (◆, TAG), firkant (■, DAG), trekant (▲, MAG) og kryss (×, etylester) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Hydrolysen av triasyglyserol når 11,7 areal% etter 4 timer. Dannelsen av etylester når 91,2 areal% etter 6 timer. Dannelsen av mono- og diasyglyserol når sitt høyeste andel etter 1 time med henholdsvis 5,0 og 7,1 areal%. Ved endt reaksjon, 24 timer, er triasyglyserol fullstendig hydrolysert. Etylester, mono- og diasyglyserol utgjør henholdsvis 96,5, 1,6 og 1,6 areal%. Resultatene er tilnærmet identiske med resultatene som ble oppnådd for sildeolje under tilsvarende betingelser. En observasjon som tilsier at lipasen hydrolyserer og danner asylglyseroler uavhengig av om substratet er sild- eller selolje.

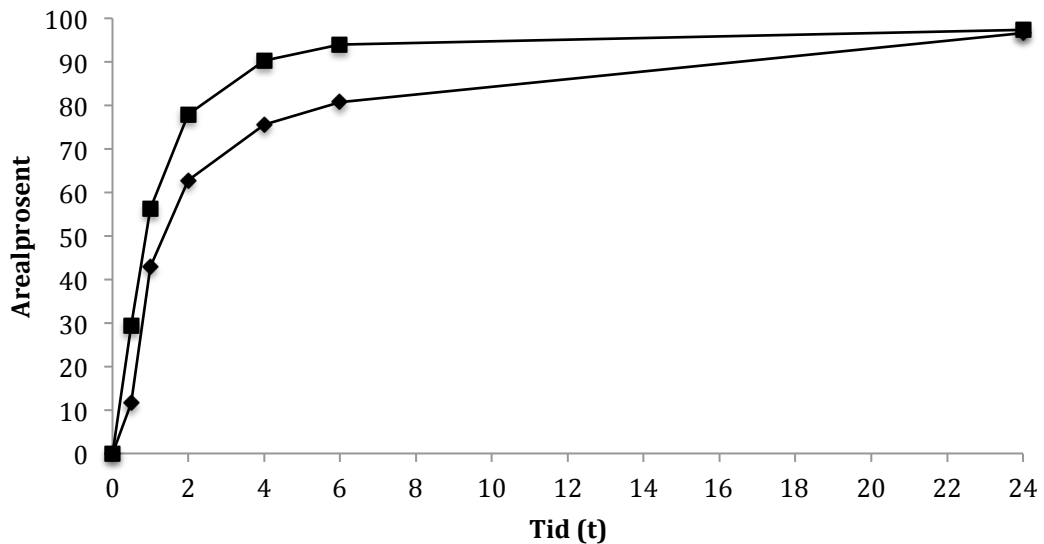
3.4.2 Etanolyse av selolje ved overskudd av etanol ved 30 og 50°C

Resultatene fra etanolyse av selolje med overskudd etanol for 30°C og 50°C, optimaliseringssystem 2 er illustrert i figur 25-27 som areal% asylglyseroler og etylester funnet ved integrasjon av TLC-FID kromatogram. Rådata finnes i appendiks D.



Figur 25. Hydrolyse av triacylglycerol ved overskudd etanol. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C) og firkant (■, 50°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

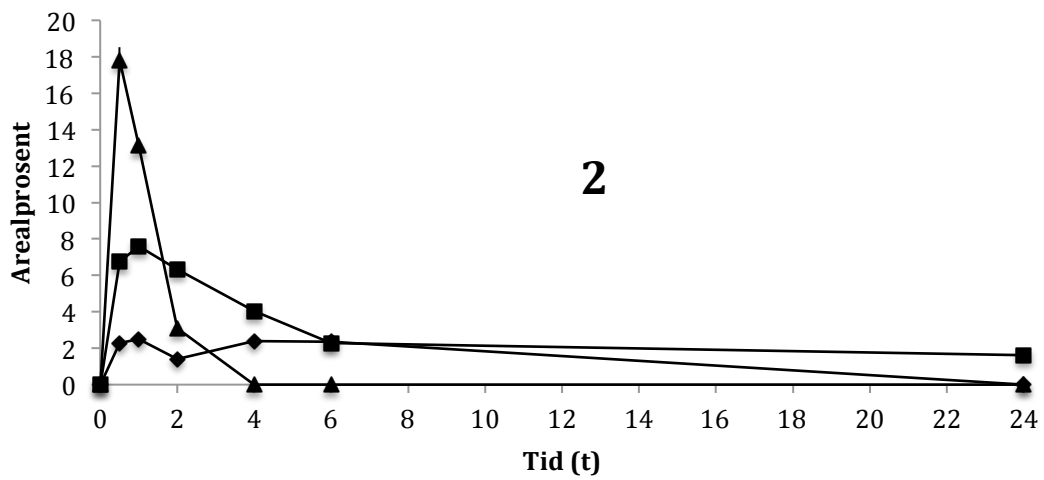
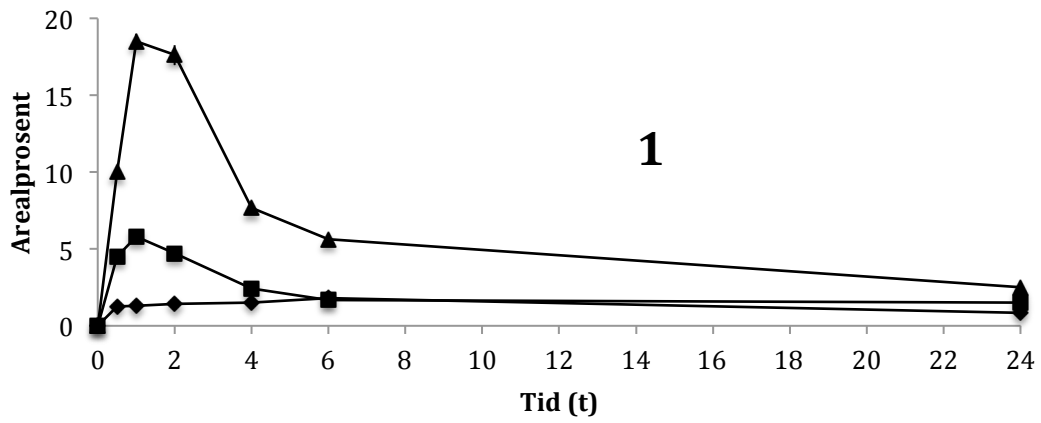
Hydrolysen av triacylglycerol viser en tilnærmet identisk reaksjonshastighet for 30 og 50°C. Etter 2 timer er triacylglycerolene fullstendig hydrolysert for begge temperaturene. Dannelsen av etylestere (figur 26) viser høyest reaksjonshastighet for 50°C, som etter 6 timer oppnår 94,0 areal% etylestere, mens 30°C utgjør en andel på 80,7 areal%. Etter 24 timer utgjør etylestere henholdsvis 97,3 og 96,7 areal% for 50 og 30°C. Observerte resultater samsvarer med at økt temperatur medfører økt etylester dannelseshastighet.



Figur 26. Dannelse av etylester ved overskudd etanol. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C) og firkant (■, 50°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

Monoasylglyseroldannelsen (figur 27) viser stor variasjon mellom 30 og 50°C. 50°C oppnår høyeste mengde etter 1 time, med 18,3 areal% og 30°C oppnår 25,6 areal% etter 2 timer. Etter 24 timer er monoasylglyserol mengden henholdsvis 3,0 og 2,5 areal% for 30 og 50°C.

50°C oppnår høyeste mengde diasylglyserol (figur 27) etter 0,5 time med 17,5 areal%, hvorav 30°C oppnår høyeste mengde etter 1 time med 20,7 areal%. Det observeres ikke dannelse av diasylglyserol ved verken 30 eller 50°C etter 4 timer.



Figur 27. Dannelse av (1) monoacylglyserol og (2) diacylglyserol ved overskudd etanol. Temperaturene er angitt av symbolene diamant (◆, 30°C) og firkant (■, 50°C) med standardfeil uttrykt for hver måling.

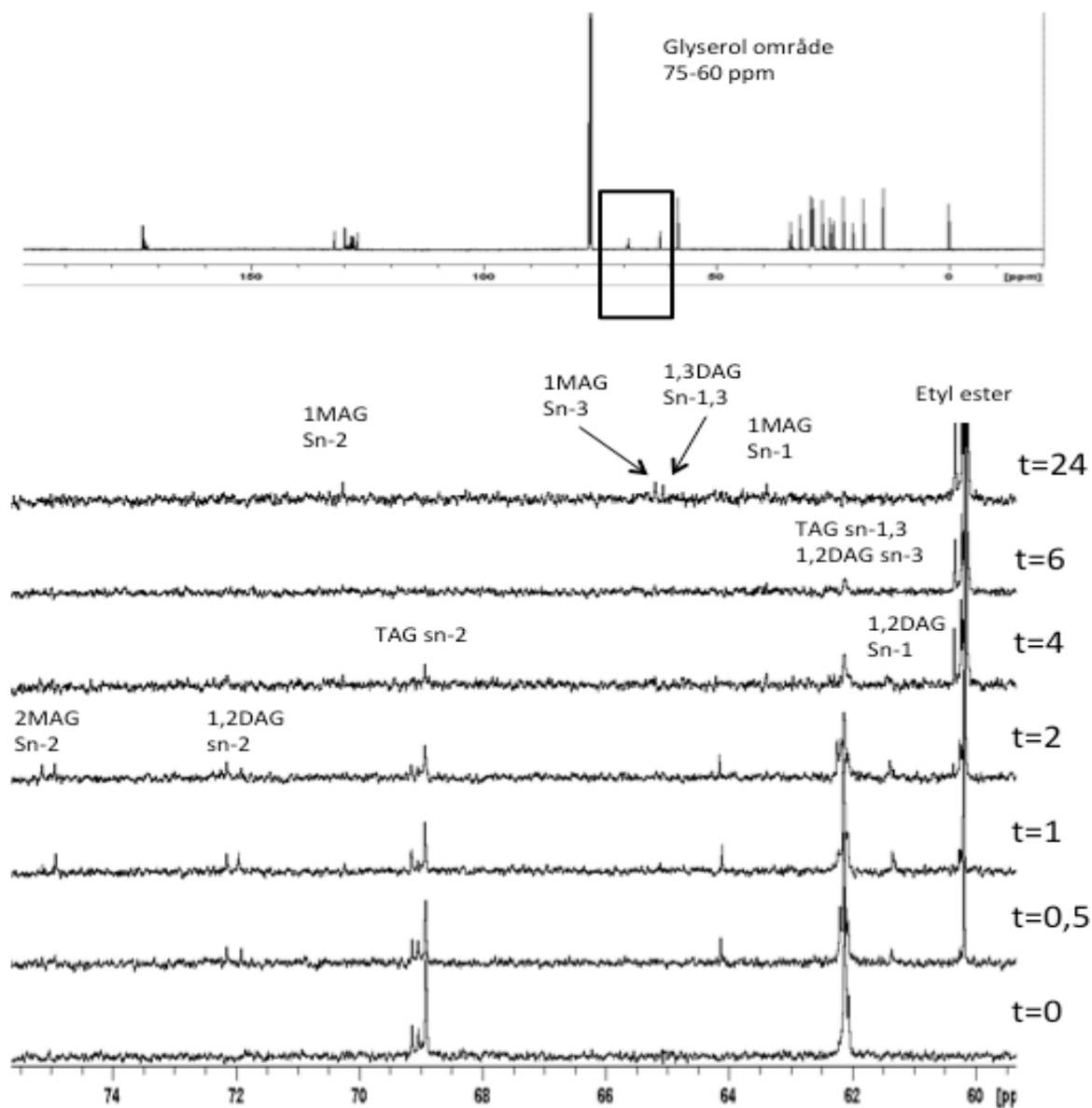
3.5 Enzymatisk etanolyse av sild- og selolje, ¹³C NMR

¹³C NMR er benyttet for å analysere etanolyse av sild- og selolje under optimale reaksjons betingelser. Teknikken gir detaljert informasjon om fettsyresammensetningen, lipidklassene og fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet (Aursand and Grasdalen 1992; Aursand, Jørgensen et al. 1995). Som det er vist i kapitel 3.1 og 3.2 har sild- og selolje ulike lipidprofiler både med hensyn til fettsyresammensetning og fettsyrenes posisjonering på triasyglyserolet. Grunnet en feil under analyse av sild- og selolje ved 50°C og overskudd etanol er dette forsøket unnlatt fra oppgaven.

3.5.1 Etanolyse av sildeolje ved støkiometrisk etanol forhold og 50°C

3.5.1.1 Glyserolkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av glyserolkarbonspekteret er presentert i figur 28. Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 28. Glyserolkarbonspekteret til ^{13}C NMR for sildeolje gjennom reaksjonsforløpet, med asylglyserolene og etylester er angitt.

Reaksjonsstart 0 timer viser to signaler som korresponderer til TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal) og TAGsn-2. Denne observasjonen er forventet ettersom prøven kun inneholder etanol og sildeoljetriasyglyserol. Funnet underbygges av TLC-FID analyse (figur 17).

Signalene observert etter 0,5 time korresponderer til etylester, 1,2DAGsn-1, TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal), TAGsn-2, 1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2. Intensiteten til TAG signalene målt i sn-1,3 og sn-2 posisjon på glyserolmolekylet reduseres gradvis frem til henholdsvis 24 og 6 timer, hvor signalene ikke observeres. At TAG ikke viser signal etter 24 timer tilsier at triasyglyserol er fullstendig hydrolysert, en observasjon som bekreftes av TLC-FID analyse (figur 17).

