



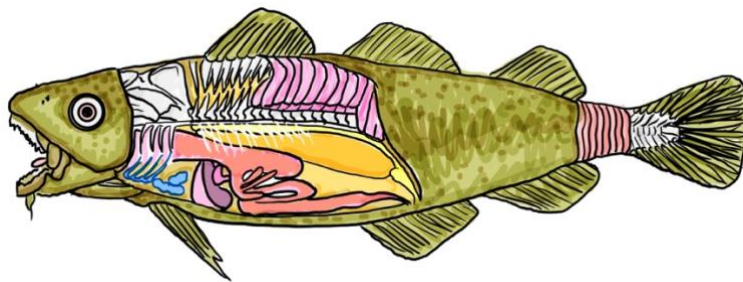
NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2021

20 studiepoeng

Bærekraftig utnyttelse av restråstoff fra torsk (*Gadus morhua*) – effekt av ulike lagringsbetingelser og sortering på oljekvalitet ved termisk prosessering



Utført av

Isa-Lill Wangbergtrø

Hedda Sofie Landa

Veiledere

Eva Falch

Line Skontorp Meidell

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matteknologi ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av oppgavens innhold skjer på eget ansvar.

Sammendrag

I denne bacheloroppgaven ble det sett nærmere på utnyttelse av restråstoff fra villfanget Atlantisk torsk (*Gadus morhua*). Mer spesifikt ble det sett på uthenting av olje fra innmat fra torsk, og dens kvalitet. Lever fra torsk består av 50-70% fett, og inneholder store mengder omega-3 fettsyrer. Det ble undersøkt hvorvidt olje kan ekstraheres direkte fra all innmaten, eller om det er nødvendig å utsortere lever for å kunne bevare god kvalitet.

Restråstoff, henholdsvis lever og innmat fra torsk, ble etter fangst kjølelagret til 4 °C, og prosessert og fryst ned etter 0, 1, 2, 3 og 6 dager. Lever fra torsk ble også fryst ned til -20 °C like etter fangst og prosessert først etter 6, 8 og 10 uker etter nedfrysning. Olje ekstrahert fra de ulike prøvene ble analysert for primære- og sekundære oksidasjonsprodukter, frie fettsyrer og farge, samt oljens fettsyresammensetning. Restråstoffet brukt i de ulike prøvene ble også analysert for totalt lipidinnhold.

Det totale lipidinnholdet i torsk var 45,5-52,1%, og mesteparten av fettene var mulig å uthente ved termisk separering. Fettsyresammensetningen viste at det var ca. 21% omega-3 fettsyrer i prøvene fra innmat og 25-30% omega-3 fettsyrer i prøvene fra lever. Oljenes farge ble mer intens over lagringstiden, og var spesielt intens for prøver med innmat.

Resultatene har vist at både kjøle- og frysning av Atlantisk torsk kan benyttes før termisk separering, for å oppnå olje av god kvalitet. Best kvalitet var på olje uthentet fra kjølelagret lever som ble prosessert samme dag som fangst. Ved kjølelagring vil det være mulig å ekstrahere olje hvor lever ikke er sortert ut fra innmaten, men her bør uthenting av olje skje inntil tre dager etter fangst, dersom en raffineringssprosess ikke er ønskelig. Det var ingen signifikant forskjell mellom olje fra lever og olje fra innmat for analyse av oksidasjonsprodukter ved kjølelagring i 0, 1, 2, 3 og 6 dager.

Dersom lever fra torsk ikke kan prosesseres innen 6 dager kan det fryslegres. Alle de analyserte prøvene ved frysning i 6, 8 og 10 uker var under grenseverdiene for kvalitetsforringende parametre.

Abstract

This bachelor thesis focused on the utilization of residual raw material from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua*). More specifically extraction of viscera oil from cod and determining the quality of the oil. Liver from cod consists of 50-70% fat and contains relatively large amounts of omega-3 fatty acids. It was investigated whether oil can be extracted directly from the viscera, or whether it is necessary to sort out the liver in order to maintain good quality.

Residual raw material, liver from cod and viscera from cod, was refrigerated and stored at 4 ° C immediately after capture, for 0, 1, 2, 3 and 6 days until processing. Liver from cod was also frozen down to -20 ° C immediately after capture and processed after 6, 8 and 10 weeks. Oil extracted from the various samples were analyzed for primary and secondary oxidation products, free fatty acids and color, as well as the oil's fatty acid composition. The residual raw material was also analyzed for total lipid content.

Liver from cod had a lipid content of 45.5-52.1% from lipid extraction by the Bligh and Dyer method, and large parts of the lipid content was possible to obtain by thermal separation. The fatty acid composition showed approximately 21% omega-3 fatty acids in the samples with viscera and 25-30% omega-3 fatty acids in the samples from the cod liver. The color of the oils from all the samples became more intense during storage time and was especially intense for oil samples from viscera.

The results showed that both refrigerated storage and frozen storage could be used before thermal separation to produce good quality oil. The best quality was found in oil extracted from refrigerated stored liver which was processed on the same day as it was caught. If oil is extracted from viscera, the results showed that processing should take place within three days of cold storage after capture. There was no significant statistical difference between oil from liver and oil from viscera for analysis of oxidation products. If extraction of oil from cod liver within 6 days isn't possible, then the results show that it is better to freeze the livers. All the analyzed samples during frozen storage for 6, 8 and 10 weeks were below the limits for quality acceptable for human consumption.

Forord

Arbeidet med denne bacheloroppgaven har blitt utført ved NTNUs laboratorier, Kalvskinnet og Gløshaugen i perioden 08.03.21-19.05.21. Bacheloroppgaven er en del av et større prosjekt hvor SINTEF Ocean har prosjektledelsen, og NTNU leder en arbeidspakke (kalt WP2). Prosjektets tittel er SUPREME (Sustainable production of ingredients from whitefish rest raw materials), og har som effektmål å styrke verdiskaping i norsk hvitfiskindustri, samt øke bærekraftig utnyttelse av restråstoff fra den havgående fiskeflåten. Bacheloroppgaven vil bidra til arbeidspakken (WP2) som angår råstoffbehandling, lagring og konservering. Ved å undersøke hvilke faktorer som kan påvirke kvaliteten og konservering av restråstoffet vil resultatene fra bacheloroppgaven kunne bidra til å nå effektmålene.

Vi vil gjerne takke de dyktige veilederne i denne prosjektet, Eva Falch (hovedveileder) og Line Skontorp Meidell (medveileder). En stor takk til Maria Alquiza Madina som har vært til hjelp med veiledning innenfor alt fra laboratoriearbeid til rapportskrivning.

Forkortelser

AV – p-anisidinverdi

DHA – dokosaheksaensyre

EPA – eikosapentaensyre

GC-MS – gas-chromotography mass spetrometry

PV – peroksidverdi

TBARS – 2-thiobarbituric acid reactive substances (thiobarbitursyre-reaktive substanser)

TOTOX – total oksidasjon

n-3 – omega 3 fettsyre

KI – konfidensintervall

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
2	Teoretisk bakgrunn.....	3
2.1	Verdikjeden i hvitfiskindustrien.....	3
2.2	Lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk (<i>Gadus morhua</i>)	3
2.3	Marine lipider i lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk.....	4
2.3.1	Fettsyresammensetning i lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk.....	5
2.4	Marine Omega-3-fettsyrer og helseeffekter	6
2.5	Kvalitetskrav til marine oljer	8
2.5.1	Lipidoksidasjon.....	10
2.6	Biokjemiske nedbrytningsprosesser av lipider	12
2.6.1	Mikrobiell vekst og enzymaktivitet.....	12
2.6.2	Hydrolytisk harskning.....	13
2.7	Sortering av innmat	15
2.8	Termisk prosessering	15
2.9	Konservering ved kjøleteknologi.....	16
2.10	Formål med oppgaven	18
3	Materialer og metode	19
3.1	Innsamling av restråstoff	19
3.2	Lagringsforsøk 1: Korttidslagret innmat fra torsk ved 4 °C.....	19
3.2.1	Forberedelser til analyser	20
3.3	Lagringsforsøk 2: Langtidslagret lever fra torsk ved -20 °C	23
3.3.1	Forberedelse til analyser.....	24
3.4	Analyser.....	26
3.4.1	Totallipid ved Blich and Dyer	28
3.4.2	Fettsyresammensetning (eksternt).....	29

3.4.3	Fargemåling.....	29
3.4.4	Peroksidverdi (PV).....	29
3.4.5	p-Anisidinverdi (AV) og TOTOX verdi	30
3.4.6	Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS).....	31
3.4.7	Mengde frie fettsyrer (FFA)	32
3.5	Statistiske analyser	34
4	Resultat.....	35
4.1	Bligh and Dyer: fett ekstraksjon og totalt lipidinnhold.....	35
4.2	Lagringsforsøk 1: Korttidslagret innmat fra torsk ved 4 °C.....	35
4.2.1	Prøvemateriale.....	35
4.2.2	Fettsyresammensetning	37
4.2.3	Farge.....	38
4.2.4	Oksidasjonstatus	40
	Frie fettsyrer	44
4.3	Lagringsforsøk 2: Langtidslagret lever fra torsk ved -20 °C	45
4.3.1	Prøvemateriale.....	45
4.3.2	Fettsyresammensetning	46
4.3.3	Farge.....	47
4.3.4	Oksidasjonsstatus	49
4.3.5	Frie fettsyrer	53
5	Diskusjon.....	54
5.1	Fett ekstraksjon og totalt lipidinnhold	54
5.2	Fettsyresammensetning	55
5.3	Fargemålingene.....	56
5.4	Oksidasjonsstatus	56
5.4.1	Peroksidverdi (PV).....	56

5.4.2	p-Anisidinverdi (AV)	57
5.4.3	Totalt oksidasjonstall (TOTOX).....	58
5.4.4	Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS).....	58
5.5	Frie fettsyrer	59
5.6	Felles diskusjon	61
6	Konklusjon	64

VEDLEGG

Vedlegg 1: Fettsyresammensetning av lever og slo (Falch, 2006)

Vedlegg 2: Tidsforløp for all laboratorieaktivitet

Vedlegg 3: Standardkurver TBARS LAGRINGSFORSØK 1 (1_{lever} og 1_{innmat})

Vedlegg 4: Standardkurver % frie fettsyrer LAGRINGSFORSØK 1 (1_{lever} og 1_{innmat})

Vedlegg 5: Standardkurver TBARS LAGRINGSFORSØK 2

Vedlegg 6: Standardkurver % frie fettsyrer LAGRINGSFORSØK 2

Vedlegg 7: Post Hoc test LAGRINGSFORSØK 1 (1A=1_{lever}, 1B=1_{innmat})

Vedlegg 8: Post Hoc test LAGRINGSFORSØK 2

Vedlegg 9: Fettsammensetning av LAGRINGSFORSØK 1 (3 sider)

Vedlegg 10: Fettsammensetning av LAGRINGSFORSØK 2 (3 sider)

1 Innledning

Fisk er en av Norges viktigste ressurser, og det utarbeides hele tiden nye løsninger for optimalisering av prosesser innen fiskerinæringen, samt utvikling av nye metoder for større utvinningsgrad innenfor flere av fiskerisektorene (Jackson & Newton, 2016). En måte å øke utvinningsgrad på kan være å benytte restråstoff fra sløyting og filetering av fisk som i dag blir kastet. Restråstoff fra fisk inkluderer bein, hode, avskjær og innmat. Fraksjoner av innmaten inneholder blant annet lever, gonader, galle, tarm og magesekk. (Falch, 2006) En rapport skrevet av SINTEF i 2019 viser at mengden råstoff fra sjømatnæringen dette året var på 3,55 millioner tonn. Hvorav 965 000 tonn beregnes til å være tilgjengelig restråstoff for videre anvendelse. Av dette restråstoffet ble 84% utnyttet til videreforedling. (Richardsen et al., 2019)

Hvitfisksektoren i Norge omfatter artene torsk, hyse, brosme, sei, blåkveite, uer, lange og steinbit. I 2019 var råstoffgrunnlaget for disse artene på 683 000 tonn. Av dette ble det beregnet å være 297 400 tonn restråstoff, hvorav 181 000 tonn ble utnyttet. Blod regnes i dette tilfellet ikke som et tilgjengelig restråstoff. Utnyttelsesgraden på restråstoffet i hvitfisknæringen regnes derfor til å være 61% i 2019. Til sammenlikning utnyttet 93% av restråstoffet i havbruk/lakseoppdrett, og 100% av restråstoffet av pelagisk fisk. Fra 2018 til 2019 har utnyttelsesgraden av restråstoff i hvitfiskindustrien økt fra 50% til 60%, som skyldes noen få ny-introduserte fartøy som har bedre løsninger for utnyttelse av restråstoffet. (Richardsen et al., 2019) Det er rapportert av FN at i 1994 ble det kastet 27% av den globale fiskerifangsten, en andel som på den tiden ble betraktet som akseptabelt. Andelen ble redusert til 8% innen 2005, og ønskes å reduseres ytterligere. (Roda et al., 2019)

Det uutnyttede restråstoffet fra hvitfisksektoren kan bidra til norsk verdiskaping. Ved å prosessere restråstoffet kan det utvinnes verdifulle næringsstoffer som proteiner, vitaminer og lipider rikt på blant annet omega-3. Utnyttelsen av alt råstoffet er et viktig steg i den bærekraftige utviklingen av hvitfisksektoren. Verdensbefolkningen øker, og det er et behov for å produsere mer mat med mindre bruk av ressurser. Det er også et økende behov for omega-3 lipider, da dette er en viktig komponent for god folkehelse. Noen av FNs bærekraftsmål er relevante for denne problemstillingen, blant annet punkt 2 (utrydde sult), 3 (god helse og livskvalitet), 12 (ansvarlig forbruk og produksjon) og punkt 14 (livet i havet)

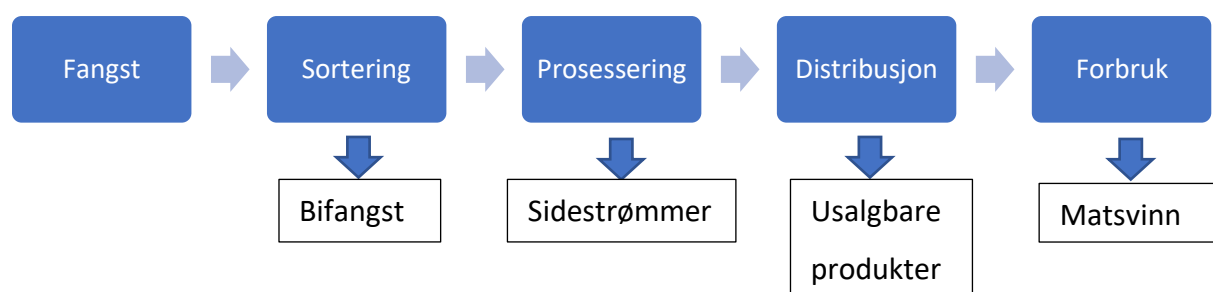
(FN-sambandet, 2021). Dagens betraktelige tap av omega-3 fra innmat, spesielt fra hvitfiskelever, gir et behov for å optimalisere utvinningsgraden ved riktig håndtering, sortering, lagring og prosessering. I et bærekraftperspektiv vil det også være bedre at en større andel av det som ses på som et restråstoff også kan gå til humant konsum, samt at det vil redusere behovet for å importere eksempelvis omega-3 oljer.

I dette prosjektet skal torskens innmat lagres ved ulike lagringsbetingelser (tid, temperatur og sorteringsgrad) før olje blir uthentet og analysert for å kunne teste dens kvalitet. Dersom kvaliteten viser seg å være god nok er det mulig å bruke oljen videre for humant konsum som ingrediens i mat, eller til andre produkter som legemidler eller ernæringsmidler. Dette avhenger av kvaliteten på råstoffet tidlig i verdikjeden, ombord på den havgående flåte, slik at muligheten for god utnyttelse videre i verdikjeden er mulig. En optimal utnyttelse av restråstoffet kan være et bidrag til Regjeringens strategi for økt verdiskaping fra marint restråstoff (Regjeringen, 2019).

2 Teoretisk bakgrunn

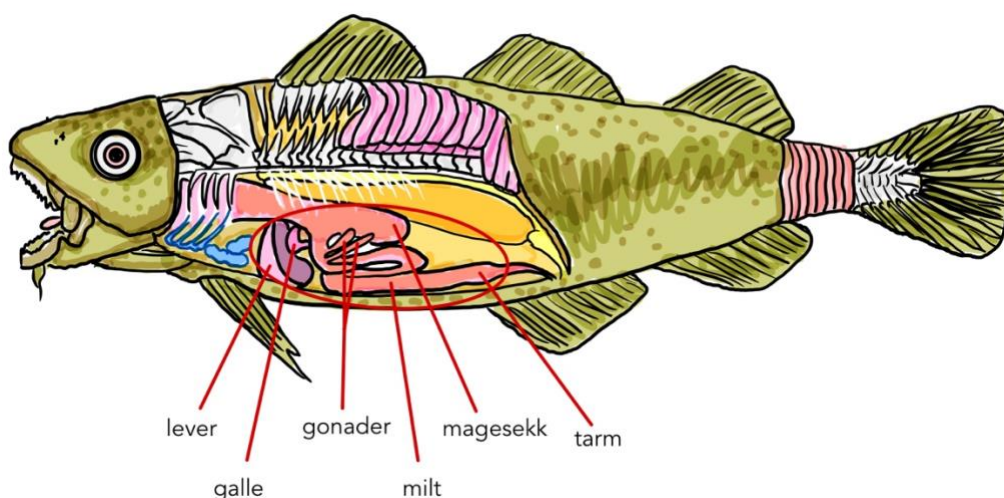
2.1 Verdikjeden i hvitfiskindustrien

Det er ikke alt som fiskes som går til humant konsum eller andre bruksområder, og det vil være tap langs hele verdikjeden fra fangst til konsum. Figur 1 illustrerer hvor det finnes tap i verdikjeden i hvitfiskindustrien. Allerede rett etter fangst vil det være en del bifangst (andre fiskearter) som må sorteres vekk. I prosesseringen av fisken vil også store deler av restråstoffet kastes. Det vil bli oppdaget produkter som ikke kan selges av diverse grunner, og til slutt vil det være en hel del produkter som ikke konsumeres, men som istedenfor kastes. (Hjellnes, 2020)



Figur 1: Oversikt over trinnene i verdikjeden til hvitfisksektoren. De hvite boksene representerer verditapene i verdikjeden. (Hjellnes, 2020)

2.2 Lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk (*Gadus morhua*)



Figur 2: Forenklet anatomi av Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) og merket innmat. Illustrasjon basert på Daviddarling.info og Falch (2006).

Innmat fra torsk består av lever, gonade (rogn/melke), galle, milt, tarm og magesekk og er vist i Figur 2. Restråstoff kan utgjøre opp til 2/3 av torskens totale vekt. Dette inkluderer innmat, hode og avskjær. Innmaten utgjør 12-15% av fiskens totalvekt. Leveren alene utgjør ca. 5 %, og resten av fraksjonene i innmaten (gonade, milt, galle, tarm og magesekk) utgjør ca. 5 % av vekten. (Falch, 2006)

2.3 Marine lipider i lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk

Fettsyrer består av en karbonkjede med en karboksylsyregruppe (COOH) i den ene enden, og en metylgruppe (CH₃) i den andre. Mettede fettsyrer har to hydrogenatomer knyttet til hvert karbon atom, bortsett fra de i endene. I en umettet fettsyre vil to eller flere karbonatomer være knyttet til kun et hydrogenatom, og heller ha dobbeltbindinger mellom karbonatomene. Enkelt og dobbeltbindinger illustreres i Figur 3: Kjemisk struktur av fettsyrene EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3) Figur 3. Fettsyrer lagres som oftest som triacylglyserider i fisk. Triacylglyserider er bygd opp av et glyserolmolekyl og tre fettsyrekjeder, bundet sammen med esterbindinger. (Frankel, 2005)

Magre fiskearter, som f.eks. torsk har store deler av energilageret sitt i leveren, og ikke i musklene som fete fisketyper. Olje utvunnet fra torsk vil derfor hovedsakelig komme fra leveren. Nivået av polare fosfolipider i fisken vil holde seg stabilt gjennom året, men mengde triacylglyserol, fiskens energilager, vil variere i større grad med årstidene. Fiskeoljens fettsyresammensetning avhenger av hvilke fettsyrer som inngår i fiskens diett, samt andre faktorer som art, alder, miljø og gytestatus. Vill- og oppdrettsfisk vil derfor kunne ha varierende fettsyresammensetning. (Aursand et al., 2011) Torsk lagrer mesteparten av fettene i leveren, hvor andelen lipid er rundt 50-70%, og kategoriseres som en mager fisk da lipidinnholdet i 100 g rå fillet er under 0-3 % (Lynum & Rustad, 1997).

Lipidklassene i lever og slo (innmat uten lever) vil variere, og det vil generelt være en større andel triacylglyserider og høyere lipidinnhold i lever, se tabell 1. Gjennomsnittlig er 95,3% av lipidinnholdet lagret som triacylglyserol. Slo (innmat uten lever) har større andel frie fettsyrer, fosfolipider, kolesterol og sterylestere enn lever, sett i Vedlegg 1: Fettsyresammensetning av lever og slo (Falch, 2006). Andelen av de forskjellige lipidklassene i slo varierer i høyere grad

mellom størrelse på fisken og tid på året, og en stor andel av lipidinnholdet i slo består av frie fettsyrer. (Falch, 2006)

Tabell 1: Lipidklasser i lever og slo fra torsk med variasjoner i størrelse og gytetidspunkt. (Falch, 2006) *v, vinter; s, sommer; h, høst **signifikans inkluderer tre andre arter (sei, hyse og brosme). i.s.: ingen signifikant forskjell

Størrelse torsk	Liten			Medium			Stor			Signifikant forskjell ($\alpha=0,05$)**
	v	s	h	v	s	h	v	s	h	
Gytetidspunkt	v	s	h	v	s	h	v	s	h	
Lever										
Lipidinnhold %	53,6	61,1	57,9	64,2	60,4	64,1	65,4	63,7	59,7	i.s.
Triacylglyserol%	92,0	96,1	95,5	95,0	95,8	95,6	95,5	96,2	95,6	i.s.
Slo										
Lipidinnhold %	2,1	2,6	2,5	3,0	3,0	1,9	2,3	2,1	1,9	i.s.
Triacylglyserol%	7,1	15,7	3,3	29,3	26,1	5,5	25,9	10,5	10,4	v > h

Dersom det skulle bli produsert fiskeolje av både lever og slo (innmaten), vil lipidklassene og fettsyresammensetningen være annerledes, avhengig av hvilken blanding av lever og slo den er ekstrahert fra. Blandingen vil i så fall ha lipidinnhold et sted mellom 2-9% og 50-70%, og sannsynligvis ikke ved de ytterste verdiene dersom blandingen er godt kvernet og mikset.

2.3.1 Fettsyresammensetning i lever og innmat fra villfanget Atlantisk torsk

Tabell 2 lister opp prosentvis mengde av noen fettsyrer og lipidgrupper i lever og i slo. Den fulle fettsyresammensetningen i lever og i slo fra torsk er i vedlegg 1.

Tabell 2: Fettsyrer og fettsyregrupper i lever og slo fra torsk med variasjoner i størrelse og gytetidspunkt (Falch, 2006). *v, vinter; s, sommer; h, høst **signifikans inkluderer tre andre arter (sei, hyse og brosme). i.s.: ingen signifikant forskjell

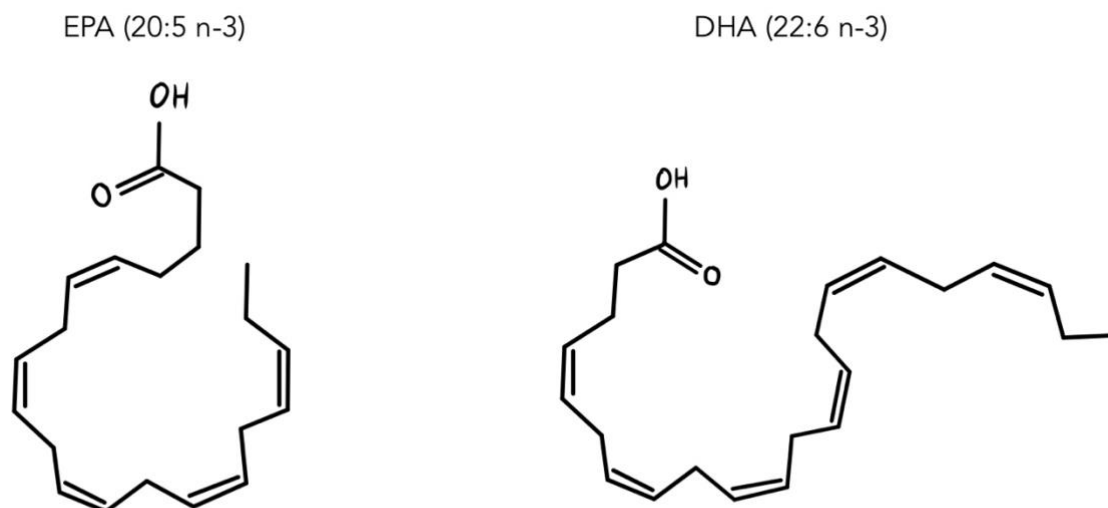
Størrelse torsk	Liten			Medium			Stor			Signifikant forskjell ($\alpha=0,05$)**
	v	s	h	v	s	h	v	s	h	
Gytetidspunkt	v	s	h	v	s	h	v	s	h	
Lever										
20:5n-3 (EPA) %	10,0	9,6	9,9	11,4	9,1	8,6	9,3	10,4	9,6	i.s.
22:6n-3 (DHA) %	15,7	14,3	14,2	16,1	15,0	11,8	15,0	16,2	14,6	i.s.

Metta fett %	17,0	14,2	14,5	13,6	14,3	15,8	15,5	13,4	14,2	i.s.
Enumetta fett %	48,2	50,4	51,2	47,0	50,9	54,0	50,5	48,8	51,8	i.s.
Flerumetta fett %	34,8	35,4	34,3	39,4	34,8	30,2	34,0	37,7	34,1	i.s.
n-3 %	31,4	29,9	29,6	35,0	29,9	25,3	30,2	33,1	29,5	i.s.
n-6 %	3,4	5,6	4,7	4,3	4,9	4,9	3,8	4,6	4,6	i.s.
Slo										
20:5n-3 (EPA) %	10,7	10,9	10,6	10,9	11,2	11,6	11,5	12,6	12,5	sh > v
22:6n-3 (DHA) %	24,3	23,3	22,0	20,0	22,0	25,6	23,6	24,9	23,3	i.s.
Metta fett %	17,7	15,6	16,1	16,8	14,8	16,5	16,6	15,4	15,6	i.s.
Enumetta fett %	38,7	40,4	41,1	43,5	42,3	37,6	39,6	37,0	38,7	v > h
Flerumetta fett %	43,5	44,0	42,8	39,7	42,9	45,9	43,9	47,6	45,6	sh > v
n-3 %	39,2	38,1	37,5	35,7	37,6	5,8	39,3	40,1	39,6	i.s.
n-6 %	4,4	5,9	5,3	4,0	5,3	40,1	4,6	6,6	6,1	sh > v

I slo (innmat uten lever) er det stort sett fettsyrene 18:1, 20:1, 22:1 og 20:5 som dominerer, som vist i vedlegg 1. Store deler av fettsyreprofilen i lever i denne studien er enumetta fettsyrer (16:1, 18:1, 20:1 og 22:1). (Falch, 2006) Det er ikke betydelige forskjeller i fettsyresammensetningen i lever og slo fra torsk. Det er litt større andel flerumettede fettsyrer, som dokosahekasensyre (DHA; 22:6n-3) og eikosapentaensyre (EPA; 20:5n-3), i slo enn i lever. Denne trenden gjelder alle gytetidspunktene tross variasjon i lipidinnhold og torskens størrelse.

2.4 Marine Omega-3-fettsyrer og helseeffekter

Marine oljer inneholder naturlig stor andel lange flerumettede fettsyrer som DHA og EPA (Falch, 2006; Gunstone, 2008). Figur 3 illustrerer strukturen til disse fettsyrene.



Figur 3: Kjemisk struktur av fettsyrene EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3)

Lange flerumettede omega-3 fettsyrer som DHA og EPA fra marine lipider har dokumentert positiv helseeffekt hos mennesker. Det vil blant annet forhindre hjerte- og karsykdommer, gi forbedret nervesystem og hjernefunksjon, samt å stimulere immunsystemet. Ny forskning oppdager stadig flere positive helseeffekter som følge av inntak av DHA og EPA. (Falch, 2006; FAO & WHO Expert Consultation, 2008) Tabell 3 viser en samlet oversikt over noen helseeffekter av inntak av flerumettede fettsyrer.

