

# **Foredling av råolje fra makrell restråstoff til høykvalitetsprodukt for humant konsum**

Faglig sluttrapport

John-Erik Haugen, Lars Thoresen, Ane Meisland og Åge Oterhals





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1433 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<p><i>Tittel:</i> <b>Foredling av råolje fra makrell restråstoff til høy-kvalitetsprodukt for humant konsum – Faglig sluttrapport</b></p>	<p>ISBN 978-82-8296-633-7 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Processing of crude oil from mackerel residue to high quality product for human consumption -</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 17/2020</p> <p><i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b></p>
<p><i>Prosjektleder/Forfatter(e):</i> John-Erik Haugen og Åge Oterhals</p>	<p><i>Dato:</i> 20.04.2020</p>
<p><i>Avdeling:</i> Mat og helse, Ernæring og fôrteknologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 92 + 17</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901370/Lars Lovund</p>
<p><i>Stikkord:</i> Makrellolje, restråstoff, bleking, deodorisering, sensorisk kvalitet, stabilisering</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 12191</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Prosjektet har hatt som hovedmål å utvikle en raffineringsprosess for råolje fra makrell restråstoff til høy-kvalitetsprodukt til humant konsum. Studerte prosenstrinn omfatter bleking, vinterisering og deodorisering samt stabilisering av oljen. Det er foretatt en vellykket oppskalering fra lab til pilotskala raffinering.</p> <p>Gjennom prosjektet har det lyktes å produsere en smaksnøytral høykvalitetsolje for humant konsum basert på råolje fra makrell restråstoff</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i> The main goal of this project was to develop a process for refining of crude oil from mackerel residues to a high quality product for human consumption. Studied processing steps include bleaching, winterization and deodorization including stabilization of the oil. Successful upscaling from lab to pilot scale refining has been made.</p> <p>Through the project, we have succeeded in producing a food grade and taste neutral high-quality oil based on crude oil produced from mackerel residues.</p>	

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>4</b>
2.1	Faglig bakgrunn for prosjektet	4
2.2	Prosjektets omfang	4
2.3	Prosjektorganisering	4
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b>	<b>6</b>
3.1	Prosjektets effektmål	6
3.2	Prosjektets resultatmål	6
3.2.1	Hovedmål	6
3.2.2	Prosjektet resultatmål	6
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>State of the art teknologi til raffinering av makrellolje</b>	<b>8</b>
5.1.1	Raffinering av fiskeolje	9
5.1.2	Degumming	9
5.1.3	Avsyring/Nøytralisering	9
5.1.4	Bleking	14
5.1.5	Vinterisering/koldklaring	18
5.1.6	Deodorisering	19
5.1.7	Fjerning av miljøgifter	21
5.1.8	Oppsummering State of the art	23
<b>6</b>	<b>Material og metoder</b>	<b>28</b>
6.1	Prøvemateriale	28
6.2	Metoder	29
6.2.1	Peroksid og anisidin tall (PV og AV)	29
6.2.2	Gardner fargemåling	29
6.2.3	Spektrofotometriske målinger	30
6.2.4	Differensial scanning kalorimetri (DSC)	30
6.2.5	Fettsyrer	30
6.2.6	Flyktige forbindelser	30
6.3	Bleking	32
6.3.1	Screening forsøk	32
6.3.2	3-faktorielt design forsøk	33
6.4	Vinterisering	34
6.4.1	Tørrfraksjoneringsforsøk	35
6.4.2	Flertrinns-tørrfraksjonering	35
6.5	Pilotskala raffinering av makrellolje	35
6.5.1	Makrellolje	35

6.5.2	Blekebetingelser .....	35
6.5.3	Deodoriseringsbetingelser .....	36
6.5.4	Sensorisk analyse.....	37
<b>6.6</b>	<b>Produktstabilitet.....</b>	<b>38</b>
6.6.1	Makrellolje.....	38
6.6.2	Antioksidanter .....	38
6.6.3	Dosering av antioksidant .....	39
6.6.4	Tilsetning av antioksidant.....	40
6.6.5	Akselerert lagringsforsøk.....	40
<b>7</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon .....</b>	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>Komponenter i råolje fra makrell restråstoff som bidrar til lukt og smak .....</b>	<b>41</b>
7.1.1	Identifiserte forbindelser.....	41
7.1.2	Konklusjon .....	46
<b>7.2</b>	<b>Bleking labskala .....</b>	<b>47</b>
7.2.1	Screening forsøk .....	47
7.2.2	Spektrofotometriske målinger .....	47
7.2.3	Peroksid og anisidin tall (PV og AV).....	48
7.2.4	Flyktige forbindelser .....	50
7.2.5	Optimalisering av blekebetingelser .....	52
7.2.6	Konklusjon .....	61
<b>7.3</b>	<b>Vinterisering lanskala.....</b>	<b>61</b>
7.3.1	Tørrfraksjoneringsforsøk .....	61
7.3.2	Flertrinns-tørrfraksjonering.....	62
7.3.3	Differensial skannekalorimetri (DSC) .....	62
7.3.4	Fettsyrer .....	63
7.3.5	Konklusjon .....	64
<b>7.4</b>	<b>Pilotraffinering .....</b>	<b>65</b>
7.4.1	Gardner fargemåling .....	65
7.4.2	Peroksid og anisidin tall (PV og AV).....	65
7.4.3	Fettsyreprofil .....	66
7.4.4	Flyktige forbindelser .....	67
7.4.5	Sensorisk analyse.....	68
7.4.6	Utbytteberegninger.....	71
7.4.7	Konklusjon .....	72
<b>7.5</b>	<b>Produktstabilitet.....</b>	<b>72</b>
7.5.1	Peroksid og anisidin tall (PV og AV).....	72
7.5.2	Flyktige forbindelser .....	76
7.5.3	Konklusjon .....	83
<b>8</b>	<b>Hovedfunn .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Leveranser .....</b>	<b>85</b>

<b>10 Referanser .....</b>	<b>86</b>
<b>Vedlegg</b>	

# 1 Sammendrag

Makrell er en pelagisk art med høyt fettinnhold og rik på essensielle fettsyrer som bl.a. EPA og DHA. Som en del a FHF sin «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell» har et av målene vært å se nærmere på hvilke muligheter som finnes for utnyttelse av restråstoffet fra filétproduksjon til produksjon av høyverdig olje til humant konsum markedet. Makrell råolje fra restråstoff uten tilsatt antioksidant danner utgangspunkt for dette prosjektet. Målet har vært gjennom foredling av råoljen å komme frem til en høykvalitetsolje som er fargeløs og flytende ved romtemperatur til bruk for humant konsum.

Konvensjonell og ny prosesseteknologi for raffinering av marine oljer er blitt kartlagt ved gjennomgang av tilgjengelig litteratur og patenter og vurdert for mulig anvendelse til raffinering av råolje fra makrell restråstoff. Det eksisterer noe litteratur på raffinering av marine råoljer, men lite på råolje fra restråstoff fra fisk. Dessuten er lite dokumentert på makrellolje. Det er derfor lagt vekt på å prioritere teknologi anvendt på råolje fra beslektede arter (sild, lodde, sardin), som vil være mest relevant for prosessering av makrellolje. Det meste av rensemetodene i litteraturen er basert på laboratoriestudier, som innebærer at disse metodene fortsatt er på FoU stadiet. Noen av teknikkene vil kunne egne seg til industriell prosessering av vegetabiliske oljer, men de fleste nye teknikkene har sine begrensninger med hensyn til bruk på marine oljer med en høy andel flerumettede fettsyrer. Den største tekniske utfordringen er oksidasjon, isomerisering og polymerisering av oljen under prosessering, skalerbarhet og kostnader i industriell skala.

Analyse av flyktige forbindelser i råolje fra makrell restråstoff viser at de fleste komponentene er luktaktive og bidrar til lukt og smak i råoljen. Det ble funnet mest hydrokarboner, etterfulgt av alkoholer, syrer, aldehyder, sulfider/tioler, ketoner, furaner og aromater. Av enkeltkomponenter hadde 2,4,6,10-pentadekan (pristan) høyest konsentrasjon og utgjorde 33 % av totalmengden flyktige forbindelser. Deretter fulgte dimetyldisulfid, 2,4-dimetyl-1,3-pentadien, 1-butanol, 4-metylpentansyre og cis, cis-3,5-oktadien. De fleste påviste hydrokarboner, aldehyder, ketoner, syrer (C2-C5), furaner og enkelte av alkoholene er sekundære lipid oksidasjonsprodukter fra de flerumettede omega-3 og omega-6 fettsyrene som finnes i oljen. Typiske markører for lipid oksidasjon i marine oljer ble funnet, som propanal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, tr, tr-heptadienal og 2-etyl-furan. I tillegg kan noen av de flyktige syrene også stamme fra bakterievekst i råstoffet, f.eks. sulfider som kan dannes fra både bakteriell nedbrytning av svovelholdige aminosyrer i råstoffet eller termisk kjemiske reaksjoner under råstoffbehandlingen. Flere av de påviste esterene kan også være bakterielle sekundære metabolitter. På grunn av manglende data på empiriske lukterskler i olje/fettfase av mange av de påviste forbindelsene, har det ikke latt seg gjøre å foreta en kvantifisering av luktverdier for alle forbindelsene for å komme frem til de viktigste aromakomponentene i oljen. Med utgangspunkt i de målte konsentrasjoner, fettløselighet til stoffene, eksisterende lukterskler og litteraturdata på tilsvarende flyktig forbindelse påvist i marine råoljer, vil aldehydene og syrene bidra mest til lukten og smaken av råoljen. Av aldehydene var det 2-propenal og butanal som hadde de høyeste luktverdiene, etterfulgt av heksanal, tr, 2-pentenal, oktanal, 2-butenal og tr, cis-2,4-heptadienal.

Syv kommersielle blekejordstyper fra tre leverandører er blitt screenet for effektivitet i labskala. Det ble benyttet 2 % blekejord ved 70 °C under vakuum i 30 minutter. Størst fargereduksjon (79 %) og reduksjon i peroksidtall (69 %) ble oppnådd med TONSIL Supreme 114F, mens CelaClear 105SF ga mest reduksjon i anisidintall (26 %), sekundære flyktige oksidasjonsprodukter, og en fargereduksjon på 50 %. Basert på en samlet vurdering mht. effekten på bleking og oksidasjon, ble TONSIL Supreme 114F valgt for videre uttesting i et 3-faktorielt optimaliseringsforsøk basert på variablene mengde blekejord

(0,5-5 %), mengde aktivt kull (0,1-1,0 %) og bleketid (15-120 min). Mengde blekejord hadde størst effekt på de studerte variable, men effekten flatet ut ved doseringer over 3,5-4 %. Tilsetning av aktivt kull ga en uavhengig effekt på farge uten interaksjon med blekejord, men effekten var mye lavere relativt til mengde adsorbent. Det ble påvist marginal effekt av en økning i bleketid utover det laveste nivået som er anvendt i optimaliseringsforsøket (15 min).

Det er gjennomført innledende studier i lab skala for uttesting av alternative betingelser for koldklaring (vinterisering) av makrellolje basert på tørrfraksjonering. Råoljen og oleinfraksjonene er analysert med differensial scanning kalorimetri (DSC). DSC viste at makrell råoljen består av 100% flytende fett ved 20°C. Tørrfraksjonering ved 0 °C ga et utbytte av olein på 40 % men oljen oppfylte ikke kravet til AOCS Cold test (AOCS 2017). Men tørrfraksjonering ved 0 °C ga en olje som holdt seg flytende og klar ved 4 °C. Utbyttet av PUFA i oleinfraksjonen var på 41 %. Det ble dokumentert en sammenheng mellom andelen fast fett i råoljen ved forskjellige temperaturer målt med DSC og utbytte av olein ved tørrfraksjonering ved de respektive temperatuene.

Det er gjennomført pilotskala raffineringforsøk på råolje fra makrell restråstoff basert på betingelser utviklet i lab skala som omfatter bleking og deodorisering. Bleking av makrell råoljen ga en olje med fargetall 1,0, peroksidtall på 0,4 og anisidintall på 4,6. Deodorisering av den blekede råoljen ga en ytterligere reduksjon i farge, og et peroksidtall på 0,0 og anisidintall på 2,6. Analyse av flyktige komponenter av bleket og deodorisert råolje viste en 98% reduksjon av de flyktige komponentene i råoljen, som var dominert av sekundære lipidoksidasjonsprodukter, og hadde en positiv korrelasjon med reduksjon i anisidintall ( $r=0,98$ ,  $p<0,001$ ).

Estimert utbytte ved fullraffinering av makrelloljen er kun 37 %. Det klart største tapet skjer ved vinterisering av oljen (40 % utbytte) og det anbefales videre optimalisering av dette raffineringstrinnet for å øke utbyttet.