Ved å integrere signalene til TAGsn-1,3 med overlappende 1,2DAGsn-3 og TAGsn-2 (tabell 11) er den prosentvise fordelingen funnet. Etter 0 timer utgjør TAGsn-2 33% og TAGsn-1,3 67%, som forventet. Gjennom reaksjonsforløpet øker den prosentvise andelen TAGsn-1,3 i forhold til TAG sn-2 og etter 4 timer utgjør TAG sn-1,3 77%. Dette tilsier at 1,2DAGsn-3 dannes.

Tabell 11. Prosentvis andel TAGsn-1,3 (1,2DAGsn-3) i forhold til TAGsn-2.

Tid (timer)	%TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	%TAG sn-2
0	66	33
0,5	69	31
1	72	28
2	73	27
4	77	23

1,2DAGsn-1, 1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2 observeres i tidsintervallet 0,5 til 2 timer. Samtidig som 1,2DAGsn-3 er inkludert i TAGsn-1,3 signalet. At signalene i tidsintervallet 0,5 til 2 timer kun viser 1,2DAG og 2MAG og verken 1MAG eller 1,3DAG tilsier at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet.

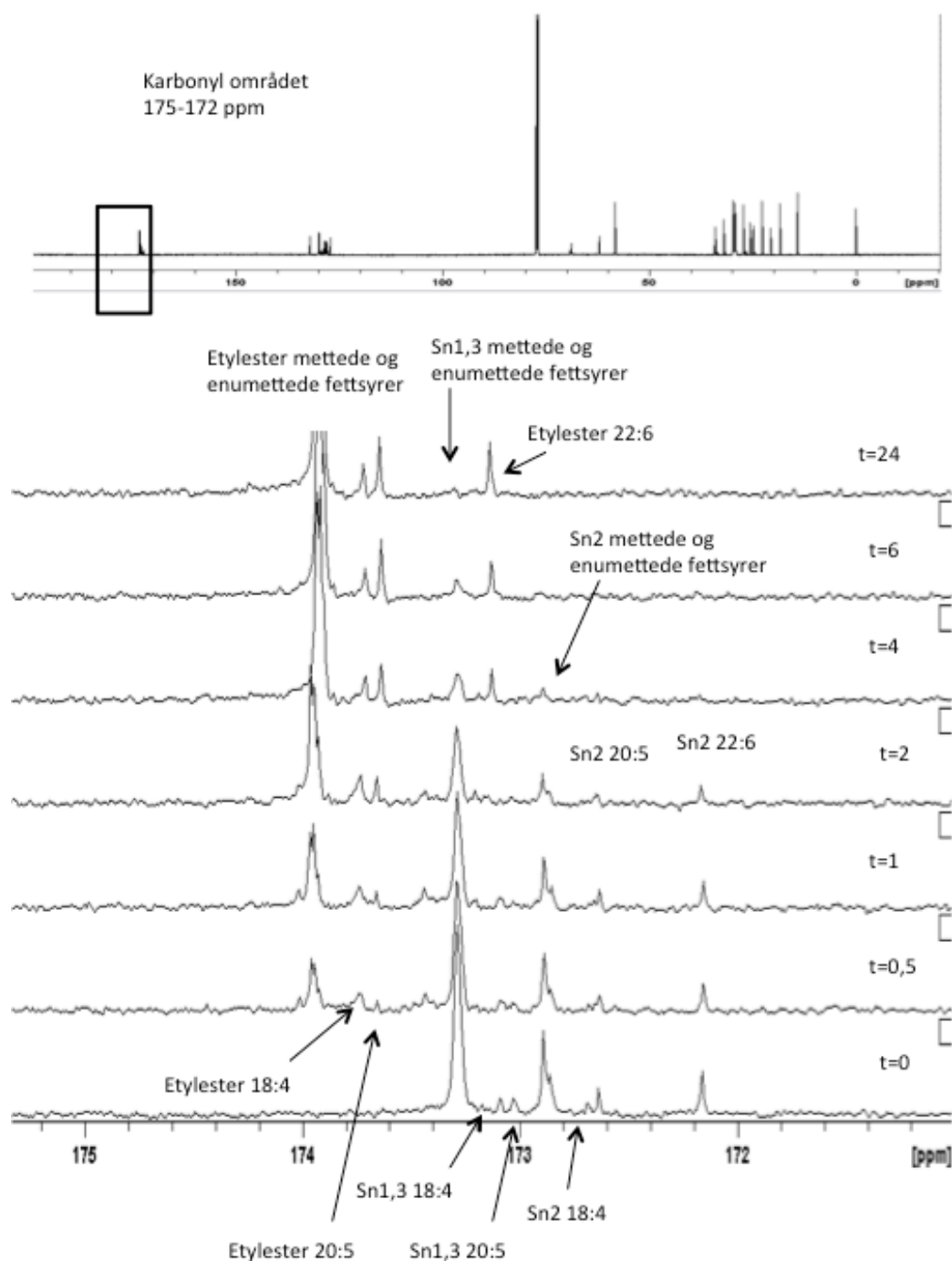
Signal for 1MAG sn-1 og sn-2 vises for første gang etter 4 timer og for 1MAG sn-3 etter 6 timer. Signalene kan forklares av intramolekylær asylnigrering (Fureby,

Virto et al. 1996). Det observeres også 1,3DAGsn-1,3 etter 24 timer som trolig skyldes intramolekylær asylnigrering av 1,2DAGsn-3 signalet etter 6 timer.

Intensiteten til etylester signalet øker gradvis gjennom reaksjonsforløpet. Økende signalintensitet til etylester signalene underbygges av TLC-FID analyse som viser økende mengde etylestere, figur 18.

3.5.1.2 Karbonylkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av karbonylkarbonspekteret er presentert i figur 29. Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 29. Karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR for sildeolje gjennom reaksjonsforløpet. Fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet og dannelse av etylester er angitt.

DHA er en fettsyre som er >95% posisjonert i sn-2 (kapitel 3.2). I karbonylkarbonspekteret viser DHAsn-2 signalet en stabil intensitet fra 0 til 2 timer. Etter 2 timer observeres ikke DHAsn-2. DHA observeres imidlertid som etylester fra 4 timer, med stigende signal intensitet til 24 timer. Gjennom reaksjonen observeres det ikke signal for DHAsn-1,3. Denne observasjonen sammen med observasjonen om at DHA etylester ikke dannes før etter 4 timer underbygger påstanden om at signalet er stabilt frem til 2 timer. Det indikerer også at DHAsn-2 ikke undergår intramolekylær asylnigrering.

Fettsyren EPA er tilnærmet likt fordelt mellom sn-1,3 og sn-2 posisjonene på glyserolmolekylet (kapitel 3.2). Karbonylkarbonspekteret viser at EPAsn-2 har stabil signalintensitet frem til 2 timer, tilsvarende som DHAsn-2. Derimot viser EPA i sn-1,3 posisjon reduserende signalintensitet fra 0,5 timer. Denne observasjonen tilsier at EPAsn-1,3 hydrolyseres før EPAsn-2. Dette indikerer at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet.

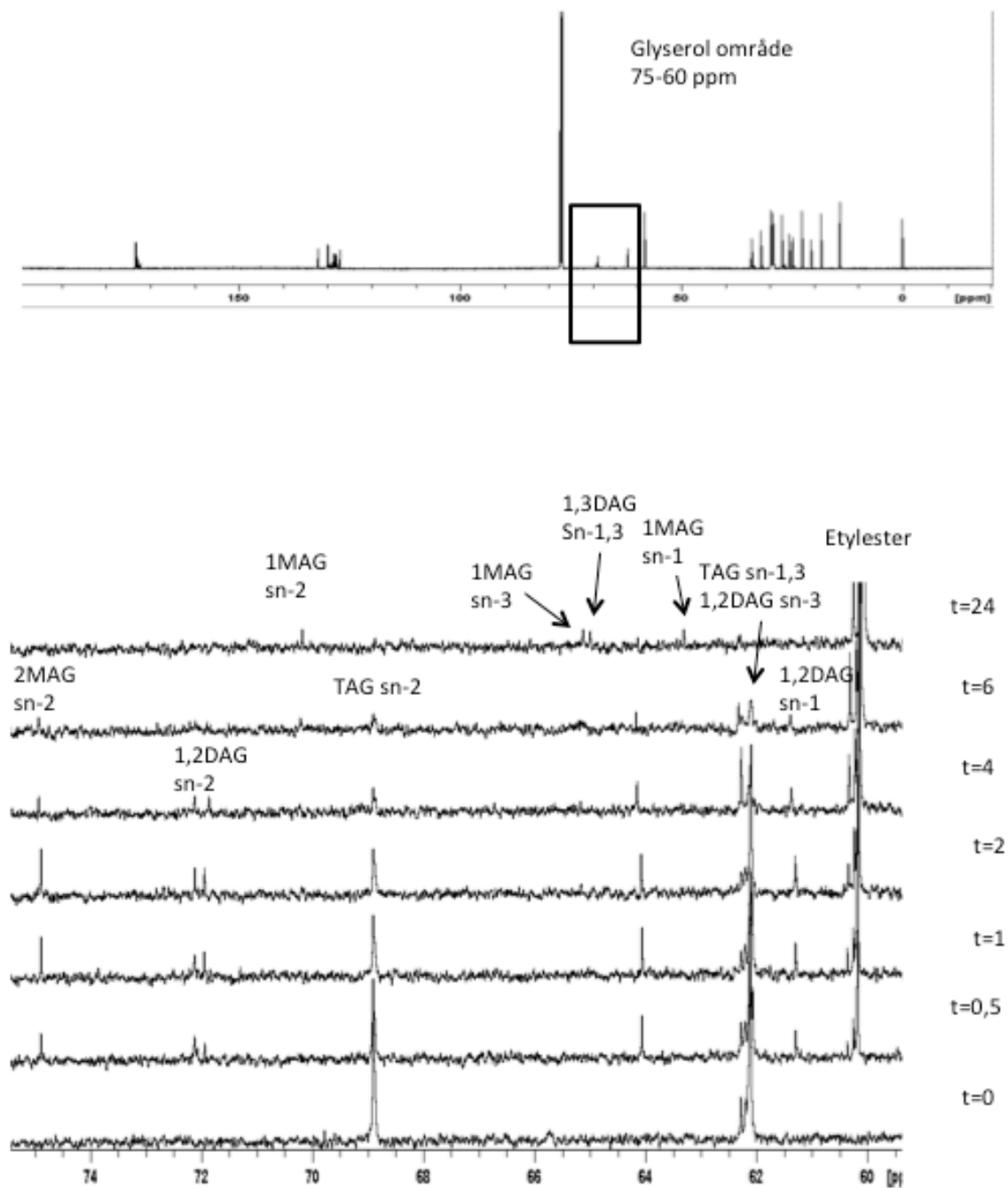
Etter 24 timer observeres det en fortsatt signal for mettede og enumettede fettsyrer i sn-1,3 posisjon. Dette tilsier at asylglyserolene ikke er fullstendig hydrolysert. Ettersom glyserolkarbonspekteret ikke viser signal for verken TAGsn-1,3 eller TAGsn2 etter 24 timer, er fettsyrene enten plassert på mono- eller diasylglyserol. Noe som er i overensstemmelse med spekteret som viser topper for 1MAG og 1,3DAG, dette underbygges av TLC-FID analyse (figur 19) som viser en liten mengde MAG og DAG etter 24 timer.

Det registreres at alle etylester toppene viser økt intensitet gjennom reaksjonsforløpet, dette er en forventet observasjon som underbygges av glyserolkarbonspekteret og TLC-FID analyse, figur 18.

3.5.2 Etanolyse av selolje ved støkiometriske etanol forhold og 50°C

3.5.2.1 Glycerolkarbon spekteret

Resultatene fra analyse av glyserolkarbon spekteret er presentert i figur 30. Skift verdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 30. Glycerolkarbon spekteret til ^{13}C NMR for selolje gjennom reaksjonsforløpet med asylglyserol og etylester angitt.

De to signalene som vises i reaksjonsstart, 0 timer korresponderer til TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal) og TAGsn-2. Signalene er forventet og underbygges av TLC-FID analyse (figur 24).

Etter 0,5 time vises 6 signaler som korresponderer til etylester, 1,2DAGsn-1, TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal), TAGsn-2 og 1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2. Intensiteten til TAG signalene målt i sn-1,3 og sn-2 posisjon på glyserolmolekylet reduseres gradvis frem til henholdsvis 24 timer, hvor signalene ikke observeres. At TAG ikke viser signal etter 24 timer tilsier at triasylglyserol er fullstendig hydrolysert, en observasjon som bekreftes av TLC-FID analyse (figur 24).

Ved å integrere signalene til TAGsn-1,3 med overlappende 1,2DAGsn-3 og TAGsn-2 (tabell 12) finnes den prosentvise fordelingen. Etter 0 timer utgjør TAGsn-2 33,4% og TAGsn-1,3 66,6%, som forventet. Gjennom reaksjonsforløpet øker den prosentvise andelen TAGsn-1,3 og etter 6 timer utgjør TAG sn-1,3 80%, som tilsier at 1,2DAGsn-3 dannes.

Tabell 12. Prosentvis andel TAGsn-1,3 (1,2DAGsn-3) i forhold til TAGsn-2.