*Tabell 3: Helseeffekter ved inntak av flerumettede fettsyrer. *Ikke like grundig dokumentert.*

Positive helseeffekter av lange flerumettede fettsyrer	Referanser
Effekt på hjerte- og karsykdommer	(Iso et al., 2006; Mozaffarian & Rimm, 2006; Psota et al., 2006; Siscovick et al., 2017; Wang et al., 2004)
Redusere risikofaktorer som hhv. fedme og blodtrykk for hjerte- og karsykdommer	(Balk et al., 2006; Colussi et al., 2017)

Anti-inflammatoriske effekter på autoimmune sykdommer som revmatoid artritt	(Calder, 2006)
Forsinke utbrudd av noen kreftformer: <ul style="list-style-type: none"> - kolon - bryst - prostata 	(Simopoulos, 2006) (Chapkin et al., 2007; Dichwalkar et al., 2017) (Hilakivi-Clarke et al., 2005; Sun et al., 2005) (Berquin et al., 2007; Istfan et al., 2007)
*Forbedring av fosterutviklingen	(Joshi et al., 2004; Newberry et al., 2016; Uauy & Dangour, 2006)
*Innflytelse på psykiatriske og psykologiske sykdommer som schizofreni og depresjon	(Peet & Stokes, 2005; Rice et al., 2016)

I tillegg til alle de gode helseeffektene, er det også funnet noen få negative helseeffekter fra inntak av omega-3 fettsyrer. Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) har rapportert både negative og positive helseeffekter av hovedsakelig omega-3 fettsyrene DHA og EPA. Rapporten nevner negative helseeffekter som «økt blødningstendens, lipidperoksidering, nedsatt betennelse- og immunfunksjoner, endret glukose- og fettmetabolisme og gastrointestinale plager» (Frøyland et al., 2011). De negative helseeffektene er derimot ikke funnet som merkbare. Eksempelvis er lipidoksidering av inntatt DHA og EPA omega-3 oljer (*in vivo*, i kroppen) ikke definert som en risikofaktor for sykdom. (Aursand et al., 2011)

2.5 Kvalitetskrav til marine oljer

Selv om marine lipider har dokumentert god effekt på menneskers helse, er det likevel en rekke kvalitetskrav olje ekstrahert fra marine produkter må overholde for å kunne sikre god mattrygghet og kvalitet. Codex Alimentarius fra WHO og FAO er en standard for fiskeoljer, som inkluderer retningslinjer for akseptabelt nivå av oksidasjon av oljer fra marine lipider til humant konsum (CODEX, 2017). GOED (The Global Organization for EPA and DHA omega-3s) er en organisasjon som bidrar med retningslinjer og standarder for EPA og DHA omega-3 produkter. GOEDs grenseverdier er satt for torsk, av typen *Gadus morhua L* og andre arter av

Gadidae, og omfatter alle oljer som kategoriseres som mat, og olje som skal brukes til produksjon av mat til humant bruk. European Pharmacopoeia (forkortet som Eur. Ph.) bidrar med spesifikasjoner og kvalitetskrav innenfor Europas legemiddelindustri (*European pharmacopoeia*, 1996). Tabell 4 viser grensene for ulike oksidasjonsprodukter som er relevante for denne oppgaven, spesifikt olje fra torsk og olje av lever fra torsk.

Tabell 4: Grenseverdier for akseptabelt nivå av oksidasjonsprodukter til humant konsum og farmasøytiske produkter

Kvalitetsparametere	CODEX (CODEX, 2017)	GOED (GOED voluntary monograph)	Eur. Ph. (<i>European pharmacopoeia</i> , 1996)
Peroksidverdi (PV) [mEq/kg olje]	≤ 5	≤ 5	≤ 10
p-Anisidinverdi (AV) [AnV]	≤ 20	≤ 20	≤ 30
TOTOX	≤ 26	≤ 26	Ingen spesifisering
Frie fettsyrer [%] Syreverdi [mg KOH/g]	≤ 0,6	(≤6%) ≤ 3	≤ 2%

Den øvre grensen for frie fettsyrer kan angis som syreverdi (acid value), og er satt i CODEX som ≤ 3 mg KOH/g (CODEX, 2017). Det kan ikke brukes mer enn 3 mg av kaliumhydroksid til for å nøytralisere 1 gram av oljen. En annen måte å uttrykke frie fettsyrer på er ved prosentvis mengde frie fettsyrer. Sammenhengen mellom syreverdi og % frie fettsyrer er at syreverdi er ca. ½ av prosent frie fettsyrer. (Aursand et al., 2011) Grensen på 3 mg KOH/g er dermed rundt 6 % frie fettsyrer.

Andre kvalitetsparametere for fiskeoljer som farge og TBARS (analyse for sekundære oksidasjonsprodukter) har ingen bestemt øvre grense i hverken CODEX eller GOED. I European Pharmacopoeia er det derimot et krav om at fargen ikke skal fremstå mer intens enn en spesifisert referanseløsning (*European pharmacopoeia*, 1996). Grenseverdier for TBARS er ikke spesifisert i verken GOED, Codex eller Eur. Ph., men Vitenskapskomiteen for

mattrygghet har foreslått 0,1 til 3,9 mmol/kg (100-3400 µmol/kg) olje som akseptabelt nivå. (Aursand et al., 2011)

2.5.1 Lipidoksidasjon

Oksidasjon er en form av harskning av oljer og fett. De lange flerumettede fettsyrene i marine lipider er spesielt utsatt for oksidasjon fordi dobbeltbindingene lett kan angripes. Dess flere dobbeltbindinger fettsyren har, desto mer utsatt er den for oksidasjon. Lagret fett i torskelever lagres som triglyserider, og fettsyrenes posisjon i forhold til hverandre vil ha betydning for hvor lett fettsyrene oksideres. (Frankel, 2005)

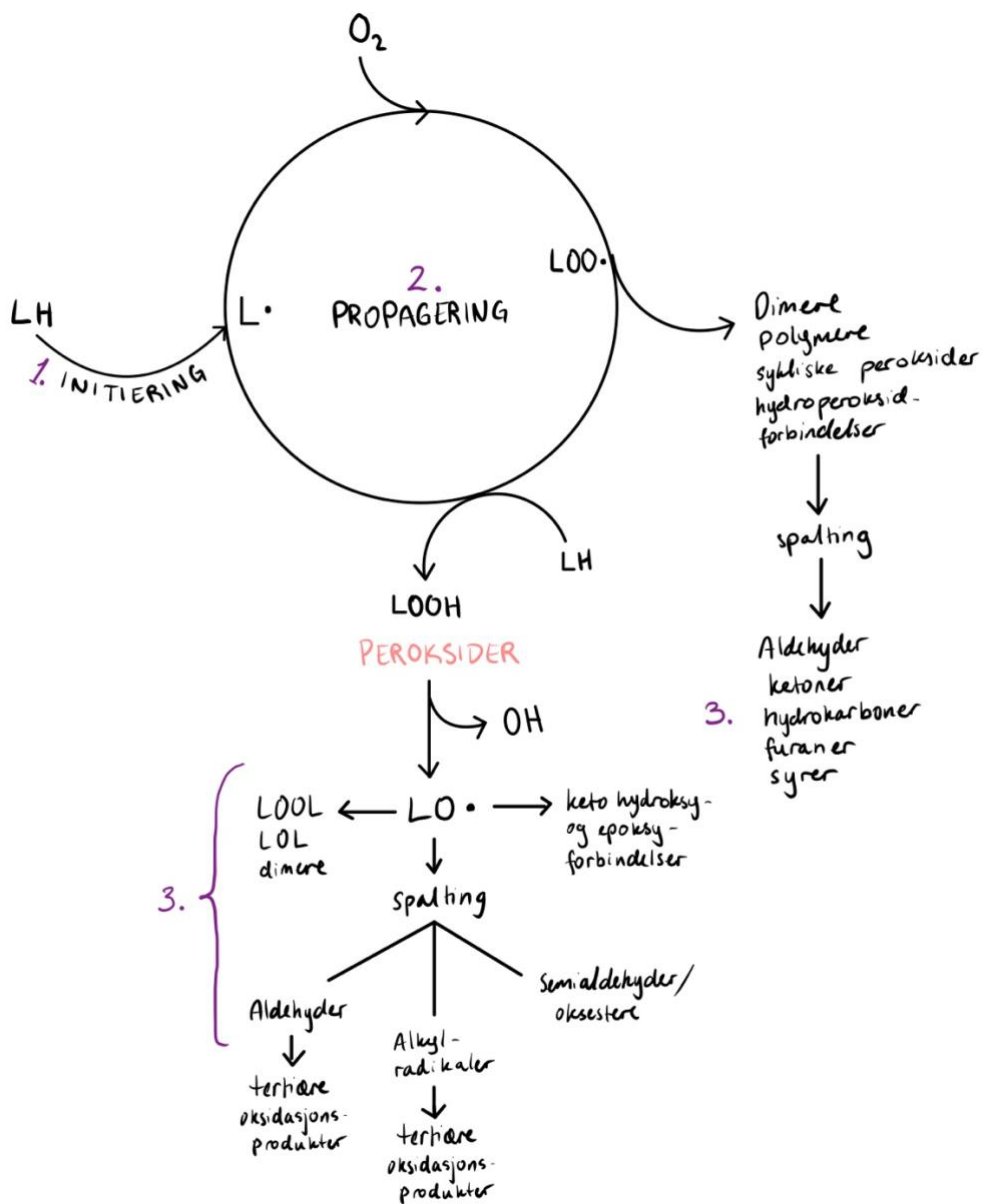
Ved oksidasjon av fettsyrer dannes det peroksider og hydrogenperoksider. Med oksygen til stede vil dobbeltbindinger i umettede fettsyrer brytes ned ved reaksjon med oksygen. De frie fettsyreradikalene kan reagere med oksygenet og danne peroksider i en prosess som kalles oksidativ harskning. Hastigheten av harskningen øker derfor med økt mengde av umettede fettsyrer i oljen og tilgang på oksygen. Andre faktorer som kan framskynde harskningsprosessen er lys og høy temperatur. Ellers vil også kobber, enkelte enzymer og visse oksidasjonsprodukter kunne katalysere denne prosessen. Faktorer som forhindrer eller forsinker oksidativ harskning er antioksidanter, vitamin E og vitamin C. (Aursand et al., 2011; Frankel, 2005). En annen faktor som kan forskynde harskning er metall katalysatorer som jern fra vevet eller blodet av fisken. Myoglobin i blodet inneholder jern, og dersom det varmebehandles vil det oksidere til metmyoglobin. Metmyoglobin er myoglobin i katalytisk form som akselerer harskning. (Frankel, 2005)

2.5.1.1 Oksidasjonsprodukter

Den omtalte oksidasjonsprosessen, autooksidasjon, pågår kontinuerlig og produserer ulike oksidasjonsprodukter. Disse oksidasjonsproduktene kan deles inn i primære, sekundære og tertiære oksidasjonsprodukter, og vil ha forskjellige karakteristiske trekk. Oksidasjonsprosessen i marine oljer vil begynne allerede i råmateriale (fisken), og fortsette etter ekstraksjon av ren olje. (Aursand, 2011) I hvilken grad oljen oksideres og hvilke oksidasjonsprodukter som er resultatet av oksideringen vil variere avhengig av kvaliteten på

råmaterialet, lagringstemperaturer og prosesseringsparametere som tid, temperatur og trykk. (Frankel, 2005)

Oksidasjonsforløpet foregår i flere steg og er illustrert i Figur 4. Det første steget, initiering (1), er katalysert ved fjerning av hydrogenatom fra fettsyren som gir et fettsyreradikal. Dette fettradikalet er reaktivt og kan videre reagere med oksygen i en kjedereaksjon kalt propagering (2). (Frankel, 2005) Produktet av en slik reaksjon er peroksidlipider som er primære oksidasjonsprodukter. Disse er smak- og luktfrie, og mengden av slike peroksidlipider måles som oftest som peroksidverdi (PV). Peroksider er ustabile og vil over tid brytes ned til en blanding av flyktige og ikke-flyktige sekundære oksidasjonsprodukter som alkyl- og hydroksylradikaler. Disse radikalene kan igjen reagere med fettsyrer og produsere hydroksylerte fettsyrer eller brytes ned til ketoner, alkoholer, syrer og aldehyder. Fiskeolje med vond lukt og smak kommer av de flyktige forbindelsene av slike sekundære oksidasjonsprodukter. (Aursand, 2011) De flyktige forbindelsene er sensorisk merkbare ned i konsentrasjoner så lave som 10^{-5} - 10^{-2} mg/g olje (Kulås, 2003). De ikke-flyktige komponentene er derimot lukt- og smaksfrie. En vanlig analysemetode for å fastslå mengden sekundære oksidasjonsprodukt er p-anisidinverdi (AV). Ved terminering (3) produseres flere sekundære oksidasjonsprodukter, og ved videre reaksjon kan det også dannes tertiære oksidasjonsprodukter. De tertiære oksidasjonsproduktene er blant annet dimere og trimere triacylglyseroler, og har ofte høy molarvekt. (Aursand, 2011)



Figur 4: Forenklet oversikt av oksidasjonsprosessen. Adaptert med utgangspunkt i figur fra (Falch, 2006)

2.6 Biokjemiske nedbrytningsprosesser av lipider

2.6.1 Mikrobiell vekst og enzymaktivitet

Mikrobiell vekst er en faktor som spiller inn på kvaliteten av lettbederverlige næringsmidler som fisk. Mikrobiologiske organismer kan produsere substanser som kan forringe kvaliteten på produktet, samt at vekst av patogene mikroorganismer kan føre til sykdom. Lang lagringstid før fettekstraksjon av råstoffet, kan ha konsekvenser for sluttproduktets kvalitet.

Lav lagringstemperatur og hygienisk behandling er viktige grunnforutsetninger som vil bevare råstoffet.

Mikrobiell nedbrytning i råstoffet kan foregå på mange ulike måter, som kommer an på hvilke mikroorganismer som er til stede og hvilke som dominerer i bakteriefloraen. SSO (specific spoilage organisms) er ofte omtalt som en fare for kvaliteten hos hvitfisk. Eksempelvis kan *Shewanella putrefaciens* omdanne trimetylaminoksid (TMAO) til trimetylamin (TMA), samt produsere H₂S og flere andre illeluktende komponenter. *S. putrefaciens* finnes naturlig spesielt i torskefamilien. I familien Enterobacteriaceae finnes det arter av *Clostridium* og *Lactobacillus* som kan dekarboksylerer frie aminosyrer i råstoffet til produkter som omtales som biogene aminer. Disse produktene er hovedsakelig vann-løselige, og lite av det blir overført videre i ekstrahert fiskeolje. (Aursand et al., 2011)

Annen mikrobiologisk aktivitet som kan være farlige for kvalitet av hvitfisk er gram positive sporedannende bakterier som *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. og *Staphylococcus* sp. Disse bakteriene er svært varmetolerante og kan produsere farlige toksiner. Toksiner som produseres før prosessering kan medføre fare for mattrygghet, men hvis råstoffet termisk prosessert over 90 °C vil det ikke medbringe en stor fare for konsumenten. Eksempelvis vil ikke *B. cereus* vokse effektivt i olje fra fisk, og selv om bakteriens toksin cereulid er lipofil er det ikke funnet i raffinerte fiskeoljer. (Aursand et al., 2011)

Prosesseringen av fiskeoljer, som varmebehandling og fjerning av vann, fører til lite mikrobiell aktivitet. I tillegg så inaktiveres enzymer ved høye temperaturer, som kan produseres av mikroorganismer og være iboende i innmaten. Det kritiske for kvaliteten er dermed hvordan råstoffet behandles og lagres før ekstraksjon av oljen. (Aursand et al., 2011)

2.6.2 Hydrolytisk harskning

Ved hydrolyse vil fettsyrekjedene løsrives fra glyserolstammen i triglyseridene, og hydrolytisk harskning kan måles i mengde frie fettsyrer. Denne nedbrytningen skjer naturlig ved autolytisk nedbrytning post mortem (etter rigor mortis, dødsstivhet). Lipolytiske enzymer som er til stede, spesielt i mage og tarm av fisk, vil fremskynde hydrolyse av lipider. De frie fettsyrene vil i større grad være utsatt for harskning. Mengde frie fettsyrer spiller derfor en stor rolle for oljens oksidative stabilitet, da de vil virke som prooksidanter. Ved

varmebehandling av olje kan frie fettsyrer forårsake mørkere farge, skum- og røykdannelse. (Aursand et al., 2011)

Frie fettsyrer kan fjernes fra en olje gjennom flere raffineringprosesser. Prosesstrinnene for blant annet fjerning av frie fettsyrer i en olje består av nøytralisering, bleking og deodorisering. Nøytraliseringsprosessen vil i tillegg til å fjerne frie fettsyrer redusere mengden fosfolipider, pigmenter, spor av metaller, samt oksidasjonsprodukter. Bleking har som hovedformål å fjerne pigmenter, men vil også bidra med å redusere frie fettsyrer, metallspor og oksidasjonsprodukter. Ved bleking vil det også kunne oppstå reduksjon av fosfolipider, såper (dersom nøytralisert) og svovelholdige metaller. Formålet med deodorisering er å fjerne flyktige oksidasjonskomponenter, men denne prosessen vil også redusere rester av frie fettsyrer og pigmenter i oljen. (Aursand et al., 2011)

2.7 Sortering av innmat

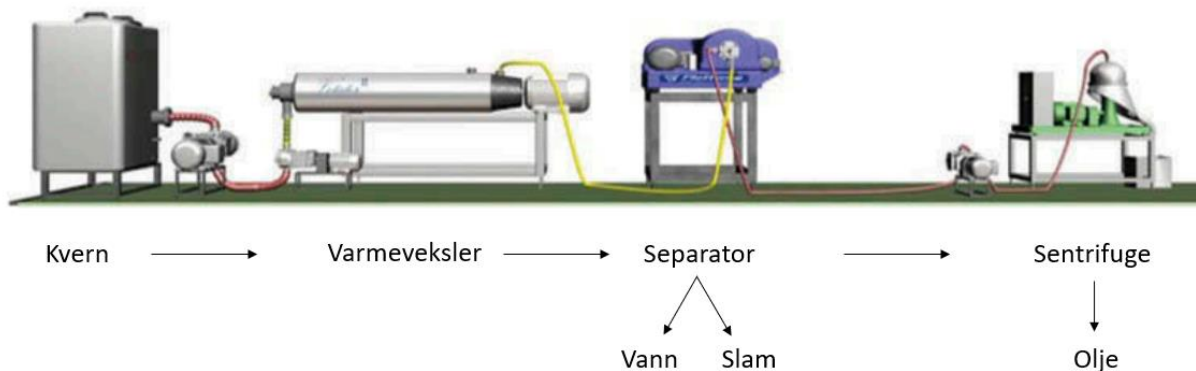
En av årsakene til den lave utnyttelsesgraden av restråstoff i hvitfiskindustrien er mangel på teknologiske og kostnadseffektive løsninger som kan videreforedle, lagre og prosessere restråstoffet. (Aursand, 2011) For større utnyttelsesgrad av restråstoff vil det være nødvendig med endring av reguleringer i fiskeriindustrien. De ulike fraksjonene i innmaten vil ha ulik fettsyresammensetning, egenskaper og kvalitet, så det kan være behov for sortering ved videreforedling (Falch, 2006).

Med de store mengdene med restråstoff som skal sorteres vil ikke manuell sortering være en kostnadseffektiv måte å separere de ulike fraksjonene av innmat på. Automatiserte sorteringssystemer ville kunne bidra til økt utnyttelse og bidra til en høyere bioressurseffektivitet, samt redusert avfall. Sorteringssystemet må kunne skille på de ulike fraksjonene i innmaten, men dette kan være en utfordring da rogn, melke og lever er relativt like i farge og utseende. Det er blitt forsøkt å bruke synlig og infrarød hyperspektral avbildning som metode for å finne absorpsjonstopper som kan kategorisere de ulike fraksjonene. (Paluchowski, 2016)

2.8 Termisk prosessering

Olje kan utvinnes fra restråstoff ved bruk av termisk prosessering, også kjent som «wet-rendering». SINTEF Ocean utarbeidet i 2015 en prosesslinje som skulle prosessere restråstoff av sild like etter den var filetert (Carvajal, 2015). En enkel framstilling av prosesslinjen er illustrert i Figur 5. Etter filetering av fisken, ble restråstoffet overført til en industriell kjøttkvern, hvor det ble kvernet til en masse. Hele produksjonslinjen var et lukket system, og materialet ble kontinuerlig beveget videre i konstant hastighet. Videre ble det kvernede restråstoffet varmet opp av en skrapevarmeveksler til valgt temperatur. Deretter ble den varmebehandlede massen overført til en separator, (Tri-canter), hvor vannfase og slam (fast materie) ble skilt ut. Etter denne separeringen ble olje sentrifugert i en sentrifuge. En bakside med slik termisk separering er at det til en viss grad vil påvirke de flerumettede fettsyrene i restråstoffet grunnet nedbrytning ved hydrolyse og oksidasjon (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018).

Denne måten å utvinne olje på blir brukt i industriell oljeproduksjon, og det samme prosesseringsprinsippet har blitt brukt i lab skala i denne oppgaven.



Figur 5: Forenklet illustrasjon av prosesslinjen ved termisk produksjon av olje (Carvajal, 2015)

2.9 Konservering ved kjøleteknologi

Konservering av råstoff er en viktig faktor for å bevare og sikre god kvalitet på produktet. Temperatur ved lagring er den viktigste faktoren som spiller inn på oksidativ stabilitet i umettede fettsyrer, hvor oksidering øker eksponentielt med økende temperatur. Den oksidative stabiliteten er uavhengig av tilstedeværelsen av oksygen ved lave temperaturer, men ved økt temperatur vil nivået av oksidering øke og tilstedeværelse av oksygen får en større påvirkning på oksideringshastigheten. Ved analyse av oksidativ stabilitet bør derfor oljer med mye umettet fett lagres ved lavere temperaturer. (Frankel, 2005)

Antioksidanter vil øke aktiveringsenergien som skal til for at en oksideringsreaksjon skal skje. Metall vil derimot katalysere en lavere aktiveringsenergi for å få oksidering til å skje. (Frankel, 2005) Ved bruk av Arrhenius-likning kan reaksjonshastigheten til oksidasjon beregnes ved ulike temperaturer. Likningen kan vise at effektiviteten av antioksidanter er omvendt proporsjonal med absolutt temperatur, og kan brukes til å regne ut ved hvilken temperatur antioksidantene ikke lenger vil ha noen virkning på å inhibere oksidasjon, men vil heller opptre som en prooksidant. (Frankel, 2005)

Det er hydrolyse av triacylglyserol og fosfolipider, dannelse av frie fettsyrer, under 0 °C som begrenser fiskens holdbarhet. Vev som inneholder høye nivåer av frie fettsyrer er mer utsatt for oksidering, og produkter som lagres ved kjøle- og frysetemperaturer over lengere tid vil kunne harskne. Det er blitt vist at både verdier for frie fettsyrer og peroksidverdi øker ved

fryselagring av fisk på grunn av hydrolytiske enzymer som er til stede i fiskens muskler og innmat. (Frankel, 2005; Karlsdottir et al., 2016). Flere enzymer i fisk blir inhibert av fryselagring ved -18 til -24 °C, men lipolytiske enzymer har vist å være aktive ved under -20 °C. Ved temperaturer lavere enn -24 °C har det derimot vist seg å være lav økning av hydrolytisk harskning. (Karlsdottir, 2016)

2.10 Formål med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke hvordan ulike lagringsbetingelser (tid og temperatur) og sortering av torskelever og -innmat påvirket kvaliteten på olje ekstrahert ved termisk prosessering. Dette for å kunne lage gode beslutningsgrunnlag for håndtering, sortering og lagring ombord på den havgående flåten, for å kunne øke utnyttelsen av restråstoff i hvitfiskindustrien.

Delmål:

- Utvinne olje fra lever og innmat fra torsk, for å få informasjon om kvaliteten på olje utvunnet fra disse fraksjonene, og hvorvidt leveren bør sorteres ut eller ikke.
- Finne effekt av ulike lagringsbetingelser (tid og temperatur) ved lagring av lever og innmat, og hvordan dette påvirker oljens kvalitet.
- Vurdere resultatene for å kunne foreslå optimal råstoffbehandling og lagringsforhold.

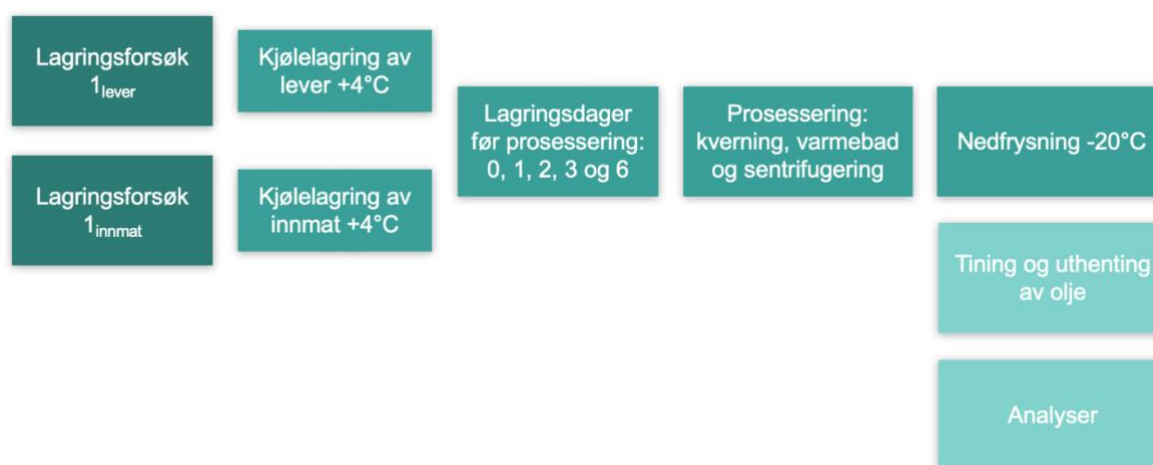
3 Materialer og metode

3.1 Innsamling av restråstoff

Råstoffet som benyttes i denne bacheloroppgaven er lever og innmat fra torsk. Det var Maria Alquiza Madina som var ombord på tråleren Helmer Hansen Research Cruise og utførte innsamling og deler av prosesseringen av råstoffet. Innhenting av råstoff var i regi av SUPREME-prosjektet og begynte 19. februar og ble avsluttet 8. mars 2021. Råstoffet ble fisket langs nordkysten og i Barentshavet, og prosessering av råstoff og restråstoff fant sted like etter fangst. Lever og innmat fra Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) ble kjøle- og fryselagret og prosessert ombord på den havgående flåten. Det er forsøkt å delvis representere variasjoner som er naturlig funnet i villfanget fisk ved å bruke restråstoff fra torsk av varierende størrelser. Innsamlet restråstoffet ble fordelt på to lagringsforsøk.

3.2 Lagringsforsøk 1: Korttidslagret innmat fra torsk ved 4 °C

Lagringsforsøk 1 gikk ut på å korttidslagre innmat fra Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) ved 4 °C, og se på hvordan kvaliteten utvikler seg. Lagringsforsøket var delt i to deler, 1_{lever} og 1_{innmat}. Råstoffet i forsøk 1_{lever} besto kun av lever fra torsk, og 1_{innmat} besto av innmat (lever, mage, tarm, galle og gonader) fra torsk. Flytskjema i Figur 6 viser forløpet for lagringsforsøk 1.



Figur 6: Flytskjema for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}

Det ble tatt ut lever fra fem fisker (1_{lever}), og innmat fra fem fisker (1_{innmat}) fra samme hal i separate poser for hver lagringsdag. Posene med prøve for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} ble

lagret i 0, 1, 2, 3 og 6 dager (D0, D1, D2, D3 og D6), før hver pose med prøve ble prosessert etter respektive lagringsdager. Etter prosessering ble prøvene fryst ned til -20 °C ombord, og deretter fryst ned til -80 °C når prøvematerialet ankom laboratoriet på NTNU. Prøvene ble uthentet ved dag 0, 1, 2, 3 og 6 fordi det ikke var materialer ombord på tråleren for å hente ut flere prøver for dette lagringsforsøket. Temperaturen for D0 ble loggført med en temperaturlogger, med en logger i posen for lagringsforsøk 1_{lever} og en i posen for 1_{innmat}. Gjennomsnittlig lagringstemperatur for 1_{lever} var 4,5 °C, med maksimumstemperatur på 6,3 °C. Gjennomsnittlig lagringstemperatur for 1_{innmat} var 6,2 °C, med maksimumstemperatur på 7,8 °C.

6 uker etter nedfrysing ble oljen analysert for oksidasjonsprodukter og frie fettsyrer, samt fettsyrekomposisjon og farge. Se tidsforløp for laboratorieaktivitetene i vedlegg 2.



Figur 7: Lever (bilde: Maria Alquiza Medina)



Figur 8: Innmat - lever og slo (bilde: Maria Alquiza Medina)

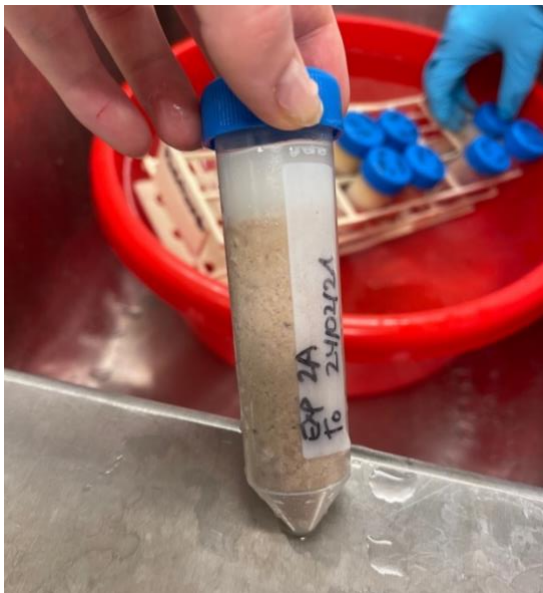
Figur 7 illustrerer torskelevrene som ble benyttet i lagringsforsøk 1_{lever}. Figur 8 illustrerer lever fra torsk og innmat fra torsk som ble benyttet i lagringsforsøk 1_{innmat}.

