

Andreas Riege Østereng
Håvard Jamessen

Effekt av ultralydbehandling før enzymatisk hydrolyse og tilsetning av antioksidant under lagring på oljer ekstrahert fra Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*)

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Janna Cropotova
Medveileder: Kristine Kvangarsnes
Mai 2024



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Andreas Riege Østereng
Håvard Jamessen

**Effekt av ultralydbehandling før
enzymatisk hydrolyse og tilsetning av
antioksidant under lagring på oljer
ekstrahert fra Atlantisk makrell
(*Scomber scombrus*)**

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Janna Crobotova
Medveileder: Kristine Kvangarsnes
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Forord

Bacheloroppgaven er skrevet våren 2024 på NTNU i Ålesund. Studieløpet i Biomarin innovasjon har gitt oss dypere kunnskap og forståelse av hvordan utnyttelse av marine ressurser anvendes til næringsmiddelprodukter for humant konsum. Videre fikk vi muligheten til å skrive oppgave om dette, og på den måten være med på å øke kunnskapen om hvilke muligheter pelagisk fisk har kommersielt. For å undersøke dette målte vi effekten av ultralydbehandling før enzymatisk hydrolyse og tilsetning av antioksidantblanding under lagring på olje ekstrahert fra Atlantisk makrell. Prosjekter har som mål å undersøke hvordan det påvirker oksidasjonsparametere PV og TBARS, og i tillegg undersøke fettsyresammensetning og frie fettsyrer (FFA).

Tusen takk til vår veileder Janna Cropotova og bi-veileder Kristine Kvangarsnes. Våre veiledere har bidratt med bistand på laboratoriet og god akademisk veiledning for en dypere forståelse av oppgaven.

Sammendrag

Denne bacheloroppgaven undersøker oksidasjonsparametere av fiskeolje ekstrahert fra Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*), gjennom bruk av ultralydbehandling og enzymatisk hydrolyse for videre stabilisering ved hjelp av kommersiell antioksidant (KALSEC - Duralox Oxidation Management Blend A NM-110, XT). Mer spesifikt går studien inn på fiskeolje ekstrahert fra restråstoff av makrell ved bruk av enzymatisk hydrolyse med (AX) og uten (Control) ultralydbehandlet restråstoff for å undersøke lipidoksidasjon. Det ble undersøkt hvordan ulik ultralydbehandling før enzymatisk hydrolyse kombinert med tilsetning av rosmarinbasert antioksidantblanding vil påvirke oksidasjonsparametere i makrellolje. Oljeprøvene ekstrahert uten ultralydbehandling og tilsetning av antioksidant fungerte som kontrollprøver hvor å evaluere effekten av antioksidanter og ultralydbehandling. Makrell anses som en fet fisk med høyt innhold av flerumettede fettsyrene eikosapentaensyre og dokosaheksaensyre. Dette gjør oljen svært attraktiv som et sunt supplement for human diett. Den høye mengden umettede fettsyrer i makrellolje gjør oljen utsatt for oksidasjon og harskning. Ved bruk av antioksidanter er det mulig å redusere oksidasjonshastigheten på grunn av dens egenskaper til å stabilisere frie radikaler. Oljeprøvene ekstrahert fra restråstoff av makrell ved bruk av enzymatisk hydrolyse med og uten ultralydbehandling og antioksidanter ble analysert for primære (PV) og sekundære (TBARS) oksidasjonsprodukter, samt en analyse på fettsyresammensetning og frie fettsyrer (FFA).

Analysen av resultatene av oksidasjonsparametere ga en bedre og dypere forståelse av stabiliteten til fiskeolje påvirket av prosessforhold (med og uten ultralydbehandling), og tilsetning av antioksidanter.

Abstract

This bachelor thesis is focused on the assessment of oxidative stability of fish oil extracted from wild-caught Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), by ultrasound pre-treatment and enzymatic hydrolysis and further stabilized with natural antioxidant (KALSEC - Duralox Oxidation Management Blend A NM-110, XT). More specifically, the study comprised the fish oil extracted from residual raw material from mackerel by enzymatic hydrolysis with (AX) and without (Control) ultrasound pre-treatments to investigate lipid oxidation. It was studied how different ultrasound pre-treatments prior to enzymatic hydrolysis for the fish oil recovery combined with the addition of antioxidants based on rosemary extracts will affect the oxidation parameters of the mackerel oil. The fish oil samples extracted without ultrasound pre-treatment and without addition of antioxidants served as control sampled to evaluate the effect of antioxidants and ultrasound pre-treatments. Mackerel is considered an abundant fat source of polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic and docosahexaenoic. This makes the oil highly attractive for implementation as healthy food supplement in the human diet. The high amount of unsaturated fatty acids in the mackerel oil makes the oil susceptible to oxidation and fast rancidity. By using antioxidants, it is possible to reduce the rate of oxidation, due to their ability to stabilize free radicals. Oil samples extracted from mackerel rest raw material by enzymatic hydrolysis with and without ultrasound pre-treatments were analysed for primary (PV) and secondary (TBARS) oxidation products, as well as fatty acid composition and free fatty acids (FFA).

The analysis of the results of lipid oxidation parameters provided a better and deeper understanding of the oxidation stability of fish oils as affected by process conditions (with or without ultrasound pre-treatment), and addition of antioxidants.

Innholdsfortegnelse

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
ABSTRACT	3
1 INNLEDNING.....	6
1.1 PROBLEMSTILLING OG FORMÅL	8
2 TEORETISK BAKGRUNN.....	8
2.1 Atlantisk makrell (<i>Scomber scombrus</i>).....	8
2.1.1 Kjemisk sammensetning og lipider i fiskemuskel	10
2.2 Ekstraksjon av makrellolje ved hjelp av enzymatisk hydrolyse.....	10
2.3 Makrellolje som ingrediens i matindustri.....	11
2.4 Helseeffekter av fiskeolje.....	12
2.5 Mekanismer for oksidasjon med primær og sekundær oksidasjonsprodukter – lipider.....	13
2.6 Oksidasjon av fiskeolje.....	14
2.7 Antioksidanter	16
2.8 Ultralydbehandling	17
3 MATERIALER OG METODER.....	18
3.3 LAGRINGSFORSØK	19
3.4 FETTSYRESAMMENSETNING.....	19
3.5 FRIE FETTSYRER (FFA).....	20
3.6 PEROKSIDVERDI (PV)	21
3.7 TIOBARBITURSRYRE-REAKTIVE-STOFFER (TBARS).....	21
3.8 STATISTISK ANALYSER	22
4 RESULTATER.....	23
4.1 FETTSYRESAMMENSETNING.....	23
4.2 FRIE FETTSYRER (FFA).....	25
4.3 PEROKSIDVERDI (PV)	26
4.4 TIOBARBITURSRYRE-REAKTIVE-STOFFER (TBARS).....	27
5 DISKUSJON.....	28
5.1 FETTSYRESAMMENSETNING.....	28
5.2 FRIE FETTSYRER	28
5.3 PV OG TBARS – ULTRALYDBEHANDLING → LIPIDOKSIDASJON	29
6 KONKLUSJON.....	31

7 REFERANSELISTE..... 32

1 Innledning

Norge har vært med på å kartlegge atlantisk makrell i den Norske Økonomiske Sone (NØS) siden 60-tallet, og gjøres årlig for å kartlegge mengde, utbredelse og vandring av norsk makrell. Havforskningsinstituttet har stått i spissen, og mellom 1995 og 2011 ble det i snitt blitt funnet 484 347 tonn med makrell i Norskehavet og Nordsjøen hvert år (Nøttestad et al. 2012). I 2015 var det estimert at omtrent 350 000 tonn makrell ble fisket opp og sendt til norske pelagiske konsumanlegg, hvor 98-99% av all makrell gikk til eksport som rundfrosset form (SINTEF Fiskeri og havbruk AS, 2015). I 2021 eksporterte Norge 389 000 tonn makrell, og i 2022 ble det eksportert 343 252 tonn. Selv med et mindre volum i 2022 ble det allikevel solgt for over 400 millioner norske kroner mer enn i 2021. Den største andelen av norsk eksportert makrell de siste tre årene har vist å gå til Asia, henholdsvis Japan, Kina, Sør-Korea og Vietnam (Norges Sjømatråd, 2023).

En trend som har vist seg de siste 10 årene er at mengden norsk fisket makrell ligger stabilt mellom 350 000 tonn til 400 000 tonn, hvorav >95% blir direkte solgt som helfisk til utland med en stadig økende prisvekst. Dette vil si at bearbeidingsgraden av norsk atlantisk makrell i all hovedsak består av sortering, pakking og frysing (Norges Sjømatråd, 2023).

Av all villfisk som eksporteres ut av Norge, er makrell den eneste fiskebestanden som sendes ut med lav bearbeidingsgrad. Ved å øke foredlingsgraden vil fiskerinæringen stå ovenfor en stor mulighet til å omgjøre råvaren til en bærekraftig gevinst, og potensielt åpne opp et større marked for norsk makrell. Utnyttelsen av makrellens verdikjede kan utvides, og med dette skape nye verdier som sysselsetting og flere arbeidsplasser, nye produkter og energikilder. Som enkelt bedrift kan dette være en utfordring, men i samarbeid med norske virkemiddelapparater kan dette på sikt bli et lønnsomt prosjekt.

Produkter som kommer av makrell kan deles inn i kategoriene råstoff, restråstoff og biprodukt. Makrell som råstoff selges i rund form og som filet. Restråstoff er det som er igjen av fisken, og fortsatt kan benyttes til humant konsum som for eksempel. råolje og proteinhydrolysat. Biprodukter er delene av fisken som ikke går til humant konsum, men som kan utnyttes til for eksempel biogass (Westavik & Kjerstad, 2016).