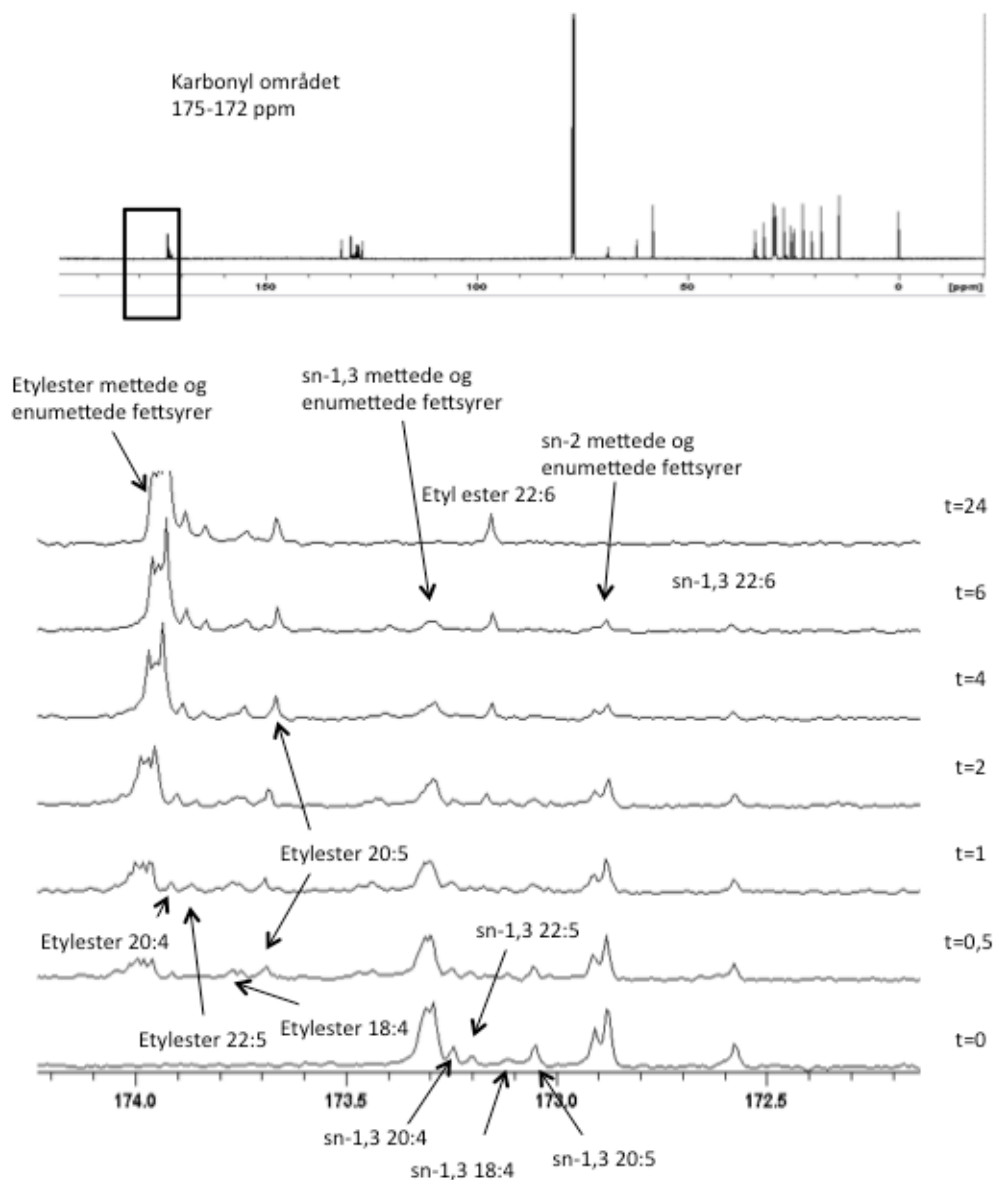
Tid (timer)	%TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	%TAG sn-2
0	66,6	33,4
0,5	72	28
1	74	26
2	76,5	23,5
4	80	20
6	80	20

At asylglyserolene 1,2DAG og 2MAG observeres i tidsintervallet 0,5 til 6 timer indikerer at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet. Etter 24 timer viser spekteret ingen signal for verken 1,2DAG eller 2MAG. Derimot vises 1MAG og 1,3DAG etter 24 timer. Denne observasjonen kan forklares av intramolekylær asylnigrering.

Som forventet øker intensiteten til etylestersignalet gradvis gjennom reaksjonsforløpet. Dette er i overenstemmelse med TLF-FID analyse, figur 24.

3.5.2.2 Karbonylkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av karbonylkarbonspekteret er presentert i figur 31. Skift verdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 31. Karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR for selolje gjennom reaksjonsforløpet med fettsyrenes posisjon angitt.

I selolje er fettsyren DHA ved >95% plassert i sn-1,3 posisjon (kapitel 3.2). DHAsn-1,3 viser en stabil intensitet fra 0 til 2 timer. Etter 2 timer observeres en reduksjon frem til 6 timer, samtidig som DHA-etylester viser en økning fra 2 timer til 24 timer.

EPA inngår i sn-1,3 posisjon med >95% for selolje (kapitel 3.2). I karbonylkarbonspekteret viser EPA i motsetning til DHA en reduksjon i signalintensitet fra 0 til 2 timer, samtidig som EPA etylester viser økende intensitet fra 0,5 time. Denne ulikheten mellom EPA og DHA tilsier at lipasen viser større aktivitet mot EPA enn DHA.

Det observeres ikke signal for mettede og enumettede fettsyrer etter 24 timer, noe som tilsier at asylglyserolene er fullstendig hydrolysert. Imidlertid viser glyserolkarbon spekteret 1MAG og 1,3DAG, en motsigelse av observerte signal. En mulig forklaring kan være stor variasjon av fettsyrer som utgjør 1MAG og 1,3DAG. Deres bidrag til signalets intensitet blir da så lite at signalet forsvinner i støyen. TLC-FID (figur 24) viser MAG og DAG etter 24 timer.

3.5.3 Oppsummering: Etanolyse av sild- og selolje ved støkiometrisk forhold etanol og 50°C.

I tidsintervallet 0,5 til 2 timer dannes det 1,2DAG og 2MAG ved etanolyse av både sild- og selolje. Denne observasjonen indikerer at lipasen viser spesifisitet mot sn-1(3) posisjonen på glyserolmolekylet, ettersom det ikke observeres 1MAG eller 1,3DAG. Dette er et avvik fra produsenten, Novo-nordisk deklarerer av lipasen som ikke-spesifikk. Novo-nordisk deklarasjon er underbygget av flere studier (Breivik, Haraldsson et al. 1997; Irimescu, Iwasaki et al. 2002) som har utført etanolyse under støkiometriske molarforhold etanol. Studiene viser at lipasen ikke viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene. Observert spesifisitet mot sn-1(3) posisjonene kan teoretisk forklares av enten steriske hindringer (at sn-2 posisjonen er "hindret") eller fettsyreselektivitet. Fettsyreselektivitet kan imidlertid utelukkes ettersom substratene sild- og selolje har fettsyrene EPA og DHA posisjonert i henholdsvis sn-2 og sn-1,3 posisjon (kapitel 3.2).

Dannelse av 2MAG og 1,2DAG i reaksjonens startfase (0,5 til 2 timer) med påfølgende frafall og dannelse av 1MAG og 1,3DAG i tidsintervallet 4 til 24 timer kan forklares av intramolekylær asylnigrering. Dette er en prosess hvor en asylnigring endrer posisjon intramolekylært fra en hydroksylgruppe til en annen på glyserolmolekylet (Fureby, Virto et al. 1996). Hastigheten til intramolekylær asylnigring avhenger av løsemiddelet og temperaturen (Kodali, Tercyak et al. 1990; Compton, Vermillion et al. 2007). Ettersom det verken er observert frie fettsyrer i karbonylkarbonspekteret eller TLC-FID analyse, eller tilsatt vann til systemet burde asylnigring være begrenset (Irimescu, Iwasaki et al. 2002).

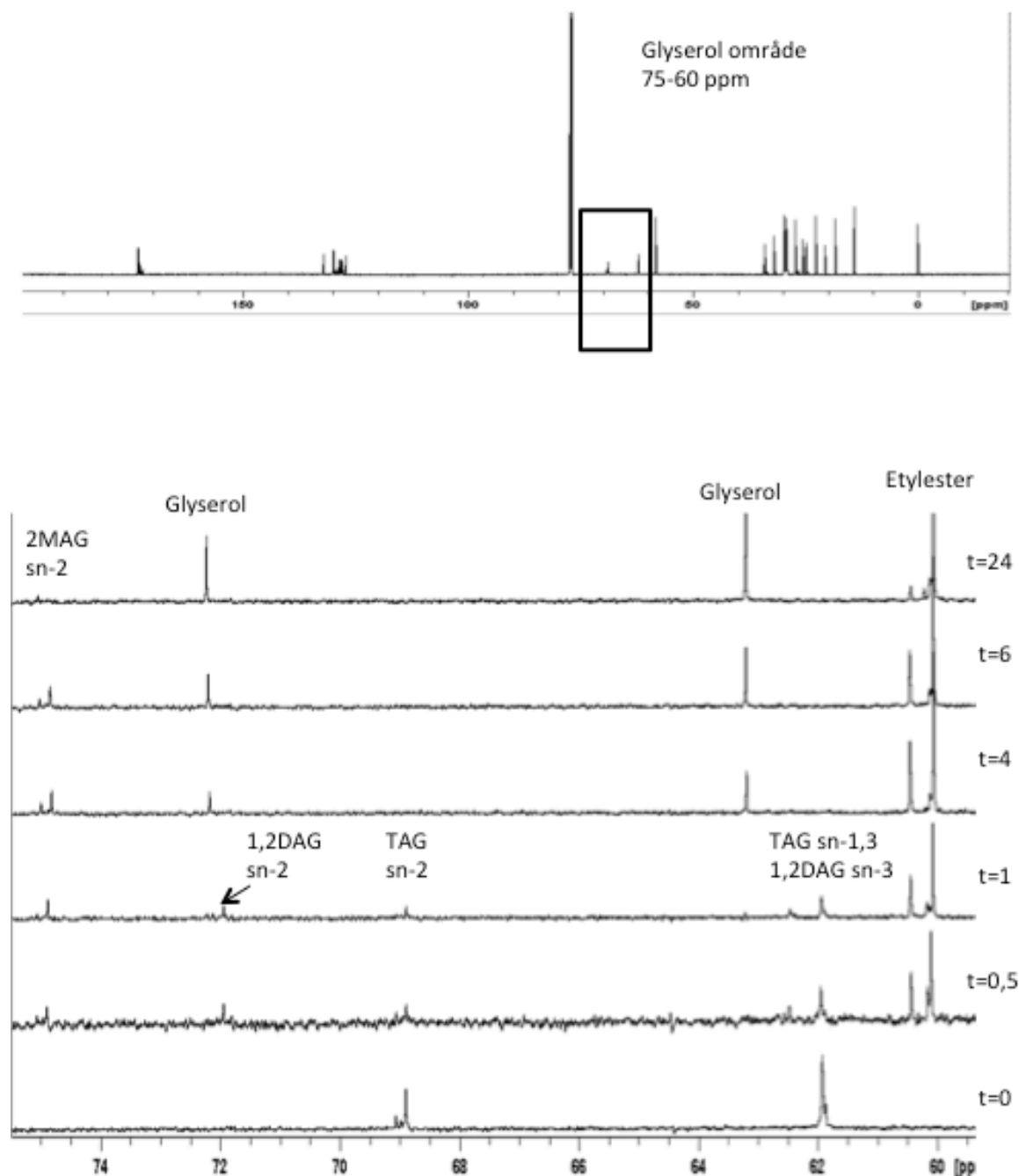
I selolje hvor EPA og DHA befinner seg ved >95% i sn-1,3 posisjon, viser EPA reduksjon i intensiteten til sn-1,3 signalet, samtidig som det observeres dannelse av EPA etylestere etter 0,5 timer. I motsetning viser DHA i sn-1,3 posisjon minimal reduksjon i signalintensiteten fra 0 til 2 timer og DHA etylester dannelse først etter 1 time. Denne observasjonen tilsier at lipasen viser større aktivitet mot EPA enn DHA når fettsyrene er plassert i sn-1,3 posisjon. Høyere aktivitet for EPA enn DHA er vist i flere studier (Haraldsson, Gudmundsson et al. 1995; Haraldsson, Halldorsson et al. 2000).

3.5.4 Etanolyse av sildeolje ved overskudd etanol og 30°C

3.5.4.1 Glyserolkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av glyserolkarbonspekteret er presentert i figur 32.

Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks F.



Figur 32. Glyserolkarbonspekteret til ^{13}C NMR for sildeolje gjennom reaksjonsforløpet, med asylglyserolene er angitt på figuren. Prøve etter 2 timer er ikke inkludert som følge av teknisk feil under NMR analyse.

Reaksjonsstart (0 time) viser to signaler som korresponderer til TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-1,3 (overlappende signal) og TAGsn-2. Denne observasjonen er forventet ettersom prøven kun inneholder etanol og sildeolje triasyglyserol. Funnet underbygges av TLC-FID analyse (Figur 21).

Signalene observert etter 0,5 time korresponderer til etylester, TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal), TAGsn-2, 1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2. Intensiteten til signalene for TAG i sn-1,3 og sn-2 posisjon reduseres frem til 1 time. Etter 1 time er vises ikke signal for TAG verken i sn-1,3 eller sn-2 posisjon noe som tilsier at triasyglyserol er fullstendig hydrolysert, en observasjon som bekreftes av TLC-FID analyse (figur 21).

Integrasjon av TAGsn-1,3 med overlappende 1,2DAGsn-3 og TAGsn-2 signalene gir den prosentvise fordelingen. Etter 0 timer utgjør TAGsn-2 34% og TAGsn-1,3 66%, som forventet. Gjennom reaksjonsforløpet øker den prosentvise andelen TAGsn-1,3 i forhold til TAG sn-2 og etter 1 time utgjør TAG sn-1,3 75%. Dette tilsier at 1,2DAGsn-3 dannes.