Det er blitt utført sensorisk profilering av den raffinerte makrelloljen i sammenligning med en fersk makrellolje tilsatt antioksidanter i form av rosmarinekstrakt, en kommersiell fersk raffinert tran (CLO) og en kommersiell raffinert vegetabilisk soyaolje. 13 lukt- og 11 smaksegenskaper ble bedømt av et trent sensorisk panel. Oljene i forsøket ble generelt beskrevet med lave sensoriske intensiteter i egenskapene som ble undersøkt, med noen unntak: total luktintensitet, metallukt, bitter, nøtte og pungent smak. Den ferske makrelloljen var svært nøytral på lukt og smak, der 15 av egenskapene var mere nøytrale (lavere intensitet) i lukt og smak enn tranen (CLO), og 13 av egenskapene var mere nøytrale enn soyaoljen, men var karakterisert av noe mere fiskelukt og smak (definert som *frisk fet fisk, skalldyr og frisk sjø*).

Det er gjennomført et akselerert lagringsforsøk etter tilsetning av to kommersielle naturlige antioksidanter til den pilotskalaraffinerte makrelloljen, rosmarinekstrakt og mixed tokoferol. Det ble benyttet to nivå av rosmarinekstrakt (625 og 1250 ppm) og mixed tokoferol (750 og 1500 ppm) og en blanding av de to antioksidantene på to nivå. Oljene er blitt lagret over 4 uker ved 40 °C og med lufttilgang sammen med raffinert makrellolje uten tilsatt antioksidant. Etter 2 uker har høyt nivå av rosmarinekstrakt omtrent samme effekt som mixed tokoferol, men det var ingen signifikant forskjell mellom de to nivåene tilsatt mixed tokoferol. Etter 3 og 4 uker har mixed tokoferol klart best effekt på stabilisering av makrelloljen. Ved tilsetning av rosmarinekstrakt til mixed tokoferol får man en liten synergieffekt på PV og AV etter 3 og 4 uker, men best effekt på stabilisering har mixed tokoferol. Flyktige komponenter var dominert av sekundære lipidoksidasjonsprodukter hvorav 2-etyl-furan, 1-



penten-3-ol og eddiksyre utgjorde 30-60 % av totalmengden flyktige komponenter. De sekundære lipidoksidasjonsproduktene viste en signifikant positiv korrelasjon med anisidintall ( $r > 0,9$ ,  $p < 0,0002$ ). En samlet vurdering av resultatene tilsier at tokoferol tilsatt raffinert makrellolje i en mengde på 750 ppm gir en god lagringsstabilitet på oljen mht. harskning. Best effekt på stabilisering av makrellolje er oppnådd ved å kombinere mixed tokoferol og rosmarinekstrakt på hhv lavt (750 ppm) og høyt (1250 ppm) nivå.

## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

FHF har i løpet av de siste to årene arbeidet systematisk og målrettet med utvikling av kunnskap og teknologi for økt bearbeiding av makrell. Satsingen kalles «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell». Bakgrunnen er at bare 2–4 % av landets makrell foredles til filét. Resten av de ca. 350.000 tonn eksporteres ut av landet rundfrosset. Næringen har, i samarbeid med FHF, etablert en pilotlinje på ett av de pelagiske anleggene (Pelagia, Selje). Pilotlinjer er satt sammen av flere ulike prosjekter med relativt stor spredning i tematikk.

Makrell er en art med stort fettinnhold og rik på essensielle fettsyrer som bl.a. EPA og DHA. Neste fase i «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell» ser nærmere på hvilke muligheter som finnes for utnyttelse av restråstoffet fra filétproduksjon til produksjon av høyverdige olje- og proteinkomponenter til humant konsum og *petfood*-markedet. Arbeidet med å utnytte restråstoffet har utfordringer som krever betydelig FoU-innsats. Det er laget eget «veikart» for denne satsingen som danner grunnlaget for prioriteringene i 2018.

FHF ønsker på overordnet nivå å få gjennomført et prosjekt som skal raffinere et gitt kvantum råolje fra restråstoff av makrell. Raffineringen skal gjøres for å oppnå høykvalitetsprodukt for humant konsum av råolje fra restråstoff av makrell. Makrellolje uten tilsatt antioksidant danner utgangspunkt for dette prosjektet.

### 2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet har hatt et totalt budsjett på 3,1 mill NOK, fullfinansiert av FHF, med en varighet på ca 2 år. Prosjektet har omfattet 5 hovedaktiviteter: Kartlegging av teknologi for raffinering av makrellolje, undersøke hvilke komponenter som forårsaker lukt/smak på makrellolje, utvikle en bleke- og koldklaringsprosess for å oppnå en fargeløs og klar og flytende olje ved romtemperatur, pilotskala raffinering av makrell råolje og produktstabilitet mht. harskning og bruk av antioksidanter.

### 2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet er ledet av Nofima, og *den interne Nofima faggruppen har bestått av J.E. Haugen, Å. Oterhals, L. Thorsen og M. Carlehög. Sentrale industripartnere har vært Pelagia og Epax AS, som besitter bred kompetanse innen makrell råstoff, raffinering av marine oljer og oljekvalitet.*

*Styringsgruppen har bestått av: A. Krokedal Rønnevik, R. Rathore, Pelagia AS I. Stoknes, Epax AS (Pelagia AS), J. Seliussen, Industri Utvikling Vest, O. Flesland, Vedde Sildoljefabrikk, K. Jakobsen, Nils Sperre AS, K. Reiten, Vikomar AS og L.R. Lovund, FHF.*

#### **Nøkkelpetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen**

Nofima: Dr. John-Erik Haugen: Prosjektleder; kompetanse innen oljekvalitet, lukt/smakskjemi, lipid oksidasjon, raffinering av olje, organisk analyse. Dr. Åge Oterhals: kompetanse innen olje raffineringsteknologi og oljekvalitet. Dr. Lars Thoresen: kompetanse innen oljekvalitet og olje prosessering. Mats Carlehög: kompetanse innen sensorisk analyse og oljekvalitet. Haugen har vært ansvarlig for

gjennomføring av labskala testingen av bleking av makrellolje, analyse av lukt/smakskomponenter i makrelloljen og lagringsforsøk med antioksidanter, Oterhals i samarbeid med Thoresen, har vært ansvarlig for koldklaring testene av oljen og Haugen og Oterhals har vært ansvarlige for pilotraffineringen av makrellolje. Carlehög har vært ansvarlig for sensorisk analyse. Senioringeniørene Ane Meisland, Elin-Merete Wetterhu og ingeniør Magnus Rein har bidratt til det praktiske lab arbeidet gjennomført i prosjektet.

## **3 Problemstilling og formål**

### **3.1 Prosjektets effektmål**

Det å kunne anvende fett fra makrell restråstoff til verdiskapning vil være et viktig bidrag til den totale utnyttelse av restråstoff innen pelagisk sektor. Næringen har, i samarbeid med FHF, etablert en produksjonslinje for prosessering av makrell restråstoff på ett av de pelagiske anleggene (Pelagia, Måløy), og som vil levere råolje fra makrell restråstoff, som vil bli videreforedlet til en høykvalitetsolje til humant konsum. Arbeidet som er gjennomført og resultatene som er oppnådd i dette prosjektet, vil ha stor nytteverdi for den videre industrielle satsingen og verdiskapning basert på råolje fra makrell restråstoff.

### **3.2 Prosjektets resultatmål**

#### **3.2.1 Hovedmål**

Hovedmålet til prosjektet er å foredle råolje av restråstoff fra makrell for å komme fremt til en høykvalitetsolje som er fargeløs/klar og flytende ved romtemperatur til bruk for humant konsum.

#### **3.2.2 Prosjektet resultatmål**

1. Kartlegge *state of the art* teknologi til raffinering av makrellolje
2. Undersøke hvilke komponenter som forårsaker lukt/smak på makrellolje
3. Utvikle en koldklaringsprosess for å oppnå klar olje ved romtemperatur (med nøytral smak og lukt, lite farge og evt. tilsatt kunstig smak)
  - i) Uttesting i labskala
  - ii) Uttesting i pilotskala
4. Gjennomføre sensoriske analyser for kartlegging av best egnet sluttprodukt for humant konsum
5. Beregne utbytte for produksjon av ulike produkttyper
6. Produktstabilitet mht. harskning

## 4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet har vært inndelt i henhold til 5 hovedaktiviteter:

1. Kartlegge *state of the art* teknologi til raffinering av makrellolje
2. Undersøke hvilke komponenter som forårsaker lukt/smak på makrellolje
3. Utvikle en bleke- og koldklarings/vinteriseringsprosess for å oppnå en fargeløs og klar og flytende olje ved romtemperatur
4. Pilotskalatesting av makrell råolje
5. Produktstabilitet mht. harskning og bruk av antioksidanter

Aktivitet 1 har omfattet en litteraturstudie der konvensjonell og ny prosess teknologi for raffinering av marine oljer er blitt kartlagt ved gjennomgang av tilgjengelig litteratur og patenter og vurdert for mulig anvendelse til raffinering av råolje fra makrell restråstoff.

Aktivitet 2 har omfattet analyser på flyktige forbindelser i råolje fra makrell restråstoff ved bruk av headspace gasskromatografi massesspektrometri (HS-GC/MS) for å påvise komponenter som kan bidra til lukt og smak i råoljen.

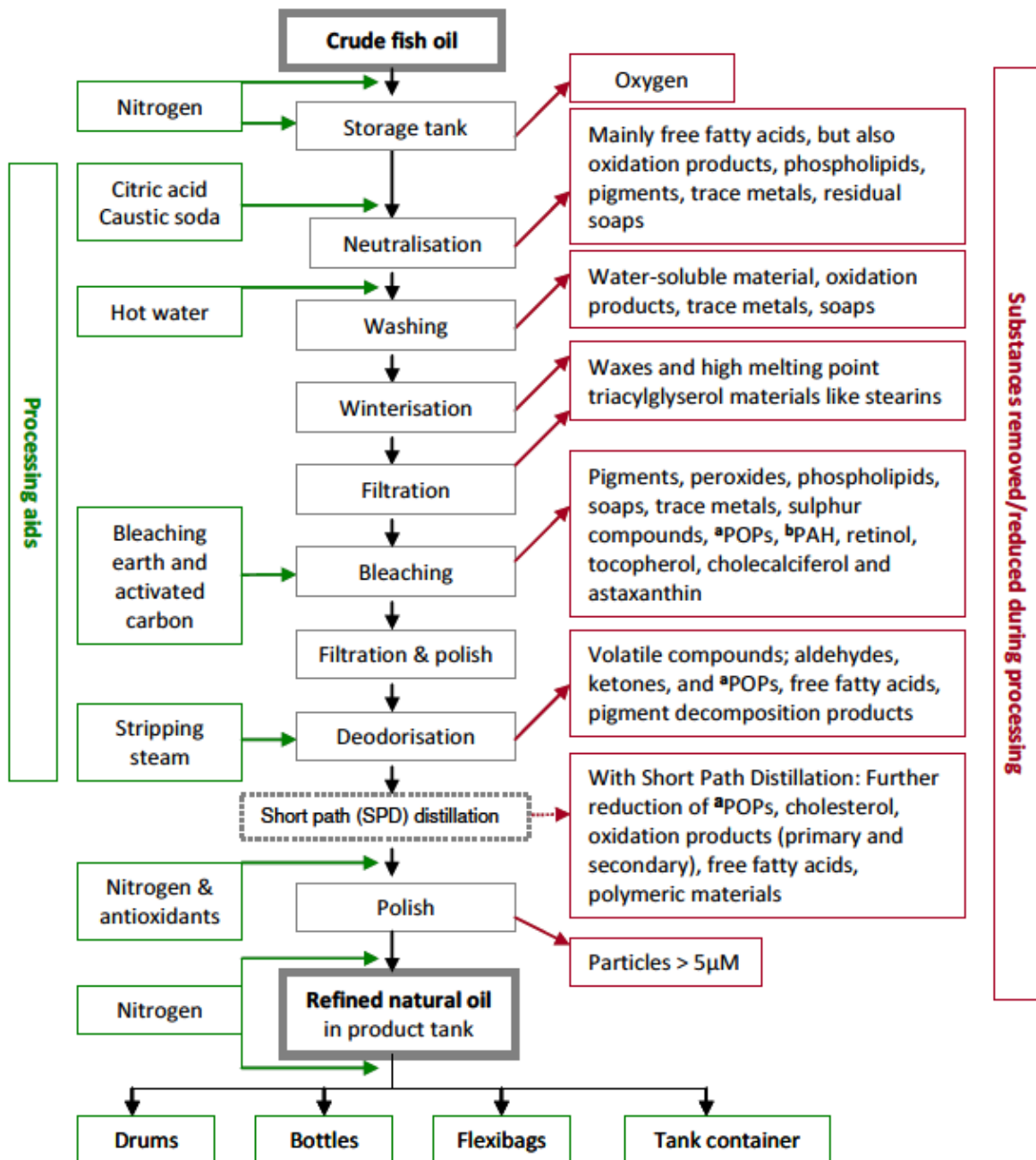
I Aktivitet 3 er det blitt utført labskala blekeforsøk med screening av ulike kommersielle blekjordtyper mht. effekten på farge og oksidasjon. I tillegg er det utført forsøk på koldklaring/vinterisering i labskala ved bruk av tørrfraksjonering for å redusere stearin i makrelloljen.