Ut ifra bearbeidingsgrad på Makrell i Norge er det et stort utnyttelsespotensial for restråstoffet, og mulighetene det har for humant konsummarked. Fra restråstoff er det mulig å ekstrahere olje og protein, og man kan også måle tørrstoff og aske, men dette brukes ikke til noe. Tørrstoff er alt som ikke er vann som for eksempel fett, protein og aske. Fett ekstrahert fra restråstoffet er et ettertraktet produkt fra makrellen. Utvinning av fett fra makrellen skjer gjennom enzymatisk hydrolyse og termisk behandling. For å analysere kvaliteten på makrelloljen benyttes det kvalitetsparametere som primære oksidasjonsprodukter (PV) og frie fettsyrer (FFA). I tillegg til TBARS og undersøkelse av fettsyresammensetning i makrelloljen.

Makrellolje har et høyt innhold av flerumettede fettsyrer som gjør den attraktiv for helsekost og tilsetning i mat. Viktige fettsyrer som makrellen inneholder er blant annet EPA og DHA. Disse fettsyrene bidrar med flere helsefremmede prosesser og er av den grunn svært ønskelig å implementere i det norske kostholdet. Det er derimot utfordringer knyttet til lipidoksidasjon av fiskeolje på grunn av det høye innholdet av flerumettede fettsyrer. Viktige faktorer å kontrollere for å unngå dette er lys, temperatur, fettsyresammensetning og oksygen. Ved å tilsette antioksidanter er det mulig kunne evaluere og studere hvordan det påvirker makrelloljens oksidative stabilitet. (Albert *et al.*, 2013).

1.1 Problemstilling og formål

Fiskeolje har et høyt innhold av flerumettede fettsyrer som omega-3 eikosapentataensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) som harskner veldig fort. Omega-3 fettsyre antas å kunne forebygge hjerte – kar – sykdommer, og har også positiv virkning på immunsystemet, noe som gjør at oljen er svært attraktiv som ingrediens og høykvalitetsprodukt i matindustrien for humant konsum. Utfordringen med å prosessere fiskeolje er at det oksiderer lett og kvaliteten reduseres betraktelig som en konsekvens av det. Forskning på produksjonsmetoder for å produsere høykvalitetsprodukter av fiskeolje er i vekst, inklusivt makrellolje. Utfordringen videre er å undersøke hvordan ultralydbehandlingen før enzymatisk hydrolyse og tilsetningen av antioksidanter påvirker råoljen ekstrahert fra makrell i løpet av lagringsperioden. På bakgrunn av dette er følgende hypotese utarbeidet:

Ved å tilsette kommersielle antioksidanter i råolje ekstrahert fra restråstoff av makrell ved bruk av ultralydbehandling og enzymatisk hydrolyse vil det føre til mindre lipidoksidasjon.

Formålet med oppgaven er å undersøke om ultralydbehandling av råstoff før enzymatisk hydrolyse og lagring med tilsetning av antioksidanter, påvirker oksidasjonsparametere og fettsyresammensetning i råolje ekstrahert fra makrell restråstoff.

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*)

Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) tilhører makrellfamilien Scombridae (Nøttestad & Slotte, 2020), og er en populasjonssterk fisk i den nordlige delen av Atlanterhavet. Makrellen er en pelagisk stimfisk som tilbringer hele livssyklusen sin i frie vannmasser. Den følger en horisontal migreringsfase basert på sesong, gyting og fôringsområder, som gjør makrellen til en tradisjonell generalist. (Jansen & Gislason, 2013).

Atlantisk makrell er en hurtigsvømmende fiskeart med små, myke skjell og en strømlinjeformet kropp. Dens særtrekk er en lysende blågrønn rygg med bølgende sorte striper og sølvgrå buk (se

figur 1). Makrellen blir vanligvis < 1 kilogram og mellom 30 – 50 centimeter, men er målt opptil 3,5 kilogram og 65 centimeter. I gytesesongen vandrer den sørover, og foregår vanligvis i vårsesongen januar til juli. Så tidlig som i januar skjer ofte i varmere områder; portugisiske farvann, og så sent som juli skjer i kaldere områder; Nordsjøen. Fiskens mangel på svømmeblære gjør at den må være i konstant bevegelse for ikke å synke. Dette fører til et stort behov for næring til bevegelse. Årstidene påvirker lipidinnholdet i makrellen ettersom fisken har forskjellig atferdsmønster gjennom året. Vinterperioden vandrer makrellen og spiser lite. Sommerperioden er beiteperiode og oppbygger seg et stort fettinnhold og stagnerer rundt september/oktober. Makrellens føde består av dyreplankton, fiskelarver, krill og småfisk. Beitemetodene som brukes er aktiv jakt eller filtrering gjennom gjellene (Nøttestad, 2019).



Figur 1 Atlantisk makrell (Scomber scombrus) (Svensen, 2019).

Atlantisk makrell spiller en nøkkelrolle i både økologisk og økonomisk sammenheng. Dens sentrale rolle som predator, konkurrent og byttedyr er viktig for de norske marine økosystemene. Norge fisker omtrent 7% av makrellbestanden hvert år. I 2020 tilsvarte dette 5 milliarder norske kroner i eksport (Nøttestad, 2019).

2.1.1 Kjemisk sammensetning og lipider i fiskemuskel

Makrellen har om høsten en kjemisk sammensetning og fordeling av næringsstoff slik; protein 15 %, fett 27 %, 1,4 % aske og 56.5 % vann. Til sammenligning har atlantisk makrell om våren et proteinnivå på 18 %, 5.5 % fett, 1.6 % aske og 75 % vann. (Adeniyi, O. D., & Bawa, A., 2006). Vitaminer er en del av den kjemiske sammensetningen i fiskemuskelen og består av vitamin A, D og E. Andre faktorer som påvirker den kjemiske sammensetningen i fiskemuskelen er hvor den lever, aktivitetsnivå, kjønn og alder. Før gyting kan fisken stanse matinntaket og henter energi fra fett- og proteinreserver.

Makrellen sin kvalitet og stabilitet varierer med lipidinnholdet. Faktorer som påvirkes er blant annet farge, tekstur og bindevev. Matkvalitetsparametere som smak, lukt, tekstur og farge påvirkes av lipider. Fisk generelt har store fettvariasjoner. Det er en markant forekomst av triglyserider med 12-24 karbonatomer med dobbeltbindinger (1-6). Andre fettsyrer som linolensyre (C18:3) og linolsyre (C18:2) er essensielle og kan utgjøre opp til 2% av fettinnholdet. Videre kan EPA (eicosapentaensyre) og DHA (docosahexaensyre) være opp til 29 % av fettinnholdet. (Romotowska *et al.*, 2016). De fettsyrene har en påvist sammenheng med i produksjon av prostaglandin-hormonet som bidrar til redusert risiko for hjerte- og karsykdommer (Haraldsson *et al.*, 1997., Romotowska *et al.*, 2016, Lylum, 1997; Mozaffarian & Wu, 2012).

Lipider er med i oppbyggingen av fettvev, membraner og muskelceller. Kolesterol, fosfolipider og triglyserider finner man i muskelcellene. Fosfolipidene inneholder fosfat, glyserol og en nitrogenholdig hydroksyforbindelse, i tillegg til flerumettede fettsyrer. Det bidrar til oppbyggingen og strukturen til cellemembranen. Kolesterol er det sterolet det forekommer mest av i fet fisk. (Lylum, L. (1994).

2.2 Ekstraksjon av makrellolje ved hjelp av enzymatisk hydrolyse

Råstoff er den spiselige delen av produktet som går direkte ut til humant konsum. Restene fra råstoffet blir enten ansett som restråstoff eller biprodukt. Restråstoff består av en rekke

næringsrike kilder som kan bli utnyttet til nye produkter for humant konsum eller dyrefôr ved hjelp av ulike prosesseringsmetoder. Biprodukt er ofte deler av råstoffet som etter hygieneregelverket ikke kan brukes til konsum, men blant annet til fiskefôr eller biogass (Mattilsynet, 2023).

Mesteparten av restråstoffet fra pelagisk fisk blir utnyttet, men mye av makrellen blir eksportert slik at man ikke sitter igjen med restråstoffer i Norge. Restråstoff som hode, finner, organer og skinn fra marin næring inneholder fiskeolje som kan utnyttes. Andel fiskeolje varierer mellom fiskearter (Ghaly AE, 2013).

Enzymatisk proteinhydrolyse er en av de mest brukte framgangsmåtene til å utnytte restråstoff. Andre metoder er fiskemelproduksjon og ensilasje. Hydrolyseprosessen bruker vann og enzymer til å kutte opp proteiner til mindre biter som muliggjør innhenting av spesifikke proteiner, som ellers er vanskelig å få tak i ved konvensjonelle metoder. Utfallet av denne framgangsmåten gir et trelags resultat, hvor det øverste fettlaget er viktigst for ekstraksjon av olje. Det midtre laget består av proteiner og peptider, etterfulgt av bunnlaget som er en oppsamling av ikke-løselige stoffer (Johansen, 2023).

2.3 Makrellolje som ingrediens i matindustri.

Fra 2020 til 2021 økte gruppen for marine olje med 5% og utgjorde omtrent 126 000 tonn. Det som utgjorde dataen for denne undersøkelsen var hvitfisk, laks og pelagisk fisk. (Strandheim, 2022).

Restråstoff fra pelagisk fisk (makrell) benyttes som ingrediens til matindustrien for humant konsum, og fôrindustrien. Tidligere har lukt og smak vært et problem for fiskeolje fra makrell, og blitt mest utnyttet til dyrefôr. Nofima har utviklet en fiskeolje fra makrell som er lukt og smaksfri og har åpnet mulighetene for å benytte oljen i produkter innen helsekost og markedet for funksjonell mat. Prosessen for å lykkes med denne oljen går tre faser. Bleking er den første fasen og komponenter som fargestoff, spormetaller og harskningsprodukter fjernes. Videre i fasen vintersiering fjernes det mettede fettene kalt stearin ved at fettene går i fast form ved kjøling. Når

stearinen er fjernet sitter man igjen med oljen. Til slutt blir oljen deodorisert ved at lukt og smak destrueres. (Haugen, 2022).