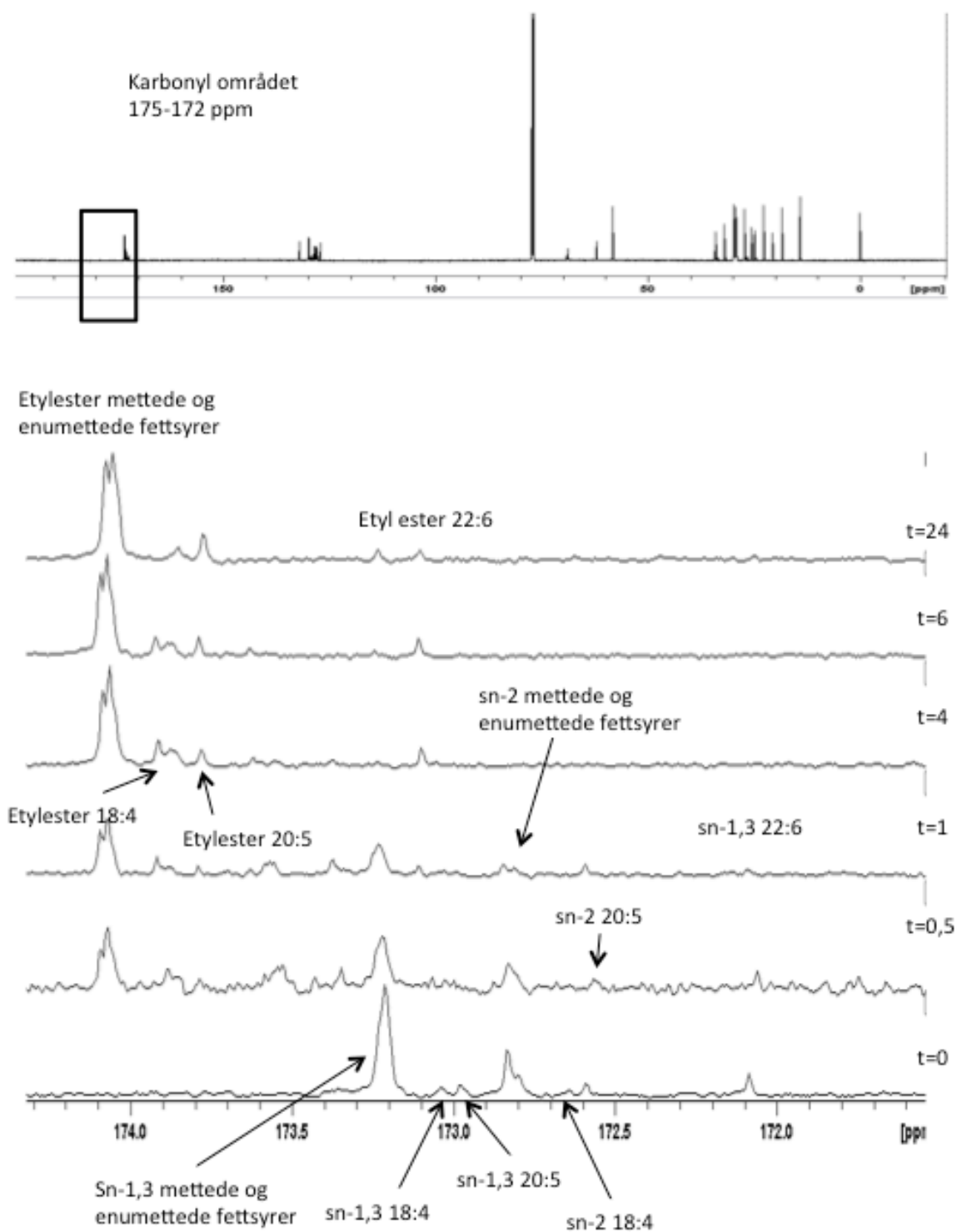
1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2 viser signal fra 0,5 time og frem til henholdsvis 1 og 24 timer, som er i overenstemmelse med TLC-FID analyse, figur 23. At signalene kun viser 1,2DAG og 2MAG og verken 1MAG eller 1,3DAG tilsier at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet.

Intensiteten til etylester signalet øker gradvis gjennom reaksjonsforløpet. Økende signalintensitet til etylestersignalene underbygges av TLC-FID analyse som viser økende mengde etylestere, figur 22.

3.5.4.2 Karbonylkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av karbonylkarbonspekteret er presentert i figur 33.

Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 33. Karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR for sildeolje gjennom reaksjonsforløpet, med fettsyrenes posisjonering angitt. Prøve etter 2 timer er ikke inkludert som følge av teknisk feil under NMR analyse.

Fettsyren DHA viser kun signal for sn-2 posisjon, dette er i henhold med fettsyrens posisjonering >95% i sn-2 posisjon (kapitel 3.2). DHAsn-2 viser redusert signal intensitet fra 0 til 1 time. Etter 1 time observeres ikke DHA i sn-2 posisjon. DHA etylester observeres imidlertid etter 1 time med stigende signal intensitet frem til 4 timer, fra hvor signalet er stabil ut reaksjonstiden. At DHA ikke observeres i sn-1,3 posisjonen, indikerer at DHA ikke undergår asymmetrisk migrering.

Fettsyren EPA er fra kapitel 3.2 vist og være jevnt fordelt mellom sn-1(3) og sn-2 posisjonene på glyserolmolekylet. I karbonylkarbonspekteret viser EPA signal for begge posisjonene. Imidlertid forsvinner signalet for sn-1,3 posisjonen etter 0,5 timer, mens signalet for sn-2 posisjonen forsvinner etter 1 time. Dette kan forklares med at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet. I motsetning til DHA-etylester, viser EPA-etylester signal fra 0,5 time. Observasjonen underbygger forklaringen om at lipasen viser sn-1,3 spesifisitet og hydrolyserer EPA i sn-1,3 posisjon før EPA i sn-2 posisjon.

At karbonylkarbonspekteret ikke viser signal for mettede og enumettede fettsyrer etter 24 timer, tilsier at asyglyserolene er fullstendig hydrolysert. Imidlertid viser glyserolkarbonspekteret 2MAG etter 24 timer, dette er en motsigelse av observerte signal. Dette kan forklares ved at dersom ulike fettsyrer utgjør 2MAG, vil deres bidrag til de enkelte signalene i karbonylkarbonspekteret være så lite at signalet forsvinner i støyen. TLC-FID analyse (figur 23) viser MAG etter 24 timer.

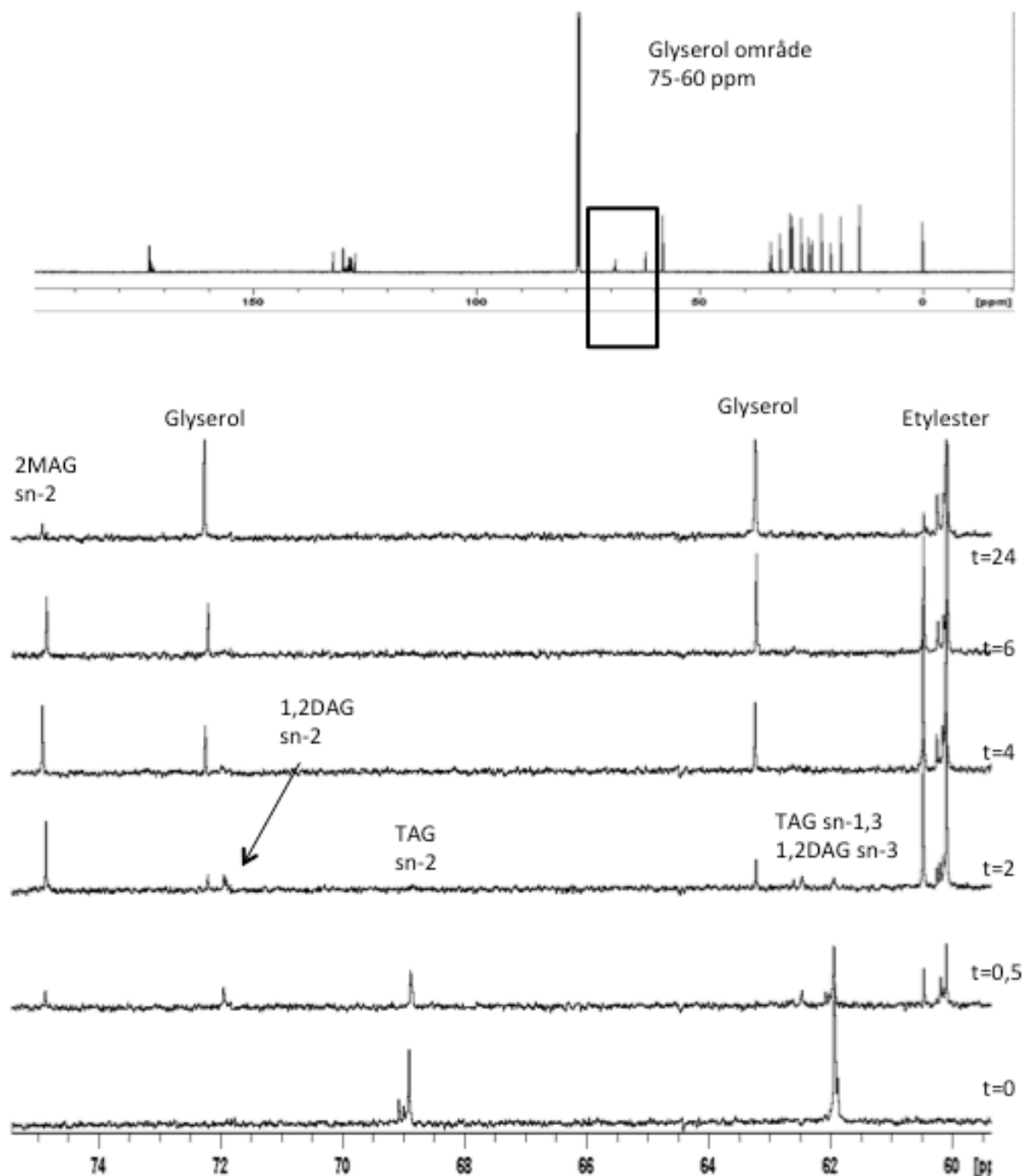
Det registreres at etylester signalene viser økt intensitet gjennom reaksjonsforløpet, dette er en forventet observasjon som underbygges av glyserolkarbonspekteret og TLC-FID analyse, figur 22.

3.5.5 Etanolyse av selolje ved overskudd etanol og 30°C

3.5.5.1 Glyserolkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av glyserolkarbonspekteret er presentert i figur 34.

Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 34. Glyserolkarbonspekteret til ^{13}C NMR for selolje gjennom reaksjonsforløpet, asylglyseroler og etylester er angitt. Prøve etter 1 time er ikke inkludert som følge av teknisk feil under NMR analyse.

Glyserolkarbonspekteret viser to signaler ved reaksjonsstart. Disse korresponderer til TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-1,3 (overlappende signal) og TAGsn-2. Observasjonen er forventet ettersom prøven kun inneholder etanol og sildeolje triacylglyserol. Funnet underbygges av TLC-FID analyse (Figur 25).

Signalene som vises etter 0,5 time korresponderer til etylester, TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal), TAGsn-2, 1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2. Signalene til TAG i sn-1,3 og sn-2 posisjon reduseres frem til 2 timer. Etter 2 timer observeres ikke signal for TAG, noe som tilsier fullstendig hydrolyse, en observasjon som bekreftes av TLC-FID analyse (figur 25).

Integrasjon av TAG signalene gir den prosentvise fordelingen. Etter 0 timer utgjør TAGsn-2 33% og TAGsn-1,3 og 1,2DAGsn-3 (overlappende signal) 67%, som forventet. Gjennom reaksjonsforløpet øker den prosentvise andelen TAGsn-1,3 i forhold til TAG sn-2 og etter 2 timer utgjør TAG sn-1,3 en andel på 75%. Dette tilsier at 1,2DAGsn-3 dannes.