3.2.1 Forberedelser til analyser

Om bord på tråleren ble prøvematerialet i lagringsforsøk 1_{lever} kvernet for hånd, og 1_{innmat} kvernet for hånd og delvis ved håndmikser. Lever var lett å kverne til en semihomogen masse

med kun bruk av hender, men de andre fragmentene av innmat ville ikke like lett spaltes til mindre segmenter (på grunn av høyt innhold av sterke fibre), og måtte derfor homogeniseres med håndmikser. 40 ml av den semihomogene massen ble overført til 50 ml sentrifugerør, og plassert i kokende vann og inkubert ved $> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 20 minutter. Med et termometer ble det sørget for at temperaturen holdt en temperatur på over $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sentrifugerørene med prøve ble videre sentrifugert ved 3500rpm i 15 minutter, og deretter fryst ned til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Denne prosesseringen ble gjort samme dag som fangsten ble gjort, dag 0 (D0), og videre 1, 2, 3 og 6 dager etter fangst. Dagene mellom fangst og prosessering ble restråstoffet lagret ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hver lagringsdag hadde 4 paralleller av 50 ml sentrifugerør, med to unntak (D1 og D2) grunnet lekkasjeproblemer.



Figur 9: Nedfrost sentrifugerør for lagringsforsøk 1_{lever} D0



Figur 10: Nedfrost sentrifugerør for lagringsforsøk 1_{innmat} D0

Figur 9 illustrerer et fyst sentrifugerør fra lagringsforsøk 1_{lever} D0. Det er mulig å se en hvit oljefase øverst i røret. Figur 10 illustrerer to sentrifugerør fra lagringsforsøk 1_{innmat} D0. Her er oljefasen betydelig mindre, og har en gulere farge.

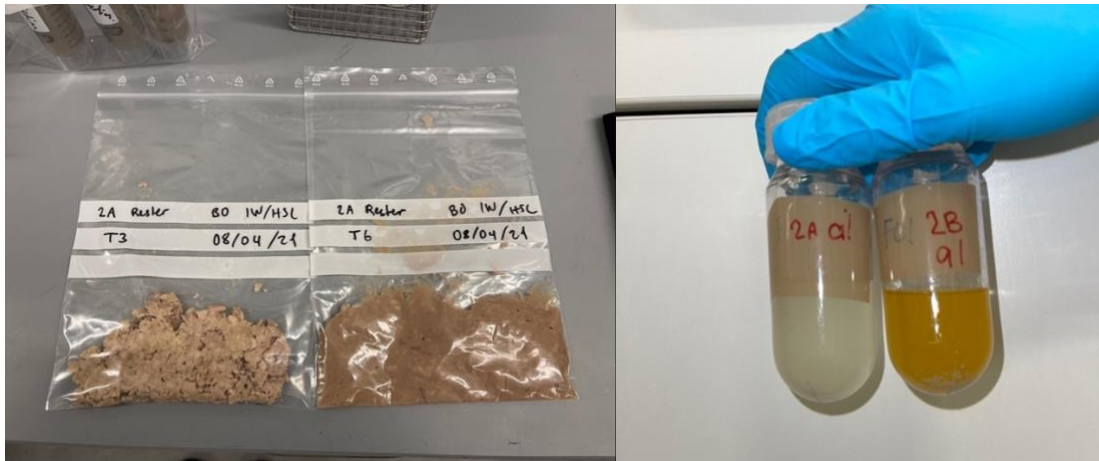
Prøvematerialet i lagringsforsøk 1_{innmat}, var vanskelig gjøre homogen, og det vil derfor være forskjellig forhold av lever og slo i parallellene. På grunn av mindre volum av lever i sentrifugerørene, var det mindre olje å hente fra dette lagringsforsøket.

6 uker etter nedfrysning ble sentrifugerørene tint for uthenting av olje og videre analyse. Etter tining ble oljefasen pipettert over i et nytt sentrifugerør. Restfraksjon etter første sentrifuge ble sentrifugert på nytt ved 4800 rpm, da 3500 rpm var den høyeste hastigheten som kunne oppnås om bord.



Figur 11: En siste sentrifugering av oljen før overføring i lys- og lufttett flaske.

Ny oljefase ble pipettert over i samme sentrifugerør som ved første oljeuttagelse. Vekt av uthentet olje og resterende restfraksjon er listet opp i Tabell 1 (i resultater). For å sikre at oljen var ren olje uten kontaminasjon av leverpartikler eller vann ble oljen på nytt sentrifugert ved 4800rpm i 10 minutter og pipettert over i lystett glassflaske med lufttett lokk (Figur 11). Analyse av PV, TBARS og FFA ble gjort innen 48 timer etter samling av oljeprøvene. Mellom analysene ble oljeprøvene «flushet» med nitrogen og lagret mørkt ved kjøleskapttemperatur. Prøvene ble så fryst ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, og tint til analyse av farge, AV og fettsyresammensetning ved senere anledning.



Figur 12: Rester fra 1_{lever} D3 (venstre) og D6 (høyre) til nedfrysing. Figur 13: Olje fra 1_{lever} (venstre) og 1_{innmat} (høyre) (D0)

3.3 Lagringsforsøk 2: Langtidslagret lever fra torsk ved -20 °C

Lagringsforsøk 2 gikk ut på å langtidslagre fryst lever fra torsk ved -20 °C. Flytskjema for forsøket vises i Figur 14. Fem leverer fra torsk (fra samme hal) i varierende størrelse ble lagt i separate poser. Temperaturen ombord ble målt ved bruk av temperatureloggere. Temperaturen av to poser ble målt, hvor gjennomsnittet var -17,1 °C og -15,7 °C, og maksimumstemperaturen var henholdsvis -8,9 °C og -5,5 °C. Temperaturen på andre poser ble ikke målt på grunn av mangel av utstyr ombord.

Vekten på hver lever i de separate posene er listet opp i Tabell 10 i resultater. En pose med lever ble prosessert sammen. Det ble prosessert 3 poser, med 2 ukers mellomrom mellom hver prosessering, henholdsvis 6, 8 og 10 uker etter nedfrysning.

Uke 0 brukes som referanse i grafene for lagringsforsøk 2 i Resultat og er fra resultatene for lagringsforsøk 1_{lever} D0 (torskelever prosessert og nedfrost like etter fangst).



Figur 14: Flytskjema for lagringsforsøk 2

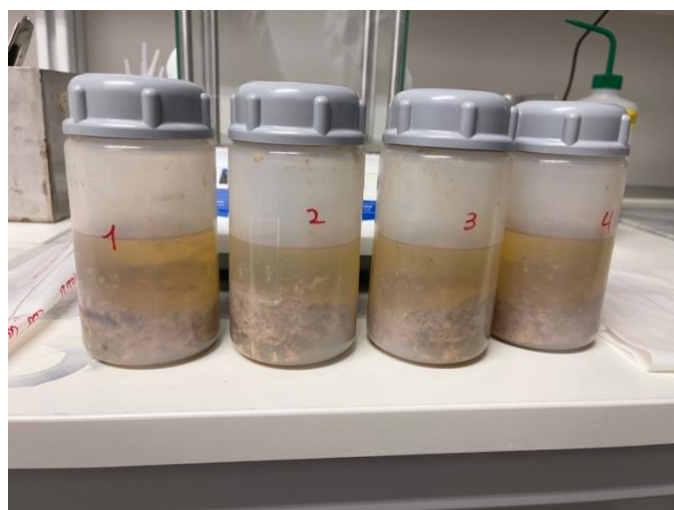
3.3.1 Forberedelse til analyser

For uthenting av olje måtte torskelleverne tines, og prosesseres. En pose med torskellever ble lagret ved 4 °C i ca. 24 timer før videre prosessering. Etter tining ble hver lever veid, og vekten ble notert, se Tabell 10 i resultater.



Figur 15: Bilder av lever fra torsk brukt i lagringsforsøk 2 (uke 8) før prosessering. Bildet til høyre viser metode for kverning.

Figur 15 illustrerer tre bilder av prosesseringsforløpet før uthenting av olje. De fem torskelleverne ble kvernet for hånd til en semihomogen masse, på samme måte som i lagringsforsøk 1_{lever}. Dette ble gjort med nitrilhansker. Massen ble overført til tette sentrifugerør, og satt i varmebad hvor de ble inkubert ved > 90 °C i 20 minutter. Sentrifugerørene ble sentrifugert ved 4800rpm i 10 minutter. Etter sentrifugering var det øverste laget en oljefase, og resterende restfraksjon etter lever var på bunnen, slik som vist i Figur 16.



Figur 16: Olje separert fra lever sediment etter sentrifugering.

Oljefasen ble pipettert over i nye sentrifugerør, hvor vekt av olje ble notert. Restene fra den semihomogene massen av kvernet lever ble lagret ved -80 °C for eventuelle analyser i senere tid.

For å sikre at oljen var ren olje uten kontaminasjon av leverpartikler eller vann ble oljen på nytt sentrifugert ved 4800rpm i 10 minutter, og pipettert over i lystett glassflaske med lufttett lokk. Analyse av peroksidverdi, TBARS og frie fettsyrer ble gjort innen 48 timer etter samling av prøvene. Mellom analysene ble oljeprøvene «flushet» med nitrogen og lagret mørkt ved kjøleskaptemperatur. Prøvene ble så fryst ved -40 °C, og tint til analyse av farge, p-anisidinverdi og fettsyrekomposisjon.

3.4 Analyser

Metodikkene for analyse av peroksidverdi, 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser og frie fettsyrer ble alle hentet fra SINTEF Ocean. Analysene ble utført likt for lagringsforsøk 1_{lever}, 1_{innmat} og lagringsforsøk 2. Tabell 5 viser en oversikt av bruksområde for utstyr og kjemikalier for alle analysemetodene brukt.

Tabell 5: Oversikt av utstyr og kjemikalier, samt bruksområde.

Bruksområde	Utstyr
Bligh & Dyer	Sentrifugerør – VWR Ultraturrax T25 – Janke & Kunkel Varmeblokk – VWR Stuart sample concentrator Sentrifuge – Rotina 420R Hettich
Fargemåling	Spektrofotometer Evolution 200 Series – Thermo Scientific Semi-mikrokyvetter – BRAND GMBH
Peroksidverdi	Titratortitrolin [®] 7000 - SI Analytics 150 ml begerglass – VWR Magnettrører – Heigar
p-Anisidinverdi	CDR FoodLab [®] Labolytic
Thiobarbitursyre-reaktive substanser	Spektrofotometer – Ultrospec 200 Amersham Pharmacia Kimax rør med lokk – VWR Makrokyvetter – VWR Vortexmikser - VWR
Mengde frie fettsyrer	Spektrofotometer – Ultrospec 200 Amersham Pharmacia Kimax rør med lokk – VWR Makrokyvetter – VWR Vortexmikser - VWR
Bruksområde	Kjemikalier
Bligh & Dyer	Kloroform (stabilisert med 0,6% etanol) – VWR Metanol (for HPLC LC-MS grade) – VWR

Peroksidverdi	0,01 M natriumthiosulfat – MERCK Kloroform (stabilisert med 0,6% etanol) – VWR Eddiksyre – VWR Kaliumiodid – Supelco, EMSURE® ISO, Reag. Ph Eur
p-Anisidinverdi	CDR FoodLab® ferdigfylte kyvetter for p-anisidinverdi
Thiobarbitursyre-reaktive substanser	Ca. 97% 1,1,3,3-tetraoksypropan (TEP) – SIGMA 2-thiobarbitursyre (TBA) – VWR Eddiksyre – VWR Kloroform (stabilisert med 0,6% etanol)– VWR Natriumsulfitt – VWR Trikloreddiksyre (TCA) – VWR
Mengde frie fettsyrer	Isooktan (99% 2,2,4-trimetylpentan ACS Reagens) – Acros organics 98% kobber(III)acetat-monohydrat – AlfaAesar Pyridin – Supelco, EMSURE® ISO, Reag. Ph Eur Technical grade 90% oljesyre – Aldrich

3.4.1 Totallipid ved Bligh and Dyer

Bligh and Dyer er en metode som ble brukt for å bestemme totalt lipidinnhold i torskelleverne brukt i lagringsforsøk 2.

Etter homogenisering av torskellever i lagringsforsøk 2 ble en mengde kvernet lever fryst ned til -80 °C. Dette ble gjort for å senere kunne utføre Bligh and Dyer fett ekstraksjon for å kunne bestemme totalt lipidinnhold i torskelleveren. Bligh & Dyer metoden er en metode som ofte blir brukt ved ekstraksjon og analyse av oljer. Metoden som ble tatt utgangspunkt i var Bligh og Dyer (1959).

Rundt 5 g kvernet torskellever fra lagringsforsøk 2, uke 6 og uke 10, ble veid inn i et sentrifugerør. Det ble lagd 2 paralleller for hver prøve. Det ble så tilført 16 ml destillert vann, 20 ml kloroform og 40 ml metanol i sentrifugerøret, og blandingen ble homogenisert i 2 minutter ved Utraturrax. Det ble deretter tilsatt ytterligere 20 ml kloroform, og blandingen ble sentrifugert i 40 sekunder. Deretter ble det tilsatt 20 ml destillert vann, og blandingen ble homogenisert i 30 sekunder. Sentrifugerøret ble sentrifugert ved 4800rpm i 10 minutter. Kloroformfasen pipetteres ut til et glassrør. Et nytt glassrør veies og 1 ml av kloroformfasen overføres til det veide røret. Røret holdes ved 60 °C i et avtrekkskap og tilføres nitrogen ved en varmeblokk. Når kloroformfasen hadde fordampet ble røret på nytt veid. Vekt av olje ble brukt til utregning av totalt lipidinnhold.

3.4.2 Fettsyresammensetning (eksternt)

Analyse av fettsyresammensetning ble utført ved SINTEF Ocean av laboratorieingeniør Merethe Selnes ved bruk av gasskromatografi.

Oljeprøvene fra uke 6, 8 og 10 fra lagringsforsøk 2, og oljeprøve fra dag 0, 3 og 6 fra lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} ble sendt inn for analyse av fettsyresammensetning.

3.4.3 Fargemåling

Det ble utført spektrofotometrisk måling av oljens farge.

Etter analyse av oksidasjonsporidukt og frie fettsyrer ble olje nedfrost til -40 °C. Oljeprøvene D0, D3 og D6 fra lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}, og alle prøvene fra lagringsforsøk 2, ble tint for fargemåling. Det ble overført 1 ml prøve til en semi-mikrokyvette, og oljen ble målt i et UV-spektrofotometer, med et bølglengdeintervall fra 400 nm til 750 nm. Absorbans for hver bølglengde ble notert i et Excel-ark.

3.4.4 Peroksidverdi (PV)

Peroksidverdien er en metode som benyttes for å bestemme mengde primære oksidasjonsprodukter, hydroperoksider. Metoden som ble brukt var AOCS Official method Cd 8-53 (AOCS, 2003). Instrumentet som ble brukt for titrering var TitroLine® 7000 fra SI Analytics. Alle prøvene i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}, samt alle prøvene fra lagringsforsøk 2 ble analysert for peroksidverdi.

Peroksidverdi ble bestemt ved titrering av Na₂S₂O₃-løsning med konsentrasjon 0,01 M. For denne konsentrasjonen skulle det veies ut over 1 g prøve. Veiing av oljeprøvene ble gjort kort tid før analysen, og begerglassene med oljeprøve ble dekket med aluminiumsfolie.

Før utførelse av analysen, samt ved bruk av ny batch av reagenser ble det utført 2-4 paralleller av blankprøver. Gjennomsnittet av disse parallellene ble brukt i utregningen av PV for oljeprøvene. Blankprøver utføres på samme vis som oljeprøver, bare uten olje.

Når 1 g oljeprøve ble innveid i et 150 ml begerglass, så ble det deretter tilsatt 30 ml eddiksyre:kloroform, i et 3:2 blandingsforhold og 0,5 ml av kaliumiodid, KI (1 g KI i per 1,3 g

destillert vann for 3 prøver). Blandingen ble rørt med magnetrører i 1 minutt, dekket med aluminiumsfolie. Deretter ble 30 ml destillert vann tilsatt, og elektroden ble senket ned i løsningen. Titrering startes, Na₂S₂O₃-løsning titreres mens elektroden måler. Na₂S₂O₃-løsningen reagerer med peroksider i oljen. Når titrering er ferdig, blir mengde av titrator notert og brukt for beregning av PV i mEq/kg olje.

Beregning av PV ble utført med følgende formel:

$$\text{Peroksidverdi } \left(\frac{\text{mEq}}{\text{kg}}\right) = \frac{(V_P - V_B)(\text{ml}) \times 0,01\left(\frac{\text{mEq}}{\text{kg}}\right) \times 1000\left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right)}{\text{prøvemengde}(\text{g})}$$

V_P = titreringsvolum for prøven, V_B = gjennomsnittlig titreringsvolum for blankprøve

Hver oljeprøve ble analysert med 5 paralleller, med unntak av D1 og D2 i lagringsforsøk 1_{innmat}. Grunnet begrenset mengde olje som kunne hentes ut kunne det kun kjøres 3 paralleller istedenfor 5. På grunn av dette, samt to store avvik ved 1_{lever} D0 og 1_{innmat} D6, ble det bestemt å kutte ned fra 5 til 3 paralleller for alle lagringsdagene i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} ved utførelse av statistiske analyser og utforming av grafer. Det ble benyttet konfidensintervallprinsippet, med en KI på 95%. Dermed kunne utvelgelsen gjøres mest mulig representativ. Det var prøveresultatene som var innenfor konfidensintervallet som ble brukt. Differansen fra de ytre grensene ga grunnlag til hvilke paralleller som ble inkludert dersom det var flere utenfor eller innenfor grensene.

3.4.5 p-Anisidinverdi (AV) og TOTOX verdi

p-Anisidinverdi er et tall som beskriver mengden sekundære oksidasjonsprodukter, hovedsakelig aldehyder og ketoner, som er i en prøve.

Det karsinogene stoffet p-Anisidin reagerer med aldehyder i oljen og danner farge som måles spektrofotometrisk på 366 nm. Et CDR FoodLab® test-kit fra Labolytic ble brukt for å bestemme p-anisidinverdien, da det var et lukket system som minimerer farerisiko og øker nøyaktighet dersom brukt korrekt.

CDR FoodLab® instrumentet ble brukt ved metoden fra Campden laboratoriet (Campden BRI Method TES-AC-360), hvor det vises at korrelasjonskoeffisient er høy på rundt 0,98. (BRI, 2017). Resultatene kan sammenlignes med AOCS offisielle metode Cd 8-53 (AOCS, 2003).

Ferdigfylte kyvetter med reagens fra Labolytic ble brukt, tilhørende samme test-kit. (Labolytic, 2021) En spesialpipette med stempel ble brukt for å forsikre nøyaktig pipettering av oljeprøvene. Pipetten ble tørket av og rensset i henhold til instruksene. Før tilsats av 25 µl av oljeprøve og avlesning ble kyvettene varmet opp til rundt 37 °C. Raskt arbeid og god blanding av oljen i reagensen var presisert. Prøvene som ble analysert var fra lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} dager D0, D3, D6. På grunn av mangel av prøvemateriale ble ikke D1 og D2 målt for AV. Total oksidasjon, TOTOX, ble beregnet med gjennomsnittet for peroksidverdien og p-anisidinverdien. Formelen som ble brukt var $TOTOX = (2 \times PV) + AV$. (CODEX, 2017)

3.4.6 Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS)

TBARS analyserer for sekundære oksidasjonsprodukt som kan reagere med 2-thiobarbitursyre (2-thiobarbituric-reactive substances = TBARS). Det er reaksjonen mellom 2-thiobarbitursyre og aldehydet malondialdehyd som produserer det rosa TBA-pigmentet som brukes til å bestemme TBARS verdi (Frankel, 2005). Metoden som ble brukt var mikrometode som basert på metoden av Ke og Woyewoda (1979).

Hver gang analysen ble utført ble det laget en standardkurve som gikk fra 25-200 µmol av TEP-løsning (1,1,3,3-tetraoksypropan), disse er vedlagt i vedlegg 3 for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}, og vedlegg 5 for lagringsforsøk 2. Korrelasjonskoeffisienten var 0,9969-0,999. Rundt 10 mg oljeprøve ble innveid i et kimax-rør, og tilsatt 5 ml TBA-working solution (2-thiobarbitursyre, kloroform og natriumsulfitt). Rørene ble satt i varmebad i 45 minutter ved 90 °C, før nedkjøling. Rørene ble tilsatt 2,5 ml 0,28 M trikloreddiksyre (TCA) løsning. Rørene ble snudd på 1-2 ganger for å mikse prøven, før de ble sentrifugert på 2500 rpm i 7 minutter. Den rosa vannfasen ble målt ved 538 nm i et spektrofotometer. Destillert vann ble brukt som referanse. Absorbansen ble notert i et Excel-skjema.

Absorbansen (Abs), prøvemengde, stigningstallet (A) og y-intersept (B) fra standardkurven. TBARS ble beregnet med bruk av denne formelen:

$$TBARS \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{kg}} \right) = \frac{A (\mu\text{mol}) \times \text{Abs}(nm)}{B(nm) \times \frac{\text{prøvemengde}(g)}{1000 \left(\frac{g}{\text{kg}} \right)}}$$

3.4.7 Mengde frie fettsyrer (FFA)

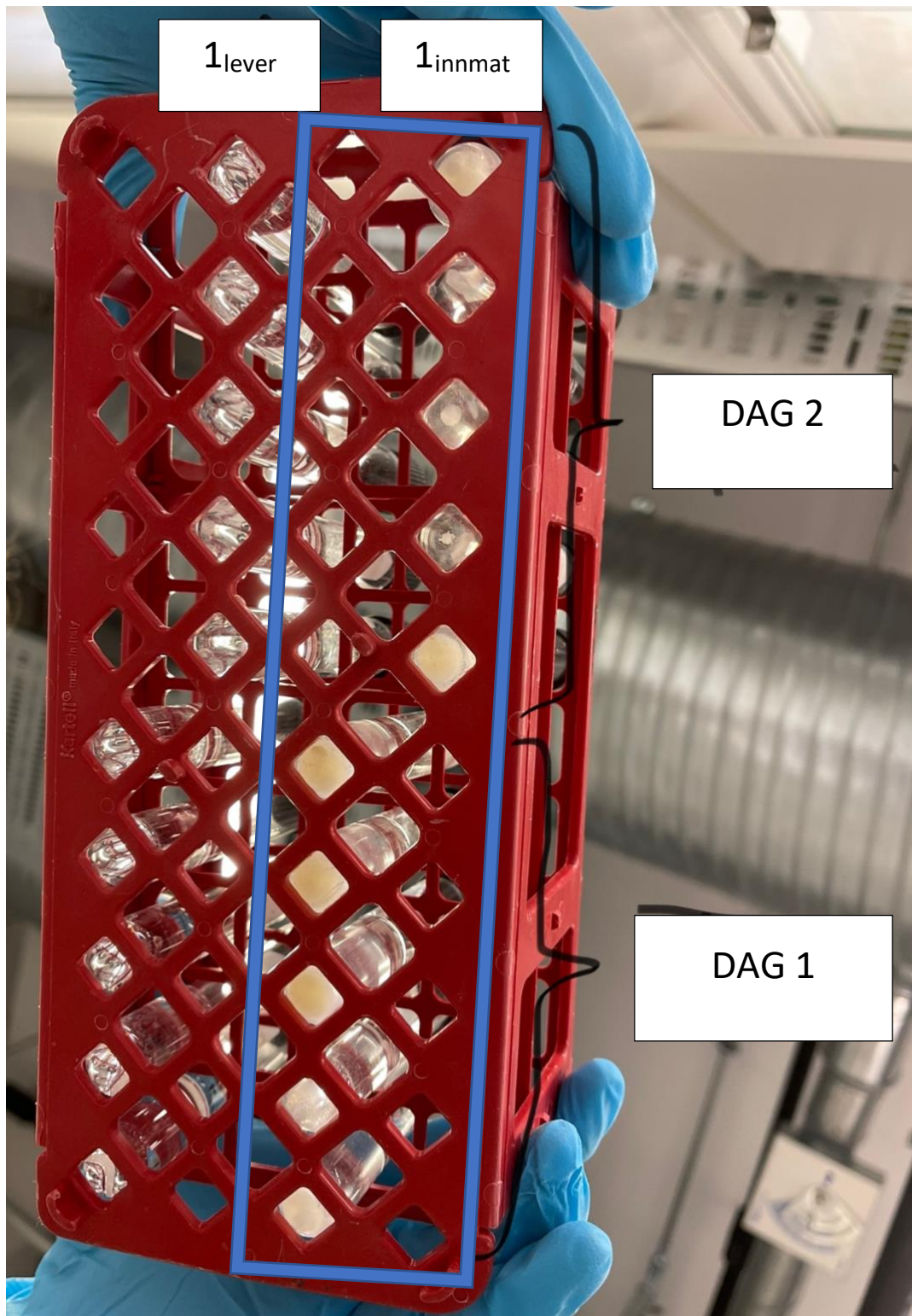
Analysen for bestemmelse av mengde frie fettsyrer for oljeprøver ble basert på en metode av Bernárdez et al. (2005) Isooktan ble benyttet i stedet for sykloheksan. Hver gang analysen ble utført ble det laget en standardkurve med en oljesyrestandard (0,1M). Standardkurven gikk fra 25-200 μmol oljesyre, og ble brukt for beregningen av prosentvis mengde frie fettsyrer. Standardkurvene er vedlagt i vedlegg 4 for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}, og vedlegg 6 for lagringsforsøk 2. Korrelasjonskoeffisienten var 0,9990-0,9999.

Oljeprøve (0,1-0,2 g) ble pipetert til et kimax rør, fulgt opp av 5 ml isooktan. Hver prøve ble analysert med 5 paralleller. Rørene ble vortex-mikset kort for å oppløse prøven. Deretter ble det tilsatt 0,5 ml kobberacetat-pyridin, og vortex-mikset i 20-30 sekunder. Rørene ble sentrifugert ved 2500rpm i 7 minutter, før den øverste fasen ble pipetert ut i en kyvette og målt ved 715 nm. Isooktan ble brukt som referanse. Absorbansen ble notert i et Excel-skjema.

Absorbansen (Abs), prøvemengde, stigningstallet (A) og y-intersept (B) ble brukt for å beregne %FFA:

$$\%FFA = \frac{(\text{Abs} - B)(nm) \times 282,47 \left(\frac{\text{mol}}{g} \right)}{A (\text{mol}) \times \text{prøvemengde} \left(1000 \frac{\text{kg}}{g} \right) \times 10}$$

For dager 1 og 2 ved lagringsforsøk 1_{innmat} ble det observert at det var utfellinger/sediment i bunnen av kimax rørene før måling av absorbans, sett i Figur 17. Dette skyldes at det var lite olje å hente ut, og dermed var det vanskelig å gjøre oljeprøvene frie for vann og andre partikler. Slike utfellinger var mulig å se ved analyse av frie fettsyrer og TBARS.



Figur 17: Bilde av sediment/utfellinger ved TBARS ved lagringsforsøk 1_{innmat} dag 1 og dag 2.

3.5 Statistiske analyser

Programmet SPSS Statistics ble brukt for å analysere resultatene for oksidasjonsstatus. For lagringsforsøk 1 ble en-veis ANOVA (signifikansnivå 0,05) benyttet for å sammenligne 1_{lever} og 1_{innmat} . Deretter ble datasettet splittet og analysert for T-test, med Tukeys post hoc test for å se på forskjeller mellom dagene (vedlegg 7). For lagringsforsøk 2 ble kun T-test med Tukeys Post Hoc test (signifikansnivå 0,05) benyttet for å se på forskjeller mellom ukene 6, 8 og 10 (vedlegg 8). Ved presentering av resultater fra Tukeys Post Hoc test grupperes de som er signifikant like, i grupper a, b, c, osv... Dette vises ved at bokstaven for gruppen står i hevet skrift ved koden for prøven. For eksempel $D0^a$, $D1^a$ betyr da et dag 0 og dag 1 er signifikant like ved signifikansnivå 0,05.

For enkelhetens skyld ble datasettene splittet ved å oppdeles basert på lagringsforsøk 1 og 2, og så på antall paralleller. Grupperingen var slik:

- Lagringsforsøk 1:
 - AV (2 paralleller for hver prøve)
 - PV (3 paralleller for hver prøve)
 - FFA og TBARS (5 paralleller for hver prøve)
- Lagringsforsøk 2:
 - AV (2 paralleller for hver prøve)
 - PV, FFA, TBARS (5 paralleller for hver prøve)

4 Resultat

4.1 Bligh and Dyer: fettekstraksjon og totalt lipidinnhold

Tabell 6 viser totalt lipidinnhold i prøvematerialet for uke 6 og 8 i lagringsforsøk 2. I gjennomsnitt er det totale lipidinnholdet av levrene fra uke 8 52,1%. For uke 10 var gjennomsnittet noe lavere, 45,5%.

Tabell 6: Resultater fra Bligh and Dyer analyse av restråstoff fra lagringsforsøk 2 uke 6 og uke 10.

Antall uker etter oljeekstraksjon	Gj.snitt lipidinnhold [g/100g prøve] ± standardavvik
Uke 6	52,079 ± 1,025
Uke 10	45,519 ± 0,293

4.2 Lagringsforsøk 1: Korttidslagret innmat fra torsk ved 4 °C

4.2.1 Prøvemateriale

Tabell 7 viser mengde olje og restfraksjon hentet ut fra sentrifugerørene for alle dagene i lagringsforsøk 1. Lagringsdagene hadde 4 paralleller 50 ml sentrifugerør, med unntak av 1_{innmat} D1 og D2, som hadde 3 paralleller. Dette medførte lite prøvemateriale som førte til en begrensning i antall paralleller som kunne kjøres ved videre analyse. Tining og uthenting av olje skjedde på 3 forskjellige dager. D0 ble analysert først, og det ble ikke målt mengde sediment for dag 0 for 1_{innmat}.