Makrelloljen har et høyt innhold av flerumettede omega 3 fettsyrer og betydelig innhold av EPA og DHA fettsyrer. Makrelloljen benyttes som ingrediens i omega 3 olje/kapselprodukter og til proteinekstrakter innen helsekost. Mye av fiskeoljen fra pelagisk fisk er viktig for fiskefôrindustrien og spesielt til lakseoppdrett. Før det ble produsert olje fra makrell ble den vanligvis solgt hel og/eller i filettform. I rapporten fra SINTEF er det fortsatt slik at fiskeolje anvendes i betydelig grad i landbrukssektoren og hadde en økning på 12% fra 2020 -2021. Spesielt husdyrfôr, fiskefôr og kjæledyrfôr er de største fôrindustriene fiskeolje benyttes i. (Strandheim, 2022).

2.4 Helseeffekter av fiskeolje

Fiskeolje kommer fra en betydelig mengde torskelever (tran) og fra fet fisk som makrell (*Scomber scombrus*), laks (*Salmo salar*) og sild (*Clupea harengus*). Fiskeolje fra marine kilder inneholder flerumettede omega-3 fettsyrer hvorav eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) har vist dokumenterte helseeffekter (Johnsen, 2021). Tilstrekkelig inntak av EPA og DHA har vist å gi positive helserelaterte utfall ved å endre fysiologien til cellemembraner og genetisk uttrykk (Calder & Yaqoob, 2009). Resultatet av dette har vist forebyggende tilfeller av allerede rammede personer med hjerte- og karsykdommer, samt utvikling av sentralnervesystemet. Enkelte med revmatiske lidelser har også vist redusert symptomer ved tilstrekkelig inntak av flerumettede omega-3 fettsyrer (Frøyland et al., 2011).

Lange kjeder med omega-3 fettsyrer fra har potensielt forebyggende effekt mot inflammatorisk tarmsykdom og leddgikt, samt redusere nedsettelse av hjernefunksjoner hos voksne og forbedring i læring og oppførsel hos barn. Dokosaheksaensyre (DHA) har vist å spille en kritisk rolle for utvikling av hjernen og øyne (Calder & Yaqoob, 2009).

Negative helseeffekter har blitt påvist hos personer med et daglig inntak av EPA og DHA over 6,9 gram, som har ført til økt blødningstid hos hjerte- og karsykdom pasienter. 95% av Norges

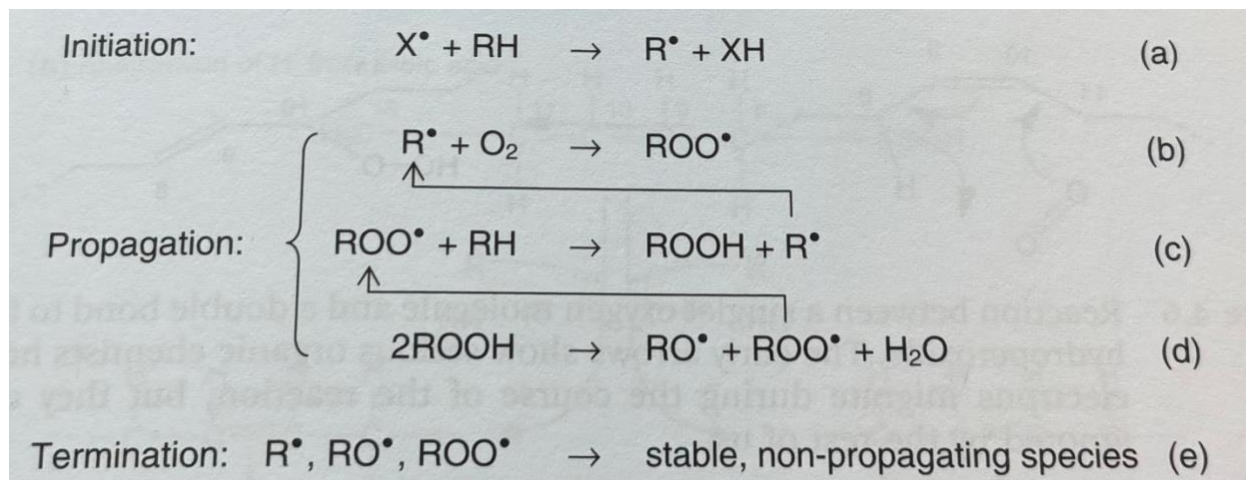
befolkning har et daglig inntak under 3,5 gram. Det er ikke satt noen anbefalinger på daglig inntak spesifikt på EPA og DHA. Norsk anbefaling på inntak av omega-3 fettsyrer er for barn og voksne over to år er satt på 1,1 gram (Frøyland et al., 2011).

2.5 Mekanismer for oksidasjon med primær og sekundær oksidasjonsprodukter – lipider

Mekanismene for oksidasjon kan deles inn i tre faser og kalles autooksidasjon. Den første fasen er initiering og er dannelsen av frie radikaler. I denne fasen blir hydrogenatom fjernet fra fettsyren og det resulterer i et reaktivt fettsyre-radikal.

Fase to er propagering og innebærer en kjedereaksjon av frie radikaler som kommer i kontakt med oksygen. Dette resulterer i produksjon av primære oksidasjonsprodukter som peroksider.

Terminering er den tredje fasen i oksidasjonsmekanismene. I denne fasen blir ikke-radikale produkter dannet. På grunn av at peroksider er ustabile forekommer det ofte at de brytes ned til nye radikaler som hydroksylradikaler og alkylradikaler. Når disse nye radikalene kommer i kontakt med fettsyrer og det produseres hydroksylerte fettsyrer. Videre kan sekundære oksidasjonsprodukter som aldehyder, alkoholer og ketoner dannes ved nedbrytning av alkylradikaler. (Kochhar and Henry, 2009). Se figur 2 for stegene som skjer gjennom oksidasjonsfasen.



Figur 2 viser en kjedereaksjon av frie radikaler i lipidoksidasjon. (Coultrate & Blumenthal, Food, 2016).

Primære oksidasjonsprodukter bestemmes ved peroksidverdianalyse. Produktene har ingen indikerende faktorer som lukt, smak og farge. De sekundære oksidasjonsproduktene kan deles inn i flyktige og ikke-flyktige. Flyktige kalles for aldehyder, mens ikke-flyktige er omtales som core-aldehyder. Det er de flyktige aldehydene som påvirker harskning og lukt. (Ruyter., 2010). (Nogala-Kalucka, 2005).

Oksidasjonshastighet påvirkes av flere faktorer. De mest innflytelsesrike faktorene er varme og lys. For å redusere oksidasjonshastigheten mest mulig er det flere preventive tiltak som gjøres. Det første er å fjerne mest mulig energi som varme og lys, samt å fjerne tilgang på oksygen. Videre er en nøyaktig raffineringssprosess viktig for fjerning av prooksidanter. Til slutt er tilsetning av antioksidanter et nyttig tiltak. (Ruyter 2010). Tilsetning av antioksidanter er en vanlig metode å bruke i stabilisering av omega 3 oljer. Vitamin E og C er vanlige antioksidanter å benytte for sine egenskaper som radikalfanger, nøytralisering og oppbindingsevnen av transisjonsmetaller. (Nogala-Kalucka *et al.*, 2005).

2.6 Oksidasjon av fiskeolje

Fiskeolje har en betydelig mengde av helsefremmende flerumettede fettsyrer EPA og DHA, og det medfører at oljen er utsatt for oksidasjon. Molekylær kontakt mellom flerumettede fettsyrer og oksygen forårsaker en reaksjon som danner lipid peroksider. Denne reaksjonen kalles

lipidoksidasjon. Fiskeolje består av lange umettede fettsyrer, og i kontakt med oksygen vil den naturlig være utsatt for lipidoksidasjon. Oksidering av fiskeolje fører til vond smak, lukt og videre nedsatt sunnhetskvalitet. (O'Sullivan et al., 2005).Utfordringen med oksidasjon er at det er en kontinuerlig prosess og i tillegg kan forekomsten av oksidasjonen være inaktiv før det stiger eksponentielt. Faktorer som påvirker oksidasjonsprosessen er tilgang på oksygen, varme, lys og redusert vanninnhold. Antioksidanter beskytter kroppen mot frie radikaler ved å nøytralisere de og motvirker oksidasjonsprosesser. Forbindelsen i frie radikaler kjennetegnes ved at de inneholder et uparet elektron, og forekomsten er høy i matvarer med høyt innhold av flerumettede fettsyrer. Det er en sammenheng mellom oksidasjonsstabilitet og mengde umettede dobbeltbindinger. For eksempel vil en fettsyre med 2 dobbeltbindinger oksidere en del raskere enn en fettsyre med en dobbeltbinding. Ettersom fisk har et høyt innhold av flerumettede fettsyrer, er oljen i fisken utsatt for dannelse av oksidasjonsprodukter i betydelig grad. (Blomhoff, 2011.,Ruyter, 2010).

Målinger av oksidasjon gjøres ved å benytte peroksidverdi (PV) og TBARS. Disse målingene benyttes i AOCS (American Oil Chemistry Society) som er et innovasjons selskap med mål om å bedre verdens folkehelse med et sunnere kosthold. Målingene er gode parametere for forskning og vurdering av fiskeoljekvaliteten. Peroksidverdi viser mengde lipid peroksider i oljer der høyere verdier indikerer akkumulering av primære lipidoksidasjonsprodukter og harskning eller lipidoksidasjon, mens lavere verdier kan i noen tilfeller indikere mindre primære lipidoksidasjonsprodukter i oljen. I tillegg viser målingen mengde primære oksidasjonsprodukter. Peroksider er en kjemisk sammensetning av en dobbelt oksygenbinding knyttet til hverandre og dannes i fettsyrer når det er i kontakt med oksygen. (Blomhoff, 2011.,Ruyter, 2010).