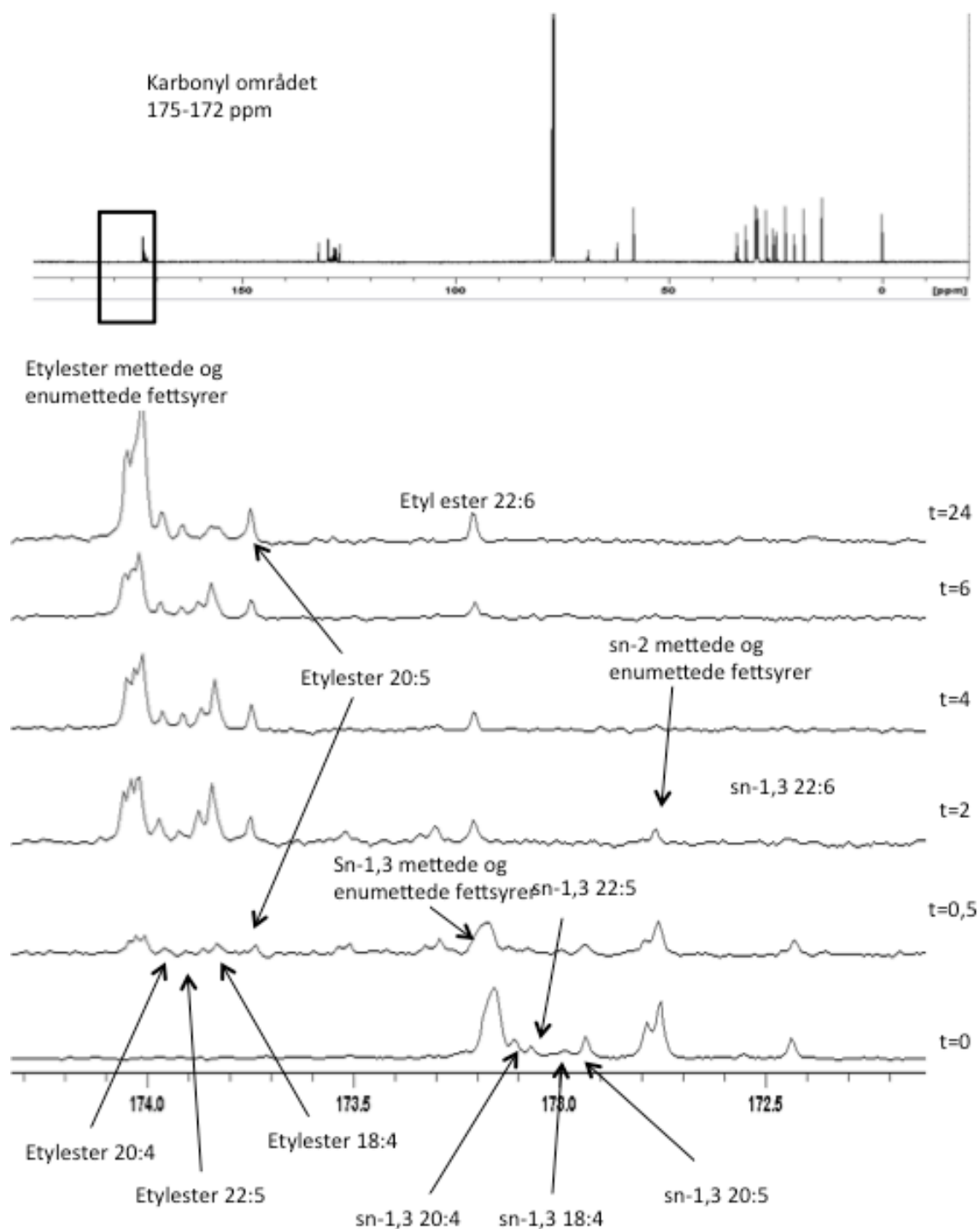
1,2DAGsn-2 og 2MAGsn-2 viser signal etter 0,5 time og frem til henholdsvis 2 og 24 timer, i overensstemmelse med TLC-FID analyse figur 27. At signalene kun viser 1,2DAG og 2MAG og verken 1MAG eller 1,3DAG forklares med at lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet.

Intensiteten til etylester signalet øker gradvis gjennom reaksjonsforløpet. Økende signal intensitet til etylester signalene underbygges av TLC-FID analyse som viser økende mengde etylestere, figur 26.

3.5.5.2 Karbonylkarbonspekteret

Resultatene fra analyse av karbonylkarbonspekteret er presentert i figur 35.

Skiftverdiene som funksjon av reaksjonstid er gitt som tabell i appendiks E.



Figur 35. Karbonylkarbonspekteret til ^{13}C NMR for selolje gjennom reaksjonsforløpet med fettsyrenes posisjonering angitt. Prøve etter 1 time er ikke inkludert som følge av teknisk feil under NMR analyse.

Selolje inneholder fettsyren DHA i sn-1,3 posisjon ved >95% (kapitel 3.2). Signalet til DHAsn-1,3 reduseres fra 0 til 2 timer. Etter 2 timer observeres ikke DHAsn-1,3, imidlertid viser DHA etylester signal fra 2 timer, med stigende intensitet ut reaksjonstiden.

Fettsyren EPA finnes i sn-1,3 posisjon ved >95% (kapitel 3.2). Signalet til EPAsn-1,3 reduseres over tidsintervallet 0 til 0,5 time, samtidig som EPA etylester viser økende signal intensitet fra 0,5 time. Etter 0,5 time viser EPAsn-1,3 ikke signal. At EPAsn-1,3 hydrolyseres fullstendig og viser etylester signal før DHAsn-1,3 kan forklares av at lipasen viser høyere aktivitet for fettsyren EPA enn DHA.

Mettede og enumettede fettsyrer viser ikke signal etter 24 timer, noe som tilsier en fullstendig hydrolyse av asylglyserolene. Imidlertid viser glyserolkarbon spekteret 2MAG som er en motsigelse av observerte signal. En forklaring er at dersom ulike fettsyrer utgjør 2MAG signalet vil deres bidrag til signalene i karbonylkarbonspekteret være lavt og signalet forsvinner i støyen. TLC-FID analyse viser MAG etter 24 timer, figur 27.

Signalene til etylesterene viser økt intensitet gjennom reaksjonsforløpet, dette er en forventet observasjon som underbygges av glyserolkarbon spekteret og TLC-FID analyser, figur 26.

3.5.6 Oppsummering: Etanolyse av sild- og selolje ved overskudd etanol og 30°C

1,2DAG viser signal etter 0,5 timer i både sild- og selolje. Signalet observeres ikke etter henholdsvis 1 og 2 timer. Observasjonene er i samsvar med TLC-FID analyse (figur 27), utenom for sildeolje som har DAG observert ved 2 timer ved TLC-FID, figur 23. Sildeolje er imidlertid ikke detektert ved 2 timer for ^{13}C NMR som et resultat av en teknisk feil under analysen. Det kan derfor ikke utelukkes at DAG viser signal etter 2 timer.

2MAG viser signal fra 0,5 timer og ut reaksjonstiden (24 timer) for sild- og selolje, en observasjon som samsvarer med TLC-FID analyse (figur 27) for selolje. Derimot observeres ikke MAG for sildeolje etter 24 timer ved TLC-FID, figur 23. At 1,2DAG og 2MAG er de eneste lipidklassene som dannes gjennom reaksjonen, kan forklares av at lipasen vises spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet, ettersom det ikke observeres 1MAG eller 1,3DAG. Dette er et avvik fra produsenten, Novo-nordisk deklarerer av lipasen som ikke-spesifikk. I kapittel 3.5.3 vises det til flere studier som underbygger produsentens deklarerer under støkiometrisk molar forhold etanol til olje. Imidlertid viser flere studier (Irimescu, Furihata et al. 2001; Torres, Hill et al. 2004; Piyatheerawong, Iwasaki et al. 2005; Lee, Choi et al. 2011) at ved et overskudd etanol viser lipasen spesifisitet mot sn-1,3 posisjonen. En studie (Watanabe, Nagao et al. 2009) viser at sn-1,3 spesifisiteten korrelerer lineært med polaritets indeksen til systemet, noe som tilsier at økt mengde etanol gir økt sn-1,3 spesifisitet.

Som forklart i kapittel 3.5.3 kan observert sn-1,3 spesifisiteten forklares av enten steriske hindringer knyttet til posisjonen på glyserolmolekylet eller fettsyre selektivitet. Sistnevnte kan utelukkes ettersom resultatene viser sn-1,3 spesifisitet både for etanolyse av sild- og selolje. Spesifisiteten kan derfor forklares av at steriske hindringer, hvor posisjon sn-2, har en mer hindret tilgjengelighet enn sn-1(3).

Fettsyrene EPA og DHA er i kapitel 3.2 funnet å være plassert i sn-1,3 posisjon ved >95% i selolje. Resultatene fra karbonylkarbonspekteret viser en reduksjon i signalet til DHA over tidsintervallet 0 til 2 timer, tilsvarende viser EPA reduksjon fra 0 til 0,5 time. EPA viser signal for etylester etter 0,5 time, mens DHA viser etylester signal etter 2 timer. Denne observasjonen kan forklares ved at lipasen viser større aktivitet mot EPA enn DHA når fettsyrene er plassert i sn-1,3 posisjon. Som nevnt i kapitel 3.5.3 er høyere aktivitet for EPA enn DHA er vist i flere studier (Haraldsson, Gudmundsson et al. 1995; Haraldsson, Halldorsson et al. 2000).

4 Fremtidig arbeid

Denne studien har vist at lipidprofilene til sild- og selolje er ulik både med hensyn til fettsyresammensetning og fettsyrenes posisjonering på glyserolmolekylet. Det anbefales derfor at fremtidige studier benytter tilsvarende metoder for å undersøke substratets sammensetning og posisjonering. Dette fordi sammensetningen og posisjoneringen gir grunnlaget for planlegging av eventuelle oppkonsentreringsforsøk ettersom lipasen viser spesifisitet mot sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet.

Temperaturoptimaliseringen viser at 60°C gir redusert dannelseshastighet som forklares av massetransportbegrensninger. Dette er begrensninger som er et resultat av at immobilisert lipase er benyttet. Ved fremtidige forsøk anbefales det å undersøke hvordan lipasen reagerer på ulike substratkonsentrasjoner og rørehastigheter. Dette er begge parametere som påvirker massetransportbegrensningen.

Endring i sammensetning av asylglyseroler i reaksjonsprogresjonen til støkiometriske betingelser og 50°C forklares av asylmigrering. Dette observeres ikke ved overskudd etanol og 30°C. Med hensyn til asylmigrering bør fremtidige studier analysere flere temperaturer og substratforhold for å studere årsaken til asylmigreringen.

5 Konklusjon

Sammensetning og posisjonering av fettsyrer er ulik i sild- og selolje. Omega-3 fettsyrer utgjør 16,2% (133,1 mg/g) i sildolje og 23,3% (194,9 mg/g) i selolje. I selolje er omega-3 fettsyrene EPA og DHA posisjonert med >95% i sn-1,3 posisjon. Sildeolje har DHA posisjonert >95% i sn-2 og EPA er posisjonert med 49% i sn-1,3 og 51% sn-2.

Optimalisering av etanollysereaksjonen på sildeolje viser at 50°C gir den høyeste etylester dannelseshastigheten med 27,3 areal%/time under støkiometriske betingelser. 30°C gir høyeste utbytte etylestere med 98,9 areal% etter 24 timer. Etanolens innvirkning på etanollysereaksjonen viser høyeste etylester dannelseshastighet ved overskudd etanol.

¹³C NMR analyser indikerer at lipasen viser spesifisitet for sn-1,3 posisjonene på glyserolmolekylet for både støkiometrisk og overskudd etanol. I selolje er det også vist at lipasen viser høyere aktivitet for fettsyren EPA enn DHA. 50°C viser endringer i asylglyserolsammensetningen som tilsier asylmigrering. Dette er ikke observert ved 30°C.

Appendiks A

Fettsyresammensetning, GC

Appendiks B

Temperatures innvirkning på etanollyse av sildeolje

Tabell 1 viser rådata for etanollyse reaksjonen til sideopile ved 30°C

AREAL PROSENT

Pøver nr	Tid (t)	Menge µL	TAG				MAG				EE								
			TA	g/snitt	STD avvik	STD feil	MA	g/snitt	STD avvik	STD feil	EE	g/snitt	STD avvik	STD feil					
x10	0	2	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x11	0.5	2	93,045	92,9455	0,18519629	0,09259815	2,664	2,69125	0,25965153	0,12982516	1,749	1,84675	0,06625393	0,03312697	2,011	2,335	2,37575	0,3205972	0,16152986
			93,13	92,9455	0,18519629	0,09259815	2,657	2,69125	0,25965153	0,12982516	1,877	1,84675	0,06625393	0,03312697	2,335	2,37575	0,3205972	0,16152986	
			92,707	92,9455	0,18519629	0,09259815	3,037	2,69125	0,25965153	0,12982516	1,895	1,84675	0,06625393	0,03312697	2,361	2,37575	0,3205972	0,16152986	
			92,9	92,9455	0,18519629	0,09259815	2,407	2,69125	0,25965153	0,12982516	1,866	1,84675	0,06625393	0,03312697	2,797	2,37575	0,3205972	0,16152986	
x12	1	2	80,521	82,187	1,22065798	0,56032898	6,204	5,425	0,5425468	0,27127734	2,423	2,40025	0,23115561	0,11557781	8,97	9,061	9,04725	0,0563464	0,0281732
			82,187	82,1225	1,22065798	0,56032898	5,424	5,425	0,5425468	0,27127734	2,16	2,40025	0,23115561	0,11557781	9,061	9,04725	0,0563464	0,0281732	
			82,988	82,1225	1,22065798	0,56032898	5,647	5,425	0,5425468	0,27127734	2,311	2,40025	0,23115561	0,11557781	9,053	9,04725	0,0563464	0,0281732	
			82,793	82,1225	1,22065798	0,56032898	4,894	5,425	0,5425468	0,27127734	2,707	2,40025	0,23115561	0,11557781	9,105	9,04725	0,0563464	0,0281732	
x13	2	2	66,886	66,50075	0,29073169	0,14536585	7,055	6,95	0,19865212	0,09932606	6,338	6,06	0,18833304	0,09416652	19,921	20,48	20,48925	0,4042632	0,20211316
			66,747	66,50075	0,29073169	0,14536585	6,765	6,95	0,19865212	0,09932606	6,008	6,06	0,18833304	0,09416652	20,48	20,48925	0,4042632	0,20211316	
			66,466	66,50075	0,29073169	0,14536585	6,803	6,95	0,19865212	0,09932606	5,968	6,06	0,18833304	0,09416652	20,763	20,48925	0,4042632	0,20211316	
			66,104	66,50075	0,29073169	0,14536585	7,177	6,95	0,19865212	0,09932606	5,936	6,06	0,18833304	0,09416652	20,793	20,48925	0,4042632	0,20211316	
x14	4	2	55,105	54,759	1,23079378	0,61539689	4,924	5,08225	0,20599737	0,10299869	4,933	4,6975	0,4668798	0,23334399	35,037	34,439	34,696	1,49142661	0,74571331
			55,001	54,759	1,23079378	0,61539689	5,323	5,08225	0,20599737	0,10299869	5,238	4,6975	0,4668798	0,23334399	34,439	34,696	1,49142661	0,74571331	
			53,017	54,759	1,23079378	0,61539689	5,184	5,08225	0,20599737	0,10299869	4,261	4,6975	0,4668798	0,23334399	36,455	34,696	1,49142661	0,74571331	
			55,913	54,759	1,23079378	0,61539689	4,898	5,08225	0,20599737	0,10299869	4,358	4,6975	0,4668798	0,23334399	32,853	34,696	1,49142661	0,74571331	
x15	6	2	51,742	52,2895	0,46079388	0,23039694	3,566	3,59575	0,18848585	0,09424293	3,051	3,13775	0,06815363	0,03407681	40,977	40,69	40,81075	0,17093542	0,08546771
			52,567	52,2895	0,46079388	0,23039694	3,556	3,59575	0,18848585	0,09424293	3,187	3,13775	0,06815363	0,03407681	40,69	40,81075	0,17093542	0,08546771	
			52,759	52,2895	0,46079388	0,23039694	3,405	3,59575	0,18848585	0,09424293	3,197	3,13775	0,06815363	0,03407681	40,639	40,81075	0,17093542	0,08546771	
			52,09	52,2895	0,46079388	0,23039694	3,856	3,59575	0,18848585	0,09424293	3,116	3,13775	0,06815363	0,03407681	40,937	40,81075	0,17093542	0,08546771	
x16	24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97,261	99,499	98,8625	1,0707625	0,53538125	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99,499	98,8625	1,0707625	0,53538125	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99,3	98,8625	1,0707625	0,53538125	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99,39	98,8625	1,0707625	0,53538125	