Tabell 7: Mengde olje og restfraksjon separert ved prosessering av 1_{lever} og 1_{innmat}, samt prosentandel olje. (m.d.: mangler data) * bare 3 paralleller

Antall dager før prosessering	Prøve	Olje (g)	Restfraksjon etter andre sentrifuge (g)	Prosentandel som var olje
D0	1 _{lever}	155,72	96,20	61,8%
	1 _{innmat}	23,82	m.d.	m.d.
D1	1 _{lever}	78,25	93,98	45,4%
	1 _{innmat} *	11,73	93,04	11,2%
D2	1 _{lever}	65,37	72,94	47,3%
	1 _{innmat} *	12,2	95,88	11,3%
D3	1 _{lever}	66,41	51,75	56,2%
	1 _{innmat}	50,05	82,13	37,9%
D6	1 _{lever}	43,74	38,59	53,1%
	1 _{innmat}	24,97	46,69	34,8%

Andel olje hentet ut for 1_{lever} varierte fra 45,4% til 61,8%. Andel olje hentet ut for 1_{innmat} varierte fra 11,2% til 37,9%.

4.2.2 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning er vedlagt i vedlegg 9. Tabell 8 viser fettsyregrupper for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} dag 0, 3 og 6. Stort sett er det liknende trender for alle dagene. Det er høyere andel av metta- og enumetta fettsyrer, og lavere andel flerumetta- og omega-3 fettsyrer i 1_{innmat} enn 1_{lever}. Ellers er det relativt små variasjoner innenfor dagene ($\pm 0,05$ til 2,05%).

Tabell 8: Fettsyregrupper for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} for dag 0, 3 og 6 som prosentandel av totalt fettsyreinhold.

%	Dag 0		Dag 3		Dag 6	
	1 _{lever}	1 _{innmat}	1 _{lever}	1 _{innmat}	1 _{lever}	1 _{innmat}
Metta fettsyrer	19,87	21,09	19,17	20,11	19,80	20,16
Enumetta fettsyrer	50,88	53,63	52,93	54,25	52,14	54,51
Flerumetta fettsyrer	29,25	25,28	27,91	25,64	28,07	25,33
Omega-3 fettsyrer	25,02	21,42	24,15	21,85	24,06	21,77

Fokuset faller på EPA og DHA. Tabell 9 viser variasjonen av innhold av EPA og DHA for lagringsforsøk 1.

Tabell 9: Innhold av EPA og DHA i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} i mg/g og forskjell mellom D0, D3 og D6

[mg/g]	Dag	1 _{lever}		1 _{innmat}
EPA 20:50 n-3	D0	82,95 \pm 4,51	>	72,59 \pm 1,14
	D3	97,88 \pm 2,38	>>	70,83 \pm 0,51
	D6	80,32 \pm 3,35	\approx	85,35 \pm 1,99
DHA 22:6 n-3	D0	110,14 \pm 6,16	>	99,36 \pm 1,65
	D3	100,85 \pm 2,44	>	99,19 \pm 0,94
	D6	107,42 \pm 5,90	>	94,55 \pm 2,55

Hovedsakelig har 1_{lever} mer EPA og DHA enn 1_{innmat} . Men, det er ikke store forskjeller. Standardavvikene for 1_{lever} er høyere enn for 1_{innmat} . Det er mer DHA enn EPA ved alle dagene for både 1_{lever} og 1_{innmat} .

4.2.3 Farge

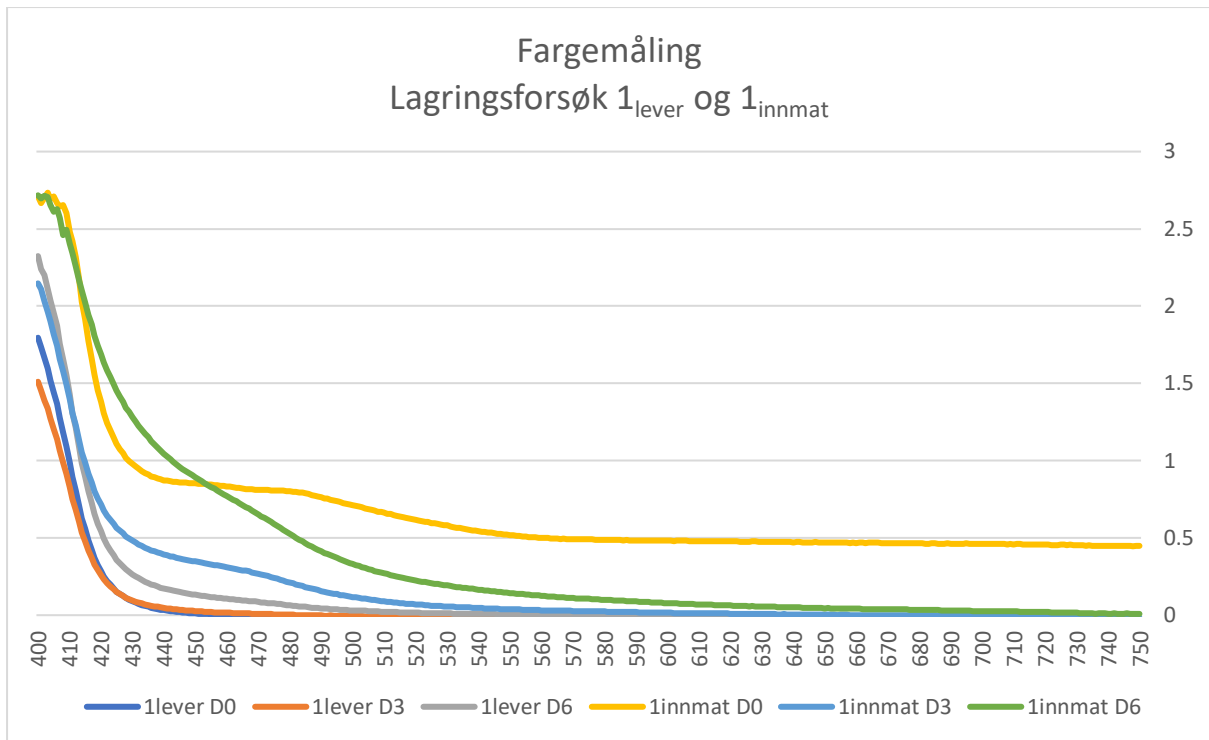
Figur 18 viser den visuelle fargen på oljene fra D0, D3 og D6 fra lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} . Referansen var avionisert vann.



Figur 18: Fra venstre til høyre: Referanse (avionisert vann); 1_{lever} D0; 1_{innmat} D0; 1_{lever} D3; 1_{innmat} D3; 1_{lever} D6; 1_{innmat} D6.

Figur 19 viser resultatene av UV-spektrofotometrisk måling av de samme prøvene som overnevnt i en absorbansgraf. Det viser en trend av høyere absorbans for 1_{innmat} enn det for 1_{lever} . Dette samsvarer med det som kan sees visuelt i Figur 18.

Det kommer til syne i grafene for fargemåling at D0 fra lagringsforsøk 1_{innmat} var kontaminert med vann eller partikler. Visuelt var det mulig å se at prøvene var uklare, noe som kan tyde på en slik kontaminasjon. I grafen kommer det til syne at denne prøven hadde høyere absorbans på alle bølgelengdene fra 400 til 750 nm. Alle prøvene hadde størst absorbansutslag på bølgelengde 400, som vises visuelt som gul farge. Absorbansintervallet for alle prøvene i lagringsforsøk 1 ved denne bølgelengden var 1,5-2,7.

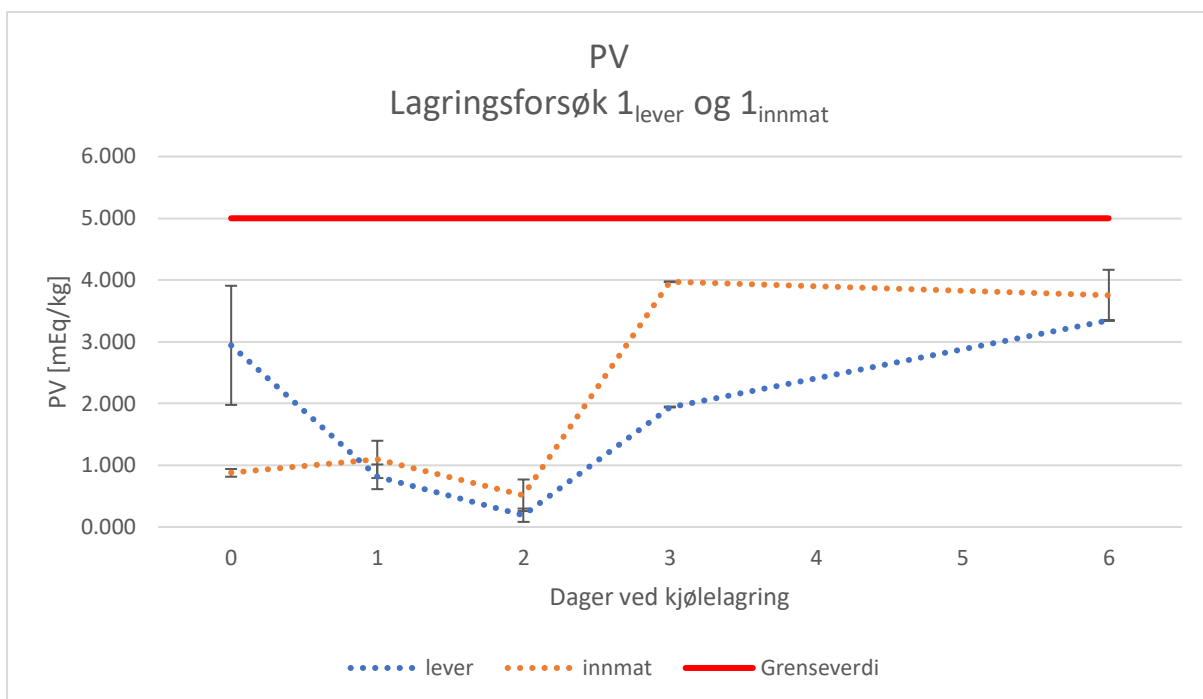


Figur 19: Absorbansgraf for 1_{lever} og 1_{innmat} for dag 0, 3 og 6 (D0, D3 og D6) fra 400 nm til 750 nm.

4.2.4 Oksidasjonstatus

4.2.4.1 Peroksidverdi (PV)

Figur 20 er en grafisk framstilling av resultatene for peroksidverdi i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}. I tillegg til grafene for peroksidverdi for prøvene er det også lagt inn en øvre grense for akseptabelt nivå for innhold av peroksidverdi for produkter som skal benyttes til humant bruk fra Codex Alimentarius (CODEX, 2017). Alle verdier i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} er under den akseptable grensen på 5,00 mEq/kg (milliekvivalenter peroksid/kg olje).



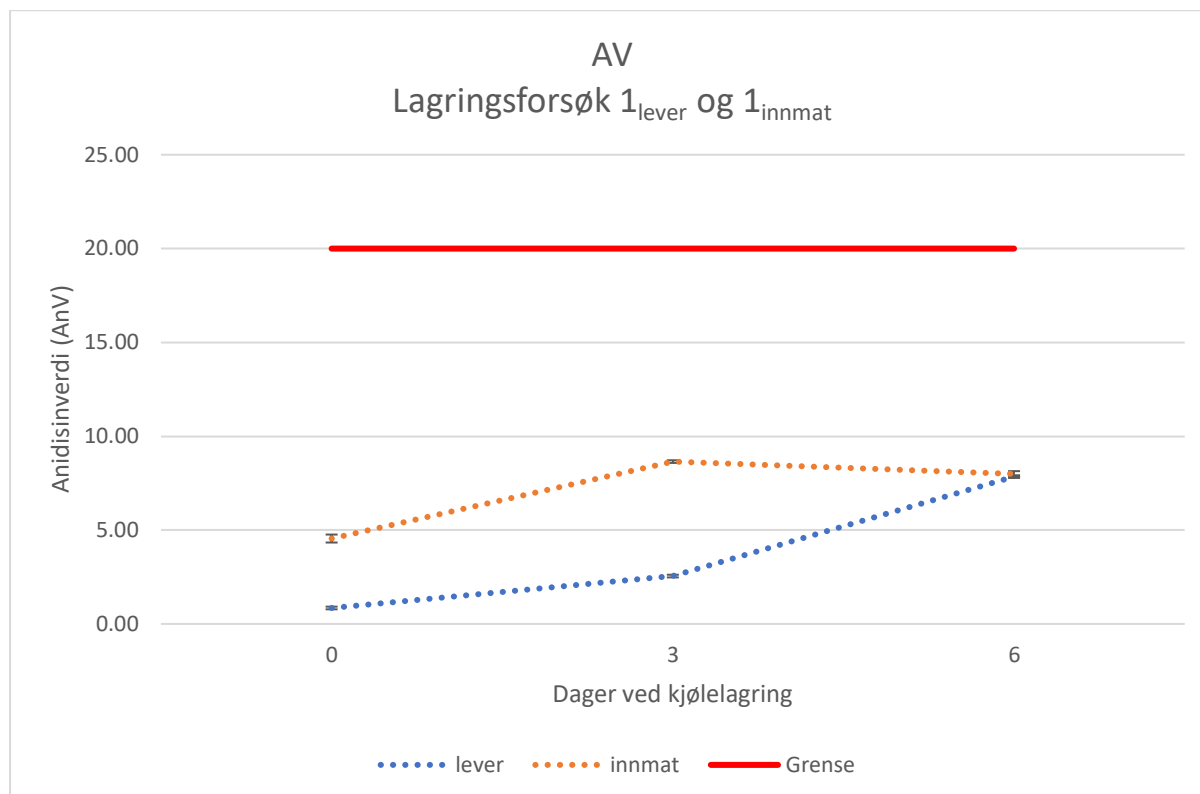
Figur 20: Gjennomsnittlig peroksidverdi for dag 0, 1, 2, 3 og 6 for 1_{lever} og 1_{innmat} med standardavvik, samt grenseverdien på 5 mEq/kg (CODEX, 2017). Grunnet mangel på sentrifugerør ble det ikke utført analyse av dag 4 og 5 i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}. Verdiene for disse lagringsdagene er derfor ukjent, og trenden som fremstilles i grafen for disse dagene er derfor usikker.

Utførelse av T-test med antatt like varianser viser ikke signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi på 0,714. Det er derimot signifikant forskjell i peroksidverdi mellom dagene i begge lagringsforsøkene med en p-verdi lavere enn 0,001. Dette gjort med en-veis ANOVA. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D2^a, D1^{ab}, D3^{bc}, D0^{cd}, D6^d for lagringsforsøk 1_{lever}. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D2^a, D0^a, D1^a, D6^b, D3^b for lagringsforsøk 1_{innmat}.

Ved utføre av samme statistiske analyse uten D0, ga T-test resultatet at det er signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi på 0,026 med antatt like varianser.

4.2.4.2 p-Anisidinverdi (AV)

Figur 21 er en grafisk framstilling av resultatene for p-anisidinverdi i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} . I figuren viser også en grense for AV fra Codex Alimentarius på 20 AnV (CODEX, 2017).

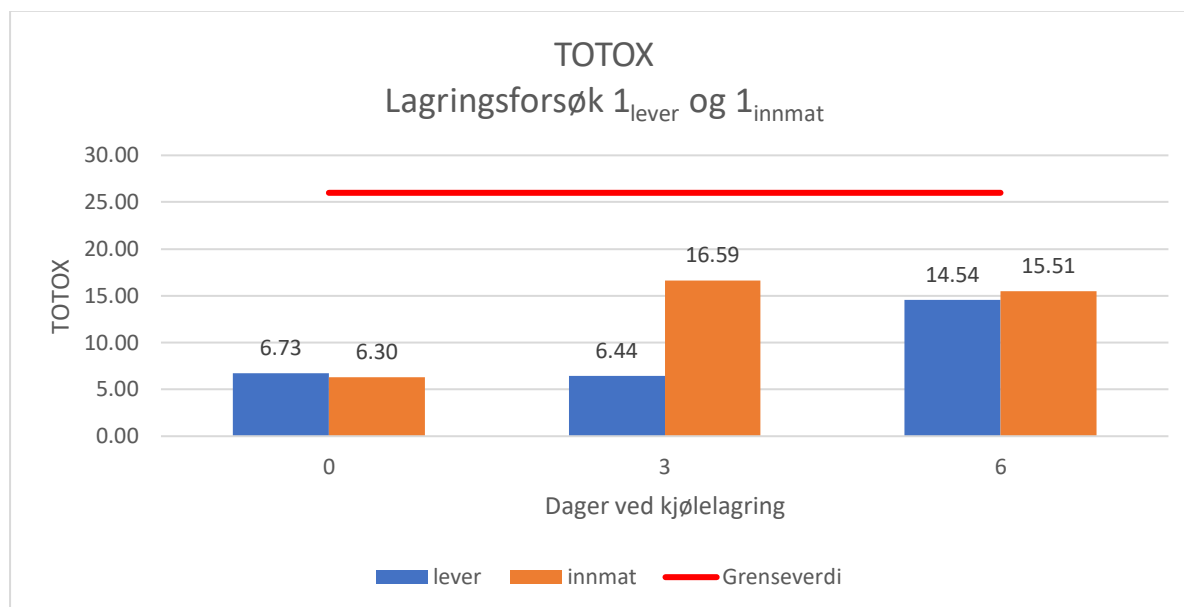


Figur 21: Gjennomsnittlig p-anisidinverdi for dag 0, 3 og 6 for 1_{lever} og 1_{innmat} med standardavvik, samt grenseverdien på 20 AnV (CODEX, 2017).

Utførelse av T-test med antatt like varianser viser at det er ikke signifikant forskjell mellom lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi på 0,059. Her finner vi en type-I-feil, forkastningsfeil, i og med at vi forkaster at det er signifikant forskjell statistisk selv om det er kun 6% sannsynlig at 1_{lever} og 1_{innmat} er like. Det er altså ikke langt unna at det er signifikant forskjell mellom lagringsforsøkene. Hvis signifikansnivået var 0,06 ville det vært signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} . En-veis ANOVA viser signifikant forskjell i p-anisidinverdi mellom dagene for både lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi lavere enn 0,001. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D0^a, D3^b, D6^c for lagringsforsøk 1_{lever} . Tukeys HSD PostHoc test ga resultatene D0^a, D6^b, D3^c for lagringsforsøk 1_{innmat} . D6 og D3 er signifikant forskjellige fra hverandre, men hvis man sammenligner D3 og D6 med D0, er begge en god del høyere.

4.2.4.3 Totalt oksidasjonsnummer (TOTOX)

Grafen i Figur 22 viser forskjellen i total oksidasjon mellom olje fra kun lever og olje fra lever og slo ved kjølelagring i 0, 3 og 6 dager. Grenseverdien på 26 er fra Codex Alimentarius (CODEX, 2017).

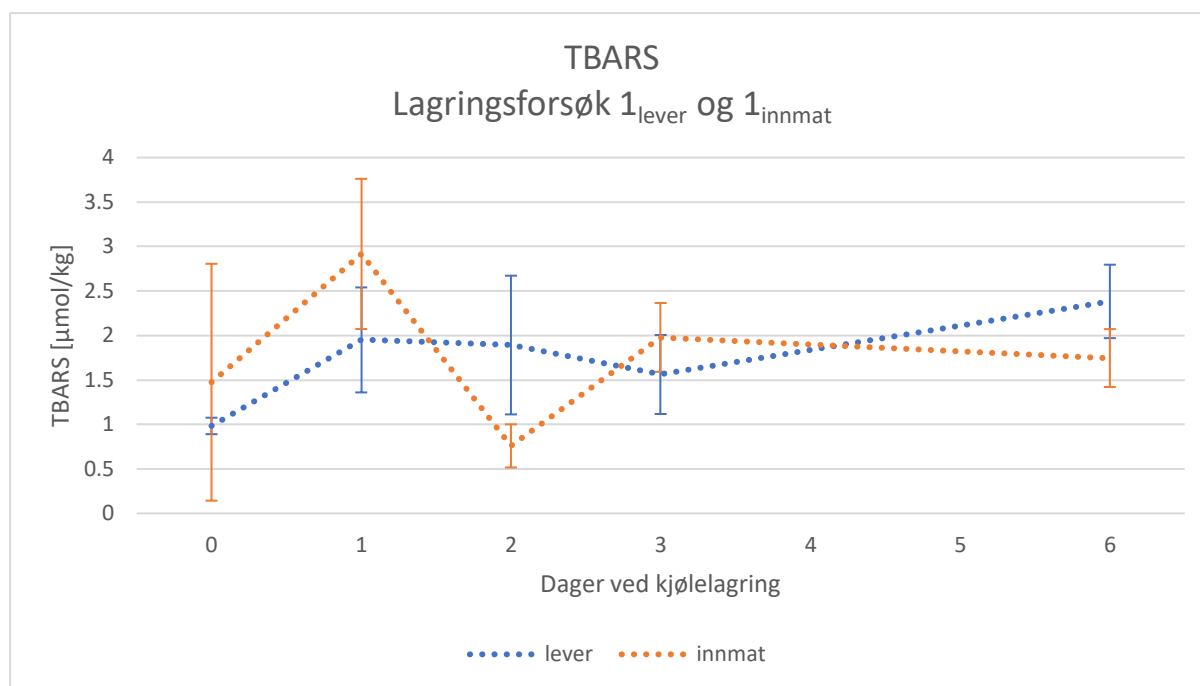


Figur 22: Gjennomsnittlig TOTOX-verdi for dag 0, 3 og 6 for 1_{lever} og 1_{innmat}, samt grenseverdien på 26 (CODEX, 2017).

Ved startpunktet, dag 0, er 1_{lever} og 1_{innmat} relativt like, rundt 6,5. Ved 3 dager kjølelagring øker 1_{innmat} betraktelig og man får en TOTOX verdi på 16,6. TOTOX for oljen 1_{lever} ved dag 3 holder seg fortsatt lavt på 6,4. Innen dag 6 er både 1_{lever} og 1_{innmat} oppe i høyere TOTOX tall, hhv. 14,5 og 15,5. Alle de målte verdiene for TOTOX er under grensen på 26 (CODEX, 2017).

4.2.4.4 Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS)

Figur 23 viser en grafisk fremstilling av resultatene for thiobarbitursyre-reaktive substanser for lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} ved dag 0, 1, 2, 3 og 6 av kjølelagring. Det vises ingen tydelig trend fra dag til dag for begge lagringsforsøkene, med relativt store standardavvik. I en rapport fra VKM er det foreslått et akseptabelt nivå av TBARS på 0,1 til 3,9 mmol/kg olje (100 til 3900 $\mu\text{mol/kg}$ olje) (Aursand et al., 2011).

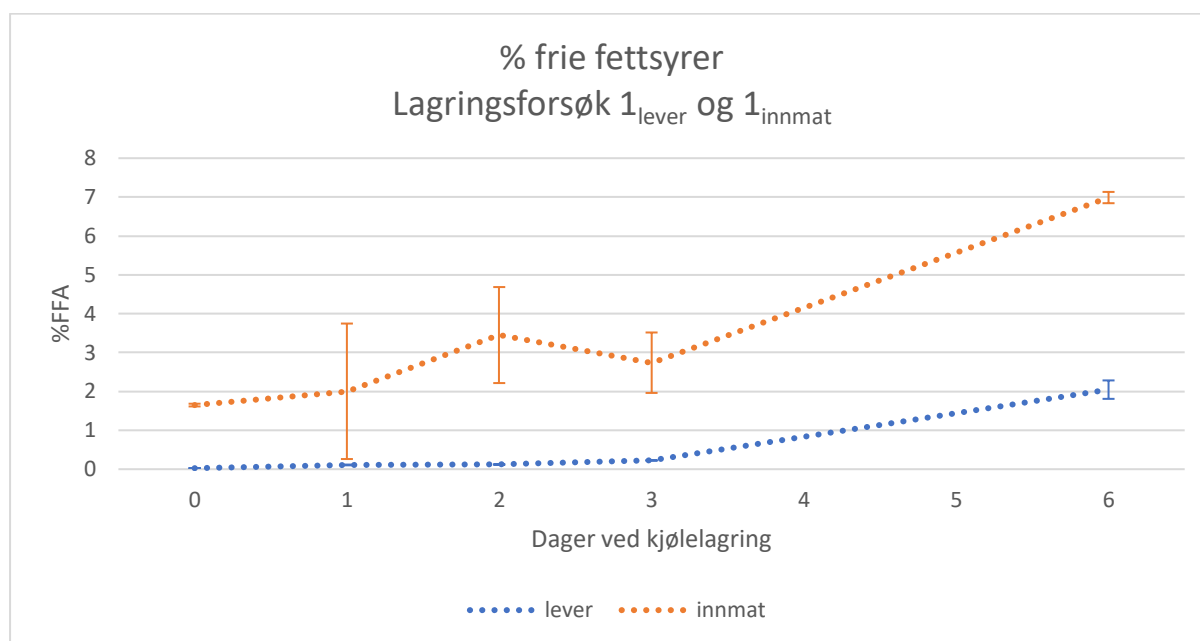


Figur 23: Gjennomsnittlig TBARS for dag 0, 1, 2, 3 og 6 for 1_{lever} og 1_{innmat} med standardavvik. Grunnet mangel på sentrifugerør ble det ikke utført analyse av dag 4 og 5 i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}. Verdiene for disse lagringsdagene er derfor ukjent, og trenden som fremstilles i grafen for disse dagene er derfor usikker.

En T-test med antatt like varianser viser ikke signifikant forskjell i mengde thiobarbitursyre-reaktive substanser mellom 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi på 0,931. Med en-veis ANOVA kan det påvises signifikant forskjell mellom dagene for begge lagringsforsøkene, men med ulik p-verdi. 1_{lever} er signifikant forskjellig mellom dagene med en p-verdi på 0,009, og 1_{innmat} er signifikant forskjellig mellom dagene med en p-verdi på 0,004. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D0^a, D3^{ab}, D2^{ab}, D1^{ab}, D6^b for lagringsforsøk 1_{lever}. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D2^a, D0^a, D6^{ab}, D3^{ab}, D1^b for lagringsforsøk 1_{innmat}.

Frie fettsyrer

Grafen i Figur 24 under viser prosent frie fettsyrer i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} etter 0, 1, 2, 3 og 6 dager ved kjølelagring. Det er stort sett høyere nivå frie fettsyrer i 1_{innmat} enn 1_{lever}. Ved lagringsforsøk 1_{lever} holder nivået seg lavt frem til dag 3, mens ved dag 6 er nivået litt høyere, på rundt 2 %. For lagringsforsøk 1_{innmat} er mengde frie fettsyrer relativt lave fram til dag 3, men har større standardavvik. Det økte til ca. 7 % frie fettsyrer ved dag 6, som er over det som anses som akseptabelt (2-5 %).



Figur 24: Gjennomsnittlig prosent frie fettsyrer for dag 0, 1, 2, 3 og 6 for 1_{lever} og 1_{innmat} med standardavvik. Grunnet mangel på sentrifugerør ble det ikke utført analyse av dag 4 og 5 i lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}. Verdiene for disse lagringsdagene er derfor ukjent, og trenden som fremstilles i grafen for disse dagene er derfor usikker.

T-test med antatt like varianser viser en signifikant forskjell i frie fettsyrer mellom lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat} med en p-verdi mindre enn 0,001. Med en-veis ANOVA kan det også påvises signifikant forskjell mellom dagene i begge lagringsforsøk med en p-verdi på mindre enn 0,001. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D0^a, D1^a, D2^a, D3^a, D6^b for lagringsforsøk 1_{lever}. Tukeys HSD Post Hoc test ga resultatene D0^a, D1^a, D3^a, D2^a, D6^b for lagringsforsøk 1_{innmat}.

4.3 Lagringsforsøk 2: Langtidslagret lever fra torsk ved -20 °C

4.3.1 Prøvemateriale

Tabell 10 viser vekt av hver lever i hver av ukene i lagringsforsøk 2. For hver uke ble 5 stk. torskelever prosessert og analysert. Levrene hadde intensjonelt forskjellig størrelse, for å gi en representativ variasjon. Største gjennomsnitt på leverstørrelse er i uke 8, og minste er i uke 10.

Tabell 10: Vekt av de 5 levrene for hvert uttak, uke 6, 8 og 10, og gjennomsnittsvekten

Lever	Uke 6 [gram]	Uke 8 [gram]	Uke 10 [gram]
1	124,71	138,99	183,12
2	83,35	491,54	93,05
3	543,47	630,30	132,77
4	220,35	248,80	106,18
5	128,94	144,37	58,05
Gjennomsnitt	220,16	330,80	114,63

Tabell 11 viser vekt av olje og restfraksjon for hver oljeuthenting i lagringsforsøk 2. Tallene i tabellen er ikke den totale mengden olje og restfraksjon fra de respektive 3 ukene med torskelever. Ved hver prosessering ble en mengde kvernet lever fryst ned til senere analyse av Bligh and Dyer. Prosentandel olje oppgitt i tabellen skal derimot være representativt, da den kvernedede levermassen ble semihomogen.

Det var høyest prosentandel olje i uke 8. Det var ganske likt i uke 6 og 10, men det var lavere prosentandel olje i uke 6.