TBARS er en metode som benyttes for å måle sekundære oksidasjonsprodukter. Målingen tar for seg reaksjonsprosessen ved sekundære oksidasjonsprodukter MA (malonaldehyde) og TBA (Thiobarbituric acid reactive substances -TBARS). Metoden inneholder to molekylder av TBA og ett molekyl MA der to vannmolekyler fjernes. Prosessen skal resultere i en rødfarget sammensetning der en kan bruke et spektrometer for utarbeiding av resultat. (Vu, 2020). TBARS har sine begrensninger når det kommer til sensitivitet og spesifisering. Det går ut på at TBA er reaktivt andre komponenter enn MA. i tillegg er TBARS sensitivt overfor faktorer som

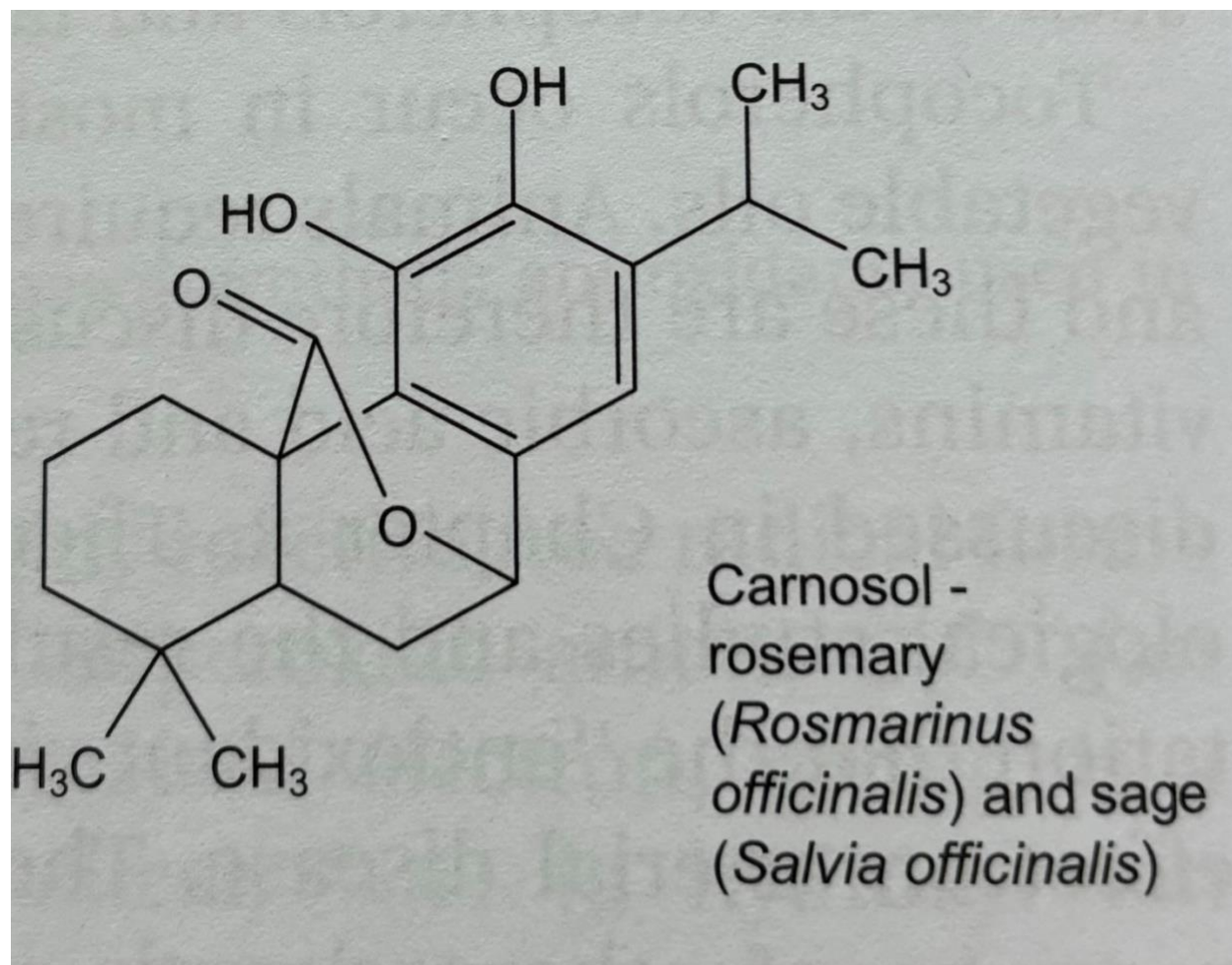
temperatur, pH og tid. Tiltak for å skape best mulig forhold er å redusere temperatur, tilsetning av antioksidanter og fokusere testen rundt MA. (Kishida 1993).

2.7 Antioksidanter

Antioksidanter er stoffer som hemmer oksidasjonsprosessen og reduserer mengden frie radikaler, fordi de er i stand til å donere elektroner til frie radikaler uten å selv bli ustabile. Ved bruk av antioksidanter i fiskeolje vil oksidering av lipider forsinkes, og være med på å opprettholde kvaliteten på produktet (O'Sullivan et al., 2005). Oksideringshemmede stoffer eksisterer i naturlig form og syntetisk form. Naturlige antioksidanter og syntetiske antioksidanter. 126 skriv mer om rosmarin

Naturlige antioksidanter forekommer i en rekke matkilder og plantevarer. Derav grønnsaker som spinat, hvitløk og paprika, citrus frukt, bær som acerola kirsebær, urter som rosmarin og grønn te og oliven og olivenolje (Moure et al., 2001). En kombinasjon av ulike antioksidanter tilsatt iblant annet fiskeolje fører til et preventivt oksidasjonslag i tillegg til en positiv smaksendring.

Rosmarin er en type naturlig antioksidant og anvendelsen av det belyser flere praktiske problemer ved at det er kostbart å produsere i nødvendige mengder. De smaksmessige fordelene kan benyttes i matvarer om ønskelig, men kan også benyttes som en nøytral tilsetning. Rosmarin brukes i for eksempel kjøttprodukter ettersom innholdet av antioksidanter gir en fordelaktig holdbarhetsfunksjon i fett. Organiske matvarer kan benytte seg av de fordelene rosmarin gir ettersom de ikke kan benytte syntetiske antioksidanter som for eksempel BHT. Det er viktig å legge til at rosmarin ekstraktene må være organiske i disse tilfellene (Coulter & Blumenthal, 2016).



Figur 3. Strukturen til Carnosol-rosmary. Polyfenoler koblet til benzol-ringer med dobbeltbindinger. (Coultae & Blumenthal, Food, 2016).

Syntetiske antioksidanter har over tid blitt mer aktuelt å bruke som en substitusjon for naturlige antioksidanter på grunn dens effektive produksjon og lavere produksjonskostnad. Derav er butylert hydroksynasiol (BHA), butylert hydroksytoluen (BHT), propylgallat (PG) og tert-butylhydrokinon (TBHQ) de fire største (Moure et al., 2001). Bruken av syntetiske antioksidanter har vist en sammenheng med utvikling av kreft (O'Sullivan et al., 2005).

2.8 Ultralydbehandling

Termisk behandling for å prosessere og bevare kvalitet på matprodukter er blant de vanligste prosessene i dag. Konsekvensen av en slik prosess kan skade produkter som inneholder varme

sensitive ingredienser. Resultatet av dette gjør at produktet vil få lavere kvalitet og næringsinnhold. Forskning på bruk av ikke-termisk behandling, som ultralyd er derfor økende. Årsaken til dette kommer av dens evne til å produsere lignende kvalitetsfremmende produkter som termisk behandling, samtidig som den bevarer varme sensitive ingredienser. I tillegg ser nyere forskning på muligheten til å endre og forbedre produkters tekstur på mikro nivå, ved bruk av ultralyd (Chavan et al., 2022).

Lydbølger på over 20 kHz kan defineres som ultralyd, og varierer mellom 20 – 100 kHz. Ultralyd er en slags lydvern der lav ultralydfrekvens endrer de fysiske egenskapene, mens høy ultralydfrekvens endrer de kjemiske egenskapene. Årsaken til dette kommer fra produksjonen av trykkbobler. Når ultralyd sendes gjennom et stoff dannes det trykkbobler som gradvis vokser til de sprekker. Når slike bobler sprekker dannes det en sjokkbølge som øker temperatur, trykk og overføring av masse (Jadhav, Gogate and Annapure, 2023). Lipider som gjennomgår ultralydbehandling utløser en endring i den kjemiske krystalliseringen, og basert på kHz endre produktets funksjonelle og fysiske egenskaper (Wagh et al., 2016).

Ved bruk av ultralyd på marint restråstoff, vil endring av blant annet tykkelse, morfologi og polymorfisme være mulig. Resultatet av endringen på lipidene vil allikevel baseres på ulike faktorer fra ultralydbehandlingen. Faktorer som energi, tid og krystalliserings temperatur spiller derfor en stor rolle i det ferdige produktet. Basert på dette kan bruken av høy-intensitets ultralyd (HIU) være med på å skreddersy matprodukter der lipider spiller en rolle i smak, tekstur og konsistens (Wagh et al., 2016). En utfordring med bruk av ultralydbehandling er at den forårsaker lipidoksidasjon. Dette kommer av at trykkboblene som dannes, sprekker og produserer frie radikaler som starter oksidasjonsprosess (Jadhav, Gogate and Annapure, 2023).

3 Materialer og metoder

Råoljen som ble brukt i oppgaven ble ekstrahert fra restråstoff av atlantisk makrell hentet hos Fosnavåg Pelagic AS i oktober 2023. Restråstoffet bestod av hode, ryggbein, skinn og finner. Det vil si at alt som ikke er filet eller mage. Restråstoffet ble ultralydbehandlet før det ble utført en

enzymatisk proteinhydrolyse for å ekstrahere makrelloljen. Før lagring av oljen ble det tilsatt antioksidant. Lagringsmetoden som ble brukt var kjøling av oljeprøvene i kjølerom på 4 grader celsius. Analysemetodene som ble utført var bestemmelse av fettsyresammensetning ved bruk av gasskromatografi, analyse av frie fettsyrer og TBARS ved bruk av plateleser og utregning av PV ved bruk av potensiometrisk titrering med automatisk titrator.