Tabell 3 viser rådata for etanollyse reaksjonert til sildedje ved 500C

AREAL PROSENT

Påvne nr	Tid (t)	TAG	G.snitt	STD avvik	STD feil	DAG	g.snitt	STD avvik	STD feil	MAG	g.snitt	STD avvik	STD feil	EE	g.snitt	STD avvik	STD feil	
x10	0	100	100			0				0				0				
		100	100			0				0				0				
		100	100			0				0				0				
		100	100			0				0				0				
x11	0,5	74,115				6,594				4,784				14,507				
		73,524				7,156				4,848				14,472				
		73,02	73,9075	0,828724	0,4443562	6,674	6,738	0,28498889	0,14249444	4,579	4,524	0,4418099	0,2205905	14,55	14,542	0,0721064	0,0360532	
		74,948				6,528				3,885				14,639				
x12	1	58,161				6,865				5,696				29,278				
		57,545				7,649				6,277				28,53				
		58,323	58,05125	0,3453234	0,1726617	7,909	7,59675	0,50680724	0,25340562	5,621	5,815	0,30953837	0,15476918	28,147	28,5375	0,5222654	0,2611827	
		58,176				7,964				5,666				28,195				
x13	2	36,379				6,159				4,496				52,966				
		32,899				6,597				5,198				55,306				
		32,717	34,13175	1,7062098	0,85301049	6,202	6,32125	0,19716047	0,09858023	4,707	4,70025	0,35574745	0,17787373	56,373	54,8465	1,42463481	0,7123714	
		34,532				6,327				4,4				54,741				
x14	4	11,23				4,087				2,452				82,232				
		11,603				4,153				2,76				81,384				
		11,097	11,303	0,21465613	0,10731806	3,863	4,03675	0,12420514	0,06210257	2,888	2,43175	0,23856847	0,11928424	82,056	82,02975	0,45923297	0,22961648	
		11,282				4,044				2,227				82,447				
x15	6	3,597				2,271				1,708				91,929				
		3,933				2,399				1,759				91,908				
		3,733	3,73525	0,14317908	0,07158954	2,52	2,29675	0,0686264	0,0343132	1,472	1,655	0,1266096	0,06333048	92,107	91,98625	0,0898123	0,04490615	
		3,678				2,265				1,687				92,001				
x16	24	0				1,481				1,518				97,001				
		0				1,601				1,631				96,649				
		0	0	0	0	1,732	1,60325	0,10254227	0,05127113	1,329	1,50125	0,12576267	0,06288134	95,754	96,423	0,53258677	0,26629338	
		0				1,599				1,527				96,288				

Tabell 4 viser rådata for etanollyse reaksjonen til sildedje ved 60°C

Påvø nr	Tid (t)	TAG	Gj.snitt	STD avvik	STD feil	DAG	Areal prosent		MAG	Gj.Snitt	STD avvik	STD feil	EE	Gj.Snitt	STD avvik	STD feil	
							gj.snitt	STD avvik									
X10	0	100	100			0			0				0				
		100	100	0		0			0				0				
		100	100	0		0			0				0				
		100	100	0		0			0				0				
X11	0,5	71,502	8,383			8,106		12,009					12,009				
		70,622	8,742			8,112		12,524					12,524				
		73,274	7,591	71,4725	1,28333248	0,64166624	8,41625	0,5977956	0,2988978	7,84575	0,70459084	0,35229542	12,331	12,2675	0,21664468	0,10832234	
		70,487	8,949			8,361		12,203						12,203			
		52,438	9,577			11,838		26,147						26,147			
X12	1	52,379	10,691			11,878		25,052					25,052				
		52,464	10,574	52,955	1,05659863	0,52829932	10,26775	0,50057459	0,25028729	11,465	0,70845089	0,3542545	25,223	25,3125	0,57936776	0,28968388	
		54,539	10,227			10,406		24,828						24,828			
		34,008	9,606			10,62		45,767						45,767			
		34,303	9,517	34,22075	0,18703364	0,09351682	9,63675	0,16108942	0,08052471	9,3075	0,93098102	0,46549051	46,21	46,54675	0,6723279	0,3362619	
X13	2	34,137	9,552			9,284		47,027					47,027				
		34,435	9,872			8,511		47,183					47,183				
		6,745	6,722			6,438		79,539						79,539			
		7,018	6,647			6,348		79,087						79,087			
X14	4	7,827	6,546			5,973		78,723					78,723				
		7,639	6,365	7,30725	0,50989827	0,25494914	6,57	0,15452508	0,07726254	6,2215	0,21099526	0,10549763	78,727	79,019	0,38639531	0,19319765	
		6,437	6,064			4,891		82,19						82,19			
		6,272	6,15			4,741		82,867						82,867			
X15	6	6,271	5,379	6,51	0,37487309	0,18743755	5,77075	0,39247707	0,19623853	4,57	0,30343149	0,15171574	83,918	83,05225	0,72119086	0,36059543	
		7,06	5,49			4,217		83,234						83,234			
		0	3,152			3,677		93,171						93,171			
X16	24	0	3,267			3,207		93,05					93,05				
		0	3,454	0		3,557		92,989					92,989				
		0	3,42125	0		3,5735		92,886					92,886				
		0	3,812	0		3,834		92,334						92,334			

Appendiks C

Etanolens mengdens innvirkning på etanollyse av sildeolje, TLC-FID

Tabell 1 viser rådata for etanol mengdens påvirkning av etanol/ise reaksjonen til sideolje ved diskontinuerlig tilsett av etanol.

AREAL PROSENT

Prøve nr	Tid (t)	TAG	G.snitt	STD avvik	SE	DAG	g.snitt	STD avvik	SE	MAG	g.snitt	STD avvik	SE	EE	G.snitt	STD avvik	SE
x10	0	98,964	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		97,627				0				0							
		99,507				0				0							
		98,739				0				0				0			
x11	0,5	90,672	91,9495	0,94485572	0,47242786	2,506	2,28	0,22590854	0,11295427	1,449	1,2555	0,13880082	0,06940041	3,823	4,08025	0,31173406	0,15586713
		92,681				1,994				4,534							
		91,797				2,406				3,991							
		92,648				2,214											
		85,689				2,52				8,29							
x12	1	86,217	86,1315	0,8626168	0,43118084	2,319	2,48175	0,28313763	0,14156881	1,183	1,31775	0,14883184	0,07441592	7,95	7,4905	0,70653356	0,35326678
		85,319				2,864				6,659							
		87,301				2,224				7,218							
		76,902				1,993				20,221							
		77,139				1,291				20,187							
x13	2	74,539	76,16325	1,1752388	0,58766294	1,496	1,41175	0,15862193	0,07931096	1,482	1,43025	0,1075372	0,0537686	21,995	20,8105	0,71538218	0,35769109
		76,073				1,267				21,239							
		31,556				2,387				62,821							
		34,826				1,978				61,44							
		27,289				2,533				68,525							
x14	4	30,6475	30,6475	3,2979406	1,64869703	2,39125	2,39125	0,27983611	0,13991806	1,416	1,49175	0,07960057	0,03980028	63,083	63,96725	3,12281202	1,56140601
		28,9				2,467											
		11,24				1,998				84,87							
		11,303				2,446				84,304							
x15	6	11,649	11,552	0,35779417	0,17889708	2,35325	2,35325	0,25605126	0,12802563	1,747	1,7835	0,15787231	0,07893616	81,14	83,5795	1,66549802	0,83274901
		12,016				2,376											
		0				1,981				84,87							
		0				1,947				84,304							
x16	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0,846	0,83725	0,07679138	0,03839569	99,154	98,17375	0,96568473	0,48184236
		0				0,745				96,864							
		0				0,922				98,505							
		0															

Tabell 2 viser rådata for etanol mengdens påvirkning av etanolanalyse reaksjonen til sildedole ved støkkometrisk forhold etanol.

AREAL PROSENT

Prove nr	Tid (t)	TAG			DAG			MAG			AREAL PROSENT		
		TA	Gj.snitt	STD avvik	DA	Gj.snitt	STD avvik	MA	Gj.snitt	STD avvik	EE	Gj.snitt	STD
x10	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100											
		100											
		100											
x11	0,5	74,115	73,90175	0,8287124	6,594	6,738	0,28498889	4,784	4,524	0,44118099	14,507	14,542	0,0
		73,524											
		73,02											
		74,948											
x12	1	58,161	58,05125	0,3453234	6,655	7,9675	0,50680724	5,696	5,815	0,30953837	29,278	28,5375	0,52
		57,545											
		58,323											
		58,176											
x13	2	36,379	34,13175	1,70602098	6,159	6,32125	0,19716047	4,996	4,70025	0,35574745	52,966	54,8465	1,42
		32,899											
		32,717											
		34,532											
x14	4	11,23	11,303	0,21463613	4,087	4,0875	0,12420514	2,452	2,43175	0,23856847	82,232	82,02975	0,45
		11,603											
		11,097											
		11,282											
x15	6	3,597	3,73525	0,14317908	2,271	2,29675	0,0686264	1,708	1,6565	0,12666096	91,929	91,98625	0,08
		3,933											
		3,733											
		3,678											
x16	24	0	0	0	1,481	1,60325	0,10054227	1,518	1,50125	0,12576267	97,001	96,423	0,53
		0											
		0											
		0											

Tabell 3 viser rådata for etanol mengdens påvirkning av etanol/ise reaksjonen til sideolje ved overskudd etanol.

AREAL PROSENT

Påvnr	Tid (t)	TAG	G.snitt	STD avvik	SE	DAG	g.snitt	STD avvik	SE	MAG	g.snitt	STD avvik	SE	EE	g.snitt	STD avvik	SE
x10	0	99,454	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		98,974				0				0				0			
		98,986				0				0				0			
		97,646				0				0				0			
x11	0,5	40,487	42,44025	1,5658012	0,78284006	19,666	17,833	1,39110196	0,69555998	10,402	10,0125	0,74923984	0,37461992	27,246	28,9495	1,59789205	0,79894602
		42,063				18,162				10,874				28,041			
		43,022				16,763				9,449				30,766			
		44,189				16,741				9,325				29,745			
		10,412				13,075				18,905				57,608			
x12	1	11,483	11,68725	1,37376281	0,6686814	12,971	13,1315	0,40439988	0,20218494	17,767	18,49775	1,03507725	0,51753863	57,779	56,68375	1,25247149	0,62762374
		11,223				12,772				19,769				56,237			
		13,631				13,708				17,55				55,111			
		0				3,336				19,436				76,267			
x13	2	0	0	0	0	2,907	3,08325	0,24131912	0,12065956	16,552	17,61375	1,30483061	0,6524153	79,653	78,74775	1,6552344	0,8276172
		0				2,849				17,664				79,487			
		0				3,241				16,803				79,584			
		0				0				6,762				90,012			
x14	4	0	0	0	0	7,782	7,6595	0,6166441	0,30833221	89,592	89,69925	0,32636521	0,1631826	89,904	89,289	0	0
		0				7,947				89,289				91,253			
		0				8,147				5,937				91,253			
		0				0				5,79				92,754			
x15	6	0	0	0	0	5,881	5,63225	0,47802048	0,23901024	94,119	93,30125	1,66572514	0,83286257	95,079	96,605	0	0
		0				4,921				96,605				96,356			
		0				0				2,66				96,356			
		0				0				2,654				97,346			
x16	24	0	0	0	0	2,771	2,51075	0,18391552	0,09195776	95,583	96,4725	0,7269436	0,3634718	0	0	0	0
		0				2,654				97,346				95,583			
		0				0				2,771				95,583			

Appendiks D

Enzymatisk etanolyse av selolje, TLC-FID

Tabell 1 viser rådata for etanollyse av selolje ved støkiometrisk forhold etanol og SiO₂

AREAL PROSENT

SEL 50 grader 3:1 wt

Påvne nr	Tid (t)	TAG	G/snitt	STD avvik	SE	DAG	g/snitt	STD avvik	SE	MAG	g/snitt	STD avvik	SE	EE	g/snitt	STD avvik	SE	
x10	0	99,587	0			0				0				0				
		98,789	0			0				0				0				
		98,345	0			0				0				0				
		99,143	0			0				0				0				
x11	0,5	39,546	17,536	0		8,999				29,346				29,346				
		40,098	18,024	0		9,789				28,932				28,932				
		40,249	16,769	0		9,456				30,016				30,016				
		40,657	17,678	0		9,725				29,213				29,213				
x12	1	11,425	12,983	0		17,893				56,987				56,987				
		11,897	12,632	0		17,984				57,392				57,392				
		11,012	12,89	0		18,736				57,071				57,071				
		12,056	13,098	0		18,563				54,013				54,013				
x13	2	0	3,098	0		18,024				77,177				77,177				
		0	4,509	0		17,533				77,479				77,479				
		0	3,789	0		17,346				78,865				78,865				
		0	4,095	0		17,035				78,096				78,096				
x14	4	0	0	0		7,097				91,035				91,035				
		0	0	0		7,658				89,987				89,987				
		0	0	0		7,392				90,025				90,025				
		0	0	0		8,091				90,467				90,467				
x15	6	0	0	0		4,998				93,547				93,547				
		0	0	0		5,319				92,693				92,693				
		0	0	0		5,372				94,628				94,628				
		0	0	0		4,928				95,072				95,072				
x16	24	0	0	0		2,578				97,422				97,422				
		0	0	0		2,667				96,944				96,944				
		0	0	0		2,476				97,524				97,524				
		0	0	0		2,398				97,602				97,602				

Tabell 2 viser rådata for etanollyse av selje med overskudd etanol og 30°C.