Under Aktivitet 4 er det blitt gjennomført pilotskalaraffinering av makrell råoljen som har omfattet bleking og deodorisering basert på erfaringene og kunnskapen etablert under aktivitet 1 og 3.

I Aktivitet 5 er det gjennomført et akselerert lagringsforsøk for å undersøke lagringsstabiliteten til den raffinerte makrelloljen etter tilsetning av to kommersielle naturlige antioksidanter.

## 5 State of the art teknologi til raffinering av makrellolje

Det finnes mye litteratur på raffinering av vegetabiliske oljer, spesielt standardverket *Bailey's industrial oil and fat products* (Shahidi, 2005) og flere review artikler med en kritisk gjennomgang av de enkelte raffineringstrinnene (Shahidi m.fl., 1997; Bhosle og Subramanian, 2005; Vaisali m.fl., 2015; Coutinho m.fl., 2009; Hamm 2009; Dijkstra, 2009, 2013; Ghazani og Marangoni, 2013). For raffinering av fiskeoljer finnes det noen få tekster som har en kritisk gjennomgang av de ulike teknikkene som anvendes (Breivik, 2007; Rossell, 2009) og en del generell litteratur. Det foreligger svært lite spesifikk litteratur på raffinering av makrellolje og det er derfor tatt utgangspunkt i litteratur på fiskeolje generelt i denne rapporten.



Figur 1 Flytskjema for raffinering av fiskeolje (Aursand m.fl., 2011)

### 5.1.1 Raffinering av fiskeolje

Det er en rekke faktorer, fra kvaliteten på råoljen og kombinasjonen av prosessbetingelser som til sammen er avgjørende for å oppnå en høykvalitetsolje som sluttprodukt. De konvensjonelle prosesstrinn som anvendes for raffinering av fiskeolje inkluderer avsyring/nøytralisering, bleking, vinterisering og deodorisering (Bimbo 2017; Oterhals og Vogt, 2013) (**Figur 1**). I tillegg kommer bruk av aktivt kull og/eller molekylærdestillasjon til fjerning av persistente organiske miløgifter (POPs).

### 5.1.2 Degumming

Degumming anvendes oftest som det første rensetrinnet på oljer for fjerning av polare lipider (fosfolipider). Fosfolipider vil kunne opptre som emulgatorer og medføre økt tap av nøytrale lipider under avsyring av oljen samt gi en dårligere kvalitet på sluttprodukt (Young m.fl., 1994). Det skilles mellom to typer av fosfolipider: hydratiserbare og ikke-hydratiserbare. Sistnevnte er hovedsakelig til stede som kalsium- og/eller magnesiumsalter av fosfatidinsyre og fosfatidyletanolamin. Etter tilsetning av vann (1-3 %) under kraftig mixing vil de hydratiserbare fosfolipidene danne micellestrukturer som er løselig i vannfasen. Oljen blir deretter separert fra vann ved sentrifugering eller membranfiltrering. For fjerning av ikke-hydratiserbare fosfolipider blir oljen først behandlet med fosforsyre eller sitronsyre som chelaterer Ca- og Mg-ionene og omdanner fosfatidene til en hydratiserbar form. Syrebehandlingen vil også ha den tilleggs effekten at den chelaterer og fjerner spormetaller med prooksidativ effekt. Ett alternativ til bruk av syre er anvendelse av fosfolipaser for omdanning av de ikke-hydratiserbare fosfolipidene til hydratiserbar form (De Greyt, 2012; Sampaio m.fl., 2015). Motivasjonen for å utvikle denne teknologien har vært lavere bruk av kjemikalier og høyere oljeutbytte. Enzymer utgjør en kostbar innsatsfaktor og valg av teknologi avhenger av både økt utbytte og mulighet for utnyttelse av sidestrømmer til produksjon av lysofosfolipider. Enzymatisk degumming har funnet noe anvendelse innen storskala raffinering av vegetabiliske oljer.

Det er en normal rutine ved fiskemel-/oljefabrikker at fiskeoljen poleres etter separasjon fra dekantervæsken. Dette gjøres ved tilsetning av varmt vann etterfulgt av et nytt separasjonstrinn (Søbstad, 1992; Oterhals og Vogt, 2013). Poleringen fungerer i praksis som et degummingstrinn der hydratiserbare fosfolipider fjernes. Fiskeoljer inneholder av denne grunn generelt lave nivå av polare lipider og for en råolje med høy kvalitet vil det ikke være nødvendig å anvende degumming under raffinering av oljen.

### 5.1.3 Avsyring/Nøytralisering

Avsyring eller nøytralisering er et viktig innledende prosesstrinn i oljeraffineringen og som har stor betydning for sluttkvaliteten av den ferdig raffinerte oljen. Marine råoljer inneholder typisk 1-8% med frie fettsyrer, avhengig av råstoffkvalitet og prosessbetingelser. Disse bør fjernes før videre foredling av oljen fordi de kan bidra til bi/usmak. Frie umettede fettsyrer oksideres dessuten lettere enn glyseridbundete umettede fettsyrer og reduserer dermed den oksidative stabiliteten til oljen.

Konvensjonelle avsyrimetoder omfatter kjemisk nøytralisering ved bruk av lut og fysisk damp stripping under vakuum (Bhosle og Subramanian, 2005). Det har i de senere år vært mye forskning på å utvikle nye alternative metoder. Disse utgjør kjemiske metoder som løsemiddel ekstraksjon, enzymatisk reesterifisering, superkritisk væske-ekstraksjon, og fysiske teknikker som adsorpsjon og

anvendelse av polymer og nanobasert membran og filtreringsteknologi (Bhosle og Subramanian, 2005). Det har også vært anvendt biologiske metoder ved bruk av mikroorganismer.

## **Kjemiske/fysiske metoder**

### **Nøytralisering ved bruk av lut**

Tilsetning av lut i form av natriumhydroksyd (NaOH), såkalt kaustisk/alkalisk avsyring, gjør at de frie fettsyrene nøytraliseres med dannelse av Na-salter (såpe). Na-saltene er vannløselige og vil akkumulere i vannet som er tilsatt som bærer av luten. Vannfasen kan deretter fjernes ved mekanisk separasjon fra den nøytrale oljen ved bruk av sentrifugering. Lutbehandlingen kan imidlertid også bidra til en forsåping/hydrolyse av de nøytrale glyseridene og betydelige mengder av oljen kan gå tapt og dermed gi et dårlig utbytte. Dessuten oppstår det også tap av olje i form av medfelling i den vandige såpefasen. Styrken av lut er derfor kritisk mht. å oppnå effektiv fjerning av de frie fettsyrer og samtidig begrense tap av olje ved forsåping. Dessuten vil innholdet av andre komponenter i oljen som pigmenter og andre overflate-aktive stoffer påvirke reaksjonen mellom de frie fettsyrene og luten. Det finnes empiriske formler for dosering av optimal lutkonsentrasjon i forhold til mengde frie fettsyrer i oljen (Latondress m.fl., 1984). Såpefasen fjernes ved en separator, oljen vaskes med vann og tørkes under vakuu ved temperatur  $< 100$  °C. Forekomst av oksidert fett på over 0,5 vektprosent vil kunne fungere som en emulgator og derved stabilisere vann i olje emulsjonen. Dette kan forhindre en effektiv separasjon av såpefasen og derved øke tap av olje (Patterson, 2009). Soda eller natriumkarbonat kan også brukes til å fjerne frie fettsyrer fra råolje, men kullsyre frigjort under raffinering kan forårsake skumdannelse. I tillegg forhindrer innblanding av gass i såpefasen tilstrekkelig felling (settling). Fordelen ved anvendelse av lut til nøytralisering er at en viss mengde av de polare oksidasjonsproduktene også vil fjernes fra oljen.

Et nylig fremskritt innen lutbehandling er bruken av såkalte nanoreaktorer. Disse er i utgangspunktet hydrodynamiske kavitasjonsreaktorer, der oljen som skal behandles med lut blir utsatt for høyt trykk på 40-80 bar. Den kombinerte effekten av høyt trykk og design av reaktoren skaper sterke skjærkrefter som gir en effektiv nøytralisering av oljen (De Greyt, 2012). Prosessen hevdes å være fordelaktig da det er en signifikant reduksjon i bruken av syre (90 %) og kaustisk soda (over 30 %).

### **Fiskeoljer**

Det meste av litteraturen på avsyring av fiskeoljer baserer seg på tradisjonell alkalisk avsyring (Irianto, 1992; Aidos, 2002; Crexi m.fl., 2010; Aloo, 2014; Sari m.fl., 2016; Suseno m.fl., 2017). Alkalisk avsyring er også den tradisjonelle metoden som anvendes industrielt i raffinering av fiskeoljer.

Råolje fra sardin restråstoff er blitt avsyret ved bruk av lut (NaOH) under omrøring (800 omdr./min) ved 50 °C i 15 minutter (Suseno m.fl., 2017).

Råolje fra abbor (*Lates niloticus*) restråstoff ble tilsatt 10 % lut (NaOH) og oppvarmet til 80 °C i 3 timer med omrøring, vasket gjentatte ganger med vann og den nøytrale olje ble filtrert (Aloo, 2014).

Råolje fra sild med 3% frie fettsyrer er blitt avsyret med 4N NaOH (50 % overskudd på FFA) under sakte omrøring ved 90 °C og vakuu (Aidos, 2002). Såpestoffet ble så fjernet ved sentrifugering. Etter vannvask etterfulgt av ny avsyring med 0,1 NaOH ble resten av såpen skylt ut med varmt vann.



Nøytralisering av råolje fra karpe restråstoff (Crexi m.fl., 2010) ble behandlet med 20 vektprosent NaOH med 4 % overskudd NaOH i forhold syretallet etter degumming, ved 40 °C i 20 min under omrøring ved 500 rpm. Deretter ble oljen separert ved sentrifugering i 20 min ved 7000 g (Crexi m.fl., 2010). Oljen ble deretter vasket 3 ganger med 10 % vann i 10 min ved 95 °C og omrøring (500 rpm) og oljetemperatur på 50 °C. Deretter tørking i 20 min ved 90-95 °C og omrøring 500 rpm.

Råolje fra makrell fiskemelproduksjon (Feryana og Nurjanah, 2014) er blitt alkalisk avsyret. Optimal effekt ble oppnådd med 17,9 % NaOH (24 Baumé) med et utbytte på 56 %.

### **Dampstripping under vakuum**

Denne teknikken fjerner frie fettsyrer og flyktige komponenter ved destillasjon under høy temperatur og vakuum. På grunn av at oljen eksponeres for høy temperatur, og til tross for vakuum, vil denne metoden kunne bidra til økt lipid oksidasjon/harskning av oljen. Denne teknikken vil derfor ikke være så godt egnet til marine oljer med høy andel av flerumettede fettsyrer, med mindre det utvikles bedre vakuumsystemer. Derimot kan det ved for høy temperatur finne sted kjemiske reaksjoner som syklisering, isomerisering (bl.a. dannelse av trans-isomerer av fettsyrer) og polymerisering av fettsyrene (Fournier m.fl., 2006). Disse sekundære reaksjonene kan også igjen bidra til endring av fysiske, kjemiske og organoleptiske egenskaper til oljen (Sengupta and Bhattacharyya, 1992).

Dampstripping av frie fettsyrer anvendes primært innen raffinering av vegetabiliske oljer som soya og raps. Et alternativ for termisk ustabile oljer som fiskeolje er bruk av molekylærdestillasjon (Cvengros, 1995). Den fysiske avsytingsprosessen gir et høyere utbytte sammenlignet med lutbehandling, men økte kostnader i form av energiforbruk.

### **Løsemiddelekstraksjon**

Denne metoden er en ren væske-væske ekstraksjon som baserer seg på forskjellen i løselighet til frie fettsyrer og nøytrale glyserider i ulike organiske løsemidler. Fordelen er at den utføres ved romtemperatur og atmosfærisk trykk, som er energibesparende og reduserer tapet av naturlige komponenter i oljen. På grunn av den store forskjellen i kokepunkt mellom løsemiddel og oljen, lar løsemiddelet seg enkelt fjerne ved stripping/destillasjon under redusert trykk. Løsemiddelet gjenvinnes og brukes på nytt i prosessen.