3.3 Lagringsforsøk

Tillagingen av prøvene bestod av seks plastrør med lokk, makrellolje ekstrahert ved bruk av ultralydbehandling og enzymatisk hydrolyse som ble tilsatt kommersiell antioksidant. Kontrollprøvene bestod av 10 gram makrellolje hver, en kontroll på 0W, en behandlet på 300W og en behandlet på 450W. Testprøvene bestod av 10 gram makrellolje hver og 0.2 gram tilsatt kommersiell antioksidant. Testprøvene bestod av en kontroll på 0W, en behandlet på 300W og en behandlet på 450W. Antioksidanten er KALSEC sin Duralox Oxidation Management Blend A NM-110, XT.

Etter tillaging ble prøvene plassert i et kjølerom på 4 grader celsius for oppbevaring i tre uker. Prøvene ble ukentlig tatt ut av kjølerom for manuell blanding. Prøvene ble vendt og ristet for hånd, og lagt tilbake på stativet.

3.4 Fettsyresammensetning

Det ble laget 3 paralleller fra hver prøve. Ca. 25 mg olje ble veid inn i et glassrør, til sammen 18 rør. Deretter ble 1.5 ml 0.5N NaOH tilsatt. Over prøven ble det tilsatt nitrogen gass, røret ble korket og videre varmet i vannbad ved 100C i 5 minutter.

I neste steg ble tilsatt 2 mL BF₃ metanol og tilsatt nitrogen gass over prøven. Deretter plassert i varmebad ved 100 grader i 30 minutter. Videre ble det målt opp og tilsatt 1 mL isooktan, der prøvene ble ristet (kraftig) i 30 sekunder. Etter at prøvene var ristet ble det tilsatt 5 mL mettet NaCl, og etter det ble prøvene ristet på nytt i 30 sekunder. Oljelaget øverst i prøvene ble pipettert

ut i nytt reagensrør. Det ble tilsatt 1 mL isooktan i de nye reagensrørene og blandet forsiktig, for videre pipettering av oljelaget over in nytt plastrør.

Videre ble det tilsatt natriumsulfat (pulver) i oljeprøven. Hensikten med natriumsulfat var at det skulle trekke til seg eventuelle vannrester som har vært til stede i isooktanlaget. Til slutt ble det laget til 1.5 mL isooktan i vial, deretter 10 mikroliter av oljeprøven. Alle paralleller ble sendt gjennom en kromatograf for å navngi triglyseridene.

3.5 Frie fettsyrer (FFA)

Metoden startet med å tillage tre paralleller til hver makrelloljeprøve, totalt 18 paralleller. Det ble tilsatt 0.1-0.2 gram med makrellolje i hvert Kimax rør. Videre ble det tilsatt 5 mL isooktan og blandet ut ved bruk av vortex. Neste steg var å tilsette 1 mL 5% acetate-pyridine aqueos (kobber(II)acetat-pyridin). Prøvene ble blandet igjen av vortex i 30 sekunder.

Etter at prøvene var ferdig, ble det tillaget 7 standardprøver med oljesyre. Standardløsningen besto av 0.2825 oljesyre løst ut i 10 mL isooktan (0.1M). Det ble laget en standardkurve med konsentrasjon på 0, 2, 5, 7.5, 10, 15 og 20 umol. Se tabell 1.

Tabell 1. standardkurve for 7 prøver med oljesyre. Standardløsningen besto av 0.2825 oljesyre løst ut i 10 mL isooktan. Hver prøve ble tilsatt 4.8 mL isooktan for deretter å bli tilsatt ulike mengder av isooktan.

n oljesyre (µmol)	0.0 (blank)	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0	20.0
mL isooktan	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
µL isooktan	200	175	150	125	100	50	0
µL standard løsning	0	25	50	75	100	150	200

Deretter ble alle parallellene til makrelloljeprøvene og de 7 standardprøvene sentrifugert på 2000 G i 5 minutter.

Etter sentrifugeringen ble det pipetert 200 mikroliter (µl) til en brønnplate. Brønnplaten ble plassert i Thermo Scientific Multiscan Go. Plateleseren leste absorbansen til hver prøve, med bølgelengde på 715 nm. For å bestemme FFA i hver prøve ble formel vedlagt under brukt. Se formel 1.

$$\text{Formel nr. 1: } \% \text{ FFA} = \frac{(Abs-B)*282,46}{A*m*10000}$$

3.6 Peroksidverdi (PV)

Målingen av primære oksidasjonsprodukter begynte med at det ble tillaget 3 paralleller fra hver oljeprøve, totalt 18 paralleller. Hver parallell ble tilsatt 1 gram olje, for så tilsatt 18 mL eddiksyre og 12 mL kloroform. Deretter ble prøven blandet ved hjelp av magnetrører i 1 minutt. Videre ble det tilsatt 30 mL destillert vann, og prøven ble plassert tilbake på titreringsapparatet. Her ble det titrert Na₂S₂O₃- løsnings til hver prøve. Titreringen stoppet da ekvivalentpunktet ble bestemt.

Mengde løsning som ble titrert for hver prøve ble notert. Prøvene ble beregnet i mq O₂/kg.

For beregningen ble følgende formel benyttet. Se formel 2.

V – volum av titrant brukt under titreringen i mL.

B – volum av titrant brukt under titreringen av blank prøve i mL.

T – molar av titrator agent (0.01).

M – molaritet (1000).

F1 – faktor 1 (1.0).

F2 – faktor 2 (1.0).

w – vekt av oljeprøven i gram.

$$\text{Formel 2: } PV = \frac{(V-B)*T*M*F1}{w*F2}$$

3.7 Tiobarbitursyre-reaktive-stoffer (TBARS)

Måling av sekundære oksidasjonsprodukter startet med at det ble tillaget 3 paralleller fra hver oljeprøve, totalt 18 paralleller. Hver parallell ble tilsatt 0.01 gram med makrellolje. Deretter ble det laget en standardkurve som besto av 6 prøver. Se tabell 2.

Tabell 2. Standardkurve med 6 prøver.

TEP løsning (μL)	Destillert vann (μL)
0	200
25	175
50	150
100	100
150	50
200	0

Det ble laget en TBA work solution som besto av 90 mL TBA stock solution, 60 mL kloroform, 7.5 mL sodium sulphite og 4.7 mL butylated hydroxytoluene (3% BHT i etanol).

Videre ble det tilsatt 5 mL av TBA work solution i hver olje -og standardparallell. Prøvene ble blandet i en vortex i 10-15 sekunder. Prøvene ble videre satt i varmebad i en temperatur på 100 grader celsius i 45 minutter. Etter varmebadet ble prøvene lagt i beger med kaldt vann og isbiter for å bli kjølt ned. Deretter ble det tilsatt 2.5 mL TCA løsning i alle prøvene. Til slutt ble prøvene sentrifugert i 10 minutter på 900 G.

Etter sentrifugeringen ble prøvene overført til brønnplate. I hver brønn ble det tilsatt 200 μL fra hver olje -og standardprøve. Hver enkelt prøve hadde to paralleller i brønnplaten. Brønnplaten ble plassert i Thermo Scientific Multiscan Go. Plateleseren leste absorbansen til hver prøve, med bølgelengde på 538 nm.

3.8 Statistisk analyser

Det ble bruk Microsoft Excel for å utarbeide signifikans. Data ble analysert med Excel ved bruk av T.TEST. Signifikante forskjeller ble målt basert på et sannsynlighetsnivå på $P \leq 0.05$.

4 Resultater

4.1 Fettsyresammensetning

Tabell 3. Fettsyresammensetning. Gjennomsnitt og standardavvik (N3) målt i oljeprøvene ekstrahert fra Atlantisk makrell.

	CONTROL	CONT 300	CONT 450	AX	AX 300	AX 450
C14:0	5.99 ± 0.01	6.01 ± 0.01	5.87 ± 0.02	5.85 ± 0.01	5.87 ± 0.01	5.76 ± 0.01
C16:0	15.26 ± 0.01	15.01 ± 0.02	14.97 ± 0.03	14.90 ± 0.01	14.75 ± 0.03	14.79 ± 0.02
C18:0	2.85 ± 0.01	2.76 ± 0.01	2.79 ± 0.01	2.78 ± 0.01	2.73 ± 0.01	2.77 ± 0.01
C20:0	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01
C14:1	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
C16:1n-7	4.08 ± 0.01	4.01 ± 0.01	4.21 ± 0.01	3.96 ± 0.01	3.94 ± 0.01	4.14 ± 0.02
C18:1n-7	2.87 ± 0.01	2.70 ± 0.10	2.84 ± 0.01	2.86 ± 0.01	2.69 ± 0.01	2.85 ± 0.1
C18:1n-9	16.22 ± 0.02	15.78 ± 0.01	15.69 ± 0.04	17.01 ± 0.02	16.51 ± 0.06	16.62 ± 0.06
C20:1n-9	8.04 ± 0.14	8.28 ± 0.17	8.14 ± 0.14	7.78 ± 0.01	8.05 ± 0.13	7.99 ± 0.14
C22:1n-9	1.00 ± 0.02	1.02 ± 0.01	1.05 ± 0.04	0.96 ± 0.01	1.01 ± 0.02	0.99 ± 0.01
C22:1n-11+13	12.72 ± 0.03	13.27 ± 0.04	13.11 ± 0.01	12.48 ± 0.02	13.04 ± 0.02	12.88 ± 0.01
C24:1	0.95 ± 0.01	1.04 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.92 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.94 ± 0.01
C18:2n-6	1.59 ± 0.01	1.63 ± 0.01	1.52 ± 0.01	1.92 ± 0.01	1.94 ± 0.01	1.87 ± 0.01
C18:3n-3	1.52 ± 0.01	1.53 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.65 ± 0.01	1.62 ± 0.01	1.60 ± 0.01
C18:4n-3	4.08 ± 0.03	4.17 ± 0.01	4.02 ± 0.01	4.11 ± 0.01	4.13 ± 0.01	3.97 ± 0.01
C20:2n-6	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.26 ± 0.01
C20:3n-3	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.25 ± 0.01
C20:4n-6	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.01
C22:5	1.47 ± 0.01	1.48 ± 0.01	1.52 ± 0.01	1.45 ± 0.01	1.48 ± 0.01	1.49 ± 0.01
EPA	7.60 ± 0.04	7.55 ± 0.01	8.09 ± 0.03	7.60 ± 0.01	7.50 ± 0.02	7.89 ± 0.03
DHA	12.49 ± 0.06	12.46 ± 0.03	12.44 ± 0.03	12.53 ± 0.01	12.43 ± 0.03	12.22 ± 0.08
Mettede fettsyrer	24.28%	23.97%	23.81%	23.71%	23.55%	23.51%
Enumettede fettsyrer	45.93%	46.15%	46.08%	46.03%	46.30%	46.46%
Flerumettede fettsyrer	29.79%	29.88%	30.11%	30.26%	30.15%	30.02%

Oljeprøvene av mettede fettsyrer bestod av myristinsyre (C14:0), palmitinsyre (C16:0), stearinsyre (C18:0) og arkidinsyre (C20:1). Den største andelen av mettede fettsyrer bestod av palmitinsyre (15.26 ± 0.01) og den laveste andelen bestod av arkidinsyre (0.18 ± 0.01).