AREAL PROSENT

Prove nr	Tid (t)	TAG				MAG												
		gj.snitt	STD avvik	STD feil	DAG	gj.snitt	STD avvik	STD feil	EE									
x10	0	99,233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
		100			99,53075				0,32944638				0,16472319	0	0	0		
		99,477																
		99,413																
x11	0,5	73,509	72,427	0,74248412	0,37124206	12,226	13,33825	1,25078865	0,62539433	2,755	2,483	2,7555	0,20652607	0,10331304	11,51	11,59725	0,91201147	0,45600573
		72,295				12,319				2,801					11,13			
		71,867				14,674				2,983								
		72,037				14,134												
		19,207				21,422				16,886					42,484			
x12	1	18,06	19,19175	1,34029558	0,67014779	20,917	20,651	0,81146082	0,40573041	17,773	16,65175	1,13189704	0,56594852	43,25	42,9435	0,82144973	0,41072487	
		18,43				20,754				16,872				43,944				
						19,511				15,076				42,096				
						10,248				25,333				61,942				
x13	2	0	0	0	0	11,004	10,97925	0,57128856	0,28562428	26,91	25,57225	0,92303246	0,46151623	62,086	62,8295	0,94580671	0,47290336	
		0				11,644				24,793				63,564				
		0				11,021				25,253				63,726				
		0				0				24,299				75,701				
		0				0				22,442				73,154				
x14	4	0	0	0	0	22,575	0	0	0	22,9975	22,99975	0,87224323	0,43612161	77,425	75,58075	1,7812457	0,89062285	
		0				22,679				76,043								
		0				18,993				81,007								
		0				19,097				80,903								
x15	6	0	0	0	0	20,747	0	0	0	19,3175	19,3175	0,99661611	0,49830805	79,253	80,6825	0,99661611	0,49830805	
		0				18,433				81,567								
		0				2,982				97,018								
		0				3,188				96,812								
x16	24	0	0	0	0	2,942	0	0	0	2,97275	2,97275	0,16822876	0,08411438	96,662	96,7085	0,28459738	0,14229869	
		0				2,779				96,342								
		0																

Tabell 2 viser rådata for etanollyse av seie olje med overskudd etanol og 50°C.

AREAL PROSENT

Prøve nr	Tid (t)	TAG	G.snitt	STD avvik	STD feil	DAG	G.snitt	STD avvik	STD feil	MAG	G.snitt	STD avvik	STD feil	EE	G.snitt	STD avvik	STD feil
x10	0	99,587	98,966	0,52723809	0,26361904	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		98,789				0				0							
		98,345				0				0							
		99,143				0				0							
x11	0,5	39,546	40,1375	0,45961759	0,2298088	17,536	17,50175	0,52974986	0,26487493	8,999	9,48725	0,35990404	0,17995202	29,346	29,37675	0,45978355	0,22989178
		40,098				18,024				9,789				28,932			
		40,249				16,769				9,456				30,016			
		40,657				17,678				9,725				29,213			
x12	1	11,425	11,5975	0,47345855	0,23672928	12,983	12,90075	0,19833873	0,09916396	17,893	18,294	0,41818098	0,20909049	56,987	56,36575	1,57817941	0,7890897
		11,897				12,632				17,984				57,392			
		11,012				12,89				18,736				57,071			
		12,056				13,098				18,563				54,013			
x13	2	0	0	0	0	3,098	3,87275	0,59482792	0,29741396	18,024	17,4845	0,41418394	0,20709197	77,177	77,90425	0,7459793	0,37299897
		0				4,509				17,533				77,479			
		0				3,789				17,346				78,865			
		0				4,095				17,035				78,096			
x14	4	0	0	0	0	7,097	7,5595	0,42196248	0,21098124	91,035	90,3785	0,48886538	0,24444819	91,035	90,3785	0,48886538	0,24444819
		0				7,658				89,987				89,987			
		0				7,392				90,025				90,025			
		0				8,091				90,467				90,467			
x15	6	0	0	0	0	4,988	5,15425	0,22372658	0,11886329	93,547	93,985	1,07333219	0,5366661	93,547	93,985	1,07333219	0,5366661
		0				5,319				92,693				92,693			
		0				5,372				94,628				94,628			
		0				4,928				95,072				95,072			
x16	24	0	0	0	0	2,578	2,52975	0,11749149	0,05874574	97,422	97,373	0,29534387	0,14767193	97,422	97,373	0,29534387	0,14767193
		0				2,667				96,944				96,944			
		0				2,476				97,524				97,524			
		0				2,398				97,602				97,602			

Appendiks E

Enzymatisk etanolyse av sild- og selolje ved støkiometrisk etanol forhold og 50°C, ¹³C NMR

Tabell 1 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av sildeolje under støkiometrisk forhold og 50°C

Tid (timer)	Kjemisk skift verdi (ppm)							
	0	0,5	1	2	4	6	24	
Ehyl ester	-	60,15-60,27	60,15 - 60,27	60,13 - 60,28	60,07	60,07 - 60,24	60,08- 60,24	
1,2DAG sn-1	-	61,34- 61,38	61,27- 61,35	61,33- 61,40	-	-	-	
TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	62,03 - 62,28	62,03- 62,25	62,03 - 62,28	62,00 - 62,29	62,00 - 62,20	62,06 - 62,18	-	
1MAG sn-1	-	-	-	-	63,83	63,83	63,83	
1,3DAG sn-1,3	-	-	-	-	-	-	65,08	
1MAG sn-3	-	-	-	-	-	65,2	65,2	
TAG sn-2	68,85 - 69,18	68,85 - 69,17	68,87 - 69,17	68,87 - 69,17	68,90 - 68,98	-	-	
1MAG sn-2	-	-	-	-	70,26	70,26	70,26	
1,2DAG sn-2	-	72,14	72,14	72,14	-	-	-	
2MAG sn-2	-	74,9	74,9	74,9	-	-	-	

Tabell 3 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av seløje under støkiometrisk forhold og 50oC

Tid (timer)	Kjemisk skift verdi (ppm)						
	0	0,5	1	2	4	6	24
Etyl ester	-	60,06-60,39	60,06-60,39	60,06-60,39	60,06-60,39	60,00-60,39	59,96-60,34
1,2DAG-sn-1	-	61,24-61,33	61,24-61,33	61,24-61,33	61,24-61,33	61,31-61,43	-
TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	-
1MAG sn-1	-	-	-	-	-	-	63,31
1,3DAG sn-1,3	-	-	-	-	-	-	65
1MAG sn-3	-	-	-	-	-	-	65,12
TAG sn-2	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	68,80 - 69,00	-
1MAG sn-2	-	-	-	-	-	70,21	70,21
1,2DAG sn-2	-	72,12	72,12	72,12	72,12	-	-
2MAG sn-2	-	74,89	74,89	74,89	74,89	74,89	-

Tabell 4 Skift verdier observert i karbonylkarbon spekteret til etanollyse av selolje under støkiometrisk forhold og 500C

Tid (t)	Kjemisk skift verdi (ppm)							
	0	0,5	1	2	4	6	24	
22:6 sn-2	-	-	-	-	-	-	-	
22:6 sn-1,3	172,577	172,577	172,577	172,577	172,577	172,577	-	
20:5 sn-2	-	-	-	-	-	-	-	
18:4 sn-2	-	-	-	-	-	-	-	
Mettede og enummettede fettsyrer sn-2	172,85 - 172,93	172,85 - 172,93	172,85 - 172,93	172,85 - 172,93	172,85 - 172,93	172,86 - 172,89	-	
20:5 sn-1,3	173,05	173,05	173,05	-	-	-	-	
18:4 sn-1,3	173,11	173,11	-	-	-	-	-	
Etylster 22:6	-	-	-	173,16	173,16	173,16	173,16	
22:5 sn-1,3	173,2	173,2	-	-	-	-	-	
20:4 sn1,3	173,24	173,24	173,24	173,24	-	-	-	
Mettede og enummettede fettsyrer sn-1,3	173,27 - 173,36	173,27 - 173,36	173,27 - 173,36	173,27 - 173,36	173,27 - 173,36	173,22 - 173,36	-	
Etylster 20:5	-	173,68	173,68	173,68	173,66	173,66	173,66	
Etylster 18:4	-	173,75	173,75	173,75	173,74	173,74	173,74	
Etylster 22:5	-	-	173,87	173,87	173,83	173,83	173,83	
Etylster 20:4	-	173,91	173,91	173,91	173,88	173,88	173,88	
Etylster mettede og enummettede fettsyrer	-	173,94 - 174,04	173,94 - 174,04	173,94 - 174,04	173,90 - 174,04	173,90 - 174,00	173,90 - 174,00	

Appendiks F

Enzymatisk etanolyse av sild- og selolje ved overskudd etanol og 30°C, ¹³C NMR

Tabell 1 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av sildeolje under overskudd etanol og 30oC. Teknisk analysefeil etter 2 timer er merket rødt.

Tid (timer)	Kjemisk skift verdi (ppm)						
	0	0,5	1	2	4	6	24
Etyl ester	-	60,06-60,39	60,06-60,39	-	60,06-60,39	60,00-60,39	59,96-60,34
1,2DAG-sn-1	-	61,24-61,33	61,24-61,33	-	61,24-61,33	61,31-61,43	-
TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	61,75 - 62,04	61,75 - 62,04	61,89	-	-	-	-
1MAG sn-1	-	-	-	-	-	-	-
1,3DAG sn-1,3	-	-	-	-	-	-	-
1MAG sn-3	-	-	-	-	-	-	-
TAG sn-2	68,84 - 69,11	68,74 - 68,97	68,86	-	-	-	-
1MAG sn-2	-	-	-	-	-	-	-
1,2DAG sn-2	-	71,83	71,92	-	-	-	-
2MAG sn-2	-	74,78	74,83	-	74,83	74,83	-

Tabell 2 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av sildeolje under overskudd etanol og 30oC. Teknisk analysefeil etter 2 timer er merket rødt.

Tid (t)	Kjemisk skift verdi (ppm)						
	0	0,5	1	2	4	6	24
22:6 sn-2	172,08	172,06	-	-	-	-	-
22:6 sn-1,3	-	-	-	-	-	-	-
20:5 sn-2	172,59	172,59	172,59	-	-	-	-
18:4 sn-2	172,64	-	-	-	-	-	-
Mettede og enumettede fettsyrer sn-2	172,76 - 172,88	172,76 - 172,88	172,80 - 172,85	-	-	-	-
20:5 sn-1,3	172,97	-	-	-	-	-	-
18:4 sn-1,3	173,03	-	-	-	-	-	-
Etylester 22:6	-	-	173,1	-	173,1	173,1	173,1
Mettede og enumettede fettsyrer sn-1,3	173,15 - 173,29	173,15 - 173,29	173,15 - 173,29	-	-	-	-
Etylester 20:5	-	173,79	173,79	-	173,79	173,79	173,79
Etylester 18:4	-	173,88	173,91	-	173,91	173,91	173,91
Etylester mettede og enumettede fettsyrer	-	174,01 - 174,11	174,01 - 174,11	-	174,01 - 174,11	174,01 - 174,11	174,01 - 174,11

Tabell 3 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av seløje under overskudd etanol og 30oC. Teknisk analysefeil etter 1 time er merket rødt.

Tid (timer)	Kjemisk skift verdi (ppm)						
	0	0,5	1	2	4	6	24
Etyl ester	-	60,06-60,39	-	60,06-60,39	60,06-60,39	60,00-60,39	59,96-60,34
1,2DAG-sn-1	-	61,24-61,33	-	61,24-61,33	61,24-61,33	61,31-61,43	-
TAG sn-1,3 (1,2DAG sn-3)	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	-	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	62,00 - 62,36	-
1MAG sn-1	-	-	-	-	-	-	63,31
1,3DAG sn-1,3	-	-	-	-	-	-	65
1MAG sn-3	-	-	-	-	-	-	65,12
TAG sn-2	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	-	68,60 - 69,00	68,60 - 69,00	68,80 - 69,00	-
1MAG sn-2	-	-	-	-	70,21	70,21	70,21
1,2DAG sn-2	-	72,12	-	72,12	72,12	-	-
2MAG sn-2	-	74,89	-	74,89	74,89	74,89	-

Tabell 4 Skift verdier observert i glyserolkarbon spekteret til etanollyse av selolje under overskudd etanol og 30oC. Teknisk analysefeil etter 1 time er merket rødt.