Tabell 11: Mengde olje og restfraksjon separert ved prosessering etter 6, 8 og 10 uker frysing, samt prosentandel olje

	Olje [gram]	Restfraksjon [gram]	Prosentandel olje
Uke 6	279,34	286,06	49,4%
Uke 8	519,71	396,27	56,7%
Uke 10	206,84	201,28	50,7%

4.3.2 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning er vedlagt i vedlegg 10. Tabell 12 viser ulike fettsyregrupper i prosent av totalt fettsyreinhold etter uke 6, 8 og 10 fryselagring. Det er variasjoner mellom de ulike ukene ($\pm 0,3$ til 4,9). Det var høyere andel omega-3 fettsyrer i uke 8, og høyere andel metta fettsyrer i uke 6. Man kan også se at det var mindre enumetta fettsyrer og mer flerumetta fettsyrer i uke 8. Det var størst forskjell i andel flerumetta- og omega-3 fettsyrer, hvor uke 8 hadde størst andel av disse i forhold til uke 6 og 10.

Tabell 12: Fettsyregrupper for lagringsforsøk 2 for uke 6, 8 og 10 som prosentandel av totalt fettsyreinhold.

%	Uke 6	Uke 8	Uke 10
Metta fettsyrer	19,26	17,31	17,67
Enumetta fettsyrer	52,19	49,27	53,03
Flerumetta fettsyrer	28,55	33,42	29,30
Omega-3 fettsyrer	24,46	29,25	25,23

Fokuset faller på EPA og DHA innhold, som vises i tabellen under. Tabellen viser også hvordan det varierte mellom ukene.

Tabell 13: Innhold av EPA og DHA i lagringsforsøk 2 og forskjell mellom uke 6, 8 og 10.

[mg/g]	Uke 6		Uke 8		Uke 10
EPA 20:5 n-3	84,76 \pm 0,26	<	106,12 \pm 1,97	>	95,75 \pm 0,18
DHA 22:6 n-3	107,56 \pm 0,21	<	119,40 \pm 2,58	>	110,32 \pm 0,01

Tabell 13 viser at det er en trend for både mengde EPA og DHA, hvor det er lavest innhold i uke 6, og høyest i uke 8. Det var også mer EPA enn DHA ved alle ukene i lagringsforsøk 2.

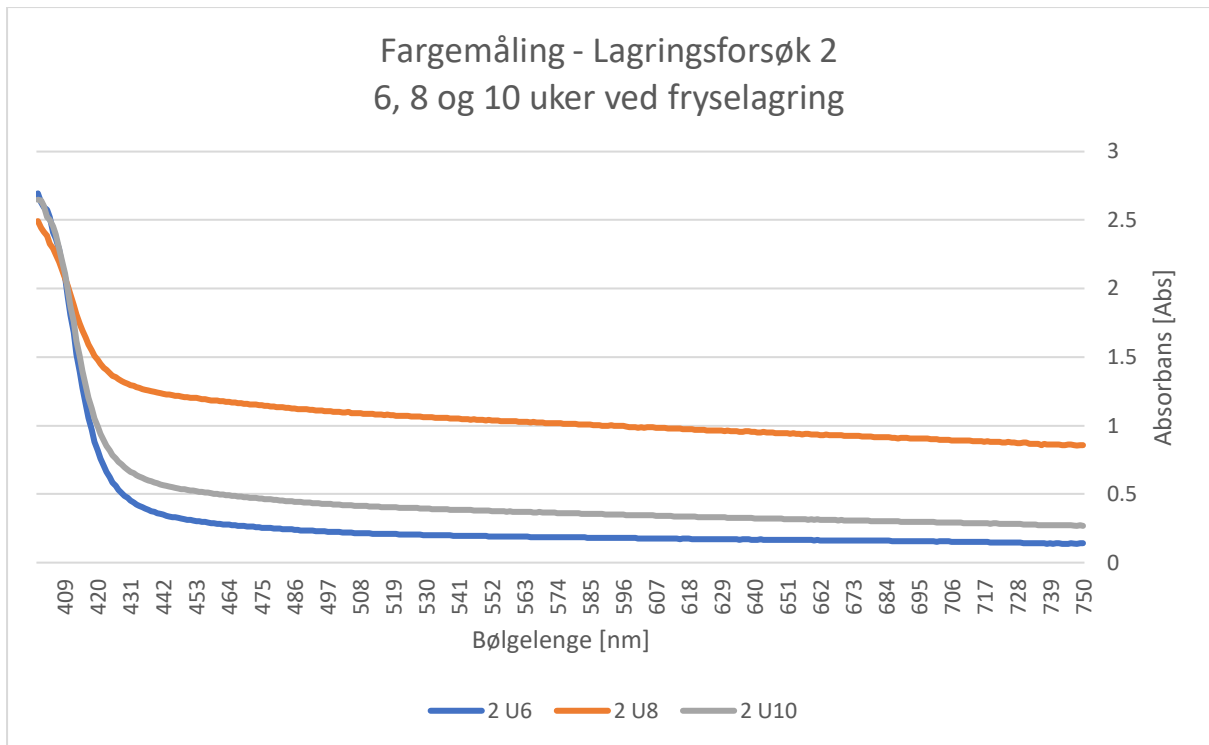
4.3.3 Farge

Figur 25 illustrerer den visuelle fargen på oljen fra ukene 6, 8 og 10 etter nedfrysning.



Figur 25: Fra venste til høyre: Referanse (avionisert vann); uke 6; uke 8; uke 10

Figur 26 viser absorbansen i oljeprøvene i lagringsforsøk 2. Absorbansen måles mellom 400 og 750 nm. Den høye absorbansen i uke 8 kan skyldes kontaminasjon av oljen som forårsaket uklarhet og ga utslag som farge. Visuelt var det mulig å se at prøven var uklar, noe som kan tyde på en slik kontaminasjon. I grafen kommer det til syne at denne prøven hadde høyere absorbans på alle bølgelengdene fra 400 til 750 nm. Alle prøvene hadde størst absorbansutslag på bølgelengde 400, som vises visuelt som gul farge. For oljeprøvene i lagringsforsøk 2 var absorbansen ved bølgelengde 400 nm rundt 2,5.

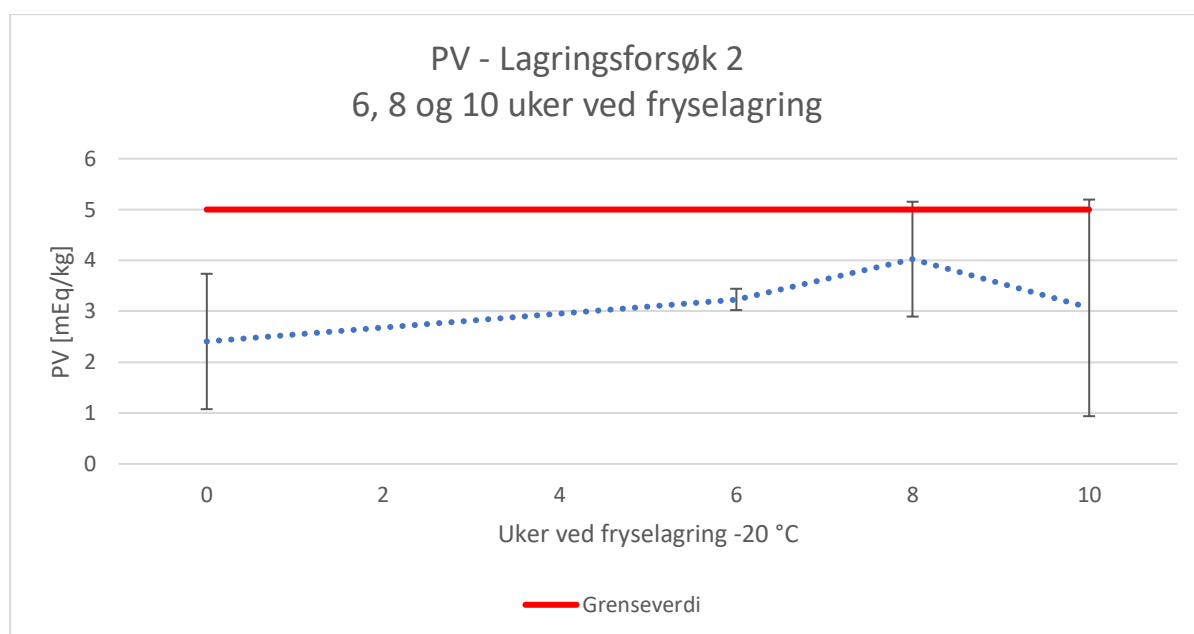


Figur 26: Absorbansgraf fra lagringsforsøk 2 uke 6, 8 og 10 (U6, U8, U10) fra 400 nm til 750 nm.

4.3.4 Oksidasjonsstatus

4.3.4.1 Peroksidverdi (PV)

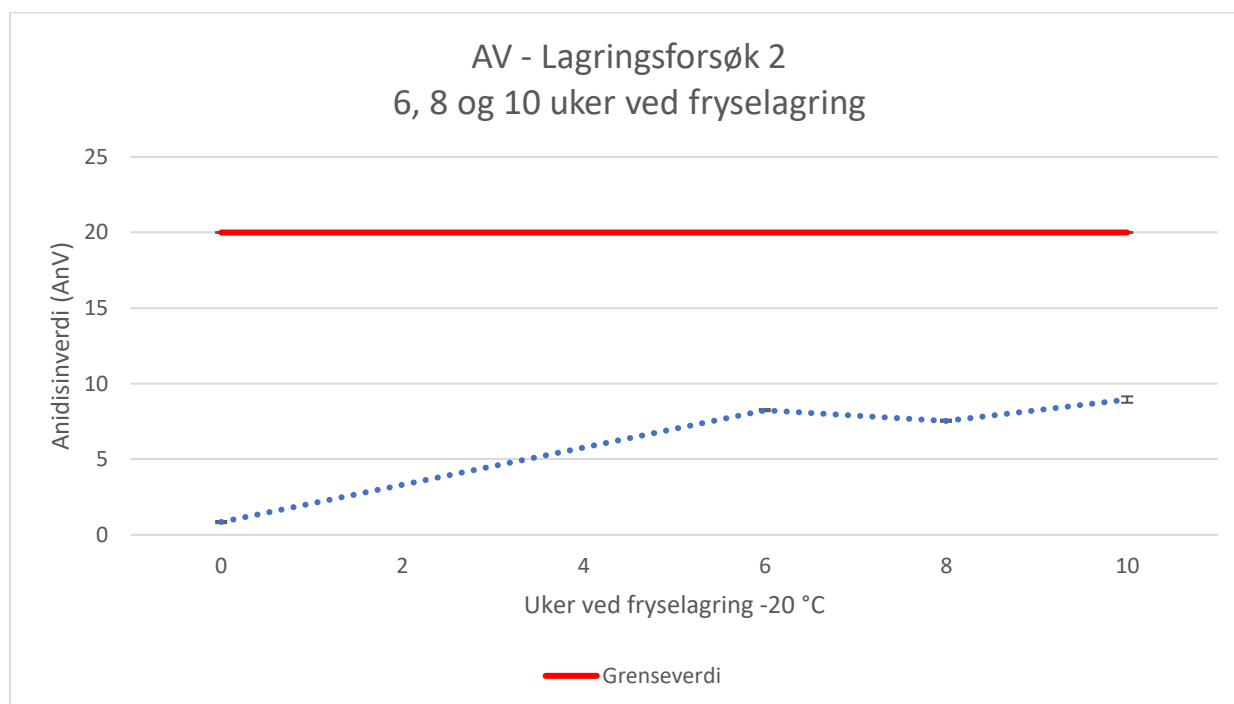
Figur 27 viser en grafisk illustrering av resultatene for peroksidverdi for lagringsforsøk 2 etter 0, 6, 8 og 10 uker. Uke 0 er en referanseverdi som ble hentet fra lagringsforsøk 1_{lever} dag 0 (D0) for å representere et startpunkt. Verdiene for uke 6, 8 og 10 er mellom 3 og 4 mEq/kg, og er relativt like. Det er store standardavvik på uke 8 og 10, og størst på uke 10. Den øre grensen på standardavvikene på både uke 8 og 10 er litt over grenseverdien fra CODEX på 5 mEq/kg (CODEX, 2017). Med en-veis ANOVA kan det ikke påvises en signifikant forskjell i peroksidverdi mellom ukene med en p-verdi på 0,530.



Figur 27: Gjennomsnittlig peroksidverdi for uke 0 (referanse fra 1_{lever} D0), 6, 8 og 10 med standardavvik, samt grenseverdien på 5 mEq/kg (CODEX, 2017). Verdiene mellom uke 0 og uke 6 er ikke kjent, trenden som fremstilles i grafen for disse ukene er derfor usikker.

4.3.4.2 p-Anisidinverdi (AV)

Grafen i Figur 28 viser p-anisidinverdi for lagringsforsøk 2 etter 0, 6, 8 og 10 uker fryselagring. Uke 0 er en referanseverdi som ble hentet fra lagringsforsøk 1_{lever} dag 0 (D0) for å representere et startpunkt. Verdiene ligger godt under grenseverdien fra CODEX på 20 AnV (CODEX, 2017). Standardavvikene er små for alle ukene.

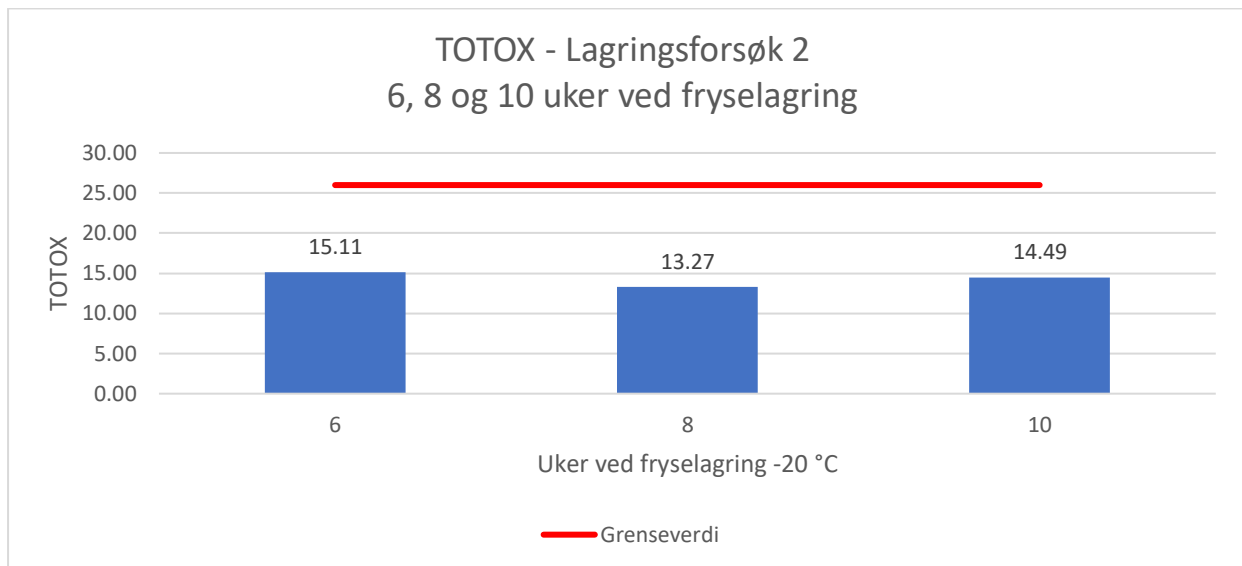


Figur 28: Gjennomsnittlig p-anisidinverdi for uke 0 (referanse fra lagringsforsøk 1_{lever}D0), 6, 8 og 10 med standardavvik, samt grenseverdien på 20 AnV (CODEX, 2017). Verdiene mellom uke 0 og uke 6 er ikke kjent, trenden som fremstilles i grafen for disse ukene er derfor usikker.

Med en-veis ANOVA kan det påvises en signifikant forskjell i p-anisidinverdi mellom ukene 6, 8 og 10 med en p-verdi på 0,005. Tukeys HSD Post Hoc test viser at uke 10 er signifikant høyere enn uke 6, og uke 6 er signifikant høyere enn uke 8 (U8^a, U6^b, U10^c). Her er forskjellen sannsynligvis på grunn av at det kun ble brukt to paralleller for hver oljeprøve. Disse to parallellene hadde veldig små standardavvik. Dette fører til at verdiene egentlig er ganske like, men at de fortsatt er signifikant forskjellig fra hverandre.

4.3.4.3 Totalt oksidasjonstall (TOTOX)

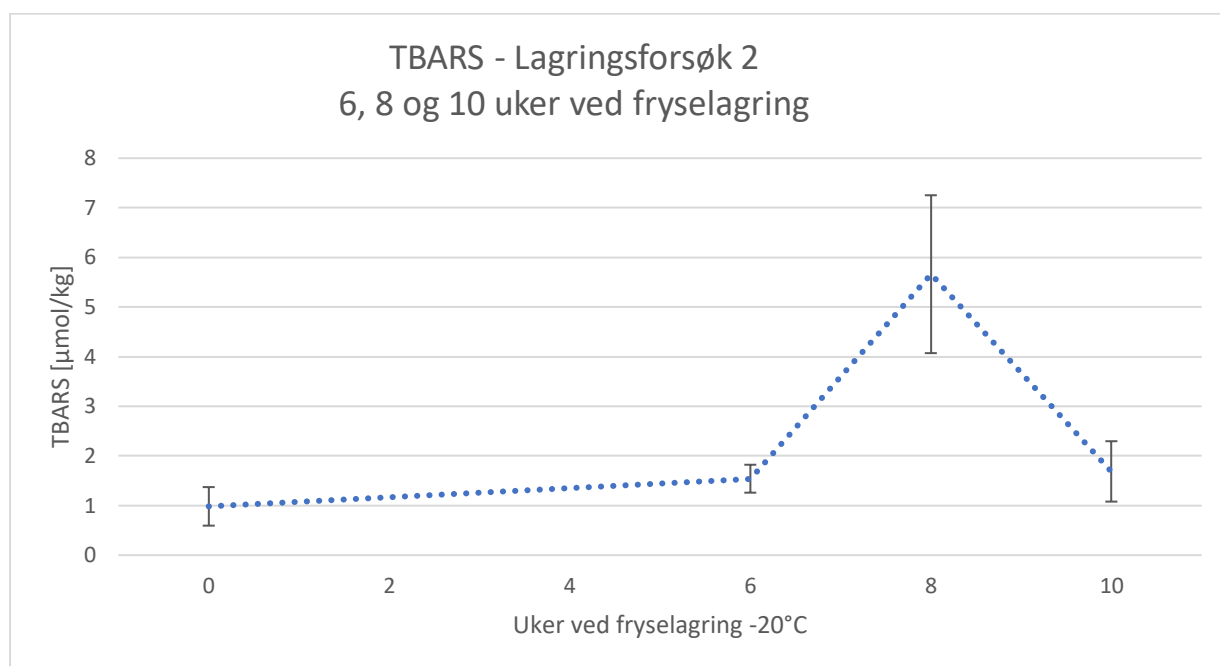
Figur 29 viser at det var relativt like resultater for total oksidasjon ved alle ukene. Det var ikke forventet at det var høyest oksidasjonstall ved den første uken av analysering, og er lavere i uke 8 og uke 10. Generelt sett var det ikke store forskjeller mellom ukene. Rekkevidden på total oksidasjon var mellom 13,27 og 15,11.



Figur 29: Gjennomsnittlig TOTOX verdi for uke 6, 8 og 10 med standardavvik, samt grenseverdien på 26 (CODEX, 2017)

4.3.4.4 Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS)

Figur 30 viser forløpet for mengde 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser av olje fra fryselaagret lever i 0, 6, 8 og 10 uker. Uke 0 er en referanseverdi som ble hentet fra lagringsforsøk 1_{lever} dag 0 (D0) for å representere et startpunkt. Uke 6 og uke 10 er lavere enn uke 8. Uke 8 har høyere verdi med større standardavvik. Som nevnt i Kvalitetskrav til marine oljer er det oppgitt i en rapport fra VKM at akseptabelt nivå TBARS er på 0,1 til 3,9 mmol/kg olje (100 til 3900 $\mu\text{mol/kg}$ olje) (Aursand et al., 2011).

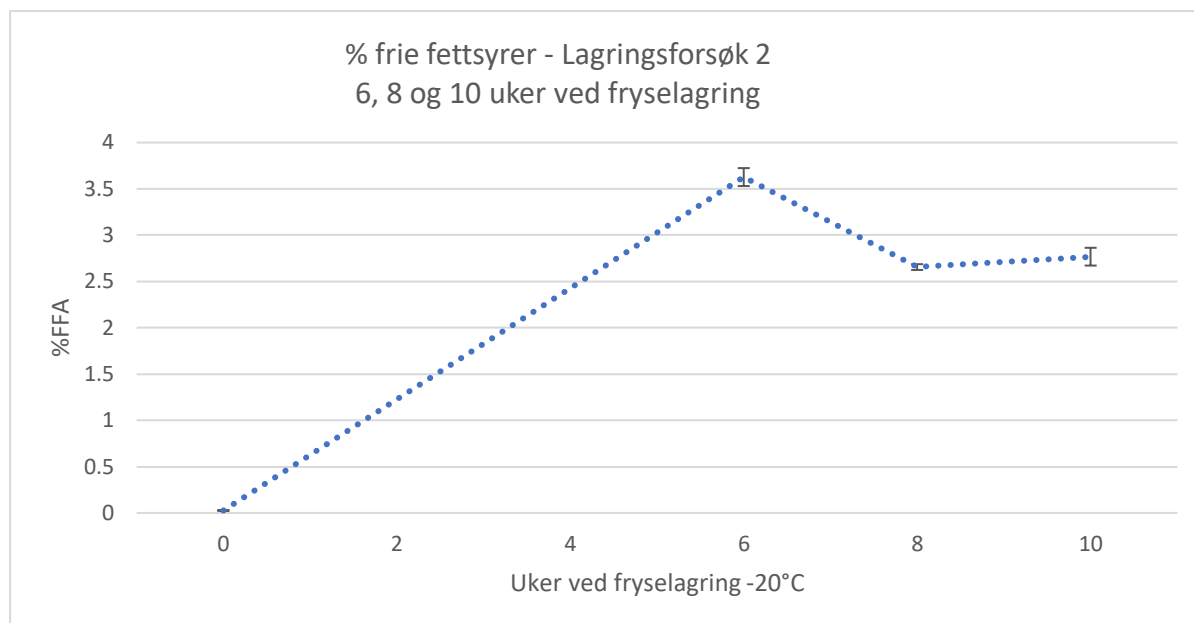


Figur 30: Gjennomsnittlig TBARS for uke 0 (referanse fra lagringsforsøk 1_{lever} D0), 6, 8 og 10 med standardavvik. Verdiene mellom uke 0 og uke 6 er ikke kjent, trenden som fremstilles i grafen for disse ukene er derfor usikker.

Med en-veis ANOVA kan det påvises signifikant forskjell i 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser mellom ukene 6, 8 og 10 med en p-verdi på mindre enn 0,001. Tukeys HSD Post Hoc test viser at uke 8 er signifikant høyere enn uke 6 og 10 ($U6^a$, $U10^a$, $U8^b$).

4.3.5 Frie fettsyrer

Figur 31 viser grafisk forløp av mengde frie fettsyrer for lagringsforsøk 2 etter 0, 6, 8 og 10 uker ved fryselagring. Uke 0 er en referanseverdi som ble hentet fra lagringsforsøk 1_{lever} dag 0 (D0) for å representere et startpunkt. Verdiene i uke 6, 8 og 10 er mellom 2,5 % og 3,6 %, og er relativt like. Uke 6 har høyest mengde frie fettsyrer. Standardavvikene er ikke betydelig store.



Figur 31: Gjennomsnittlig %FFA for uke 0 (referanse fra lagringsforsøk 1_{lever} D0), 6, 8 og 10, med standardavvik. Verdiene mellom uke 0 og uke 6 er ikke kjent, trenden som fremstilles i grafen for disse ukene er derfor usikker.

Med enveis ANOVA kan det påvises signifikant forskjell i % frie fettsyrer mellom uke 6, 8 og 10 med en p-verdi lavere enn 0,001. Tukeys HSD Post Hoc test viser at uke 6 er signifikant høyere enn uke 8 og 10 (U10^a, U8^a, U6^b).

5 Diskusjon

5.1 Fettekstraksjon og totalt lipidinnhold

Lagringsforsøk 1

Teorien tilsier at lipidinnholdet i lever fra torsk kan variere mellom 50-70% (Lynum & Rustad, 1997). Tabell 1 tilsier at lever fra torsk fisket i vintermånedene har gitt henholdsvis 53,6% fett fra liten torsk, 64,2% for medium og 65,4% fra stor torsk (Falch, 2006). Siden våre prøver er en blanding av levre fra torsk av varierende størrelser kan det være interessant å se på gjennomsnittet av lipidinnhold for de tre størrelseskategoriene av lever ved vintermånedene. Dette gjennomsnittet er på ca. 61%. Prosentvis mengde utvunnet olje fra lagringsforsøk 1_{lever} varierte mellom 45,4% til 61,8% ved de ulike dagene, som er under gjennomsnittet fra Falch (2006). På grunn av få antall prøver er det mulig at våre resultater ikke er så representative som mer omfattende studier, hvor fokuset er enda mer spisset på størrelse. I tillegg er innholdet av oljen sannsynligvis ikke bare lipid, og inneholder trolig vann, proteiner, pigmenter og metaller da oljen ikke er raffinert (Gunstone, 2008). Prosent mengde av fett som oppgis for lagringsforsøk 1_{lever} er en antatt mengde beregnet ut fra vekten av olje og restfraksjon ved utvinning av olje fra lever.

I lagringsforsøk 1_{innmat} var det forventet at prosentvis mengde fett ville være lavere, da andre fraksjoner i innmaten vil inneholde mindre fett enn lever. Det er tidligere er funnet 2-9% fett i innmat uten lever fra torsk (Falch, 2006). Innholdet av olje i lagringsforsøk 1_{innmat} varierte mellom 11,2% til 37,9%. Det var forventet å få et lipidinnhold mellom 2-9% og 50-70% for lagringsforsøket. Det var større variasjon av lipidinnhold mellom dagene, og generelt en mindre andel olje i 1_{innmat} enn 1_{lever} . Variasjonen er sannsynligvis grunnet at det er uvisst hvor mye av de andre fraksjonene av innmaten det var i prøvene i forhold til lever. Det ble tatt ut små prøver av den semihomogene massen med innmat fra 5 torsk, og det var dermed ikke mulig å vite hvor stor andel av lever og de andre fraksjonene som var i hver enkelt prøve. Det var i tillegg utfordringer ved kverning for å få denne semihomogene massen. Det var enkelte dager, dag 1 og 2, hvor det var veldig lite olje mulig å separere, og det er mulig å anta at disse prøvene hadde lavest andel lever i forhold til de andre fraksjonene.

Lagringsforsøk 2

Av mengde olje og restfraksjon som ble veid i de respektive ukene i lagringsforsøk 2 ble lipidinnholdet beregnet å være 49,4% i uke 6, 56,7% i uke 8 og 50,7% i uke 10. Disse resultatene er sammenliknbare med lipidinnholdet beregnet for lagringsforsøk 1_{lever}. Lipidinnholdet er også her i den nedre enden av spekteret av hva som forventes å finne i lever fra torsk i vintermånedene. Resultatene for Bligh & Dyer ga liknende resultater, med et totalt lipidinnhold på 52,1% i uke 6 og 45,5% i uke 10. Det kan tyde det på at det meste av olje ble separert ut fra restråstoffet, da resultatene fra Bligh and Dyer var så like resultatene for beregnet utvunnet olje for de samme prøvene.

I Tabell 1 kommer det frem at lever fra store og middels store torsk har et høyere lipidinnhold enn små levre. Lever fra stor torsk hadde 65,4% lipidinnhold om vinteren sammenlignet med 53,6% i lever fra liten torsk samme tiden. (Falch, 2006) Sammenliknet med denne oppgaven hadde uke 10 den laveste gjennomsnittstørrelsen på levrene og det laveste lipidinnholdet, og uke 6 hadde det neststørste gjennomsnittet og et høyere lipidinnhold. Det ble ikke utført Bligh and Dyer for uke 8, men utregnet lipidinnhold fra olje og restfraksjon tilsier å være 56,7%, og har derfor høyest lipidinnhold og størst gjennomsnittstørrelse på levrene.

5.2 Fettsyresammensetning

Lagringsforsøk 1_{lever} hadde størst andel flerumetta- og omega-3 fettsyrer og 1_{innmat} hadde størst andel metta- og enumetta fettsyrer. Det var ikke særlig store forskjeller mellom dagene. Dette stemmer overens med teorien om at fettsyresammensetningen ikke endres mye ved lagring. Det som sannsynligvis har gitt forskjellene i fettsyresammensetningen er at oljen er fra forskjellige levre fra forskjellige individer (Falch, 2006).

For lagringsforsøk 2 var det større gjennomsnittsvikt for levrene i uke 8, og minst i uke 10. Det var mindre EPA og DHA (omega-3 fettsyrer generelt) i uke 6 og 10, enn i uke 8. Liten, medium og stor torsk hadde henholdsvis 31,6%, 35,0% og 30,2% omega-3 i vintersesongen (Falch, 2006). Det ser ut som det er en sammenheng mellom størrelse på torsk og mengde omega-3 fettsyrer som DHA og EPA. Uke 6 og 10 var relativt like i fettsyresammensetning, men det var merkbart høyere nivå av DHA og større gjennomsnittsvikt for leverne i uke 8. Det er omvendt av det som er blitt funnet for kysttorsk i Canada (*Gadus morhua* L.) hvor nivå

av DHA er signifikant lavere i lever fra større individer (Jangaard et al., 1967). En mulig forklaring kan være at et stort individ i vårt parti kan være et medium individ for et parti fra et annet sted og forskjellig underart.