Antioksidantblandingen har ikke hatt noen påvirkning på de mettede fettsyrene, men prøvene tilsatt antioksidant viser en ikke signifikant lavere andel umettet fett. Ultralydbehandlingen har vist en ikke signifikant nedgang i andel mettede fettsyrer (T-test 0.94).

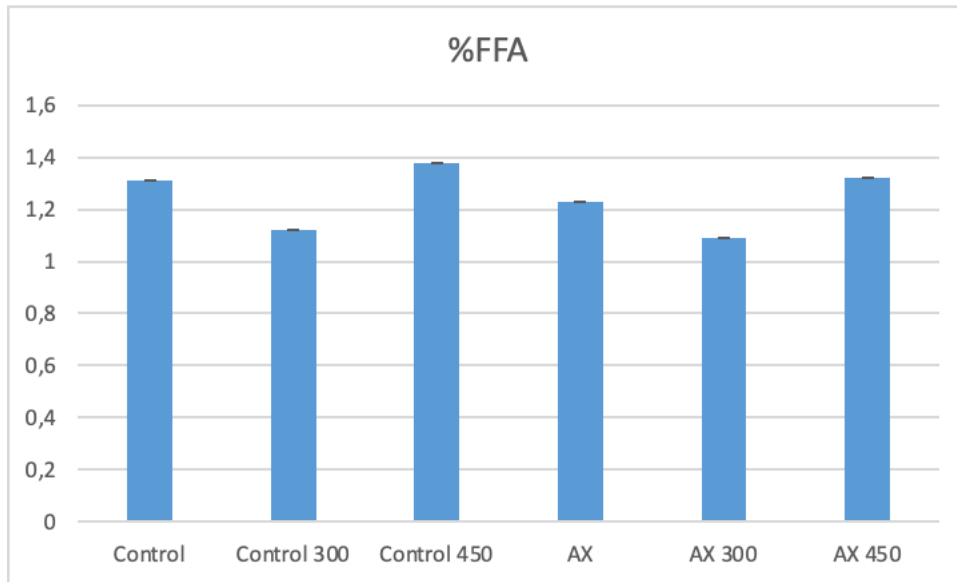
Oljeprøvene uten antioksidantblanding viser høyere andel av enumettet fettsyresammensetning enn prøvene med antioksidant i C16:1, C20:1, C22:1-9, C22:1-11 og C:24:1. Prøvene har likt innhold av fettsyre C14:1 (0.05 ± 0.01). Innhold av C18:1-7 er høyere i oljeprøvene Control (2.87 ± 0.01) og Control 300 (2.70 ± 0.01) enn AX (2.86 ± 0.01) og AX 300 (2.69 ± 0.01). Control 450 (2.84 ± 0.01) har et lavere innhold av C18:1-7 enn AX 450 (2.85 ± 0.1). Fettsyre C18:1-9 har høyest forekomst i oljeprøvene med antioksidant (ax) enn prøvene uten antioksidant.

Oljeprøvene uten antioksidantblanding viser høyere andel av flerumettet fettsyresammensetning enn prøvene med antioksidant i C20:3n-3, C20:4n-6, og motsatt i prøvene C18:2n-6 og C18:3n-3. Oljeprøvene C20:2n-6 og C22:5 har høyere verdier i Control (0.28 ± 0.01 og 1.47 ± 0.01) enn AX (0.27 ± 0.01 og 1.45 ± 0.01), prøven EPA har lik verdi mellom Control (7.60 ± 0.04) og AX (7.60 ± 0.01), og prøvene C18:4n-3 og DHA har lavere verdier i Control (4.08 ± 0.03 og 12.49 ± 0.06) enn AX (4.11 ± 0.01 og 12.53 ± 0.01). Oljeprøvene C18:4n-3, EPA og DHA har alle høyere verdier i Control 300 enn i AX 300, mens prøvene C20:2n-6 og C22:5 har lik verdi mellom Control 300 (0.29 ± 0.01 og 1.48 ± 0.01) og AX 300 (0.29 ± 0.01 og 1.48 ± 0.01). Oljeprøvene C18:4n-3, C20:2n-6, C22:5, EPA og DHA har alle høyere verdier i Control 450 enn AX 450.

I Control prøvene har mettede fettsyrer (24.28%, 23.97%, 23.81%) og enumettede fettsyrer (45.93%, 46.15%, 46.08%) en synkende andel fettsyrer med økende ultralydbehandling (0W, 300W, 450W), mens flerumettede fettsyrer har en økende andel (29.79%, 29.88%, 30.11%)

I AX prøvene har mettede fettsyrer (23.71%, 23.55%, 23.51%) og flerumettede fettsyrer (30.26%, 30.15%, 30.02%) en synkende andel fettsyrer med økende ultralydbehandling (0W, 300W, 450W), mens enumettede fettsyrer har en økende andel (46.03%, 46.30%, 46.46%).

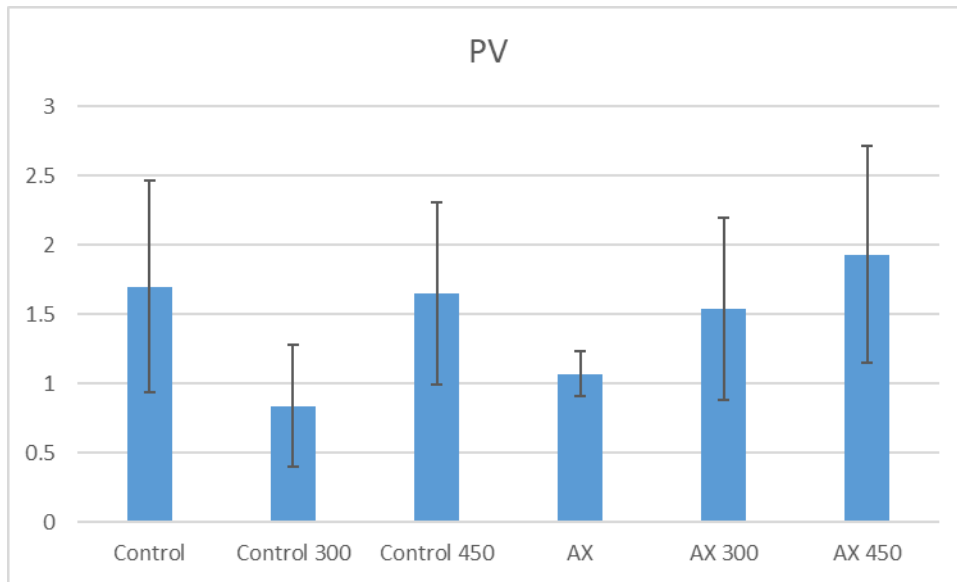
4.2 Frie fettsyrer (FFA)



Figur 3. Viser gjennomsnitt og standardavvik av frie fettsyrer beregnet fra oljeprovne ekstrahert fra Atlantisk makrell.

Den høyeste verdien av FFA ble funnet i Control 450 uten tilsatt antioksidant ($1.38\% \pm 0.01$). AX 450 hadde også et høyt innhold av FFA (1.32 ± 0.02). Laveste verdien av FFA ble observert i AX prøven som ble behandlet med ultralyd 300W og tilsatt antioksidant ($1.09\% \pm 0.05$). Control 300 uten tilsatt antioksidant hadde også et lavt innhold av FFA ($1.12\% \pm 0.01$). Prøvene med og uten antioksidanter er ikke signifikante (T-test 0.30).