Metoden er først og fremst anvendt på oljer med relativt høyt innhold av frie fettsyrer, etterfulgt av en ekstra konvensjonell avsyring ved bruk av lut eller dampstripping. Vandige løsninger med ulike konsentrasjoner av relativt polare organiske løsemidler som alkoholer (metanol, etanol, propanol og butanol), aceton og acetonitril har vært mye anvendt for selektiv ekstraksjon av frie fettsyrer i oljer. Det er stor interesse for bruk av vandig isopropylalkohol (IPA) for utvinning av olje fra oljebærende materialer på grunn av lav giftighet.

For å kunne anvende denne teknikken industrielt, er det utviklet en modifisert prosess ved bruk av varmevekslere sammen med filter for å fjerne urenheter etterfulgt av sentrifugering (Cheng og Lixiang, 2013). Løsemiddelekstraksjonen medfører imidlertid ekstra energiforbruk i forbindelse med fjerning av rester av løsemiddel fra oljen etter ekstraksjon. Superkritiske væsker har derfor vært foreslått i stedet for løsemiddelekstraksjon.

## **Fiskeoljer**

Med utgangspunkt i et foreslått patent (Hamm, 1992), er det dokumentert at avsyring basert på løsemiddelekstraksjon ved bruk av kortkjedete alkoholer kan være et alternativ i anrikning av EPA og DHA i fiskeoljer. Dette prinsippet er blitt undersøkt nærmere i en studie på råolje fra sardin med et innhold av frie fettsyrer på 5,6 % (Charanyaa m.fl., 2017). Avsyring ble foretatt ved en totrinns løsemiddelekstraksjon. Ulike løsemidler (metanol, etanol, propanol og butanol) ble utprøvd i ulike blandingsforhold løsemiddel:olje (1:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1 og 4:1). Best effekt ble oppnådd ved bruk av metanol, som ga en reduksjon fra 5,6 til 1,3 % frie fettsyrer.

## **Superkritisk væskeekstraksjon**

Dette er en metode der det ekstraheres med et løsemiddel ved temperatur og trykk over det kritiske punkt til løsemiddelet, som oftest CO<sub>2</sub> (Temelli, 2009). Teknikken har noen fordeler fremfor konvensjonelle metoder. Den er miljøvennlig ved at den ikke gjør bruk av organiske løsemidler og er meget selektiv med hensyn til frie fettsyrer som har en bedre løselighet enn glyseridene ved bestemte temperaturer og trykk. Så langt har teknikken kun vært utprøvd på vegetabiliske oljer og det er blitt oppnådd opp til 98 % reduksjon i frie fettsyrer med denne teknikken (Vázquez m.fl. 2009; Chen m.fl. 2008). Men ulempen er at dette er en kostbar teknikk, spesielt med tanke på industriell anvendelse, og er hovedgrunnen til at den ikke enda er tatt i bruk industrielt. Metoden vil først kunne bli lønnsom i fremstilling av dyre spesialoljer og råoljer med høy andel frie fettsyrer, der kvaliteten og renheten til de ekstraherte komponentene er av stor betydning. Noen studier på vegetabiliske oljer har vist at, til tross for at superkritisk ekstraksjon utgjør en høy investeringskostnad, medfører den imidlertid lavere totale prosesskostnader og mindre nedstrøms prosessering (Pereira og Meireles, 2007; Temelli, 2009). Dette vil kunne gjøre prosessen konkurransedyktig sammenlignet med dampdestillasjon i prosessering av høykvalitetsprodukter. Det foreligger imidlertid ingen lignende studier ved bruk av superkritisk ekstraksjon til avsyring av fiskeoljer.

## **Adsorpsjon**

Adsorpsjonsmetoder har også blitt undersøkt for å fjerne frie fettsyrer fra oljer. Det finnes noen patenter på bruk av adsorbenter til avsyring av vegetabiliske oljer. De er basert på bruk av henholdsvis aluminiumoksid (Ayorinde og Hassan, 1993) og magnesiumoksid (Kundrot, 1984).

Vannløselige silikater som natriumsilikat er også effektive i nøytralisering av frie fettsyrer. Denne prosessen gjør det også mulig å fjerne såperester ved filtrering eller dekantering. Silika og silikater har vært benyttet til avsyring av vegetabiliske oljer (Hernandez og Rathbone, 2002; El-Salam m.fl., 2011). Ved høye silikatkonsentrasjoner tenderer imidlertid såpefasen til å agglomerere til en fast fase. Raffinert olje, med mindre enn 0,02 % frie fettsyrer, kan oppnås med minimalt oljetap. Silikatraffinerer øker oljeutbyttet, eliminerer sentrifugering for å separere såpefasen og vannvasking av oljen. Andre kommersielle adsorbenter som sterke anionbyttere som f.eks. Amberlite® A26 i hydroksid form brukt innen preparativ kromatografi, har også vært benyttet til fjerning av frie fettsyrer i peanøttoljer (Chung m.fl., 2018). 98 % av de frie fettsyrene kunne fjernes med denne adsorbenten.

## **Membranfiltrering**

Membraner er et godt alternativ for alle separasjonsprosesser som involverer kjemikalier (de Morais Coutinho m.fl., 2009). Fjerning av frie fettsyrer ved membranteknologi er en enkel prosess som gir visse fordeler i forhold til de konvensjonelle prosessene, nemlig lavt energiforbruk, lav temperatur, og

mindre tap av næringsstoffer og andre ønskelige komponenter. På grunn av det store omfanget av energibesparelser, samt potensial for forbedring av oljekvaliteten, har vegetabiliske oljer blitt et av hovedområdene for membran-applikasjoner.

I prinsippet kan membraner brukes i nesten alle stadier av oljeproduksjon og rensing (Cheryan, 1998). Mange av de potensielle bruksområdene til membranteknologi i vegetabilisk oljebehandling er blitt evaluert på laboratorie- eller pilotskalaanlegg, men det er enda svært få industrielle installasjoner (Raman m.fl., 1996).

Det foreligger flere studier på bruk av membraner med eller uten løsemidler for å avsyre vegetabiliske oljer ved bruk av porøse og ikke-porøse membraner (de Morais Coutinho m.fl., 2009). Teknologien gir en kostnadseffektiv og enklere prosess, men til tross for dette har metoden enda ikke kommet til industriell anvendelse. Hovedgrunnen er at de frie fettsyrene har en tredjedel av molekylvekten til triglyserider og forskjellen er dermed for liten til å separere de effektivt ved bruk av membraner alene (Subramanian m.fl., 1998; Bhosle og Subramanian, 2005). Det har derfor vært forsøkt å kombinere membranfiltrering med løsemiddelekstraksjon for å oppnå en effektiv separasjon av de frie fettsyrene. Organiske løsemidler vil kunne påvirke permeabiliteten til membraner negativt med hensyn til effekten på separasjon av frie fettsyrer (Raman m.fl., 1996). Tres m.fl. (2010) har testet en rekke polymere membraner for deres anvendelse innen avsyring og fant at noen membraner basert på polyamid eller polysulfon som er stabile og egnet for avsyring av olje-løsningsmiddelblandinger. Krishna Kumar og Bhowmick, (1996) behandlet blandinger av triglyserider og frie fettsyrer med alkohol ved bruk av både cellulose- og ikke-cellulose baserte membraner. Polyamidmembraner (MWCO 500-600Da) viste bedre selektivitet mot fettsyreseparasjon sammenlignet med celluloseacetat (MWCO 500Da) og polysulfon membraner (MWCO 1000Da). Begrensning til denne metoden var imidlertid «begroing» og tetting av membranen på grunn av avsetning av olje på overflaten.

### **Fiskeoljer**

Råolje fra sardin med et innhold av frie fettsyrer på 5,6 % (Charanyaa m.fl., 2017), ble avsyret ved bruk av en tottrinns membranfiltrering i kombinasjon med løsemiddel. Det ble benyttet en upolar polytetrafluoroetylen (PTFE) membran med 0,45 µm porestørrelse under varierende trykk (0,5, 1, 2, og 3 bar) og metanol. 3 bar ga det høyest effekt på fjerning av frie fettsyrer og ga 4 ganger høyere utbytte av olje sammenlignet med løsemiddelekstraksjon (se over under løsemiddelekstraksjon).

Ved bruk av membranfiltrering vil imidlertid nedbrytning av flerumettetede fettsyrer kunne være betydelig i fiskeoljer med mindre avsyringen kan utføres uten nærvær av oksygen (Fournier m.fl., 2006). Derfor har flere forskere arbeidet med å modifisere eksisterende teknologi ved å kombinere to eller flere prosesser og ved introduksjon av et nytt rensetrinn til allerede eksisterende teknikker (Niazmand m.fl., 2011). Det er imidlertid behov for ytterligere studier på nye tilnærminger med tanke på den økonomiske levedyktigheten for å kunne erstatte eksisterende teknologi. Spesielt er kapasiteten til membranfiltrene alt for dårlig med hensyn til industriell anvendelse.

### **Biologiske metoder**

Biologisk avsyring, også kalt bioraffinering, har vært benyttet til å fjerne frie fettsyrer (Bhosle og Subramanian, 2005). Biologisk avsyring har vært studert over en rekke år. Metoden innebærer bruk av mikroorganismer som selektivt kan fjerne og/eller utnytte frie fettsyrer til egen vekst eller lipase enzymsystemer som kan forestre frie fettsyrer tilbake til triglyserider.

## **Mikroorganismer**

Det har vært utført studier på jordbakteriestammer som kan omdanne langkjedete fettsyrer uten at de skiller ut ekstracellulære lipaser (Cho m.fl., 1990). Metodens anvendelse har forøvrig noen begrensninger: f.eks. at kortkjedede fettsyrer med mindre enn 12 karbonatomer som ikke blir utnyttet. Dessuten ble det vist at graden av fjerning av fettsyrer er proporsjonal med deres løselighet i vann, og vil derfor begrense seg til de kortkjedete fettsyrene, men det viste seg også at noen av dem kunne være toksiske overfor mikroorganismene.

## **Enzymatisk reesterifisering**

Det er også gjort forsøk på å avsyre vegetabiliske oljer ved enzymatisk reesterifisering (Bhattacharyya og Bhattacharyya, 1989; Sengupta og Bhattacharyya, 1992). Denne bioraffineringsmetoden utnytter evnen enkelte mikrobielle lipaser har til å syntetisere et triglyserid fra en fettsyre og glyserol, og som er blitt utnyttet for å utvikle en alternativ prosess for avsyring av oljer med høyt innhold av frie fettsyrer. I lys av behovet for lavenergiprosesser, kan mikrobiell lipase-katalysert forestring være mer fordelaktig for avsyring enn kjemisk forestring ved bruk av katalysator, som høyere temperaturer (180-200 °C) enn de lipasekatalyserte reaksjonene. Den mikrobielle lipaseprosessen er også lovende mht. den endelige kvaliteten på den raffinerte oljen og utbytte (Sengupta og Bhattacharyya, 1992). Det vil imidlertid være visse begrensninger mht. lipasenes spesifisitet for bestemte fettsyrer som utelukker omsetning av en rekke fettsyrer.

Effekten av enzymatisk avsyring avhenger av flere faktorer: enzymkonsentrasjon, temperatur, tid, glyserolkonsentrasjon, vannmengde i reaksjonsblandingen, trykk etc. (Bhattacharyya og Bhattacharyya, 1989). Enzymatisk avsyring er demonstrert i laboratorieskala, hovedsakelig på vegetabiliske oljer. Den største fordelen med denne metoden er det høye utbyttet av nøytrale glyserider, spesielt triglyserider. Imidlertid er den største årsaken til at den har funnet begrenset industriell anvendelse den høye kostnaden til enzymene som benyttes.

Kannan og Gundappa (2014) sammenlignet enzymatisk avsyring av rå palmeolje med løsemiddel ekstraksjon (etanol/heksan 9:1) og alkalisk raffinering. Med enzymatisk avsyring ble det oppnådd høyest utbytte på 100%.

## **Fiskeoljer**

For fiskeoljer har enzymatisk reesterifisering primært vært benyttet i forbindelse med produksjon av høykonsentratoljer, og ikke til avsyring. Enzymatisk avsyring av marokkansk råolje fra sardin har vært undersøkt ved bruk av lipase enzym (Mariem og Fatima 2017). Forestringen av de frie fettsyrene ble utført med immobilisert Novozym 435. Best resultat ble oppnådd med 2 % glyserol, 1 % enzym, 15-25 mbar ved 70 °C med en avsyingsgrad på opp til 91 %.