Tid (t)	Kjemisk skift verdi (ppm)						
	0	0,5	1	2	4	6	24
22:6 sn-2	-	-	-	-	-	-	-
22:6 sn-1,3	172,43	172,43	-	172,43	-	-	-
20:5 sn-2	-	-	-	-	-	-	-
18:4 sn-2	-	-	-	-	-	-	-
Mettede og enummettede fettsyrer sn-2	172,73 - 172,80	172,73 - 172,80	-	172,76	-	-	-
20:5 sn-1,3	173,05	173,05	-	-	-	-	-
18:4 sn-1,3	172,99	172,99	-	-	-	-	-
22:5 sn-1,3	173,06	-	-	-	-	-	-
20:4 sn1,3	173,11	-	-	-	-	-	-
Mettede og enummettede fettsyrer sn-1,3	173,12 - 173,21	173,14 - 173,22	-	-	-	-	-
Eylester 22:6	-	-	-	173,2	173,2	173,2	173,2
Eylester 20:5	-	173,75	-	173,75	173,75	173,75	173,75
Eylester 18:4	-	173,83	-	173,83	173,83	173,83	173,83
Eylester 22:5	-	-	-	173,91	173,91	173,91	173,91
Eylester 20:4	-	173,96	-	173,96	173,96	173,96	173,96
Eylester mettede og enummettede fettsyrer	-	173,99 - 174,06	-	173,98 - 174,07	173,98 - 174,07	173,98 - 174,07	173,98 - 174,07

Referanser

Aidos, I., A. van der Padt, et al. (2001). "Upgrading of Maatjes Herring Byproducts: Production of Crude Fish Oil." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3697-3704.

Aidos, I., A. van der Padt, et al. (2002). "Seasonal Changes in Crude and Lipid Composition of Herring Fillets, Byproducts, and Respective Produced Oils." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(16): 4589-4599.

Akoh, C. C. (2006). "Handbook of functional lipids." 525 s. .

Akoh, C. C. and D. B. Min (2008). "Food lipids : chemistry, nutrition, and biotechnology." (3rd ed): xiii, 914 s. .

Analysesysteme, S. G. " Chart MK6 FID/FPD." 2013, from http://www.ses-analysesysteme.de/IATROSCAN_UK.htm.

Ando, Y., S. Kobayashi, et al. (2004). "Positional distribution of n-3 highly unsaturated fatty acids in triacyl-sn-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG." Aquaculture **229**(1-4): 275-288.

Ando, Y., K. Nishimura, et al. (1992). "Stereospecific analysis of fish oil triacyl-sn-glycerols." Journal of the American Oil Chemists' Society **69**(5): 417-424.

Aursand, M. and H. Grasdalen (1992). "Interpretation of the ¹³C-NMR spectra of omega-3 fatty acids and lipid extracted from the white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Chemistry and Physics of Lipids **62**(3): 239-251.

Aursand, M., H. Grasdalen, et al. (1993). "Quantitative high-resolution ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance of ω3 fatty acids from white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." S. 971-981

Aursand, M., L. Jørgensen, et al. (1995). "Positional distribution of ω3 Fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy." Journal of the American Oil Chemists' Society **72**(3): 293-297.

Aursand, M., I. B. Standal, et al. (2007). "High-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy pattern recognition of fish oil capsules." S. [38]-47

Belton, P. S., S. B. Engelsen, et al. (2005). "Magnetic resonance in food science: the multivariate challenge." 1 online resource (ix, 238 s.)

Breivik, H. (2007). Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, Oily Press.

Breivik, H., G. Haraldsson, et al. (1997). "Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid." Journal of the American Oil Chemists' Society **74**(11): 1425-1429.

Brockerhoff, H., R. J. Hoyle, et al. (1968). "Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals." Lipids **3**(1): 24-29.

Chesterfield, D. M., P. L. Rogers, et al. (2012). "Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase." Chemical Engineering Journal **207-208**(0): 701-710.

Compton, D., K. Vermillion, et al. (2007). "Acyl Migration Kinetics of 2-Monoacylglycerols from Soybean Oil via ¹H NMR." Journal of the American Oil Chemists' Society **84**(4): 343-348.

Crane, R. T., S. Goheen, et al. (1983). "Complexities in lipid quantitation using thin layer chromatography for separation and flame ionization for detection." Lipids **18**(1): 74-80.

Damodaran, S., K. Parkin, et al. (2008). Fennema's food chemistry. Boca Raton, Taylor & Francis.

Doran, P. M. (2012). "Bioprocess Engineering Principles." (2nd ed): 1 online resource (928 s.).

Fraser, A. J., D. R. Tocher, et al. (1985). "Thin-layer chromatography — flame ionization detection and the quantitation of marine neutral lipids and phospholipids." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **88**(1): 91-99.

Freedman, B., E. H. Pryde, et al. (1984). "Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils." Journal of the American Oil Chemists Society **61**(7): 1215-1220.

Fureby, A. M., C. Virto, et al. (1996). "Acyl group migrations in 2-monoolein." Biocatalysis and Biotransformation **14**(2): 89-111.

Gottlieb, H. E., V. Kotlyar, et al. (1997). "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities." The Journal of Organic Chemistry **62**(21): 7512-7515.

Greibrokk, T., E. Lundanes, et al. (2005). Kromatografi. Oslo, Pensumtjeneste.

Gunstone, F. D. (1991). "High resolution NMR studies of fish oils." Chemistry and Physics of Lipids **59**(1): 83-89.

Gunstone, F. D. (2001). "Structured and modified lipids." x, 547 s. .

- Gunstone, F. D. and S. Seth (1994). "A study of the distribution of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid between the α and β glycerol chains in fish oils by ^{13}C -NMR spectroscopy." Chemistry and Physics of Lipids **72**(2): 119-126.
- Han, M. H. (1972). "Non-linear Arrhenius plots in temperature-dependent kinetic studies of enzyme reactions: I. Single transition processes." Journal of Theoretical Biology **35**(3): 543-568.
- Haraldsson, G., A. Halldorsson, et al. (2000). "Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids." Journal of the American Oil Chemists' Society **77**(11): 1139-1145.
- Haraldsson, G., B. Kristinsson, et al. (1997). "The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol." Journal of the American Oil Chemists' Society **74**(11): 1419-1424.
- Haraldsson, G. G. (1999). The application of lipase for preparing various lipids enriched with omega-3 fatty acids. Rit Fiskideildar 9.
- Haraldsson, G. G., B. Ö. Gudmundsson, et al. (1995). "The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase." Tetrahedron **51**(3): 941-952.
- Helbæk, M. and P. A. Godejord (2001). "Statistikk for kjemikere." 296 s. .
- Helsedirektoratet, S.-o. (2005). "Norske anbefalinger for ernæring og fysisk aktivitet."
- Hernández-Martín, E. and C. Otero (2008). "Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM." Bioresource Technology **99**(2): 277-286.
- Hou, C. T. (2005). "Handbook of industrial biocatalysis." 616 s. .
- Indrasena, W. M., K. Henneberry, et al. (2005). "Qualitative and Quantitative Analysis of Lipid Classes in Fish Oils by Thin - Layer Chromatography with an Iatroscan Flame Ionization Detector (TLC - FID) and Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector (LC - ELSD)." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **28**(16): 2581-2595.
- Irimescu, R., K. Furihata, et al. (2001). "Two-Step Enzymatic Synthesis of Docosahexaenoic Acid-Rich Symmetrically Structured Triacylglycerols *via* 2-Monoacylglycerols." AOCS Press **78**(7): 743-748.
- Irimescu, R., K. Furihata, et al. (2001). "Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of

1,3-dicapryloyl-2-docosaheptaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol." Journal of the American Oil Chemists' Society **78**(3): 285-290.

Irimescu, R., Y. Iwasaki, et al. (2002). "Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG." Journal of the American Oil Chemists' Society **79**(9): 879-883.

Jacobsen, E. E. (2004). "Synthesis of enantiopure building blocks for biologically active compounds by enzyme catalysis : optimization of reaction conditions for increased enantioselectivity and activity." **2004:50**.

Avhandling (dr. scient.) - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, Trondheim, 2004

Jaeger, K.-E. and M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." Trends in Biotechnology **16**(9): 396-403.

Kodali, D. R., A. Tercyak, et al. (1990). "Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol." Chemistry and Physics of Lipids **52**(3-4): 163-170.

Lee, B.-M., J.-H. Choi, et al. (2011). "Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil via lipase-catalyzed ethanolysis with an immobilized *Candida antarctica* lipase." Biocatalysis and Biotransformation **29**(4): 155-160.

Lu, Y., S. A. Ludsin, et al. (2008). "Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **65**(10): 2233-2241.

Løvås, G. G. (2004). "Statistikk for universiteter og høyskoler." (2. utg.): XIII, 489 s. : ill.

Malcata, F. X., H. R. Reyes, et al. (1992). "Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases." Enzyme and Microbial Technology **14**(6): 426-446.

Maruyama, T., M. Nakajima, et al. (2000). "Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid." Journal of the American Oil Chemists' Society **77**(11): 1121-1127.

McNair, H. M. and J. M. Miller (2009). "Basic gas chromatography." (2nd ed): xiii, 239 s. .

McNaught, A. D. and A. Wilkinson (1997). "Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations." (2nd ed.): VII, 450 s. : ill.

Metcalf, L. D., A. A. Schmitz, et al. (1966). "Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis." Analytical Chemistry **38**(3): 514-515.

- Miller, J. M. (2005). "Chromatography: concepts and contrasts." (2nd ed.): XXVI, 490 s. .
- Murty, V. R., J. Bhat, et al. (2002). "Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review." Biotechnology and Bioprocess Engineering **7**(2): 57-66.
- Nardini, M. and B. W. Dijkstra (1999). " α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing." Current Opinion in Structural Biology **9**(6): 732-737.
- Piyatheerawong, W., Y. Iwasaki, et al. (2005). "Direct separation of regio- and enantiomeric isomers of diacylglycerols by a tandem column high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1068**(2): 243-248.
- Poole, C. F. (2012). "Gas chromatography." VIII, 743 s. .
- Rajendran, A., A. Palanisamy, et al. (2009). "Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries." Brazilian Archives of Biology and Technology **52**: 207-219.
- Ratnayake, W. N. and R. G. Ackman (1979a). "Fatty alcohols in capelin, herring and mackerel oils and muscle lipids: I. Fatty alcohol details linking dietary copepod fat with certain fish depot fats." Lipids **14**(9): 795-803.
- Sacchi, R., I. Medina, et al. (1993). "Quantitative high-resolution carbon-13 NMR analysis of lipids extracted from the white muscle of Atlantic tuna (*Thunnus alalunga*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(8): 1247-1253.
- Schäfer, H. J. (1997). "Fatty Acid and Lipid Chemistry. Edited by F. Gunstone. 252 pages, Blackie Academic & Professional, 1996. ." Lipid / Fett **99**(12): 449-449.
- Shahidi, F. and U. N. Wanasundara (1998). "Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies." Trends in Food Science & Technology **9**(6): 230-240.
- Shantha, N. C. (1992). "Thin-layer chromatography-flame ionization detection Iatroscan system." Journal of Chromatography A **624**(1-2): 21-35.
- Shi, J., C.-T. Ho, et al. (2005). "Asian functional foods." xxi, 647 s. .
- Silverstein, R. M., F. X. Webster, et al. (2005). "Spectrometric identification of organic compounds." (7th ed): 1 online resource (x, 502 s.) : ill.
- Society, A. O. C. and D. Firestone (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, AOCS.
- Standal, I. B. (2009). "Use of NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques for elucidation of origin and adulteration of foodstuffs." **2009:114**.

Avhandling (ph.d.) - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet,
Trondheim, 2009

Suárez, E., P. Mugford, et al. (2010). "13C-NMR Regioisomeric Analysis of EPA and DHA in Fish Oil Derived Triacylglycerol Concentrates." Journal of the American Oil Chemists' Society **87**(12): 1425-1433.

Suplatov, D. A., W. Besenmatter, et al. (2012). "Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities." Protein Engineering Design and Selection.

Taylor, J. R. (1997). "An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements." (2nd ed.): XVII, 327 s. : ill.

Tischer, W. and F. Wedekind (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. Biocatalysis - From Discovery to Application. W.-D. Fessner, A. Archelas, D. C. Demirjian et al, Springer Berlin Heidelberg. **200**: 95-126.

Torres, C. F., C. G. Hill, et al. (2004). "Lipase-catalyzed ethanolysis of borage oil: a kinetic study." Biotechnol Prog **20**(3): 756-763.

Uppenberg, J., M. T. Hansen, et al. (1994). "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*." Structure **2**(4): 293-308.

Uppenberg, J., N. Oehrner, et al. (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." Biochemistry **34**(51): 16838-16851.

Vitenskapskomiteen for, m. (2011). "Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils : opinion of Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety." 147 s. .

Vitenskapskomiteen for, m. (2011). "Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods : opinion of the Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety." 88 s. .

Wanasundara, U. and F. Shahidi (1998). "Concentration of ω -3 polyunsaturated fatty acids of marine oils using *Candida cylindracea* lipase: Optimization of reaction conditions." Journal of the American Oil Chemists' Society **75**(12): 1767-1774.

Watanabe, Y., T. Nagao, et al. (2009). "Control of the regiospecificity of *Candida antarctica* lipase by polarity." New Biotechnology **26**(1-2): 23-28.

Watanabe, Y., Y. Shimada, et al. (1999). "Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase." Journal of Bioscience and Bioengineering **88**(6): 622-626.

Xin, J.-y., L.-l. Chen, et al. (2011). "Lipase-catalyzed transesterification of ethyl ferulate with triolein in solvent-free medium." Food and Bioproducts Processing **89**(4): 457-462.

Xin, J. y., L. l. Chen, et al. (2011). "Lipase-catalyzed transesterification of ethyl ferulate with triolein in solvent-free medium." fbio **89**(4): 6-6.

Xu, X. (2003). "Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis." European Journal of Lipid Science and Technology **105**(6): 289-304.

Yadav, G. D. and A. H. Trivedi (2003). "Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media." Enzyme Microb Technol **32**(7): 7-7.