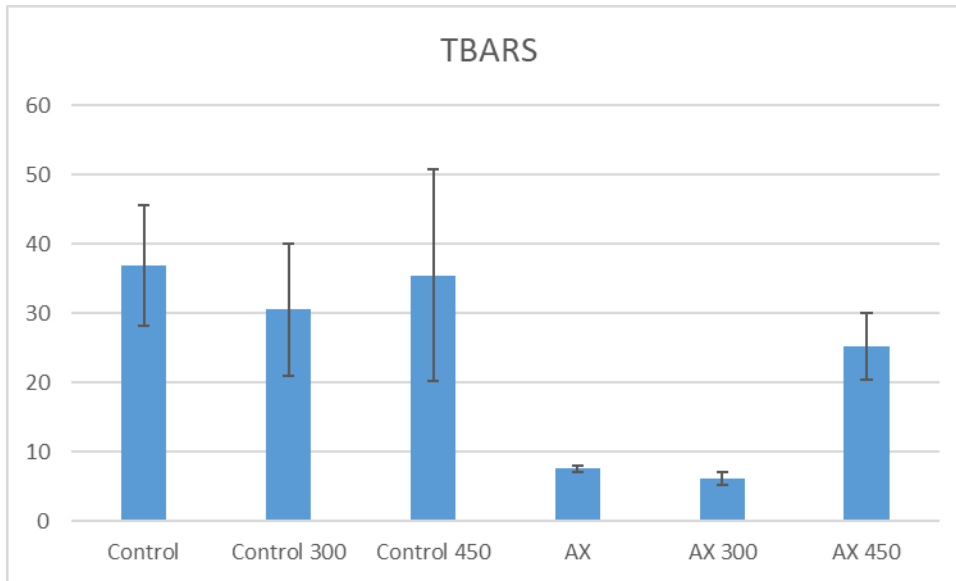
4.3 Peroksidverdi (PV)



Figur 5. Viser gjennomsnitt og standardavvik av primære oksidasjonsprodukter målt i oljeprøvene ekstrahert fra Atlantisk makrell

Målingene fra tabell 6 viser at Control prøven uten tilsatt antioksidantblanding og uten ultralyd har høyere verdi og standardavvik (1.70 ± 0.76) enn Control ax prøven med antioksidant og uten ultralyd (1.07 ± 0.16). Resterende Control prøver 300 og 450 uten antioksidant har lavere verdi og standardavvik (0.84 ± 0.44 og 1.65 ± 0.66) enn Control ax prøver 300 ax og 450 med antioksidant (1.54 ± 0.66 og 1.93 ± 0.78). PV- verdiene mellom Control prøvene og AX prøvene er ikke signifikante (T-test 0.67).

4.4 Tiobarbitursyre-reaktive-stoffer (TBARS)



Figur 4. Viser gjennomsnitt og standardavvik av sekundære oksidasjonsprodukter målt i oljeprøvene ekstrahert fra Atlantisk makrell.

Prøvene med lavest verdi av sekundære oksidasjonsprodukter er Control prøve ax tilsatt antioksidantblanding uten ultralydbehandling (7.61 ± 0.43), og Control prøve ax 300 med tilsatt antioksidant (6.19 ± 0.93). De høyeste verdiene av sekundære oksidasjonsprodukter ble funnet i prøvene Control uten ultralydbehandling og uten tilsatt antioksidant (36.88 ± 8.75), og Control prøve 450 uten tilsatt antioksidant med ultralydbehandling (35.47 ± 15.23).

Trenden av prøvene i tabell 5 viser at Control prøvene uten antioksidant har høyere verdier av sekundære oksidasjonsprodukter enn Control ax prøvene tilsatt antioksidant. TBARS verdiene mellom Control prøvene og AX prøvene er signifikante (T-test 0.00034).

5 Diskusjon

5.1 Fettsyresammensetning

Control prøvene fra oljen uten ultralydbehandling og antioksidantblanding viser en andel på 12.72% ketolinsyre (22:1n-11), 7.60% EPA og 12.49% DHA. Sett i sammenligning med ubehandlet atlantisk makrell fanget på Island i august, inneholdt denne 14% ketolinsyre, 7.10% EPA og 12.30% DHA (Romotowska, 2016). AX prøvene fra oljen uten ultralydbehandling og med antioksidantblanding viser en andel på 12.48% ketolinsyre, 7.60% EPA og 12.53% DHA. Et studiet gjort på samme sted i Island undersøkte påvirkningen på frosset atlantisk makrellfillet fra tilsatt med antioksidant Sodium erythorbate (E316) og blanding av Sodium og Potassium di- og tripolyphosphate (E450 og E451). I dette forsøket oppnådde de en andel på 16.18% ketolinsyre, 9.13% EPA og 12.22% DHA etter 2.5 måned frysetid. En frysetid på 12 måneder ga en høyere andel EPA på 10.09% og DHA på 14.95%, men en lavere andel ketolinsyre på 13.70% (Sveinsdóttir, 2020).

Fettsyresammensetningen viser at makrelloljen inneholder høyest andel enumettede fettsyrer, deriblant ketolinsyre (22:1n-11), etterfulgt av flerumettede fettsyrer med høyest andel EPA og DHA. Mettede fettsyrer har lavest andel. FHF (Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering) har et pågående prosjekt der det forskes på om ketolinsyre har en supplerende helseeffekt for å effektivisere opptak av EPA og DHA for mennesker (Halvorsen, Holven, Ruyter, & Ulven, 2020). Dersom prosjektet gir positiv avkastning kan dette bety at makrellolje har en enda større fordel mot forebygging av hjerte- og karsykdommer.

5.2 Frie fettsyrer

Målingene av frie fettsyrer viser at Control prøvene uten antioksidantblanding inneholder en større mengde FFA enn AX prøvene tilsatt antioksidant. Forskjellen i mengden frie fettsyrer er ikke signifikant, men trenden viser at Control 450 og AX 450 har høyest andel, etterfulgt av Control og AX uten tilsatt antioksidant og Control 300 og AX 300 med lavest andel frie fettsyrer.

Når olje blir utsatt for ulike lagrings- og prosesseringsmetoder, vil mengden frie fettsyrer øke basert på tid og temperatur (Mahesar *et al.*, 2014). Makrellen fra Fosnavaag Pelagic ble hentet i

oktober 2023 og ble prosessert gjennom ultralyd og enzymatisk hydrolyse samme måned. Antioksidantblanding ble tilsatt i januar 2024. Siden frie fettsyrer er mindre stabile enn triglyserider, er de mer utsatt for oksidasjon og harskning (Mahesar *et al.*, 2014). Tidsrommet og temperaturendringene mellom da makrellen ble fanget til antioksidantblanding ble tilsatt kan ha hatt en påvirkning på resultatene. På en annen side viser ikke resultatene en unaturlig høy mengde frie fettsyrer, men at prøvene uten ultralydbehandling har en høyere andel frie fettsyrer enn prøvene med behandling på 300W.

5.3 PV og TBARS – ultralydbehandling → lipidoksidasjon

En av hovedhensiktene med prosjektet var å indikere om ultralydbehandling av råstoff før enzymatisk hydrolyse, og lagring med tilsetning av antioksidantblanding, påvirker oksidasjonsparametere i råoljen ekstrahert fra makrell restråstoff. Målet med å indikere oksidasjonsparametere var å undersøke forskjellen mellom oljene med og uten antioksidantblanding. Antioksidantblandingen er basert på rosmarin ekstrakter.

Innledningsvis i oppgaven ble det forklart hvilke utfordringer makrellolje har i forhold til oksidasjon. Utfordringene kommer av fettsyresammensetningen av oljen ettersom den inneholder betydelig mengde enumettete og flerumettete fettsyrer. Oksidasjonsprosessen presenteres i tre faser. Den første fasen er initieringsfasen. I denne fasen dannes det høyt reaktive fettsyremolekyler som inneholder frie radikaler. Frie radikaler er det mye av i makrellolje på grunn av flerumettete fettsyrene. Det som kjennetegner de frie radikalene, er at de har et uparet elektron som gjør at de er svært reaktive. (Coultate & Blumenthal, 2016., O’Sullivan *et al.*, 2005)

Propageringsfasen er den andre fasen i oksidasjonsprosessen, og det er her de primære oksidasjonsproduktene (PV) dannes. I denne fasen dannes det peroksid radikaler som er svært reaktive og reagerer videre med umettete fettsyrer. Dette vil føre til dannelse av hydroperoksider som generes videre til frie radikaler. Radikalene kan videre danne en kjedereaksjon som vil føre til sekundære oksidasjonsprodukter (TBARS). Den siste fasen er termineringsfasen og her reagerer de frie radikalene med hverandre og det resulterer i ikke-radikale produkter. (Coultate & Blumenthal, 2016).

For å vurdere oksidasjonsnivåene er stabile nok er det satt en grense på 5 mq kg/olje for industriell anvendelse. Resultatene fra de primære oksidasjonsproduktene viser at alle oljeprøvene har lavere verdier enn 5 mq kg/olje. (Schaich, 2016). Se figur 5. Det indikerer en oksidasjonsstabilitet på de primære oksidasjonsproduktene. Control 300W og Control 450W viser lavere PV verdier, men ikke-signifikante, sammenlignet med AX 300W og AX 450W. Det indikerer lipidoksidasjon i propageringsfasen, og videre dannelse av sekundære lipidoksidasjonsprodukter fra primære lipidoksidasjonsprodukter. På grunn av det går antall lipidperoksider ned ettersom de genereres til sekundære lipidoksidasjonsprodukter.

Å vurdere PV alene er ikke tilstrekkelig ettersom det kan indikere lite eller mye oksidasjon. Derfor ble det foretatt en TBARS analyse for å måle verdiene for sekundære oksidasjonsprodukter. Resultatene fra TBARS viser en signifikant forskjell mellom oljeprøvene uten, og med tilsetning av antioksidant. Se figur 4. (Coultate & Blumenthal, 2016). Ut ifra det er det tydelig at antioksidantblandingen har hatt en effekt på oksidasjonsprosessen.

Antioksidantblandingen ble tilsatt tidlig for å få best mulig resultat ettersom det er vanskelig å stoppe en pågående oksidasjon, men antioksidantene kan bremse oksidasjonen og forlenge holdbarhetene. Antioksidanter hemmer dannelsen av frie radikaler ved å gi fra seg elektroner til radikalene for å gjøre dem stabile og mindre reaktive. (Coultate & Blumenthal, 2016) .

Verdiene fra TBARS indikere at antioksidantblandingen som ble tilsatt i halvparten av prøvene har hatt en forebyggende effekt mot utvikling av sekundære oksidasjonsprodukter. AX og AX 300 er prøvene med signifikant lavest TBARS verdier, og AX 450 har noe høyere. Grunnen til det er at en av de tre parallellene til AX 450 ga utslag på høyere verdier. Likevel er TBARS til AX 450 lavere enn Control, Control 300 og Control 450.