### **5.1.4 Bleking**

Bleking er en relativt viktig prosess der hensikten er å fjerne urenheter som fargestoffer, oksidasjonsprodukter (peroksider), spormetaller, fosfolipidrester og rester av såpe og vann fra nøytraliserte oljer. Den konvensjonelle metoden er å benytte adsorbenter i form av leirmineraler (blekejord) eller kull eller kombinasjon av begge, som blandes inn i oljen under omrøring, oppvarming og vakuu. Blekejord gir dessuten en mere effektiv fjerning av oksidasjonsprodukter enn lutavsyring. Etter blekingen fjernes adsorbentene mekanisk fra oljen ved filtrering. Dette rensetrinnet forbedrer

den oksidative stabiliteten og de sensoriske egenskaper av oljen (Zschau, 2001; Patterson, 2009; Garcia-Moreno m.fl., 2013). For å oppnå en god effekt av bleking, er det viktig at mest mulig såpe og vann fra avsyringstrinnet er fjernet før bleking finner sted. Fjerning av fargestoffene er meget viktig siden de ikke elimineres i de etterfølgende trinnene i raffineringen. På den annen side må sluttfiltreringen være tilstrekkelig til å oppnå en fullstendig fjerning av blekejord fra oljen, siden den kan inneholde metaller (jern) som kan fremme lipidoksidasjon under lagring.

Det har også vært benyttet ultralyd i kombinasjon med bleking, hvor fjerning av pigment ble observert selv i fravær av adsorbenter på grunn av varme- og sonokjemisk pigmentnedbrytning (Su m.fl. 2013; Essid m.fl., 2016; Ivanovs og Blumberga, 2017). Den største ulempen ved denne prosessen er manglende evne til å fjerne sekundære oksidasjonsprodukter. Siden bleking anses å være et av de viktige trinn som garanterer den endelige kvaliteten på oljen, er det viktig å ha flere nye tilnærminger til denne prosessen som er spesifikke og effektive. En effektiv adsorpsjon krever en kombinasjon av høy spesifikk overflate til porøst fast stoff og selektivitet mht. stoffene som skal fjernes fra oljen.

Virkemåten til adsorbentene er basert på to typer adsorpsjon: reversibel fysisk adsorpsjon basert på intermolekylære krefter med lav styrke og irreversibel kjemisorpsjon med sterk interaksjon, noe som kan forårsake kjemiske reaksjoner.

De to hovedreaksjonene som finner sted i oljer under bleking er følgende: Nedbrytning av hydroperoksyder og dehydrering av alkoholer (Ruiz-Mendez og Dobarganes).

Tidligere raffineringstrinn endrer normalt ikke peroksidverdien, med mindre oljen er utsatt for luft under, som vil kunne bidra til en økning i peroksidverdi. Under bleking brytes imidlertid hydroperoksider ned for å danne flyktige stoffer og oksiderte triglyserider som inneholder keto- og hydroksyfunksjoner. Etter bleking bør peroksidverdien være minst halvert eller fortrinnsvis ned mot null, men nærværet av aldehyder og ketoner vil bidra til en økning i anisidinverdien.

Hydroksysyrer dannet fra hydroperoksider gjennomgår delvis dehydrering ved jordkatalyse. Da funksjonen er i en allylisk posisjon, observeres en rask økning i UV-absorpsjon ved 232 nm på grunn av dannelsen av konjugerte diener fra hydroperoksider og ved UV-absorpsjon ved 268 nm på grunn av dannelse av konjugerte triener fra hydroperoksider. Også sterolene vil gjennomgå en betydelig dehydrering.

Kritiske faktor som bør testes ut for å optimalisere effekten av dette rensetrinnet er type adsorbent, mengde (dosering) av adsorbent, interaksjonstid, vanninnhold, syrligheten (ved bruk av blekejord/leirmineraler) og temperatur. I dette trinnet, oppslemmes den oppvarmede oljen (70-100°C) med syreaktivert blekemiddel (1-3 %), vanligvis kalsium montmorillonitt eller naturlig hydratisert aluminiumsilikat (bentonitt). For optimal adsorpsjon av både fargestoffer og oksidasjonsprodukter, må reaksjonstiden overstige 15 minutter, men ikke være lenger enn 30 minutter ved vanlige blekings-temperaturer.

En viss risiko vil være til stede for at adsorbenten som anvendes vil kunne katalysere oksidasjon av flerumetede fettsyrer, da noen leirer kan inneholde en viss mengde jern. Det anbefales derfor at adsorbenten som anvendes på fiskeoljer bør ha spormetallinnhold på under 100 ppm (Patterson, 2009).

El-Hamadi og Zaher (2016) testet 4 ulike kommersielle bleikjordtyper (Fulmont, Tonsil N, Tonsil ACC og en meksikansk fabrikk kvalitet bentonitt leire) for fjerning av karotenoider, klorofyll og fenoliske komponenter i solsikkeolje. Det ble benyttet 1 % bleikjord ved 30 og 100 °C i 10 min. Resultatene viste at karotenoidene fjernes mere effektivt enn klorofyll. Fulmont bleikjorden hadde best effekt på fjerning av farge (90-91 % reduksjon i karotenoider og klorofyll), mens Tonsil ACC bleikjorden ga en olje som var mere stabil mht. oksidasjon. Tonsil N og den meksikanske bentonitt leiren hadde best effekt på fjerning av fenoliske komponenter (60 % reduksjon).

### **Leirmineraler/Blekejord**

Naturlige, nøytrale og ikke-aktiverte leirer kommer fra leirmineral avsetninger som kun er tørket, malt og siktet til bestemte partikkelstørrelser. Disse materialene er milde i bruk og forårsaker ikke noen endringer i triglyserider. To former for bentonitt er mye anvendt; en som inneholder 85% av leirmineralet aluminium silikat, også kalt montmorillonitt og en annen variant med høyt innhold av kalsium montmorillonitt. Den førstnevnte har evnen til å svelle. Kalsium montmorillonitt kan også syreaktiveres som bidrar til at den får en mye større aktiv overflate og er dermed mere effektiv til bleking av oljer (Taylor 2009). Syreaktiveringen kan utføres med ulike syrer og mengde syre etterfulgt vasking og filtrering som igjen er bestemmende for adsorbentens blekeegenskaper. Det finnes en rekke kommersielle produkter til bleking av oljer basert på ulike typer mineraler (Taylor, 2009).

Adsorpsjonskapasiteten til leire /blekejord skyldes høyt overflateareal og surhet. Aktivert leire er det mest foretrukne materialet for behandling av vegetabiliske oljer, da de er svært spesifikke, mer kjemisk aktive og effektive (Zschau, 2001) sammenlignet med karbon/kull. Syreaktivert leire er den mest brukte adsorbenten. Syreaktiverte leire brukes fremfor naturlige leire på grunn påvist bedre effektivitet under adsorpsjonsprosessen (Rossi m.fl., 2003; Sathivel, 2010). Tilsetning av små mengder av kompleksende stoffer vil kunne bidra til en økt fjerning av både såperester og spormetaller (Patterson, 2009).

### **Aktivt kull**

Bruk av trekull og aktivert kull har lange tradisjoner da kull har en relativt bred selektivitet mht. å fjerne *de uønskede stoffene i oljer*. *Aktivt kull brukes primært for å fjerne miljøgifter som f.eks. polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), dioksiner og polysykliske klorerte bifenyler (PCB) fra fiskeoljer.* Adsorpsjonsegenskapene til kullet er avhengig en rekke faktorer; det opprinnelige plantematerialet (tre, torv, kull eller nøtteskall) og prosedyren for aktivering (temperatur, karbonisering, aktiveringsgass, partikkelstørrelse).

Det finnes en rekke kommersielle produkter av aktivert karbon med spesifikt overflateareal i området 500-1500 m<sup>2</sup>/g og porestørrelse på 2-50 nm, og som gir en veldig høy adsorpsjonskapasitet (Taylor 2009). Sammenlignet med blekejord, vil aktivt kull på vektbasis ta opp mere pigment enn aktivert blekejord fra en olje med høyt pigmentinnhold (Patterson 2009). Derimot vil aktivert kull være dyrere enn blekejord, som derfor kan utgjøre en større kostnad ved bruk i industriskala.

### **Silika**

Silika har den spesielle evnen at den i større grad kan adsorbere andre urenheter enn bare pigmenter, som såpe, fosfolipider og jern, men i tillegg har den effekten at den bryter ned oksidasjonsprodukter som peroksider og adsorberer sekundære oksidasjonsprodukter som fører til en oksidativ stabilere olje

(Patterson, 2009). På den annen side, kan den også bidra til oksidasjon på grunn av aktive polare overflater som vil kunne katalysere oksidasjonsreaksjoner.

### **Fiskeoljer**

Det foreligger noe generell litteratur på bleking av marine oljer (Hamm, 2009). Det eksisterer noe forskningslitteratur på bleking av råolje fra sardin og sild, men svært få arbeider fra makrell (Adeniyi og Bawa, 2006).

I en studie på karpeolje (Monte m.fl., 2015), ble oljen oppvarmet til på 70 °C med omrøring ved 40 omdr./min, og tilsatt en kombinasjon av kommersiell syreaktivert blekejord (Tonsil Supreme-110FF) og aktivert kull med en kontakttid på 20 minutter under vakuum på 720 mm Hg. Deretter ble blekejord og kull filtrert av oljen på en Büchner-trakt med lag av diatoméjord. Den optimale effekten ble funnet med 2 % blekejord (til oljemassen) og 10 % aktivert karbon i forhold til total adsorbentmasse, som ga det laveste tapet av karotenoidinnhold (44,4 %) og høyest reduksjon i oljefarge (87,5 %) og av TBA-verdi (79,7 %), som svarte til ca. 80 % reduksjon i sekundære oksidasjonsprodukter.

I en annen studie på råolje fra karpe (Crexli m.fl., 2010) ble blekettrinnet utført ved 70 °C og 40 omdr./min, med tilsetning av 5 % av adsorbenter, en blanding av aktivert blekejord og aktivert kull i mengdeforhold 9: 1, med en kontakttid på 20 min under vakuum på 720 mm Hg. Filtrering ble utført i en Büchner-trakt med et forlag av diatoméjord. Det ble oppnådd 50 % reduksjon i farge (Lovibond rødfargeindeks) og TBA-verdi, 33 % i anisidintall, 10 % i peroksidtall og 20 % i frie fettsyrer i oljen etter blekettrinnet.

Det finnes flere studier på raffinering av sardinolje. Garcia-Moreno m.fl. (2013) har studert bleking av degummed og nøytralisert sardinolje. Optimal verdi for Totox på 21 ble oppnådd ved 130 °C, og 5 vekt % syreaktivert kommersiell blekejord (Tonsil 278) i 60 min.

I en annen studie på sardinolje (Suseno m.fl., 2015) ble det benyttet en annen syreaktivert kommersiell blekejord (Miracle Filter Powder). Optimal effekt ble oppnådd med 3 vekt % blekejord, ved 50 °C i 15 minutter, som resulterte i da 22 % reduksjon av PV og 31 % reduksjon av frie fettsyrer.

I en annen studie på sardinolje (Suseno m.fl., 2011, 2017) er det benyttet en kommersiell vandig hvitt amorft luktfritt pulver, Magnesol XL. Resultatene viste at behandling med 1 og 3 vekt % Magnesol XL ved 25 °C i 20 min. reduserte signifikant syreverdi, peroksidverdi og innholdet av frie fettsyrer i sardinoljen. Den samme adsorbenten har også vist seg å ha en meget god effekt på fjerning av pigmenter/farge ved bruk av 5 % adsorbent ved 90 °C i 5 minutter (Suseno m.fl., 2012).

I en annen studie på sardinolje (Aidos, 2002) ble oljen bleket under vakuum i 30 minutter ved 90 °C med 4 % aktivert blekemiddel Tonsil Standard FF. Oljen blir avkjølt til 50 °C og filtrert og oppsamlet under nitrogen.

Charanyaa m.fl. (2017) har testet granulert aktivert kull, bentonitt og aktivert blekejord for bleking av råolje fra indisk sardin. 3 % aktivt kull ved 80 °C i 10 minutter under vakuum ga best effekt reduksjon i farge og det ble oppnådd en reduksjon på 90 % av frie fettsyrer, på 99 % i fosfolipider, og 100 % reduksjon av tungmetaller.

Magnesol XL er også rapportert brukt på malleolje (Srimiati m.fl., 2015), der det beste resultatet mht. reduksjon i peroksidverdi, anisidinverdi og frie fettsyrer ble oppnådd med 5 vekt % Magnesol XL ved 25 °C.