5.3 Fargemålingene

Ved analyse av farge vises det at det er høyere absorbans og mørkere farge for alle dagene i lagringsforsøk av 1_{innmat} enn 1_{lever} . Fargen endres og blir stort sett litt mer gul over tid for begge lagringsforsøk ved både kjøle- og fryselagring. Fargeendringene over tid er størst for 1_{innmat} . Krav til farge på fiskeolje er ikke spesifisert i GOED, men i European Pharmacopoeia forklares det at fargen på fiskeoljer med høyt nivå av omega-3 fettsyrer ikke skal være mer intens enn en spesifisert referanseløsning (*European pharmacopoeia*, 1996). Det er opp til enhver produsent i hvilken grad farge har å si for deres produkt, men det kan forventes at en mindre gul, lysere farge er preferert.

Det er funnet at fargen på oljen ekstrahert fra torskelever har en sammenheng med hvor lang tid det går mellom uthenting av restråstoff og prosessering. Fargen har også vist seg å være en indikator for høyere nivå av frie fettsyrer i oljen, som er en viktig kvalitetsparameter (Branion et al., 1938). Den samme trenden er mulig å se i resultatene for farge og frie fettsyrer for lagringsforsøk 1_{innmat} . Fargen på oljene ved D0, D3 og D6 i lagringsforsøk 2 blir mer intens dess lengre de ble lagret, og samme økende trend er å se i mengde frie fettsyrer de respektive dagene.

Dersom det ble brukt en metode for fargemåling som anvendes i industrien, slik som bruk av digitale kamera (for eksempel DigiEye) til å få L^*a^*b verdi, kan det ha vært enklere å sammenligne resultatene med andre studier og oljer på markedet.

5.4 Oksidasjonsstatus

5.4.1 Peroksidverdi (PV)

Alle prøvene for begge lagringsforsøk var under grenseverdien for til at mengde peroksid i oljer som skal gå til humant bruk (CODEX, 2017).

En studie lignende lagringsforsøkene i denne oppgaven, utførte et lagringsforsøk av lever fra diverse hvitfisk over flere dager ved 10 °C (Pak, 2005). Studiet undersøkte også påvirkningen av tilstedeværelse av antioksidanten tokoferol i forskjellig mengde for å se påvirkningen av oksidasjon. Desto høyere konsentrasjon av tokoferol dess lavere innhold peroksider. Naturlig innhold av tokoferol i oljen i lagringsforsøk 1_{lever}, 1_{innmat} og 2 er ukjent, men det vil trolig ha påvirket oksidasjonen, og mengde peroksider etter lagring. Resultatet for PV i lagringsforsøk 1_{lever} hadde i likhet med denne studien at det ble funnet høyere peroksidinnhold for dag 0 enn de påfølgende dagene, dag 1 og 2. En forklaring på hvorfor D0 fra lagringsforsøk 1_{lever} var høyere enn de påfølgende dagene kan være fordi disse levrene ble holdt ved romtemperatur noe lengre før de ble prosessert og fryst ned. Dette kan skje i en reell situasjon ombord. En annen grunn kan ha vært at de primære oksidasjonsproduktene fra dag 0 allerede kan ha blitt brutt ned til sekundære produkter innen dag 1 og 2. Dette støttes opp av litteraturen, hvor det sies at peroksidverdien øker til et maksimum før det faller, og at maksimum peroksidverdi skjer tidligere for oljer som inneholder mer omega-3 flerumettede fettsyrer (Frankel, 2005). I tillegg vil oksidering til hydroperoksider skje raskere ved høye temperaturer, som må tas i betraktning når oljen har blitt termisk prosessert (Frankel, 2005). På en annen side har en studie funnet ved forsøk med olje av lever fra sei (*Heragra chalcogramma*) at tiden for varmebehandling og tilgang på oksygen utgjør en større påvirkning på peroksidverdien enn temperaturen som restråstoffet varmebehandles ved (Oliveira & Miller, 2014).

5.4.2 p-Anisidinverdi (AV)

Alle målte verdier for p-anisidin var under 10 AnV, og var derfor under grensen på 20 AnV satt av CODEX (2017). De var dermed også under grensen på 30 AnV fra *European pharmacopoeia* (1996). Verdiene for lagringsforsøk 1_{innmat} D6 kan sammenlignes med verdiene som ble funnet for lagringsforsøk 2 uke 6, 8 og 10. Innenfor lagringsforsøk 1 var trenden at 1_{innmat} alltid var høyere enn 1_{lever}, og økte mer mellom dag 0 og 3, i motsetning til 1_{lever} som økte mest mellom dag 3 og 6. Oterhals og Berntssen (2010) analyserte ubehandlet fiskeolje for anisidinverdi og fant at nivået lå på 10,4 AnV, som er sammenlignbart med de verdiene funnet i denne oppgaven, som etter 6 dager kjølelagring og 6-10 uker fryselagring var rundt 8 AnV. Dette tilsier at anisidinverdiene ikke var høyere enn det som kan forventes. Statistikken tilsier at det

er signifikant forskjell mellom lagringsforsøkene, men med lav sikkerhet ($p=0,059$) som gir en type-I-feil.

5.4.3 Totalt oksidasjonstall (TOTOX)

Alle målinger er under 16,6, og er da under CODEX sin maksimumsgrense på 26 (CODEX, 2017). Dette viser til lav oksidasjon ved kjølelagring av lever og innmat opp til 6 dager samt fryselaagring opp til 10 uker. Ved kjølelagring av hermetisert levere fra Atlantisk torsk ble det funnet TOTOX $7,00 \pm 0,72$ etter 10 dager (Aas et al., 2016). Til sammenligning var TOTOX 14,5 ved dag 6 ved kjølelagring av 1_{lever} .

Tallene for total oksidasjon viser at olje fra 1_{innmat} oksiderte raskere mellom D0 og D3 enn 1_{lever} , men den totale oksidasjonen for begge lagringsforsøk er under grensen for akseptabelt nivå, og setter derfor ikke begrensinger for å inkludere innmat i produksjon av olje. Tidligere funn for oksidasjon viser samme trend, hvor oksidasjon skjer raskere i olje ekstrahert fra innmat framfor olje ekstrahert fra lever (Young, 1986).

Dersom det hadde vært mulighet å hente ut flere prøver for lagringsforsøkene kunne det vært mulig å se på hvordan primære og sekundære oksidasjonsprodukter hadde utviklet seg ved lengre lagringstid. Dette kunne ha gitt et bedre overblikk over forskjellen i peroksidverdi, anisidinverdi, og dermed totalt oksidasjonsnummer, mellom olje av innmat og olje av lever over lengre tid. (Frankel, 2005)

5.4.4 Thiobarbitursyre-reaktive substanser (TBARS)

Vitenskapskomiteen for mattrygghet oppga akseptabelt nivå for humant konsum for TBARS som 0,1 til 3,9 mmol/kg (7,206 mg MDA/kg, 100-3900 $\mu\text{mol/kg}$) (Aursand, 2011). Det er mye høyere enn verdiene fra analysen av TBARS i denne oppgaven, da vi har kalkulert i enheten $\mu\text{mol/kg}$. Det var en høy sannsynlighet ($p = 0,931$) for at det ikke var noen signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} .

Til sammenligning er det gjort en studie om kjølelagring av makrell fileter, hvor det var funnet 5 mg MDA/kg muskel (36 $\mu\text{mol/kg}$) ved dag 0, og opp mot 8 mg MDA/kg (58 $\mu\text{mol/kg}$) ved dag 5. Ved fryselaagring i 1 måned var TBARS ca. 3 mg MDA/kg (42 $\mu\text{mol/kg}$). (Cropotova et al.,

2019) Dette er mye høyere verdier enn det som er funnet i både lagringsforsøk 1 og 2. Det er nyttig å kommentere at det er forskjellig lipidinnhold i makrell og torsk. I tillegg ble vann-metanolfasen etter Bligh and Dyer benyttet for denne studien, og resultatene er dermed ikke helt sammenlignbare. Det er likevel nyttig å se på forskjell mellom fryst og kjølt råstoff. Utenom avviket i uke 8, hvor TBARS var signifikant høyere enn for uke 6 og 10, er det lavere verdier for TBARS som er fryselaagret i forhold til verdiene for TBARS i 6 dager kjølelagret lever.

En svakhet ved bruk av TBARS som metode for å måle sekundære oksidasjonsprodukter er at farge som allerede er i oljen vil påvirke absorbansresultatet (Aursand, 2011). En mulig feilkilde i resultatene for TBARS er at aldehydet, malondialdehyd, kan ha vært bundet til vannfasen, og ikke i oljen som ble analysert. Da prøvene ble prosessert termisk var det ingen vannfase å analysere. Det var kun ren, uraffinert olje som ble analysert. Det ble derimot utført Bligh and Dyer fettekstraksjon for å bestemme fettprosent av råmaterialet, og vannfasen fra denne analysen kunne blitt brukt til å analysere innhold av malondialdehyd med potensielt større nøyaktighet og mindre standardavvik. En annen svakhet er at lipid hydroperoksider også kan reagere med TBA-reagensen som er brukt for å reagere med malondialdehyd for påvisning av sekundære oksidasjonsprodukter. Malondialdehyd kan også reagere med proteiner, fosfolipider og aminosyrer i den ubehandlede oljen og dette kan ha gitt de lave TBARS verdiene (Cropotova et al., 2019; Globisch et al., 2015). Det velges å flytte fokus fra TBARS, da det er en mer usikker analyse som har gitt svært utydelige resultater med store standardavvik, og p-anisidinverdi gir et mer helhetlig bilde av sekundære oksidasjonsprodukter.

5.5 Frie fettsyrer

En studie viser til at jo lengre det går fra lever blir tatt ut av torsk, og jo lengre det tar før oljen ekstraheres fra leveren, jo større mengde frie fettsyrer er det i oljen (Branion, 1938). Dette stemmer med resultatene for frie fettsyrer i lagringsforsøk 1. Lagringsforsøk 1_{innmat} hadde et høyere innhold av frie fettsyrer enn 1_{lever} ved alle dagene i lagringsforsøket. Det var signifikant forskjell i mengde frie fettsyrer mellom 1_{lever} og 1_{innmat}, ($p \leq 0,001$). Ved D6 gikk 1_{innmat} over grensen for akseptabelt innhold av frie fettsyrer, og hadde et innhold som var 3,5 ganger høyere enn 1_{lever} (CODEX, 2017).

Dersom oljen nøytraliseres ved tilsats av syre (saponification) for å redusere mengde frie fettsyrer, vil dette også redusere nivået av de naturlige antioksidantene, hovedsakelig α - tokoferol. Dette kan dermed videre påvirke autooksidasjon (øke PV, AV, TOTOX) ved å fjerne denne inhiberende faktoren som naturlig er til stede i råstoffet. (Pak, 2005)

Lipolytiske enzymer kan enda være aktive i fisk fryst ned ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Karlsdottir et al., 2016). Prøvene ved lagringsforsøk 2 ble lagret $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, og det kunne ført til dannelse av frie fettsyrer. Dette kan være en forklaring på hvorfor mengden frie fettsyrer er høyere i lagringsforsøk 2 enn lagringsforsøk 1_{lever}.

5.6 Felles diskusjon

Det første delmålet i oppgaven var å utvinne olje fra lever og innmat fra torsk, for å få informasjon om kvaliteten på olje utvunnet fra innmat, og hvorvidt leveren bør sorteres ut eller ikke. Resultatene for oksidasjonsstatus og mengde frie fettsyrer tilsier at det ikke utgjør en stor forskjell dersom det utvinnes olje fra all innmat dersom oljen ekstraheres innen 3 dager ved kjølelagring etter fangst. Dette er fordi resultatene for oksidasjonsproduktene og frie fettsyrer er under grenseverdier fra CODEX (2017) på dette tidspunktet. Ved statistisk analyse (T-test, signifikansnivå 0,05) er det ikke signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} for peroksidverdi, p-anisidinverdi og 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser, sett i Tabell 14. Det er signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} for mengde frie fettsyrer.

Tabell 14: Signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat} . Resultater fra T-test (antatt like varianser) statistisk analyse ved signifikansnivå 0,05. *ikke langt unna å være signifikant forskjellig

Analyser av lagringsforsøk 1	Signifikant forskjell mellom 1_{lever} og 1_{innmat}
Peroksidverdi	0,714
p-Anisidinverdi	0,059*
2-thiobarbitursyre-reaktive substanser	0,931
Mengde frie fettsyrer	$\leq 0,001$

Andre delmål var å finne effekt av kjøle- og fryselagring på oljens kvalitet ved henholdsvis korttids- og langtidslagring. Resultatene for lagringsforsøk 2 viser til at utsortert lever kan fryselagres ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil 10 uker og fortsatt bevare god kvalitet. Alle resultatene for oksidasjonsstatus og mengde frie fettsyrer er under grenseverdiene for akseptabelt nivå til humant konsum i CODEX (2017). Det viser seg at det kan gi bedre resultater dersom restråstoffet fryselagres ved temperaturer under $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for optimal fryselagring, på grunn av enzymaktivitet (Karlsdottir et al., 2016).

Dersom lever og innmaten lagres ved kjøletemperatur, som i lagringsforsøk 1 vil oksidasjon skje mye fortere enn ved frysing. Resultatene for lagringsforsøk 1_{lever} viser at lever kan lagres ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil 6 dager og fremdeles bevare relativt god kvalitet. Dette da alle resultatene for oksidasjonsstatus og mengde frie fettsyrer er under grenseverdiene for akseptabelt nivå til humant konsum i CODEX (2017). Det samme gjelder 1_{innmat} fram til dag 3, da verdien for frie fettsyrer overstiger grensen ved dag 6.

Tabell 15 viser signifikant forskjell mellom dagene og ukene for de tilhørende lagringsforsøkene ved signifikansnivå 0,05. Det var signifikant forskjell mellom dagene for alle analyser av lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}. Det var signifikant forskjell mellom ukene for alle analysene utenom peroksidverdi for lagringsforsøk 2. Lagringsforsøk 2 hadde resultater hvor standardavvikene var svært små. Med små standardavvik er det mer sannsynlig at det er signifikant forskjell mellom ukene, uten at verdiene er svært ulike reelt sett. For eksempel er alle resultatene i lagringsforsøk 2 for anisidinverdi mellom 7,5 og 9 AnV, men er fortsatt signifikant forskjellige.

Tabell 15: Signifikant forskjell mellom dager (Lagringsforsøk 1_{lever} og 1_{innmat}) og uker (Lagringsforsøk 2). Resultater fra statistisk analyse (En-veis ANOVA, signifikansnivå 0,05) for analyse for peroksidverdi, p-anisidinverdi, 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser og mengde frie fettsyrer.

En-veis ANOVA	Lagringsforsøk 1 _{lever}	Lagringsforsøk 1 _{innmat}	Lagringsforsøk 2
Peroksidverdi	≤ 0,001	≤ 0,001	0,530
p-Anisidinverdi	≤ 0,001	≤ 0,001	0,005
2-thiobarbitursyre-reaktive substanser	0,009	0,004	≤ 0,001
Mengde frie fettsyrer	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001

Tredje og siste delmål var å vurdere resultatene for å kunne foreslå optimal råstoffbehandling og lagringsforhold. Dersom utsortert lever skal fryselagres ved -20 °C tilsier resultatene at kvaliteten vil være god nok til humant konsum inntil 10 uker etter nedfrysning, med forbehold om at leveren fryses ned raskt etter fangst. Lagringsforsøk 1 viser at olje hentet ut fra kjølelageret (4 °C) lever vil bevare god nok kvalitet til humant konsum inntil 6 dager etter fangst. Er derimot olje hentet ut fra innmat bør oljen ekstraheres innen 3 dager kjølelagring etter fangst for å kunne holde tilstrekkelig kvalitet til humant konsum. Dette er hovedsakelig på grunn av rask økning i mengde frie fettsyrer.

Dersom innmat ikke prosesseres innen 3 dager ved kjølelagring kan det være nødvendig å raffinere oljen, på grunn av høyt nivå av frie fettsyrer. Ved å raffinere ved «short path distillation» er det også blitt observert at verdier for peroksidverdi og anisidinverdi har redusert fra henholdsvis 1,8 til 0,7 mEq/kg og 10,4 til 5,5 mEq/kg (Oterhals & Berntssen, 2010). Ved blekning av olje, med det formål om å redusere pigmenter i oljen, vil også frie fettsyrer og mengde peroksider reduseres. Raffineringsprosessene vil derimot redusere det

naturlige innholdet av antioksidanter (f.eks. tokoferol), og oljen må sannsynligvis tilføres antioksidanter som konserveringsmiddel (Aursand et al., 2011). Innmat fra torsk har mindre av den naturlige antioksidanten α -tokoferol enn lever fra torsk (Malone et al., 2004). Fravær av tokoferol i marine oljer kan føre til raskere harskning. En studie gjort på olje fra torskelever viser at oljen var mer oksidativ stabil før raffineringprosessen på grunn av tilstedeværelse av de naturlige komponentene som opptrer som antioksidanter (Aursand, 2011).

6 Konklusjon

Målet med oppgaven var å undersøke hvordan ulike lagringsbetingelser (tid og temperatur) og sortering av torskelever og -innmat påvirket kvaliteten på olje separert ved termisk prosessering. Dette for å kunne lage gode beslutningsgrunnlag for håndtering, sortering og lagring ombord på den havgående flåten, for å kunne øke utnyttelsesgraden av restråstoff i hvitfiskindustrien.

Både kjøle- og fryselagring har vært effektive måter å lagre Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) på for å oppnå olje med god kvalitet. Ved kjølelagring vil det også være mulig å ekstrahere olje hvor lever ikke er sortert ut fra innmaten, men kun ved kort lagring på 0-2 dager. Det var ingen signifikant forskjell mellom olje fra lever og olje fra innmat for peroksidverdi ($p = 0,714$), 2-thiobarbitursyre-reaktive substanser ($p = 0,931$) og p-anisidiverdi ($p = 0,059$) ved kjølelagring i 0, 1, 2, 3 og 6 dager. Det var signifikant forskjell mellom olje fra lever og olje fra innmat for mengde frie fettsyrer ($p \leq 0,001$).

Dersom det er ønskelig og mest økonomisk nyttig å produsere olje fra all innmat, vil det ifølge resultatene fra denne oppgaven gi best kvalitet ved å prosessere restråstoffet innen 3 dager etter fangst, med forbehold om at restråstoffet blir lagret ved 4 °C. Er det ikke mulig å kjølelagre og prosessere lever innen seks dager, kan alternativet være fryselagring. Våre resultater tilsier at det kan fryselagres i opptil 10 uker før prosessering. Det ville vært best å fryselagre ved temperaturer lavere enn -20 °C da det fortsatt vil være enzymaktivitet ved temperaturer høyere enn dette.

De laveste verdiene for oksidasjonsprodukter og frie fettsyrer var dagene nærmest fangst. Best kvalitet, med de laveste verdiene for kvalitetsforringende parametere, var det på oljen separert fra lever prosessert samme dag som fangst.

Forslag til videre forskning

Til videre forskning på området ville det vært interessant å utføre et lengre lagringsforsøk ved kjølelagring for å undersøke når verdiene for oksidasjon ville overskride grensene for akseptabelt nivå til humant konsum. Det er også viktig å se på hvordan det kan oppnås total

utnyttelse av restfraksjonene ved termisk prosessering. Det er ønskelig å utnytte oljen, men også de gjenværende fraksjonene som limvannet og graksen.

Andre punkter som kan sees nærmere på er effekten av antioksidanter, naturlige til stede i restråstoffet og tilsatte, og ytterligere analyse av flyktige forbindelser som kan måles med GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry).

Dersom store mengder metallioner, for eksempel jern fra hemoglobin, er til stede kan det oppkonsentreres ved krystallisering av vann ved fryselagring og katalysere oksidasjonsreaksjoner. Det er trolig store forskjeller av tilstedeværelse av slike metaller i bare lever og i innmat fra torsk, og påvirkes i stor grad av prosessering. Dette kan være enda en faktor som påvirker oksidasjonsnivå i olje fra innmat av torsk som kan undersøkes i fremtiden.

Uunngåelige variasjoner i eksempelvis størrelse og gytestatus vil ha påvirkning på fettsyresammensetning og lipidinnhold. Dette kan ha ført til at resultatene i denne oppgaven har variert i relativt stor grad for ulike prøver fra ulike fisk. Dette burde ses nærmere på ved industriell utnyttelse av innmat fra torsk til humant konsum.

Referanser

- AOCS. (2003). Sampling and analysis of commercial fats and oils. *American Oil Chemists' Society Official Method Cd 8-53 Peroxide Value—Acetic Acid-Chloroform Method*.
- Aursand, M., Hamre, K., Knutsen, H. K., Maage, A., Arukwe, A., Alexander, J., Amlund, H., Bernhoft, A., Brantsæter, A. L., Eriksen, G. S., Fæste, C. K., Krogdahl, Å., Haugen, M., Hemre, G. I., Lassen, J. F., Nerland, A. H., Nesse, L. L., Næss, B., Ringø, E., Ruus, A., Skåre, J. U., Steffensen, I.-L., Sundheim, L., Sverdrup, L. E., Svihus, B., Thomsen, C., Torrissen, O., Østerås, O., Torstensen, B. E., Ørnstrud, R. & Mozuraityte, R. (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. I. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM).
- Balk, E. M., Lichtenstein, A. H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P. & Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis*, 189(1), 19-30.
- Bernárdez, M., Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J. J. R. & Cabo, M. L. (2005). Modified Method for the Analysis of Free Fatty Acids in Fish. *J. Agric. Food Chem*, 53(6), 1903-1906. <https://doi.org/10.1021/jf040282c>
- Berquin, I. M., Min, Y., Wu, R., Wu, J., Perry, D., Cline, J. M., Thomas, M. J., Thornburg, T., Kulik, G. & Smith, A. (2007). Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *The Journal of clinical investigation*, 117(7), 1866-1875.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bonilla-Mendez, J. R. & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 19(3), 645-668. https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:684
- Branion, H. D., Dawson, A. F., Cavers, J. R. & Motzok, I. (1938). The Alleged Toxicity of Free Fatty Acid and Nitrogen in Cod Liver Oil. *Poultry science*, 17(3), 213-223. <https://doi.org/10.3382/ps.0170213>
- BRI, C. (2017). *Comparison study between CDR FoodLab® analytical methods and reference methods for Oil and Fats testing*. Campden BRI Group. <https://www.cdrfoodlab.com/certifications/study-cdrfoodlab-reference-methods-oils/>
- Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1505S-1519S.
- Chapkin, R. S., Davidson, L. A., Ly, L., Weeks, B. R., Lupton, J. R. & McMurray, D. N. (2007). Immunomodulatory effects of (n-3) fatty acids: putative link to inflammation and colon cancer. *The Journal of nutrition*, 137(1), 200S-204S.
- CODEX. (2017). Standard for Fish Oils. (STAN 329-2017).
- Colussi, G., Catena, C., Novello, M., Bertin, N. & Sechi, L. (2017). Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: relevance for cardiovascular outcomes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(3), 191-200.
- Cropotova, J., Mozuraityte, R., Standal, I. B., Grøvlén, M. S. & Rustad, T. (2019). Superchilled, chilled and frozen storage of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets – changes in texture, drip loss, protein solubility and oxidation. *International journal of food science & technology*, 54(6), 2228-2235. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14136>
- Daviddarling.info. *Anatomy of the cod*. Pinterest. <https://i.pinimg.com/originals/87/7e/69/877e69be32cecf86ab24f37c113b6f21.jpg>
- Dichwalkar, T., Patel, S., Bapat, S., Pancholi, P., Jasani, N., Desai, B., Yellepeddi, V. K. & Sehdev, V. (2017). Omega-3 fatty acid grafted PAMAM-Paclitaxel conjugate exhibits enhanced anticancer activity in upper gastrointestinal cancer cells. *Macromolecular bioscience*, 17(8), 1600457.
- European pharmacopoeia*. (1996). (3rd ed. utg., Bd. 50). Council of Europe.

- Falch, E. (2006). *Lipids from residual fish raw materials : quality assessment by advanced analytical methods* [Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology,]. Trondheim.
- FAO & WHO Expert Consultation. (2008). Fats and fatty acids in human nutrition. *Proceedings of the joint FAO/WHO expert consultation*.
- FN-sambandet. (2021). *FNs bærekraftsmål*. <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal>
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation* (2nd ed. utg., Bd. vol. 18). Oily Press.
- Frøyland, L., Arukwe, A., Bentsen, H., Bernhoft, A., Frølich, W., Graff, I. E., Graff, I. E., Halvorsen, R., Hemre, G. I. & Haugen, 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. *VKM Report*.
- Globisch, M., Kaden, D. & Henle, T. (2015). 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and its lipation product 2-pentylpyrrole lysine (2-PPL) in peanuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(21), 5273-5281.
- Gunstone, F. D. (2008). *Oils and fats in the food industry*. Wiley-Blackwell.
- Hilakivi-Clarke, L., Olivo, S. E., Shajahan, A., Khan, G., Zhu, Y., Zwart, A., Cho, E. & Clarke, R. (2005). Mechanisms mediating the effects of prepubertal (n-3) polyunsaturated fatty acid diet on breast cancer risk in rats. *The Journal of nutrition*, 135(12), 2946S-2952S.
- Iso, H., Kobayashi, M., Ishihara, J., Sasaki, S., Okada, K., Kita, Y., Kokubo, Y. & Tsugane, S. (2006). CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation*, 113(2), 195-202.
- Istfan, N., Person, K., Holick, M. & Chen, T. (2007). 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D and fish oil synergistically inhibit G1/S-phase transition in prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 103(3-5), 726-730.
- Jackson, A. & Newton, R. (2016). Project to Model the Use of Fisheries by-products in the Production of Marine Ingredients with Special Reference to omega-3 Fatty Acids EPA and DHA. *Institute of Aquaculture, University of Stirling & IFFO, the Marine Ingredients Organisation*.
- Jangaard, P., Ackman, R. G. & Sipos, J. (1967). Seasonal changes in fatty acid composition of cod liver, flesh, roe, and milt lipids. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 24(3), 613-627.
- Joshi, S., Rao, S., Girigosavi, S., Daware, M., Kale, A. & Hegde, M. (2004). Differential effects of fish oil and folic acid supplementation during pregnancy in rats on cognitive performance and serum glucose in their offspring. *Nutrition*, 20(5), 465-472.
- Karlsdottir, M., Arason, S., Thorarinsdottir, K., Nguyen, M. V. & Kristinsson, H. (2016). Lipid Degradation of Cod Liver During Frozen Storage as Influenced by Temperature, Packaging Method, and Seasonal Variation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6), 802-810. <https://doi.org/10.1080/10498850.2014.932315>
- Ke, P. J. & Woyewoda, A. D. (1979). Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. *Analytica chimica acta*, 106(2), 279-284. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)85011-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)85011-X)
- Labolytic. (2021). *P-anisidin (AnV) i fett og oljer | Testkit til FoodLab*. <https://labolytic.no/produkter/kjemiske-analyser/metode/andre-kjemiske-analyser/p-anisidin-anv-i-fett-og-oljer-testkit-til-foodlab>
- Lynum, L. & Rustad, T. (1997). *Fisk som råstoff : holdbarhet og kvalitetssikring* (2. utg.). Tapir.
- Malone, C., Shaw, N. & Kerry, J. (2004). Effect of season on vitamin E, fatty acid profile, and nutritional value of fish by-products from cod, saithe, ling and haddock species caught in southern Irish coastal waters. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(3), 127-149.
- Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama*, 296(15), 1885-1899.
- Newberry, S. J., Chung, M., Booth, M., Maglione, M. A., Tang, A. M., O'Hanlon, C. E., Wang, D. D., Okunogbe, A., Huang, C. & Motala, A. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Maternal and Child Health: An Updated Systematic Review. *Evidence report/technology assessment*, (224), 1-826.