Resultatene viser at antioksidanter av rosmarin ekstrakter egner seg på en stabiliserende måte av oksidasjonsparametere i makrelloljen ekstrahert fra restråstoff. Det kommer nok av innholdet av mengden umettede fettsyrer, og de frie radikalene som dannes i oljen som gjør at antioksidantene reagere effektivt med dem. Grunnen til at det ble brukt rosmarin ekstrakter som naturlig antioksidant er fordi de egner godt til organiske produkter. Det kommer av at antioksidantene er rike på rosmarin-polyfenoler koblet til benzol ringer med dobbeltbindinger. Dette gjør at antioksidantene kan donere elektroner til fettsyrer som mangler elektron. Se figur 3. (Coultate & Blumenthal, 2016., O'Sullivan et al., 2005).

Ultralydbehandling har positive og negative effekter på olje ekstrahert fra matprodukter. Behandlingen gir høyere avkastning og jevnere fettfordeling (homogenisering), men går på bekostning av kvaliteten på oljen. Ultralydbehandling produserer frie radikaler (lipidoksidasjon) som reduserer kvalitet samt reduserer andelen av flerumettede fettsyrer. Sterkere behandling gir en økende effekt både kvantitativt og kvalitativt, men for høy eksponering kan igjen bli skadelig (Jadhav, Gogate and Annapure, 2023).

6 Konklusjon

Tilsetning av kommersiell antioksidantblanding i råolje ekstrahert fra restråstoff fra makrell ved hjelp av ultralydbehandling og enzymatisk hydrolyse vil føre til mindre lipidoksidasjon.

Antioksidantblandingen hadde en positiv effekt på oksidasjonsparametere til makrelloljer i forhold til sekundære lipidoksidasjonsprodukter., mens ultralyd har vist negativ påvirkningsgrad på oksidasjonsparametere i oljen. Tidsrommet fra fangst av råstoff til analyse av råolje kan ha hatt en påvirkning på studiet, og potensielt gitt feilkilder i oksidasjonsparametere. Makrellolje har potensial til å være et høykvalitetsprodukt for humant konsum, da peroksidverdien i oljeprøvene viser målinger lavere enn 5 meq O₂/kg olje. Allikevel vil det være behov for å gjennomføre samme forsøk i større skala, slik at det skal være mulig å fastslå om makrellolje kan regnes som et høykvalitetsprodukt for humant konsum.

7 Referanseliste

Adeniyi, O. D., & Bawa, A. A. (2006). Mackerel (*Scomber scombrus*) oil extraction and evaluation as raw materials for industrial utilization. *Leonardo J Sci*, 5(8), 33-42. Available at: http://ljs.academicdirect.org/A08/33_42.pdf

Albert, B.B. et al. (2013) 'Oxidation of Marine Omega-3 Supplements and Human Health', *BioMed Research International*. Edited by G. Calviello, 2013, p. 464921. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/464921>.

Calder, P. C., & Yaqoob, P. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. In *BioFactors* (Vol. 35, Issue 3, pp. 266–272). <https://doi.org/10.1002/biof.42>

Chavan, P., Sharma, P., Sharma, S. R., Mittal, T. C., & Jaiswal, A. K. (2022). Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. In *Foods* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>

Coultate, T., & Blumenthal, H. (2016). Food. I T. Coultate, *The Chemistry of its Components* (ss. 135-136). London : Royal Society of Chemistry .

Fosnavaag Pelagic AS. (2024, Mai 7). Who We Are. N-6090, Fosnavåg, Norge. Available at: <https://www.fosnavaag-pelagic.no/>

Frøyland, L., Bentsen, H., Graff, I. E., Myhrstad, M., Erik, J., Kjetil, P., Stine, R., & Ulven, M. (2011). *Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods Contributors*. Available at: <https://vkm.no/download/18.a665c1015c865cc85bab93e/1501509143166/c7a41adb79.pdf>

Ghaly AE, R. V. (2013). Extraction of Oil from Mackerel Fish Processing Waste using Alcalase Enzyme. *Enzyme Engineering*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000115>

Halvorsen, B., Holven, K. B., Ruyter, B., & Ulven, S. M. (2020, Mars 15). *FHF - Prosjektbasen - 901592*. Hentet fra FHF AS (Fiskeri- og hvabruksnæringens forskningsfinansiering AS): <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901592/>

Jadhav, H.B., Gogate, P. and Annapure, U. (2023) ‘Analysing the repercussions of ultrasound on triacylglycerols in food’, *Food Chemistry Advances*, 2, p. 100332. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100332>.

Jansen, T., & Gislason, H. (2013). Population Structure of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*). *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064744>

Johansen, A.-M. (2023, Februar 13). *Verdt å vite om enzymatisk proteinhydrolyse*. Hentet fra Nofima: <https://nofima.no/fakta/verdt-a-vite-om-enzymatisk-proteinhydrolyse/>

Johnsen, H. (2021, Mai 26). *Sintef*. Hentet fra Omega - Inkludering av mikroinnkapslet fiskeolje i matvarer for bedre helse: <https://www.sintef.no/prosjekter/2020/omega-inkludering-av-mikroinnkapslet-fiskeolje-i-matvarer-for-bedre-helse/>

Kishida, E. et al. (1993) ‘Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption’, *J. Agric. Food Chem*, 41(10), pp. 1598–1600. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf00034a013>.

Kochhar, S.P. and Henry, C.J.K. (2009) ‘Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils’, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), pp. 289–296. Available at: <https://doi.org/10.1080/09637480903103774>.

Lynum, 1997; Mozaffarian & Wu, 2012; Seafood from Norway, 2017. Available at: https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/2562789/18946_FULLTEXT.pdf?sequence=1

Lynum, L. (1994). *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring*. Tapir.

Mahesar, S.A. et al. (2014) ‘Analytical approaches for the assessment of free fatty acids in oils and fats’, *Analytical Methods*, 6(14), pp. 4956–4963. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4AY00344F>.

Mattilsynet. (2023, August 22). *Animalie biprodukter*. Hentet fra Mattilsynet: <https://www.mattilsynet.no/animaliebiprodukter/regelverk-om-animalske-biprodukter>

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domõ Â ngez, J., Sineiro, J., Domõ Â ngez, H., Â JoseÂ NuÂ nÄ ez, M., & Carlos ParajoÂ, J. (2001). *Natural antioxidants from residual sources*. www.elsevier.com/locate/foodchem

Myhre, M. S., Richardsen, R., Nystøyl, R., & Strandheim, G. (2022). Analyse marint restråstoff 2021. Available at: <https://sintef.brage.unit.no/sintef-xmlui/bitstream/handle/11250/3013196/Analyse%2Bmarint%2Brestr%25C3%25A5stoff%2B2021.pdf?sequence=1>

Nogala-Kalucka, M. et al. (2005) 'Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests', *Food Chemistry*, 93(2), pp. 227–235. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.021>.

Norges Sjømatråd. (2023, Januar 4). *Norge eksporterte sjømat for 151,4 milliarder kroner i 2022*. Hentet fra Seafood.no: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/norge-eksporterte-sjomat-for-1514-milliarder-kroner-i-2022/>

Nøttestad, L. (2019, Februar 14). *Tema: Makrell*. Hentet fra HAVFORSKNINGSINSTITUTTET: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/makrell>

Nøttestad, L., & Slotte, A. (2020). NORTH EAST ATLANTIC MACKEREL. https://www.hi.no/resources/klimastatus-pa-bestander/20211214_Mackerel_Northeast-Atlantic_narrative.pdf

Nøttestad, L., Slotte, A., Utne, K. R., Skagen, D. W., & Iversen, S. A. (2012). Makrellmengde og sonetilhørighet i Norsk Økonomisk Sone (NØS). Available at: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/64c91dccd8b1a71e86b05def/Report_of_the_Coastal_States_Working_Group_on_the_distribution_of_Northeast_Atlantic_Mackerel_2022.pdf

O'Sullivan, A., Mayr, A., Shaw, N. B., Murphy, S. C., & Kerry, J. P. (2005). Use of natural antioxidants to stabilize fish oil systems. In *Journal of Aquatic Food Product Technology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 75–94). https://doi.org/10.1300/J030v14n03_06

Oterhals, Å., Thoresen, L., & Haugen, J. E. (2022). Utnyttelse av restråstoff fra makrell og sild, ekstraksjon av fosfolipider-Faglig sluttrapport. Nofima rapportserie. Available at:

<https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/3035214/Rapport%2b18-2022%2bUtnyttelse%2bav%2brestr%25C3%25A5stoff%2bfra%2bmakrell%2bog%2bsild%252C%2bekstraksjon%2bav%2bfosfolipider.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Romotowska, P.E. et al. (2016) 'Seasonal and geographical variation in chemical composition and lipid stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) caught in Icelandic waters', *Journal of food composition and analysis*, 49, pp. 9–18. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.005>.

Ruyter, B. et al. (2010) 'Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler'. Available at:

<https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2564589/Rapport+31-2010.pdf?sequence=1>

Schaich, K. (2016) 'Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods', in, pp. 1–131. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-056-6.00001-X>.

SINTEF Fiskeri og havbruk AS. (2015, Mars 30). *Handlingsplan for "Pelagisk løft – Økt verdiskaping av makrell"*. Hentet fra FHF - Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901104/>

Sveinsdóttir, H.I. et al. (2020) 'Effect of antioxidants on the sensory quality and physicochemical stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) filets during frozen storage', *Food Chemistry*, 321, p. 126744. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126744>.

Svensen, E. (2019, Februar 14). *Tema: Makrell*. Hentet fra HAVFORSKNINGSINSTITUTTET: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/makrell>

Vu, D.T. (2020) 'Sous-vide behandling av Atlantisk sild med tilsetning av naturlige antioksidanter ekstrahert fra urter fra middelhavsområdet'. Edited by J. Cropotova and T. Rustad. Available at: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2654529?locale-attribute=en>

Wagh, A., Birkin, P., & Martini, S. (2016). High-Intensity Ultrasound to Improve Physical and Functional Properties of Lipids. In *Annual Review of Food Science and Technology* (Vol. 7, pp. 23–41). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033112>

Westavik, H., & Kjerstad, M. (2016, Januar). *Sluttrapport: Handlingsplan for “Pelagisk løft – Økt verdiskaping av makrell”*. Hentet fra FHF - Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901104/>