Til tross for noe tap av effektivitet på grunn av termodynamiske begrensninger (Chapman og Pfannkoch, 1992; Patterson, 2009), blir bleking med forskjellige typer leire eller karbon/kull fortsatt anvendt industrielt, da det forbedrer kvaliteten på sluttproduktet og fungerer godt i kombinasjon med kjemisk (lut) behandlet olje.

### 5.1.5 Vinterisering/koldklaring

Vinteriseringsprosessen består av en fraksjonert krystallisering der triglyserider med lavt og høyt smeltepunkt separeres ved delvis krystallisering i oljefasen. Målet med dette trinnet er å fjerne andelen triglyserider med høy andel mettede fettsyrer (stearin) som kan foreligge i større mengder i pelagiske oljer. Stearinfraksjonen har et høyt smeltepunkt og kan begynne å felle ut/krystallisere allerede ved romtemperatur. Krystalliseringsprosessen som normalt brukes, består i å kjøle oljen ned gradvis til temperaturer på 8 til 0 °C avhengig av spesifikasjonen på det endelige produkt. F. eks skal medisintan (Iecoris aselli oleum A) kunne holde seg klar etter 3 timers kjøling på isbad ( $0 \pm 0,5$  °C) (European Pharmacopoeia standard 1192). Krystallisering krever sakte kjøling for å oppnå store krystaller og stabile polymorfe former. Små krystaller, dannet ved rask nedkjøling, lar seg vanskelig filtreres. Krystallstørrelsen økes ved å holde lav temperatur i 24 til 48 timer før stearinfraksjonen separeres fra ved sentrifugering eller filtrering. På denne måten oppnår man en klar flytende olje ved ønsket temperatur. Det er utviklet tre typer teknologi for gjennomføring av prosessen (Kreulen, 1976):

1. Tørrfraksjonering der oljen kjøles sakte ned under skånsom omrøring og krystallisert fett separeres fra over et filter.
2. Lanza fraksjonering der oljen kjøles ned tilsvarende som for tørrfraksjonering. Krystallslørryen tilsettes deretter en detergentholdig vannløsning. Krystallfasen vil på grunn av detergenten slemmes opp i vannfasen og kan separeres fra over en separator.
3. Løsemiddelfraksjonering der krystalldannelsen skjer i en oljefase tilsatt et organisk løsemiddel. Etter nedkjøling separeres krystallene over et filter og løsemiddel fjernes fra de to fasene ved bruk av destillasjon. Vanlig brukte løsemidler er aceton og heksan.

### Fiskeoljer

Råolje fra sardin restråstoff er blitt vinterisert etter konvensjonell avsyring (lut) og bleking med Magnesol XL (Suseno m.fl., 2017). Vinterisering ble utført ved sentrifugering med hastighet på 10.000 omdr./min ved ulike temperaturer, 4 °C, 7 °C, og 10 °C i 15 minutter. Det ble oppnådd 5 % reduksjon i mengden mettede fettsyrer.

Vinterisering av råolje fra karpe restråstoff er utført av Crexi m.fl., (2010). Først fant nukleeringsprosessen sted i et kjølebad fra 30 til 5 °C, med en kjølehastighet på 0,62 °C / min og omrøring ved 500 omdr./min. I andre og tredje trinn ble krystallisasjonsprosessen utført uten omrøring, fra 5 til 4 °C med en kjølehastighet på 2,7 °C / time og fra 4 °C til -5 °C med en kjølingshastighet på 0,25 °C / time. Separasjon av flytende olein og faste stearinfraksjoner ble utført ved sentrifugering ved 7000 g i 20 minutter.



Råolje fra alkalisk nøytralisert og deodorisert råolje fra abbor (*Lates niloticus*) restråstoff er blitt vinterisert (Aloo 2014). Oljen ble avkjølt til 13 °C og deretter videre til 8 °C i løpet av 6 dager uten tilsetning av kjemikalier og deretter dekantert og filtrert (Aloo 2014).

I en studie er bruk av løsemiddel (acetone og heksan) brukt til vinterisering av råolje fra fisk (Cunha m.fl., 2009). Under vinteriseringen ble bleket olje avkjølt gradvis fra 30 C til -5 C i tre faser. Løsemiddel-type, mengdeforhold og omrøring ble undersøkt. Bruk av 40 vekt % heksan som løsningsmiddel, uten omrøring i det andre kjøletrinnet, ble funnet å være optimalt. En olje med flerumettet fettsyreinnhold (PUFA) på 64,3 % ble oppnådd med økning på ca. 9,2 % i innholdet av umettede fettsyrer og en reduksjon på 13,3 % i innholdet av mettede fettsyrer.

Soleimanian m.fl. (2015) har optimalisert tørrfraksjonering av olje fra lanternefisk (*Benthosema pterotum*) produsert i Iran. Rask vs. sakte nedkjøling og tilsetning av stearin for initiering av krystaldannelse er sammenlignet. De beste betingelser ble funnet å være en totrinns prosess med nedkjøling til 5 °C, filtrering og videre nedkjøling til 0 °C. Sakte nedkjøling, omrøring og tilsetning av kime for initiering av krystaldannelse var positivt for dannelse av store krystaller og økt utbytte. Det ble funnet en økning i nivå av n-3 PUFA fra 23,1 % i råoljen til 35,7% i den vinteriserte oljen. Utbytte av olein og PUFA var hhv. 35 % og 51,5 %. Tilsvarende ble mettede og monomettede fettsyrer redusert.

En islandsk patentert metode som nylig er blitt foreslått til vinterisering av omega-3 rike råoljer fra sild, makrell og lodde med opptil 40 % stearininnhold baserer seg på ekstraksjon ved bruk av etylesterfraksjonen fra første destillasjonstrinn ved konsentrering av EPA og DHA (Patent WO 2017/009874). Ved bruk av 33 % av etylesterfraksjonen, og langsom nedkjøling og gjentatt filtrering fra 11 ned til 0 °C, var det mulig å oppnå en flytende og klar olje fri for stearin ved 0-4 °C. Oljeutbyttet var på 83 % for makrell, 76 % for lodde og 88 % for sildeolje. Samme prosedyre ble også gjennomført ved bruk av etyloleat på råolje fra sild, som ga et utbytte på 76 % med klar flytende olje ved 0-4 °C.

Metoden ble i tillegg testet ut i industriell skala med et tradisjonelt vinteriseringsanlegg på råolje fra sild og en blanding av råolje fra sild og torskelerver. Resultatene viste at et tradisjonelt industrielt vinteriseringsanlegg ikke er egnet til vinterisering av sildeolje med den nye metoden og bl.a. ga alt for lavt utbytte (< 40 %). Metoden anvendt på blanding av råolje fra sild og torskelerver oppnådde et oleinutbytte på 59 % på et tradisjonelt industrielt vinteriseringsanlegg.

### 5.1.6 Deodorisering

Deodorisering av fiskeolje utføres tradisjonelt ved bruk av dampstripping ved høy temperatur (<200 °C) og redusert trykk (2-5 mbar). Hensikten med dette trinnet er å bryte ned eventuelle rester av peroksid, fjerne flyktige forbindelser (hovedsakelig aldehyder og ketoner som bidrar til smak og lukt), og frie fettsyrer. Luktstoffene i oljen er vanligvis biprodukter fra lipid, protein og aminosyre nedbrytning. Dette kan skyldes mikrobiell, autooksidering eller lipoksygenaseaktivitet (Lin m.fl., 1990). Deodoriseringsbetingelsene bidrar også til fjerning av uønskede organiske forbindelser (PCB, lette PAH, pesticider etc.) og til reduksjon av rester av fargestoffer i oljen ved termisk nedbrytning (såkalt varmebleking). Effekt av deodoriseringsstrinnet er avhengig av temperatur, tid, trykk og mengde strippedamp (De Greyt, 2012; **Tabell 1**). I tillegg vil apparaturdesign og type (batch, semikontinuerlig eller kontinuerlig), ha stor betydning.

Tabell 1 Effekt av prosessvariabler på kvalitet av deodorisert olje (De Greyt, 2012)

Kvalitetsparameter	Temperatur	Tid	Trykk	Damp
Smak	+	++	+	++
Farge	++	+	-	-
FFA stripping	++	-	++	+
Trans fettsyre dannelse	++	++	-	-
Tokoferol/kolesterol stripping	++	-	++	+
Fjerning av miljøgifter (POPs)	++	-	++	+

- liten eller ingen effekt; + signifikant effekt; ++ stor effekt

Temperatur og tid er styrende parametere for effekt av deodorisering. For marine oljer er det imidlertid foretrukket å bruke temperaturer under 200 °C for å unngå syklisering og polymerisering av langkjedete flerumettede fettsyrer (León-Camacho m.fl., 2001; Fournier m.fl., 2006). For høy temperatur kombinert med lang deodoriseringstid vil være uheldig for stabiliteten til oljen da betydelige mengder av de naturlige antioksidantene (f.eks. tokoferoler) vil gå tapt (Mezouari m.fl., 2006). Molekylærdestillasjon som brukes til fjerning av miljøgifter er ikke en effektiv «deodorisator». Det samme gjelder bruk av dampstripping med pakkede kolonner grunnet for kort oppholdstid (De Greyt, 2012). For fiskeolje anbefales det bruk av batch eller semikontinuerlig apparatur som gir tilstrekkelig oppholdstid ved lav temperatur, for å oppnå en stabil og nøytral olje (De Greyt, 2012).

Bruk av nitrogen som strippegass har blitt undersøkt for å unngå oksidasjon av oljen, bedre destillatkvaliteten og redusere tap av olje (Decap m.fl., 2004). Ulempen er at nitrogen er en ikke-kondenserbar gass og krever et betydelig større vakuumanlegg og dermed økte investeringer.

Det er en rekke kjemiske endringer som kan finne sted under deodoriseringen, slik at betingelsene bør være så skånsomme som mulig mht. temperatur, tid og vakuum spesielt for marine oljer med høy andel flerumettet fett (Fournier m.fl., 2006, 2007). Selv om hydroperoksidene blir ødelagt under bleking, kan noen nye primære og sekundære oksidasjonsprodukter bli dannet under varmebehandling som omdannes videre til flyktige og ikke-flyktige forbindelser. Ikke-flyktige produkter som dannes med økende temperatur under deodorisering er sykliske monomerer av fettsyrer, geometriske og posisjonsisomerer (trans, cis) av EPA og DHA, asykliske dimerer av triglyserider, dvs. upolare dimerer samt oksygenerte dimerer (Leon-Camacho m.fl., 1999; Ruiz-Méndez an Dobarganes; Fournier m.fl., 2006; Mjøs og Solvang, 2006).

Etter deodorisering blir oljen avkjølt og tilsatt antioksidant. Det er i tillegg vanlig å tilsette sitronsyre for å kompleksbinde metallrester og øke stabiliteten under lagring.

### Fiskeoljer

Under raffinering av råolje fra karpe restråstoff utført av Crexi m.fl. (2010), ble deodorisering av den vinteriserte oljen utført ved 220 °C i 60 minutter med 5 % damp (basert på oljemasse) under vakuum (750 mmHg). Det ble oppnådd en reduksjon på 17 % frie fettsyrer, mens det fant sted en økning i oksidasjonsparametre (PV, AV og TBA), som var 2-3 ganger høyere enn i den vinteriserte oljen, sannsynligvis som et resultat av kombinasjon av for høy temperatur og oksygen i vanddampen.

Deodorisering av tunfisk råolje fra enzymatisk hydrolysert restråstoff er blitt foretatt av de Oliveira m.fl. (2016). Optimale betingelser mht. fjerning av flyktige komponenter ble oppnådd ved 160 °C i 1 time etterfulgt av 200 °C i 1 time og 200 omdr./min under vakuum (650-700 mmHg).

Siden fiskoljer med høy andel flerumettede fettsyrer er følsomme for høy temperatur, har Chung og Lee (2009) undersøkt en ny deodoriseringsprosess basert på adsorpsjon ved bruk av nanoporøse zeolitter på råoljer fra fisk. De oppnådde en betydelig reduksjon av trimetylammin (fiskelukt) ved lave temperaturer (50 °C). Selv om adsorpsjonsprosesser har mange fordeler i forhold til konvensjonell dampstripping, har det vist seg at de fleste umettede aldehyder som er ansvarlige for oksidasjon av flerumettede fettsyrer, ikke fjernes like effektivt som ved dampstrippingsprosessen. Dette ser derfor ikke ut til å være noe alternativ for fiskeoljer.