- Oliveira, A. C. M. & Miller, M. R. (2014). Purification of Alaskan walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) liver oil using short path distillation. *Nutrients*, 6(5), 2059-2076. <https://doi.org/10.3390/nu6052059>
- Oterhals, Å. & Berntssen, M. H. G. (2010). Effects of Refining and Removal of Persistent Organic Pollutants by Short-Path Distillation on Nutritional Quality and Oxidative Stability of Fish Oil. *J. Agric. Food Chem*, 58(23), 12250-12259. <https://doi.org/10.1021/jf102660v>
- Pak, C. S. (2005). Stability and quality of fish oil during typical domestic application. *Fisheries Training Programme, The United Nations University, Iceland*.
- Peet, M. & Stokes, C. (2005). Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs*, 65(8), 1051-1059.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K. & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American journal of cardiology*, 98(4), 3-18.
- Regjeringen. (2019). *Regjeringens strategi for økt verdiskaping av marint restråstoff* (W-0029 N). N.-o. fiskeridepartementet.
- Rice, S. M., Hickie, I. B., Yung, A. R., Mackinnon, A., Berk, M., Davey, C., Hermens, D. F., Hetrick, S. E., Parker, A. G. & Schäfer, M. R. (2016). Youth depression alleviation: the Fish Oil Youth Depression Study (YoDA-F): A randomized, double-blind, placebo-controlled treatment trial. *Early intervention in psychiatry*, 10(4), 290-299.
- Richardsen, R., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A. (2019). Analyse marint restråstoff 2019. *Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge. SINTEF Ocean AS, Tromsø, Norway*.
- Roda, M. A. P., Gilman, E., Huntington, T., Kennelly, S. J., Suuronen, P., Chaloupka, M. & Medley, P. A. (2019). *A third assessment of global marine fisheries discards*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60(9), 502-507.
- Siscovick, D. S., Barringer, T. A., Fretts, A. M., Wu, J. H., Lichtenstein, A. H., Costello, R. B., Kris-Etherton, P. M., Jacobson, T. A., Engler, M. B. & Alger, H. M. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 135(15), e867-e884.
- Sun, H., Berquin, I. M. & Edwards, I. J. (2005). Omega-3 polyunsaturated fatty acids regulate syndecan-1 expression in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 65(10), 4442-4447.
- Uauy, R. & Dangour, A. (2006). Dietary lipids and the brain during development and ageing. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50(sup2), 27-32.
- Wang, C., Chung, M., Lichtenstein, A., Balk, E., Kupelnick, B., DeVine, D., Lawrence, A. & Lau, J. (2004). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cardiovascular Disease: Summary. *AHRQ Evidence Report Summaries*.
- Young, F. (1986). Refining and hydrogenation of fish oil.
- Aas, G. H., Kjerstad, M. & Barnung, T. (2016). Quality and Shelf Life of Liver of Farmed Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(7), 1064-1072. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1010245>

Vedlegg 1: Fettsyresammensetning av lever og slo (Falch, 2006)

670

E. Falch et al./Process Biochemistry 41 (2006) 666–674

Table 4

Fatty acid composition (percent of total fatty acids) in by-products from *Gadus morhua* (cod), *Pollachius virens* (saithe), *Melanogrammus aeglefinus* (haddock) and *Brosme brosme* (tusk)

Fame%	Cod small ^c			Cod medium ^c			Cod large ^c			Saithe ^a			Haddock ^h			Tusk ^l		Significant differences (significance level: 0.05)	
	w ^a	s ^a	a ^a	w ^a	s ^a	a ^a	w ^a	s ^a	a ^a	w ^a	s ^a	a ^a	w ^a	s ^a	a ^a	s ^a	Species (csh)	Seasonal	
(A) Liver																			
C14:0	5.2	4.4	4.2	4.1	4.0	5.0	4.9	3.4	3.9	–	3.8	3.9	–	4.5	3.8	4.8	n.s.	n.s.	
C16:0	9.2	6.8	7.5	6.7	7.3	8.0	7.9	6.4	7.3	–	7.3	8.5	–	9.4	7.7	7.2	n.s.	n.s.	
C18:0	2.6	3.0	2.8	2.8	3.0	2.8	2.6	3.5	2.8	–	3.9	4.3	–	3.8	3.7	2.4	sh > c	n.s.	
C20:0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	–	0.1	0.0	–	0.1	0.1	0.1	n.s.	n.s.	
C22:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	–	0.0	0.0	–	0.2	0.0	0.4	n.s.	n.s.	
C16:1	8.1	6.4	7.2	6.6	6.6	8.1	7.7	5.9	7.1	–	5.9	6.5	–	7.6	7.1	5.7	n.s.	n.s.	
C18:1 n-9	19.8	18.9	20.8	17.5	19.0	21.8	19.8	18.5	20.6	–	18.5	20.0	–	21.3	21.6	16.5	n.s.	n.s.	
C20:1	12.9	14.9	14.7	14.5	14.5	15.7	14.8	14.3	15.1	–	12.8	11.7	–	10.6	10.4	16.6	c > sh	n.s.	
C22:1	7.4	10.2	8.6	8.4	10.8	8.3	8.2	10.1	8.9	–	10.7	9.2	–	1.5	4.4	19.4	cs > h	n.s.	
C18:2 n-6	2.2	3.5	3.0	2.7	3.4	3.5	2.4	3.1	3.2	–	2.6	2.3	–	3.3	2.3	1.3	n.s.	n.s.	
C18:3 n-6	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	–	0.2	0.2	–	0.5	0.3	0.2	n.s.	n.s.	
C20:2 n-6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	–	0.4	0.3	–	0.5	0.6	0.4	h > cs	n.s.	
C20:3 n-6	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	–	0.1	0.0	–	0.1	0.0	0.0	n.s.	n.s.	
C20:4 n-6	0.6	1.3	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7	–	0.8	0.6	–	1.3	1.4	0.7	h > cs	n.s.	
C18:3 n-3	1.0	1.0	1.1	1.1	2.9	1.0	1.0	1.1	1.0	–	1.1	1.1	–	1.6	1.3	0.9	n.s.	n.s.	
C18:4 n-3	2.7	3.2	2.7	4.2	1.0	2.5	3.0	3.2	2.7	–	3.9	3.1	–	3.7	3.4	2.1	n.s.	n.s.	
C20:4 n-3	0.8	0.8	0.7	0.9	0.7	0.7	0.8	0.9	0.6	–	0.7	0.5	–	0.7	0.7	0.7	ch > s	w > a	
C20:5 n-3	10.0	9.6	9.9	11.4	9.1	8.6	9.3	10.4	9.6	–	10.3	11.5	–	13.1	14.8	5.0	h > cs	n.s.	
C22:5 n-3	1.2	1.0	1.0	1.2	1.1	0.8	1.1	1.3	1.0	–	0.9	0.8	–	1.2	1.3	1.4	ch > s	n.s.	
C22:6 n-3	15.7	14.3	14.2	16.1	15.0	11.8	15.0	16.2	14.6	–	15.9	15.5	–	15.2	15.2	14.2	n.s.	n.s.	
SFA	17.0	14.2	14.5	13.6	14.3	15.8	15.5	13.4	14.2	–	15.1	16.6	–	17.9	15.3	14.9	n.s.	n.s.	
MUFA	48.2	50.4	51.2	47.0	50.9	54.0	50.5	48.8	51.8	–	47.9	47.3	–	41.0	43.4	58.2	c > h	n.s.	
PUFA	34.8	35.4	34.3	39.4	34.8	30.2	34.0	37.7	34.1	–	36.9	36.0	–	41.0	41.3	26.9	h > cs	n.s.	
n-3	31.4	29.9	29.6	35.0	29.9	25.3	30.2	33.1	29.5	–	32.9	32.6	–	35.4	36.6	24.3	h > cs	n.s.	
n-6	3.4	5.6	4.7	4.3	4.9	4.9	3.8	4.6	4.6	–	4.0	3.4	–	5.6	4.7	2.6	ch > s	n.s.	
(B) Viscera																			
C14:0	4.0	3.4	3.6	4.3	3.3	2.3	3.7	2.5	2.9	5.6	4.9	2.9	–	4.3	4.1	2.8	n.s.	w > a	
C16:0	9.4	8.0	7.9	8.9	7.4	9.1	8.3	7.6	7.6	8.2	9.6	7.9	–	8.5	8.2	8.4	n.s.	n.s.	
C18:0	4.3	4.1	4.4	3.5	3.9	5.0	4.4	5.0	5.0	1.7	3.1	6.2	–	3.9	4.4	6.2	n.s.	a > w	
C20:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	–	0.1	0.1	0.2	n.s.	n.s.	
C22:0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	–	0.1	0.0	0.3	n.s.	n.s.	
C16:1	5.6	5.8	5.5	7.1	5.8	4.9	5.5	4.9	5.2	7.3	5.9	4.6	–	4.7	4.4	5.0	n.s.	w > a	
C18:1 n-9	17.0	18.5	17.5	17.8	18.2	19.0	17.2	17.7	17.6	15.4	18.8	17.8	–	16.3	16.0	17.2	n.s.	n.s.	
C20:1	9.7	11.7	11.4	11.7	12.1	10.2	10.6	10.8	11.3	17.3	9.7	8.8	–	9.5	8.2	11.6	n.s.	w > a	
C22:1	6.5	4.4	6.7	6.9	6.2	3.5	6.2	3.7	4.6	18.7	8.8	4.7	–	8.5	7.3	6.3	n.s.	n.s.	
C18:2 n-6	1.6	2.2	2.1	1.7	2.2	1.8	1.7	2.0	2.4	2.7	1.9	2.5	–	1.7	1.7	1.2	s > ch	n.s.	
C18:3 n-6	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	–	0.2	0.2	0.1	n.s.	n.s.	
C20:2 n-6	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	–	0.4	0.5	0.4	h > cs	n.s.	
C20:3 n-6	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	–	0.1	0.0	0.1	n.s.	n.s.	
C20:4 n-6	2.2	3.1	2.5	1.8	2.4	3.1	2.4	3.9	2.7	0.6	2.2	3.1	–	2.4	3.2	4.3	n.s.	as > w	
C18:3 n-3	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7	0.5	0.7	0.5	0.5	0.7	0.6	0.7	–	0.7	1.1	0.5	h > cs	n.s.	
C18:4 n-3	1.7	1.6	2.3	2.3	1.8	1.1	1.8	1.3	1.4	3.0	2.3	1.6	–	1.5	3.1	0.9	n.s.	n.s.	
C20:4 n-3	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.4	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	–	0.6	0.7	0.4	h > s	n.s.	
C20:5 n-3	10.7	10.9	10.6	10.9	11.2	11.6	11.5	12.6	12.5	7.3	12.7	13.6	–	11.7	12.0	7.0	n.s.	sa > w	
C22:5 n-3	1.0	1.0	1.2	1.1	1.2	1.0	1.1	1.3	1.3	0.6	0.7	1.0	–	1.1	1.4	1.6	ch > s	n.s.	
C22:6 n-3	24.3	23.3	22.0	20.0	22.0	25.6	23.6	24.9	23.3	9.5	17.6	23.2	–	23.7	23.2	25.5	ch > s	n.S.	
SFA	17.7	15.6	16.1	16.8	14.8	16.5	16.6	15.4	15.6	15.8	17.7	17.2	–	16.8	16.9	18.0	n.s.	n.s.	
MUFA	38.7	40.4	41.1	43.5	42.3	37.6	39.6	37.0	38.7	58.7	43.2	35.9	–	39.0	36.0	40.1	n.s.	w > a	
PUFA	43.5	44.0	42.8	39.7	42.9	45.9	43.9	47.6	45.6	25.5	39.0	46.9	–	44.2	47.1	41.9	ch > s	sa > w	
n-3	39.2	38.1	37.5	35.7	37.6	5.8	39.3	40.1	39.6	21.5	34.4	40.6	–	39.3	41.5	35.9	ch > s	n.s.	
n-6	4.4	5.9	5.3	4.0	5.3	40.1	4.6	6.6	6.1	4.0	4.6	6.3	–	5.6	4.9	6.0	n.s.	sa > w	

Vedlegg 2: Tidsforløp for all laboratorieaktivitet

Uke etter uthenting	Dato	Aktivitet	LF 1	LF 2
1	15.02-21.02	(uthenting av restråstoff)		
2	22.02-28.02			
3	01.03-07.03			
4	08.03-14.03	Opplæring		
5	15.03-21.03	Øving av analyser og tillaging av reagenser		
6	22.03-28.03	Analyse for PV, TBARS og FFA	D0	U6
7	29.03-04.04	Analyse for PV, TBARS og FFA	D1+D2	
8	05.04-11.04	Analyse for PV, TBARS og FFA	D3+D6	U8
9	12.04-18.04			
10	19.04-25.04	Analyse for PV, TBARS, FFA og farge	Farge: D0+D3+D6	U10
11	26.04-02.05	B&D og analyse for AV	AV: D0+D3+D6	B&D: U6+U10, AV: Alle

LF: Lagringsforsøk

PV: Peroksidverdi

TBARS: 2-thiobarbyturic acid reactive substances

FFA: Frie fettsyrer

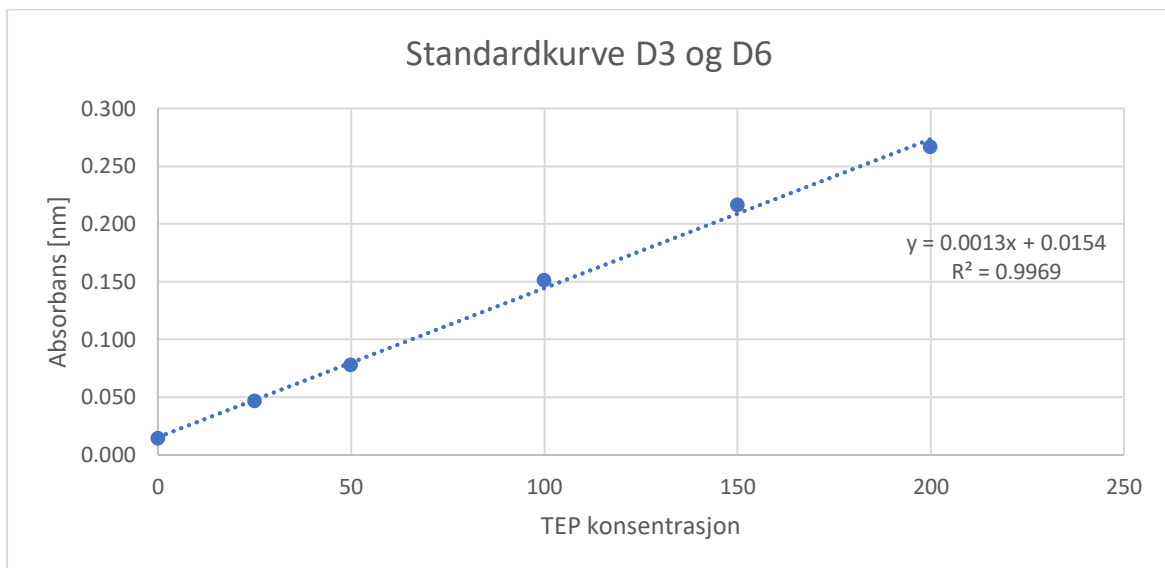
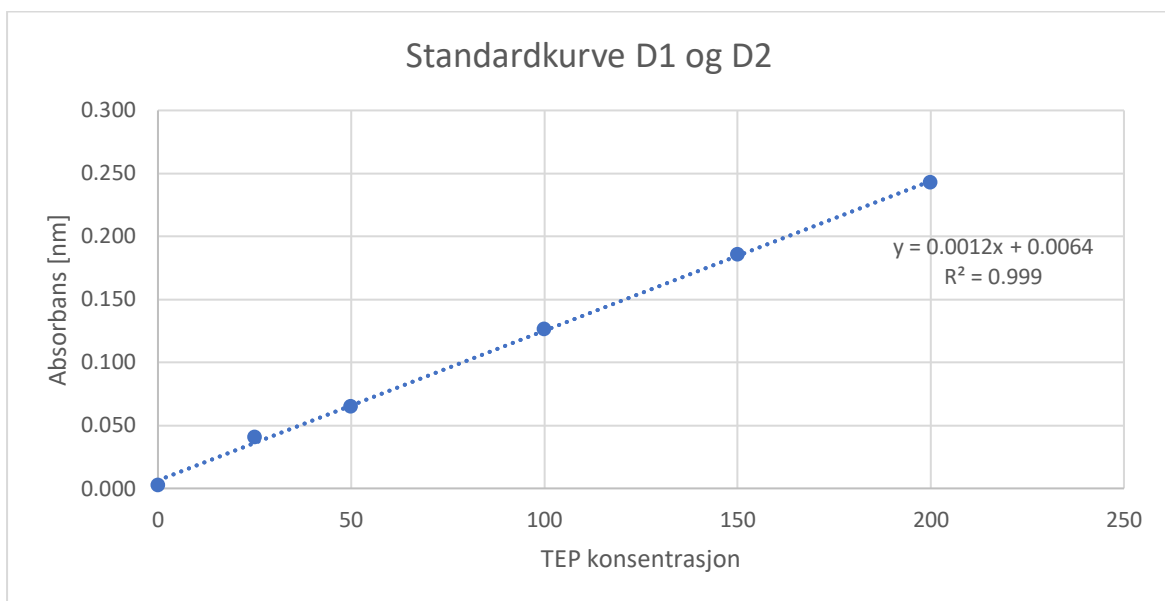
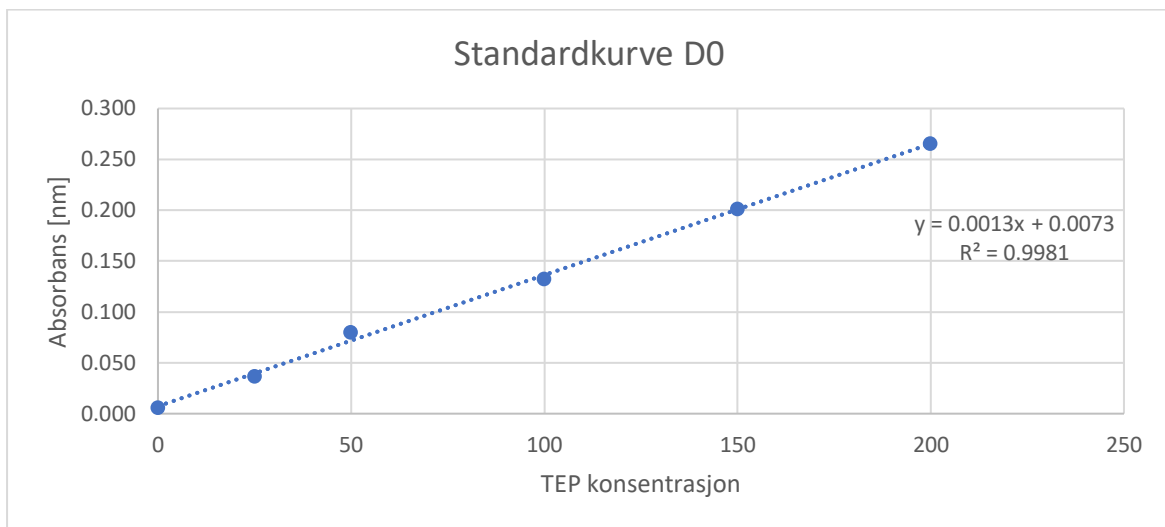
B&D: Bligh and Dyer

AV: p-Anisidinverdi

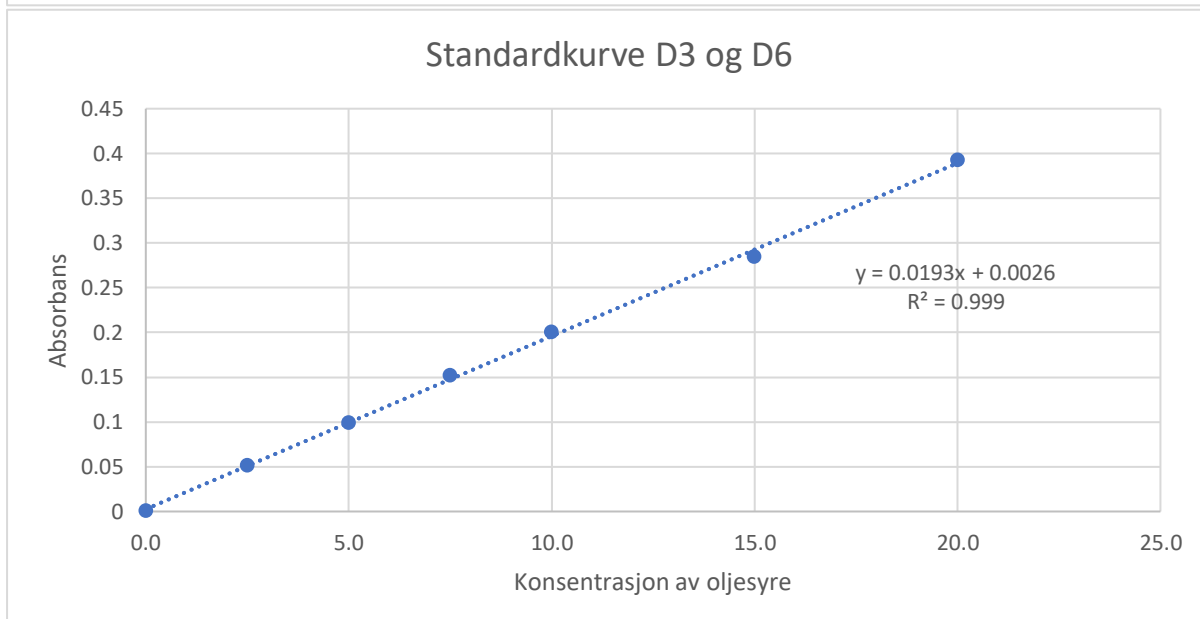
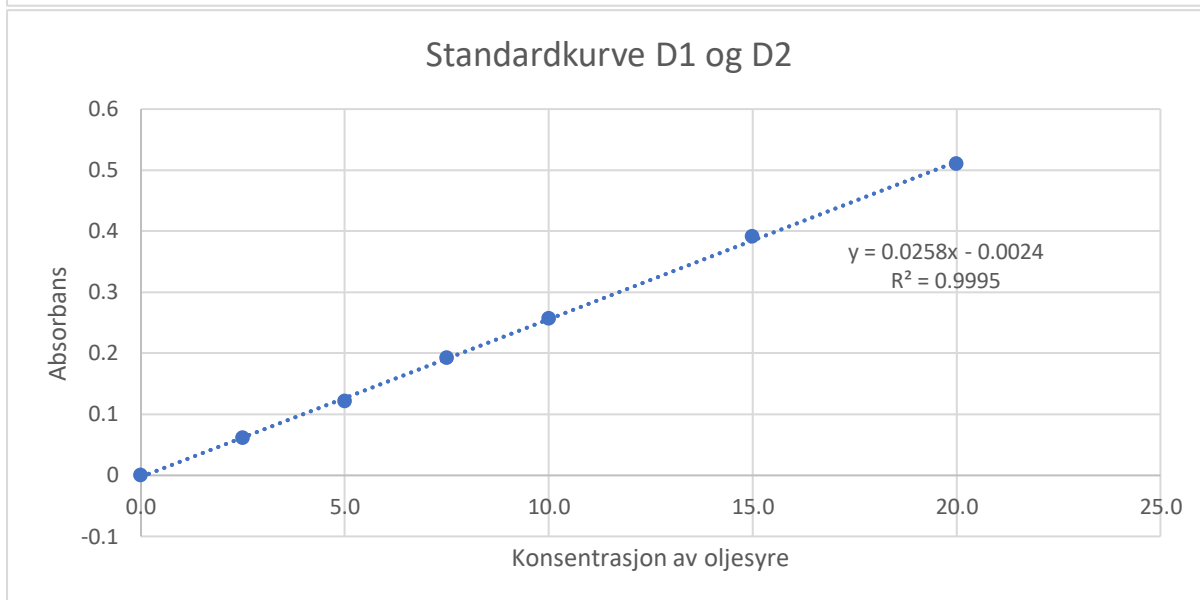
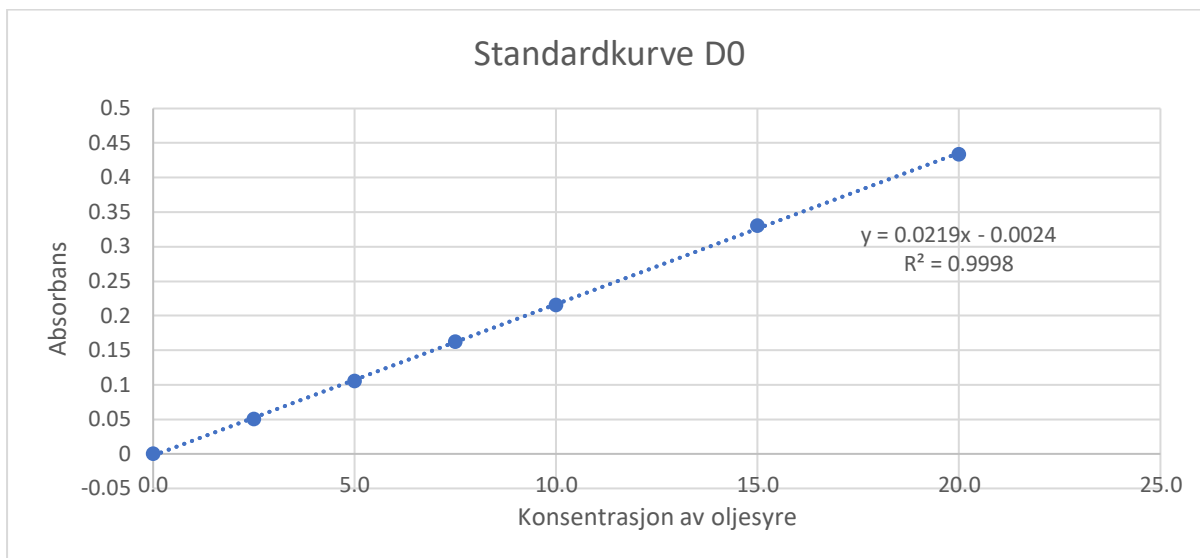
D0, D1, D2, D3, D6: hhv. dag 0, dag 1, 2, 3 og 6 etter uthenting

U6, U8, U10: hhv. uke 6, 8 og 10 etter uthenting

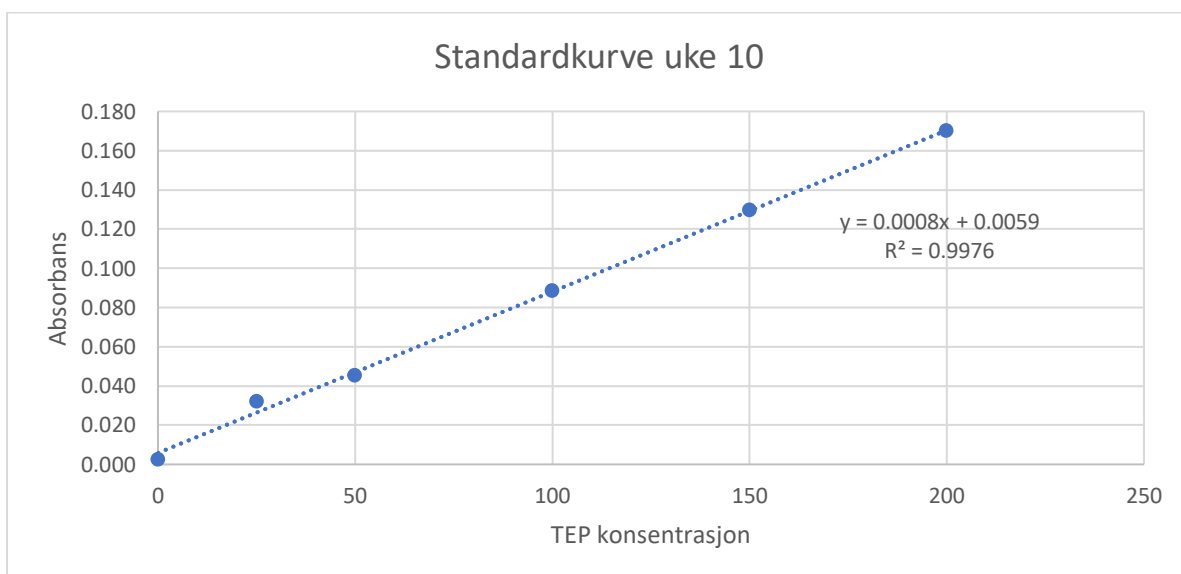
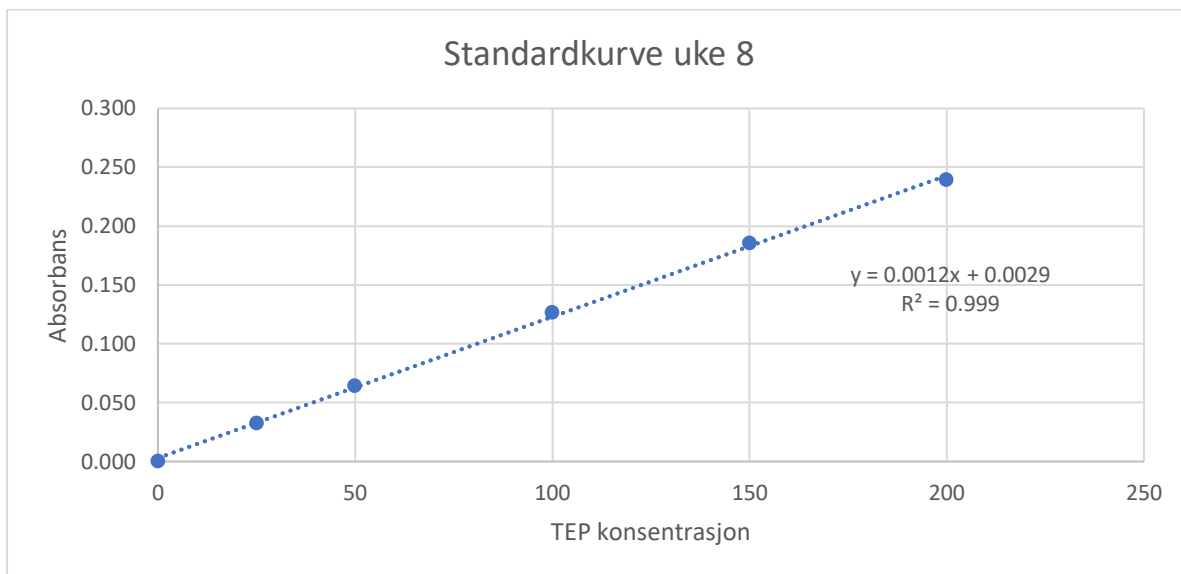
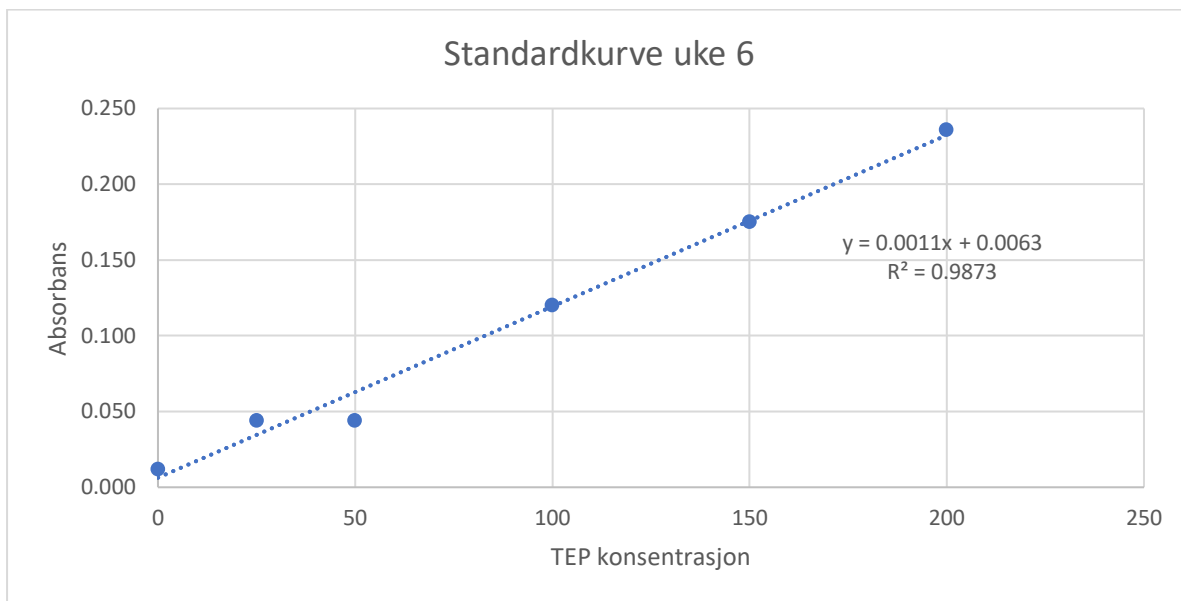
Vedlegg 3: Standardkurver TBARS LAGRINGSFORSØK 1 (1_{lever} og 1_{innmat})



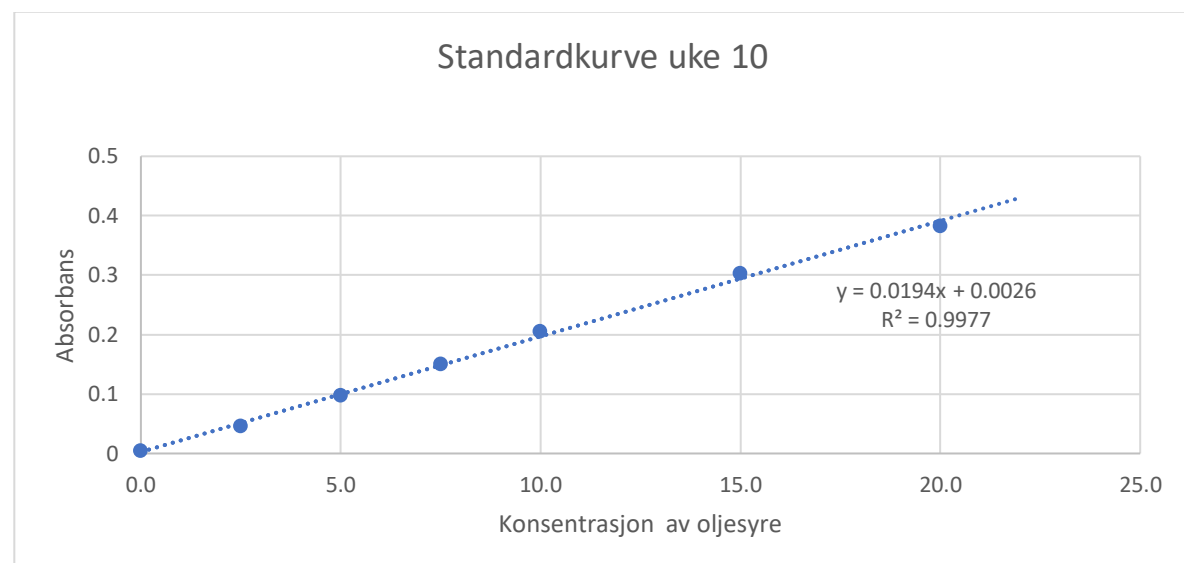
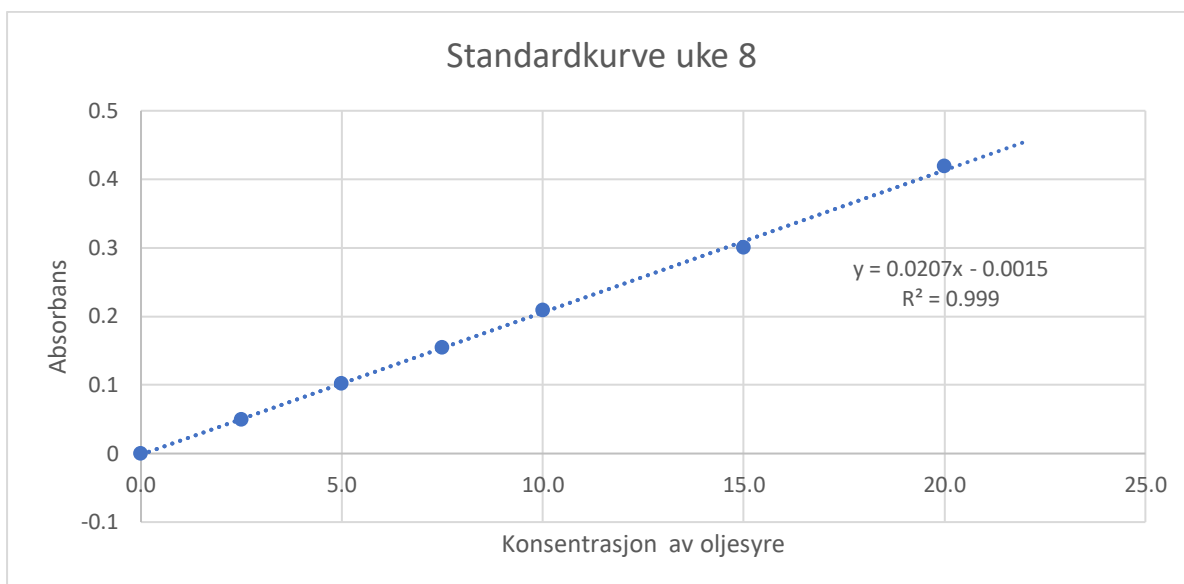
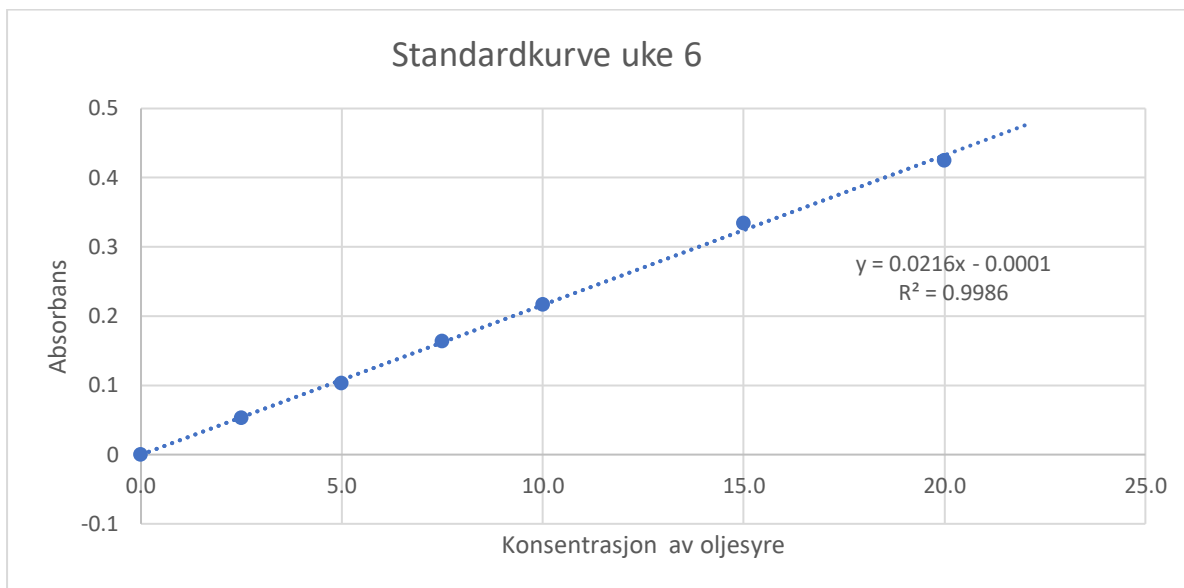
Vedlegg 4: Standardkurver % frie fettsyrer LAGRINGSFORSØK 1 (1_{lever} og 1_{innmat})



Vedlegg 5: Standardkurver TBARS LAGRINGSFORSØK 2



Vedlegg 6: Standardkurver % frie fettsyrer LAGRINGSFORSØK 2



Vedlegg 7: Post Hoc test LAGRINGSFORSØK 1 (1A=1_{lever}, 1B=1_{innmat})

PV

Prøve=1A

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D2	3	.19133			
D1	3	.81367	.81367		
D3	3		1.94367	1.94367	
D0	3			2.94213	2.94213
D6	3				3.34600
Sig.		.465	.065	.113	.795

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Prøve=1B

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D2	3	.51433	
D0	3	.87700	
D1	3	1.09500	
D6	3		3.75367
D3	3		3.97200
Sig.		.112	.832

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

AV

Prøve=1A

Tukey HSD^{a,b}

Dag	N	Subset		
		1	2	3
D0	2	.850		
D3	2		2.550	
D6	2			7.850
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

Prøve=1B

Tukey HSD^{a,b}

Dag	N	Subset		
		1	2	3
D0	2	4.550		
D6	2		8.000	
D3	2			8.650
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .023.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

TBARS

Prøve=1A

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	5	.98300	
D3	5	1.56120	1.56120
D2	5	1.89240	1.89240
D1	5	1.95020	1.95020
D6	5		2.38300
Sig.		.071	.158

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Prøve=1B

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D2	5	.75900	
D0	5	1.47440	
D6	5	1.74620	1.74620
D3	5	1.97860	1.97860
D1	5		2.91660
Sig.		.113	.137

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Frie fettsyrer

Prøve=1A

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	5	.02612	
D1	5	.10938	
D2	5	.12084	
D3	5	.22540	
D6	5		2.04640
Sig.		.052	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Prøve=1B

Tukey HSD^a

Dag	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	5	1.64940	
D1	5	2.00400	
D3	5	2.73940	
D2	5	3.45060	
D6	5		6.98740
Sig.		.074	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Vedlegg 8: Post Hoc test LAGRINGSFORSØK 2

Peroksidverdi

PV

Tukey HSD^a

Uke	N	Subset for alpha = 0.05
		1
U10	5	3.06700
U6	5	3.23340
U8	5	4.02440
Sig.		.542

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

p-Anisidinverdi

AV

Tukey HSD^a

Uke	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
U8	2	7.550		
U6	2		8.250	
U10	2			8.950
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

TBARS

TBARS

Tukey HSD^a

Uke	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
U6	5	1.54060	
U10	5	1.68780	
U8	5		5.66240
Sig.		.970	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Frie fettsyrer

FFA

Tukey HSD^a

Uke	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
U10	5	2.76760	
U8	5	2.85520	
U6	5		3.62740
Sig.		.877	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Vedlegg 9: Fettsammensetning av LAGRINGSFORSØK 1 (3 sider)

Prøve merket D0 lever					Prøve merket D0 innmat				
Fettsyresammensetning i mg/g olje					Fettsyresammensetning i mg/g olje				
Par.nr	59	60	avg	std	Par.nr	57	58	avg	std
Fettsyre					Fettsyre				
C14:0	48,62	52,41	50,52	2,68	C14:0	59,07	60,29	59,68	0,86
C14:1	3,28	3,56	3,42	0,20	C14:1	3,58	3,66	3,62	0,06
C15:0	4,00	4,32	4,16	0,23	C15:0	4,56	4,65	4,61	0,06
C16:0	112,64	121,28	116,96	6,11	C16:0	124,52	127,38	125,95	2,02
C16:1	82,15	88,38	85,27	4,41	C16:1	91,10	93,10	92,10	1,41
C17:0	7,33	7,76	7,55	0,30	C17:0	8,23	8,41	8,32	0,13
C17:1	3,12	3,37	3,25	0,18	C17:1	4,12	4,21	4,17	0,06
C18:0	19,35	20,82	20,09	1,04	C18:0	19,53	20,00	19,77	0,33
C18:1n11 +n9	165,79	178,31	172,05	8,85	C18:1n11 +n9	164,57	168,60	166,59	2,85
C18:1n7	41,82	44,97	43,40	2,23	C18:1n7	45,89	46,82	46,36	0,66
C18:2n6	24,63	26,48	25,56	1,31	C18:2n6	20,45	20,94	20,70	0,35
C18:3n6	1,29	1,41	1,35	0,08	C18:3n6	1,26	1,32	1,29	0,04
C18:3n3	12,30	13,23	12,77	0,66	C18:3n3	10,26	10,59	10,43	0,23
c18:4n3	26,79	28,92	27,86	1,51	c18:4n3	22,17	22,80	22,49	0,45
C20:0	0,59	0,63	0,61	0,03	C20:0	0,83	0,93	0,88	0,07
C20:1	128,70	138,40	133,55	6,86	C20:1	146,57	150,39	148,48	2,70
C20:2n6	3,86	4,18	4,02	0,23	C20:2n6	3,87	4,02	3,95	0,11
c20:3n6	0,68	0,78	0,73	0,07	c20:3n6	0,69	0,76	0,73	0,05
C20:4n6	3,42	3,78	3,60	0,25	C20:4n6	6,29	6,34	6,32	0,04
C20:3n3	1,56	1,70	1,63	0,10	C20:3n3	1,41	1,50	1,46	0,06
c20:4n3	7,31	8,08	7,70	0,54	c20:4n3	6,38	6,37	6,38	0,01
C20:5n3	79,76	86,14	82,95	4,51	C20:5n3	71,78	73,39	72,59	1,14
C22:0	0,69	0,67	0,68	0,01	C22:0	0,20	0,19	0,20	0,01
c22:1n11	63,26	68,00	65,63	3,35	c22:1n11	87,98	89,47	88,73	1,05
C22:1n9	6,61	7,17	6,89	0,40	C22:1n9	7,47	8,38	7,93	0,64
C22:2	3,71	4,04	3,88	0,23	C22:2	2,95	3,01	2,98	0,04
C22:3	2,08	2,86	2,47	0,55	C22:3	3,40	2,73	3,07	0,47
C22:4	1,05	1,09	1,07	0,03	C22:4	1,18	1,20	1,19	0,01
c22:5n3	9,17	9,88	9,53	0,50	c22:5n3	10,03	10,27	10,15	0,17
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	105,78	114,49	110,14	6,16	C22:6n3	98,19	100,52	99,36	1,65
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	971,34	1047,11	1009,23	53,58	sum	1028,53	1052,24	1040,39	16,77
Sum sat	193,22	207,89	200,56	10,37	Sum sat	216,94	221,85	219,40	3,47
Sum mono	494,73	532,16	513,45	26,47	Sum mono	551,28	564,63	557,96	9,44
Sum poly	283,39	307,06	295,23	16,74	Sum poly	260,31	265,76	263,04	3,85
sum omega 3	242,67	262,44	252,56	13,98	sum omega 3	220,22	225,44	222,83	3,69

Prøve merket D3 lever**Fettsyresammensetning i mg/g olje**

Par.nr	43	44	avg	std
Fettsyre				
C14:0	53,69	51,84	52,77	1,31
C14:1	3,34	3,22	3,28	0,08
C15:0	3,98	3,83	3,91	0,11
C16:0	120,32	116,15	118,24	2,95
C16:1	110,17	106,45	108,31	2,63
C17:0	8,07	7,87	7,97	0,14
C17:1	3,06	2,98	3,02	0,06
C18:0	19,17	18,47	18,82	0,49
C18:1n11 +n9	185,12	178,90	182,01	4,40
C18:1n7	52,64	50,79	51,72	1,31
C18:2n6	22,49	21,67	22,08	0,58
C18:3n6	1,90	1,62	1,76	0,20
C18:3n3	9,99	9,66	9,83	0,23
c18:4n3	30,17	29,15	29,66	0,72
C20:0	0,67	0,87	0,77	0,14
C20:1	145,50	140,58	143,04	3,48
C20:2n6	3,64	3,53	3,59	0,08
c20:3n6	0,63	0,68	0,66	0,04
C20:4n6	3,88	3,74	3,81	0,10
C20:3n3	1,36	1,31	1,34	0,04
c20:4n3	7,40	7,19	7,30	0,15
C20:5n3	99,56	96,20	97,88	2,38
C22:0	0,97	0,99	0,98	0,01
c22:1n11	63,83	61,71	62,77	1,50
C22:1n9	7,76	7,52	7,64	0,17
C22:2	4,68	4,55	4,62	0,09
C22:3	2,44	2,48	2,46	0,03
C22:4	0,90	0,84	0,87	0,04
c22:5n3	9,68	9,37	9,53	0,22
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	102,57	99,12	100,85	2,44
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1079,58	1043,28	1061,43	25,67
Sum sat	206,87	200,02	203,45	4,84
Sum mono	571,42	552,15	561,79	13,63
Sum poly	301,29	291,11	296,20	7,20
sum omega 3	260,73	252,00	256,37	6,17

Prøve merket D3 innmat**Fettsyresammensetning i mg/g olje**

Par.nr	45	46	avg	std
Fettsyre				
C14:0	58,06	57,32	57,69	0,52
C14:1	3,40	3,35	3,38	0,04
C15:0	4,14	4,08	4,11	0,04
C16:0	123,60	122,13	122,87	1,04
C16:1	96,82	95,70	96,26	0,79
C17:0	8,62	8,49	8,56	0,09
C17:1	2,73	2,88	2,81	0,11
C18:0	16,57	16,37	16,47	0,14
C18:1n11 +n9	172,00	170,13	171,07	1,32
C18:1n7	43,82	43,30	43,56	0,37
C18:2n6	23,10	22,81	22,96	0,21
C18:3n6	1,28	1,24	1,26	0,03
C18:3n3	10,80	10,77	10,79	0,02
c18:4n3	25,56	25,21	25,39	0,25
C20:0	0,93	0,90	0,92	0,02
C20:1	159,60	157,91	158,76	1,20
C20:2n6	3,66	3,62	3,64	0,03
c20:3n6	0,69	0,69	0,69	0,00
C20:4n6	3,80	3,71	3,76	0,06
C20:3n3	1,41	1,40	1,41	0,01
c20:4n3	7,60	7,14	7,37	0,33
C20:5n3	77,19	76,47	76,83	0,51
C22:0	0,83	0,93	0,88	0,07
c22:1n11	85,70	85,25	85,48	0,32
C22:1n9	9,25	9,01	9,13	0,17
C22:2	3,66	3,62	3,64	0,03
C22:3	3,27	2,87	3,07	0,28
C22:4	0,83	0,81	0,82	0,01
c22:5n3	8,82	8,72	8,77	0,07
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	99,85	98,52	99,19	0,94
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1057,59	1045,35	1051,47	8,65
Sum sat	212,75	210,22	211,49	1,79
Sum mono	573,32	567,53	570,43	4,09
Sum poly	271,52	267,60	269,56	2,77
sum omega 3	231,23	228,23	229,73	2,12

Prøve merket D6 lever					Prøve merket D6 innmat				
Fettsyresammensetning i mg/g olje					Fettsyresammensetning i mg/g olje				
Par.nr	47	48	avg	std	Par.nr	49	50	avg	std
Fettsyre					Fettsyre				
C14:0	48,57	49,17	48,87	0,42	C14:0	60,43	57,89	59,16	1,80
C14:1	3,13	3,27	3,20	0,10	C14:1	3,36	3,20	3,28	0,11
C15:0	3,95	4,02	3,99	0,05	C15:0	3,71	3,55	3,63	0,11
C16:0	115,94	116,53	116,24	0,42	C16:0	122,25	117,26	119,76	3,53
C16:1	89,67	89,81	89,74	0,10	C16:1	111,61	106,99	109,30	3,27
C17:0	7,37	6,19	6,78	0,83	C17:0	9,28	8,98	9,13	0,21
C17:1	3,34	3,35	3,35	0,01	C17:1	2,43	2,32	2,38	0,08
C18:0	22,45	22,31	22,38	0,10	C18:0	17,99	17,29	17,64	0,49
C18:1n11 +n9	171,96	168,85	170,41	2,20	C18:1n11 +n9	175,44	169,73	172,59	4,04
C18:1n7	46,60	46,79	46,70	0,13	C18:1n7	50,02	47,17	48,60	2,02
C18:2n6	22,74	22,59	22,67	0,11	C18:2n6	21,12	20,12	20,62	0,71
C18:3n6	1,57	1,51	1,54	0,04	C18:3n6	1,39	1,31	1,35	0,06
C18:3n3	10,88	10,75	10,82	0,09	C18:3n3	7,78	7,49	7,64	0,21
c18:4n3	25,07	24,29	24,68	0,55	c18:4n3	24,56	23,72	24,14	0,59
C20:0	0,67	0,95	0,81	0,20	C20:0	0,86	0,64	0,75	0,16
C20:1	138,90	136,95	137,93	1,38	C20:1	157,21	151,16	154,19	4,28
C20:2n6	3,83	3,50	3,67	0,23	C20:2n6	3,36	3,19	3,28	0,12
c20:3n6	0,78	0,59	0,69	0,13	c20:3n6	0,73	0,77	0,75	0,03
C20:4n6	4,13	3,94	4,04	0,13	C20:4n6	4,17	4,00	4,09	0,12
C20:3n3	1,53	1,48	1,51	0,04	C20:3n3	1,12	1,09	1,11	0,02
c20:4n3	7,60	7,64	7,62	0,03	c20:4n3	6,54	6,27	6,41	0,19
C20:5n3	82,69	77,95	80,32	3,35	C20:5n3	86,75	83,94	85,35	1,99
C22:0	0,93	1,09	1,01	0,11	C22:0	0,72	0,81	0,77	0,06
c22:1n11	68,54	68,00	68,27	0,38	c22:1n11	72,55	70,38	71,47	1,53
C22:1n9	7,19	7,45	7,32	0,18	C22:1n9	8,62	7,89	8,26	0,52
C22:2	3,82	3,67	3,75	0,11	C22:2	3,96	3,82	3,89	0,10
C22:3	2,70	3,28	2,99	0,41	C22:3	2,51	2,22	2,37	0,21
C22:4	1,27	1,16	1,22	0,08	C22:4	0,90	0,90	0,90	0,00
c22:5n3	10,89	10,65	10,77	0,17	c22:5n3	8,67	8,38	8,53	0,21
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	111,59	103,25	107,42	5,90	C22:6n3	96,35	92,74	94,55	2,55
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1020,30	1000,98	1010,64	13,66	sum	1066,39	1025,22	1045,81	29,11
Sum sat	199,88	200,26	200,07	0,27	Sum sat	215,24	206,42	210,83	6,24
Sum mono	529,33	524,47	526,90	3,44	Sum mono	581,24	558,84	570,04	15,84
Sum poly	291,09	276,25	283,67	10,49	Sum poly	269,91	259,96	264,94	7,04
sum omega 3	250,25	236,01	243,13	10,07	sum omega 3	231,77	223,63	227,70	5,76

Vedlegg 10: Fettsammensetning av LAGRINGSFORSØK 2 (3 sider)

Prøve merket

U6

Fettsyresammensetning i mg/g olje

Par.nr	51	52	avg	std
Fettsyre				
C14:0	53,39	53,65	53,52	0,18
C14:1	3,56	3,58	3,57	0,01
C15:0	4,12	4,15	4,14	0,02
C16:0	109,42	110,52	109,97	0,78
C16:1	91,67	92,19	91,93	0,37
C17:0	8,55	8,59	8,57	0,03
C17:1	3,15	3,17	3,16	0,01
C18:0	17,27	17,39	17,33	0,08
C18:1n11 +n9	168,43	169,21	168,82	0,55
C18:1n7	43,59	43,95	43,77	0,25
C18:2n6	23,66	23,80	23,73	0,10
C18:3n6	1,30	1,32	1,31	0,01
C18:3n3	11,11	11,14	11,13	0,02
c18:4n3	26,09	26,20	26,15	0,08
C20:0	0,80	0,79	0,80	0,01
C20:1	138,15	138,85	138,50	0,49
C20:2n6	3,57	3,68	3,63	0,08
c20:3n6	0,57	0,72	0,65	0,11
C20:4n6	3,91	3,94	3,93	0,02
C20:3n3	1,54	1,51	1,53	0,02
c20:4n3	7,51	7,65	7,58	0,10
C20:5n3	84,57	84,94	84,76	0,26
C22:0	0,76	0,91	0,84	0,11
c22:1n11	71,35	71,34	71,35	0,01
C22:1n9	7,74	7,90	7,82	0,11
C22:2	3,85	3,86	3,86	0,01
C22:3	3,05	3,32	3,19	0,19
C22:4	1,18	1,19	1,19	0,01
c22:5n3	8,91	9,39	9,15	0,34
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	107,41	107,71	107,56	0,21
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1010,18	1016,56	1013,37	4,51
Sum sat	194,31	196,00	195,16	1,20
Sum mono	527,64	530,19	528,92	1,80
Sum poly	288,23	290,37	289,30	1,51
sum omega 3	247,14	248,54	247,84	0,99

Prøve merket

U8

Fettsyresammensetning i mg/g olje

Par.nr	53	54	avg	std
Fettsyre				
C14:0	44,49	46,03	45,26	1,09
C14:1	2,86	2,97	2,92	0,08
C15:0	3,20	3,53	3,37	0,23
C16:0	97,59	100,80	99,20	2,27
C16:1	83,00	85,73	84,37	1,93
C17:0	8,21	8,37	8,29	0,11
C17:1	3,16	3,26	3,21	0,07
C18:0	19,45	20,08	19,77	0,45
C18:1n11 +n9	167,26	171,94	169,60	3,31
C18:1n7	42,23	44,04	43,14	1,28
C18:2n6	22,97	23,73	23,35	0,54
C18:3n6	1,58	1,66	1,62	0,06
C18:3n3	12,89	13,28	13,09	0,28
c18:4n3	40,12	41,30	40,71	0,83
C20:0	0,56	0,64	0,60	0,06
C20:1	127,42	131,38	129,40	2,80
C20:2n6	3,77	3,93	3,85	0,11
c20:3n6	0,82	0,87	0,85	0,04
C20:4n6	4,22	4,34	4,28	0,08
C20:3n3	1,60	1,63	1,62	0,02
c20:4n3	8,46	8,65	8,56	0,13
C20:5n3	104,73	107,51	106,12	1,97
C22:0	1,02	0,79	0,91	0,16
c22:1n11	65,24	66,54	65,89	0,92
C22:1n9	6,48	6,60	6,54	0,08
C22:2	5,52	5,36	5,44	0,11
C22:3	2,26	2,21	2,24	0,04
C22:4	1,12	1,18	1,15	0,04
c22:5n3	10,14	10,47	10,31	0,23
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	117,57	121,22	119,40	2,58
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1009,94	1040,04	1024,99	21,28
Sum sat	174,52	180,24	177,38	4,04
Sum mono	497,65	512,46	505,06	10,47
Sum poly	337,77	347,34	342,56	6,77
sum omega 3	295,51	304,06	299,79	6,05

Prøve merket **U10**
Fettsyresammensetning i mg/g olje

Par.nr	55	56	avg	std
Fettsyre				
C14:0	43,18	42,98	43,08	0,14
C14:1	3,03	3,02	3,03	0,01
C15:0	3,72	3,71	3,72	0,01
C16:0	107,64	107,00	107,32	0,45
C16:1	102,01	101,54	101,78	0,33
C17:0	8,32	8,21	8,27	0,08
C17:1	3,90	3,91	3,91	0,01
C18:0	20,53	20,40	20,47	0,09
C18:1n11 +n9	189,79	189,12	189,46	0,47
C18:1n7	56,75	56,22	56,49	0,37
C18:2n6	21,68	21,55	21,62	0,09
C18:3n6	1,81	1,78	1,80	0,02
C18:3n3	10,27	10,24	10,26	0,02
c18:4n3	25,76	25,72	25,74	0,03
C20:0	0,67	0,63	0,65	0,03
C20:1	133,81	133,07	133,44	0,52
C20:2n6	4,20	4,21	4,21	0,01
c20:3n6	0,77	0,78	0,78	0,01
C20:4n6	5,43	5,43	5,43	0,00
C20:3n3	1,59	1,58	1,59	0,01
c20:4n3	7,69	7,40	7,55	0,21
C20:5n3	95,62	95,88	95,75	0,18
C22:0	0,72	1,03	0,88	0,22
c22:1n11	57,45	57,48	57,47	0,02
C22:1n9	7,59	7,73	7,66	0,10
C22:2	4,16	4,16	4,16	0,00
C22:3	2,91	3,27	3,09	0,25
C22:4	1,32	1,32	1,32	0,00
c22:5n3	12,06	12,04	12,05	0,01
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	110,31	110,33	110,32	0,01
C24:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
sum	1044,69	1041,74	1043,22	2,09
Sum sat	184,78	183,96	184,37	0,58
Sum mono	554,33	552,09	553,21	1,58
Sum poly	305,58	305,69	305,64	0,08
sum omega 3	263,30	263,19	263,25	0,08