Bruk av membranteknologi med nanofilter er en ny teknikk som er blitt testet ut på lab på råoljer fra tunfisk og blekksprut (Fang m.fl. 2017). I denne studien er konvensjonell deodorisering ved stripping blitt sammenlignet med membranteknologi kombinert med organisk løsemiddel (heksan), basert på et kommersielt nanofilter, LNG™ NS036 med en molekylvekt cut-off på 360 Da. Fiskeolje ble blandet med heksan i forholdet 1:3 (v/v). Blandingen (500 ml) ble deretter behandlet ved hjelp av nanofiltreringsmembran. Det valgte trykket var 20 bar, og operasjonen ble utført ved romtemperatur (20 ±2 °C) i 30 minutter. Det gjenværende organiske løsningsmiddel i retentatet ble fjernet med vakuumrotavapor ved 60 °C i 30 minutter. Resultatene viste en betydelig nedgang i flyktige komponenter, ca. 80 % (målt med headspace GC/MS), 7,3 ganger reduksjon i luktverdi for tunfiskoljen og 13 ganger reduksjon i luktverdi for blekksprutoljen.

Råolje fra sild (Aidos, 2002) er blitt deodorisert i 5 timer ved 180-185 °C og 3-5 mbar. Under oppvarming og kjøling ble 50 mg/kg sitronsyre tilsatt oljen som 50% løsning. Damp «flushing» ble avbrutt på 110 °C og erstattet med nitrogen «flushing» mens oljen ble nedkjølt til <40 °C under vakuum. Oljen gikk deretter gjennom er poleringsfilter og samlet inn i polypropylen beholdere.

Karahadian og Lindsay (1990) har sammenlignet effekten av sur og basisk damp under deodorisering av fiskeolje. Menhaden, torskelever og ørretolje ble strippet ved 100- 210 °C. Best resultat ble oppnådd ved bruk av sur damp (0,025 N eddisyre). Sammenlignet med ren vanddamp ga sur damp tilsvarende sensorisk kvalitet i temperaturområdet 100-150 °C, men med mindre grad av fisk/brent og grønn smak. Redusert fiskesmak ble forklart med syrekatalysert hydrering av aldehyder med fiskelukt og smaksamuflerende effekt av tr,cis-2,6-nonadienal.

### **5.1.7 Fjerning av miljøgifter**

Fiskeolje kan i mange tilfeller inneholde persistente organiske miljøgifter (POPs) over de grenseverdier som er fastsatt i Europeisk lovgivning. Faktorer som påvirker nivået er den generelle forurensings-situasjonen i det farvannet som fisken er fanget (Joas m.fl., 2011), nivå i næringskjeden for det fisken beiter på (dvs. POPs akkumulerer oppover i næringskjeden), alder på fisken og sesongvariasjoner i fettnivå (Oterhals, 2011). Sistnevnte faktor reflekter det faktum at POPs-forbindelsene er lipofile og vil fordele seg i det tilgjengelige fettvevet i fisken. Når fettnivået reduseres vil dette medføre en akkumulering av POPs med resulterende høyere nivå i den separerte oljen, dvs. nivået er omvendt proporsjonalt med fettnivået.

For fiskeoljer er det spesielt de persistente organiske miljøgiftene dioksiner (PCDD), furaner (PCDF), dioksinlignende PCB (DL-PCB), ikke-dioksinlignende PCB (NDL-PCB) og organoklorpesticider (OCP) som

er aktuelle å fjerne. Polybromerte flammehemmere (PBDE) har også vært i fokus, men EFSA har konkludert med at foreliggende nivå ikke medfører noen helserisiko for befolkningen (EFSA, 2011). Nivå av PAH er normalt lave i fiskeoljer. Industrielt anvendes det i dag tre teknologier for fjerning av POPs: aktivt kull adsorpsjon, dampstripping (deodorisering) og molekylærdestillasjon. Disse har forskjellig effektivitet på de respektive hovedgrupper av POPs og valg av teknologi eller kombinasjon av teknologier må besluttes basert på nivå i råoljen og hvilke krav som stilles av myndigheter i det respektive land. I tillegg vil det kunne foreligge krav fra kunde eller markedsnisje som medfører at nivået bør være lavere enn det som stilles basert på vurdering av mattrygghet.

Aktivt kull adsorpsjon er den mest anvendte teknologien for fjerning av POPs i fiskeolje med typisk dosering på 1-3 kg/tonn olje (De Greyt, 2012). Effektiv adsorpsjon er avhengig av molekylenes grad av planar struktur og dette medfører at aktivt kull er mest effektiv for fjerning av dioksiner, furaner, PAH, og delvis dioksinlignende PCB, HCB og DDT (Oterhals m.fl., 2007; Jensen m.fl., 2011; Ortiz m.fl., 2011; Yebra-Pimentel m.fl., 2014). Teknologien har minimal effekt på ikke-dioksinlignende PCB og ingen effekt på PBDE.

Deodorisering anvendes ofte i kombinasjon med aktivt kull adsorpsjon. De to teknologiene supplerer hverandre i det resterende POPs etter aktivt kull behandling vil være de mest flyktige komponentene (PCB, pesticider, lavmolekylære PAH) som kan reduseres ved bruk av dampstripping. Molekylærdestillasjon anvender høyere temperatur og lavere trykk enn deodorisering og effektiviteten er dermed betydelig høyere. De fleste POPs fjernes effektivt med denne teknologien med noe lavere nivå for høymolekylære PAH og PBDE (Oterhals m.fl., 2010). Bruk av superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraksjon har vist effekter på PCDD/F og DL-PCB, men litt lavere enn aktivt kull, men med betydelig større tap av olje (Kawashima m.fl., 2009).

### **Fiskeoljer**

Det finnes en rekke leverandører og forskjellige teknikker for aktivering av aktivt kull (Bansal og Goyal, 2005). Maes m.fl. (2005) har testet fire kvaliteter ved standardiserte betingelser og nivå 0,1 og 0,5% på vektbasis. Generelt ble det oppnådd en meget høy reduksjon av PCDD/F (hhv. 83-93 % og 97-100 %), noe lavere for non-ortho PCB (hhv. 24-38 % og 72-93 %) og lavest for mono-ortho PCB (hhv. 3-11 % og 16-28 %). Nivå n-3 PUFA, PV, AV og OSI ble ikke påvirket. Noe reduksjon i spormineraler (Fe, Mg, Ca) ble observert og en kvantitativ fjerning av rester av fosfor.

Oterhals m.fl. (2007) har optimalisert betingelser for fjerning av PCDD/F og DL-PCB ved bruk av 0,5 % aktivt kull. Prosessparametere som ble studert var tid og temperatur. PCDD/F ble fjernet 90-99 %, non-ortho PCB 54-87 % og mono-ortho PCB 4-21 %. Det ble ikke observert noen effekt på PBDE-nivået. Det kunne ikke defineres noen felles optimum prosessbetingelser for alle POPs. Generelt var adsorpsjonen av PCDD/F meget raskt mens adsorpsjon av mono-ortho PCB krever mer tid og høyere temperatur. Det ble ikke påvist noen effekt på oksidasjonsnivået i oljen (PV og AV) etter aktivt kull behandlingen.

Ortiz m.fl. (2011) har testet en rekke forskjellige produkter av aktivt kull og bekreftet høy affinitet til PCDD/F (99 %) og noe lavere for dioxin-lignende PCB (81 %). Ikke-dioxinlignende PCB ble redusert med 16 %. Av pesticider ble heksaklorbenzen (HCB) redusert med 70 % og DDT med 41 %. Det ble også observert 10 % reduksjon av PBDE.

Yebra-Primentel m.fl. (2014) har studert fjerning av PAH i fiskeolje med bruk av flere forskjellige typer aktivt kull. De mest effektive adsorbentene fjernet PAH fra 80 til 100 % med økende effekt for høymolekylære forbindelser.

Fernandez-Gonzalez m.fl. 2014 har testet effekten av flere typer aktivt kull ved 2 % dosering (25 °C og 6 timer kontakttid) på fjerning av PCB. Det ble oppnådd opptil 95 % fjerning av non-ortho PCB, 37 % mono-ortho PCB og 10 % PCB markører (PCB6).

EFSA Panel of Contaminants in the Food Chain (CONTAM) har publisert en rapport som evaluerer effekten av aktivt kull filtrering for fjerning av dioksiner og dioksinlignende PCB fra fiskeolje (EFSA CONTAM Panel, 2017). Teknologien baserer seg på ferdige MOBICOB 2000 filtertanker fra DESOTEC etterfulgt av et poleringsfilter. Filtertanken skiftes ut med ny når adsorpsjonskapasiteten er brukt opp. Basert på informasjon fra industrien og publiserte studier ble det konkludert med at teknologien ga en olje med restnivå PCDD/F og DL-PCB i samsvar med gjeldende EU-krav for fiskeolje anvendt i fôr.

Motstrøms superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraksjon er studert av Kawashima m.fl. (2009) for fjerning av PCDD/F og DL-PCB i fiskeolje. Ved bruk av prosessbetingelser 70 °C, 30 MPa og CO<sub>2</sub>/olje ratio på 72 ble det oppnådd 93 % reduksjon av PCDD/F og 85 % reduksjon av DL-PCB. En stor ulempe med denne prosessen er at betydelige mengder av triglyserider co-ekstraheres med miljøgiftene. Utbytte av rensed olje var bedre enn for en batchprosess, men likevel kun 65 %. Dette gjør prosessen mindre attraktiv i industriell sammenheng.

Hilbert m.fl. (1998) har undersøkt effekt av deodorisering ved 180 °C og bruk av 7 % strippedamp ved 5 mbar på reduksjon av PCB og OCP. De mest flyktige forbindelsene ( $\alpha$ -HCH, lindan, HCB) ble fjernet til under deteksjonsnivå. Mindre flyktige OCP (dieldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDD) og PCB ble halvert.

Carbonnelle m.fl. (2006) har undersøkt effekt av temperatur (180–220 °C) på fjerning av dioksiner og dioksinlignende PCB i fiskeolje ved bruk av dampstripping i en pakket kolonne og batchapparat. Effekt på de enkelte miljøgifter økte med økende temperatur. Høyest effekt ble oppnådd for mono-ortho PCB (64 % ved 190 °C i pakket kolonne) hvilket bekrefter at teknologien kan anvendes i kombinasjon med aktivt kull for fjerning av denne gruppen miljøgifter.

Superkritisk ekstraksjon er blitt testet for fjerning av miljøgifter i fiskeolje av Kawashima m.fl. (2009). Fjerning av PCDD/F og DL-PCB økte med økende temperatur og CO<sub>2</sub>/olje-ratio, men effekten avtok med økende molekylvekt. Best effekt ble oppnådd ved 30 MPa og temperatur i området 60-70 °C. Ved bruk av CO<sub>2</sub>/olje ratio på 72 ble det oppnådd 84 % reduksjon av PCDF, men kun 35 % av PCDD. DL-PCB ble redusert med 93 %. Bruk av superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraksjon må dermed kombineres med aktivt kull behandling for effektivt å få redusert det totale TEQ-nivået i oljen. I tillegg ble det oppnådd et oljeutbytte på kun 65 %.

## 5.1.8 Oppsummering State of the art

### Degumming

Degumming anvendes oftest som det første trinnet i rensing av oljer for fjerning av polare lipider (fosfolipider). Fosfolipider vil kunne opptre som emulgatorer og medføre økt tap av nøytrale lipider under avsyring av oljen samt gi en dårligere kvalitet på sluttprodukt. Oljen blandes med 1-3 % vann og vannfasen separeres fra oljen ved sentrifugering eller membranfiltrering. Alternativt kan det benyttes

lipase enzymer for omdanning av de ikke-hydratiserbare fosfolipidene. Enzymatisk degumming har så langt kun funnet noe anvendelse innen storskala raffinering av vegetabiliske oljer. Det er imidlertid vanlig at fiskeolje poleres etter separasjon fra dekantervæsken under ekstraksjon av oljen fra råstoffet. Dette gjøres ved tilsetning av varmt vann etterfulgt av et nytt separasjonstrinn. Poleringen fungerer i praksis som et degummingstrinn der hydratiserbare fosfolipider fjernes. Fiskeoljer inneholder av denne grunn generelt lave nivå av polare lipider og for en råolje med høy kvalitet vil det ikke være nødvendig å anvende degumming under raffinering av oljen.

### **Avsyring**

Avsyring eller nøytralisering er et viktig innledende prosesstrinn i oljeraffineringen og har stor betydning for sluttkvaliteten av den ferdig raffinerte oljen. Marine råoljer inneholder typisk 1-8 % frie fettsyrer, avhengig av råstoffkvalitet og prosessbetingelser. Disse bør fjernes før videre foredling av oljen fordi de kan bidra til ytterligere oksidasjon av oljen og bi/usmak.

Fysisk avsyring dvs. stripping med dampdestillasjon kan egne seg til industriell avsyring av vegetabiliske oljer, men er ikke noe industrielt alternativ for marine oljer pga risikoen for oksidasjon ved de høye temperaturene som må til.

Biologiske metoder er ikke tilstrekkelig effektive mht. fjerning av kortkjedete frie fettsyrer. Enzymatisk reesterifisering representerer for høye enzymkostnader mht. industriell bruk til lavkonsentratoljer, men kan være et alternativ i produksjon av høykonsentrat (EPA og DHA) oljer opp til et visst volum industrielt.

Bruk av superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraksjon er en miljøvennlig og trygg metode uten bruk av løsemiddel og har vist seg å være en skånsom metode for separasjon av frie fettsyrer, da den utføres ved relativt lave temperaturer og ved fravær av luft/oksygen. Men ulempen er at dette er en kostbar teknikk, spesielt med tanke på industriell anvendelse, og er hovedgrunnen til at den ikke enda er tatt i bruk industrielt. Metoden vil først kunne bli lønnsom i fremstilling av dyre høykvalitet spesialoljer og råoljer med høy andel frie fettsyrer, der kvaliteten og renheten til de ekstraherte komponentene er av stor betydning.

Membranfiltrering med dagens teknologi har sine begrensninger mht. anvendelse på fiskeoljer pga for dårlig selektivitet (for små forskjeller i molekylvekt) mellom frie fettsyrer og triglyserider. Selv i kombinasjon med løsemiddel er ikke effektiviteten tilstrekkelig mht. fjerning av frie fettsyrer. Dessuten er ikke metoden egnet til fiskeoljer på grunn av nedbrytning av flerumettede fettsyrer med mindre avsyringen kan utføres uten nærvær av oksygen, dvs under nitrogen. De eksisterende teknikkene er dessuten fortsatt på forskningsstadiet, og pga. de nevnte begrensninger mht. bruk på marine oljer, og utgjør ingen alternativ for kommersiell industriell anvendelse. Spesielt er kapasiteten til membranfiltrene altfor dårlig med hensyn til industriell anvendelse. Det er behov for ytterligere studier på nye tilnærminger med tanke på denne teknologien.

Tradisjonell alkalisk avsyring ved bruk av lut har den svakheten at tap av olje kan være betydelig. Til tross for denne ulempen, er alkalisk avsyring fortsatt i kommersiell bruk i mange næringer og den meste anvendte metoden i produksjon av fiskeoljer på grunn av effektiv reduksjon av frie fettsyrer opp til ønsket nivå, uavhengig av innhold av frie fettsyrer i råoljen. Kjemisk nøytralisering reduserer mengde frie fettsyrer til et akseptabelt nivå - ned til 0,03 % - avhengig av egenskapene til oljen. Såpefasen dannet under avsyringen har dessuten den kombinerte virkningen av rensing, degumming og delvis

avfarging av oljen. Derfor foregår fortsatt avsyring på industrielt nivå på tradisjonelt vis ved bruk av alkalisk avsyring.

### **Bleking**

Bleking er en viktig prosess der hensikten er å fjerne urenheter som fargestoffer, oksidasjonsprodukter (peroksider), spormetaller, fosfolipidrester og rester av såpe og vann fra nøytraliserte oljer. Den konvensjonelle metoden er å benytte adsorbenter i form av leirmineraler (blekejord) eller kull eller kombinasjon av begge, som blandes inn i oljen under omrøring, oppvarming og vakuu. Etter blekingen fjernes adsorbentene mekanisk fra oljen ved filtrering.

Til tross for noe tap av effektivitet på grunn av termodynamiske begrensninger, blir bleking med forskjellige typer leire eller karbon/kull fortsatt anvendt industrielt, da det forbedrer kvaliteten på sluttproduktet og fungerer godt i kombinasjon med kjemisk (lut) behandlet olje.

Det eksisterer en del forskningslitteratur på bleking av råolje fra sardin og sild, men kun enkelte arbeider fra makrell. Mengde blekejord som anvendes på fiskeoljer varierer fra 0,5 opp til 2 % avhengig av kvaliteten på oljen. Blekingen utføres oftest under et trykk på ca. 50 mbar (vakuu), og temperaturer på 80-100 °C. Innledende tester på lab vil være påkrevd for å komme frem til de optimale betingelser mht. blekeeffekt og bevaring av oljekvaliteten. Tørrbleking har vært mest anvendt, mens våtbleking, dvs. at oljen ikke er helt tørket etter avsyringstrinnet har vist seg å være mere gunstig mht. fjerning av klorofyll og fosfatider. Ulike filterdesign har vært benyttet til fjerning av adsorbent etter bleking, men det er viktig å påse at oljen ikke blir eksponert for mye for luft/oksygen under pressing for å unngå oksidasjon. Det vil også kunne forekomme betydelige tap av oljen ved filtrering, som bør begrenses.

### **Vinterisering/Koldklaring**

Vinteriseringsprosessen består av en fraksjonert krystallisering der triglyserider av med lavt og høyt smeltepunkt separeres ved delvis krystallisering i oljefasen. Målet med dette trinnet er å fjerne andelen triglyserider med høy andel mettede fettsyrer (stearin) som kan foreligge i større mengder i pelagiske oljer. Stearinfraksjonen kan begynne å felle ut/krystallisere allerede ved romtemperatur. Krystallisering krever sakte kjøling for å oppnå store krystaller og stabile polymorfe former. Små krystaller, dannet ved rask nedkjøling, lar seg vanskelig filtreres. Utfelte krystaller fjernes ved filtrering og på denne måten oppnår man en klar flytende olje ved ønsket temperatur.

Det er beskrevet noen studier på tørrfraksjonering av fiskeoljer. For å unngå filtreringsproblemer med stor andel stearin i oljen, anvendes det en flertrinns prosess der oljen kjøles ned og filtreres før videre nedkjøling av den flytende fasen. De fleste studier viser at nivået av flerumettede fettsyrer i oleinfasen kun øker med noen få prosent etter koldklaring. Et unntak er et studie basert på olje fra lanternefisk der man i en to-trinns prosess (nedkjøling til 5 og deretter 0 °C) har oppnådd en økning i nivå n-3 PUFA fra 23,1 % i råoljen til 35,7 % i den vinteriserte oljen. Utbytte av olein og PUFA var hhv. 35 % og 51,5 %.

Bruk av et organisk løsemiddel muliggjør økt utbytte av oleinfraksjon grunnet lavere grad av flytende olje inkludert i stearinfraksjonen. Vanlig brukte løsemidler er aceton og heksan. Et patentert alternativ er bruk av etylestere av fettsyrer fra konsentrering av EPA og DHA i fiskeolje. Ved bruk av langsom nedkjøling og gjentatt filtrering fra 11 ned til 0 °C, var det mulig å oppnå en flytende og klar olje fri for stearin ved 0-4 °C. Oljeutbyttet var på 83 % for makrell, 76 % for lodde og 88 % for sildolje.

## Deodorisering

Deodorisering av fiskeolje utføres tradisjonelt ved bruk av dampstripping ved høy temperatur (<200 °C) og redusert trykk (2-5 mbar). Hensikten med dette trinnet er å bryte ned eventuelle rester av peroksider, fjerne flyktige forbindelser (hovedsakelig aldehyder og ketoner som bidrar til smak og lukt), og frie fettsyrer. Deodoriseringsbetingelsene bidrar også til fjerning av uønskede organiske forbindelser (PCB, lette PAH, pesticider etc.) og til reduksjon av rester av fargestoffer i oljen ved termisk nedbrytning (såkalt varmebleking). Effekt av deodoriseringstrinnet er avhengig av temperatur, tid, trykk og mengde strippedamp. I tillegg vil apparaturdesign og type (batch, semikontinuerlig eller kontinuerlig) ha stor betydning.

Temperatur og tid er styrende parametere for effekt av deodorisering. Bruk av for høy temperatur vil kunne medføre syklisering og polymerisering av langkjedete flerumettede fettsyrer og dannelse av transfettsyrer. For fiskeolje anbefales det bruk av batch eller semikontinuerlig apparatur som gir tilstrekkelig oppholdstid ved lav temperatur, for å oppnå en stabil og nøytral olje. Etter deodorisering blir oljen avkjølt og tilsatt antioksidant. Det er i tillegg vanlig å tilsette sitronsyre for å kompleksbinde metallrester og øke stabiliteten under lagring.

Det finnes få relevante studier på deodorisering av fiskeoljer. Publiserte data er som oftest basert på labskala apparatur og kan i liten grad brukes til oppskalering av prosessbetingelser. Bruk av nitrogen som strippedamp er beskrevet, men gir ikke forbedret kvalitet på oljen. Fortrinnet er en renere destillatfraksjon, men krever også økte investeringskostnader for vakuumanlegget. Bruk av en sur damp er vist å gi sammenlignbar sensorisk kvalitet med ren damp i temperaturområdet 100-150 °C, men med mindre grad av fisk/brent og grønn smak.

For å unngå bruk av høy temperatur er ny deodoriseringsteknologi basert på adsorpsjon og membranfiltrering testet ut på fiskeolje. Ved bruk av nanoporøse zeolitter er det oppnådd en betydelig reduksjon av trimetylamin (fiskelukt) ved lave temperaturer (50 °C). De fleste umettede aldehyder ble imidlertid ikke fjernet like effektivt som ved dampstripping. Bruk av membranteknologi er testet ut på tunfisk- og blekksprutolje. Oljen ble løst i heksan før filtrering over et nanofilter med cut-off på 360 Da. Teknologien ga en betydelig nedgang i flyktige komponenter (80 %) og hhv. 7,3 og 13 ganger reduksjon i luktverdi for tunfisk og blekksprutoljen.

## Fjerning av persistente organiske miljøgifter (POPs)

For fiskeoljer er det spesielt de persistente organiske miljøgiftene dioksiner (PCDD), furaner (PCDF), dioksinlignende PCB (DL-PCB), ikke-dioksinlignende PCB (NDL-PCB) og organoklorpesticider (OCP) som er aktuelle å fjerne. Nivå av PAH er normalt lave i fiskeoljer. Industrielt anvendes det i dag tre teknologier for fjerning av POPs: aktivt kull adsorpsjon, dampstripping (deodorisering) og molekylærdestillasjon. Disse har forskjellig effektivitet på de respektive hovedgrupper av POPs og valg av teknologi eller kombinasjon av teknologier må besluttet basert på nivå i råoljen og hvilke krav som stilles av myndigheter i det respektive land. I tillegg vil det kunne foreligge krav fra kunde eller markedsnisje som medfører at nivået bør være lavere enn det som stilles basert på vurdering av mattrygghet.

Aktivt kull adsorpsjon er den mest anvendte teknologien for fjerning av POPs i fiskeolje med typisk dosering på 1-3 kg/tonn olje. Effektiv adsorpsjon er avhengig av molekylenes grad av planar struktur



og aktivt kull er mest effektiv for fjerning av dioksiner, furaner, PAH, og delvis dioksinlignende PCB, HCB og DDT. Teknologien har minimal effekt på ikke-dioksinlignende PCB og ingen effekt på PBDE.

Deodorisering anvendes ofte i kombinasjon med aktivt kull adsorpsjon. De to teknologiene komplementerer hverandre i det resterende POPs etter aktivt kull behandling vil være de mest flyktige komponentene (PCB, pesticider, lavmolekylære PAH) som kan reduseres ved bruk av dampstripping. Molekylærdestillasjon anvender høyere temperatur og lavere trykk enn deodorisering. De fleste POPs fjernes effektivt med denne teknologien, men med noe lavere nivå for høymolekylære PAH og PBDE. Bruk av superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraksjon har vist litt lavere effekter på PCDD/F og DL-PCB sammenlignet med aktivt kull, men med betydelig større tap av olje.

## 6 Material og metoder

### 6.1 Prøvemateriale

Makrellråoljen ble produsert av makrellbiprodukter i SINTEFs forsøkskontainer ved Pelagias anlegg i Selje i oktober 2017. Den ble i desember fraktet i 1000 liters IBC-kontainere til Epax i Ålesund der den ble varmet til ca 40 °C før filtrering for å fjerne proteinrester som prosessen i Selje ikke hadde fjernet pga tekniske problemer. Etter filtrering gjennom posefilter tidlig i desember 2017 ble to kontainerne stående kjølig i produksjonslokalene før tilsetning av 1,2 mg/g mixed tokoferol som antioksidant til den ene kontaineren. Dette ble gjort 29.1.2018. Begge containere ble videre satt på permanent lager som holder sval temperatur; ca 10 °C).

En representativ prøve av dette materialet har id A18-041 og ble analysert 29.1.2018. Prøven ble tatt fra kontaineren med tilsatt antioksidant. En antar at analyseverdiene vil være like ved fylletidspunktet for de to kontainerne.

Det ble besluttet å bruke oljen fra kontaineren UTEN tilsatt mix-tokoferol for dette FHF-prosjektet.

Før prøveuttak til NOFIMA, ble kontaineren varmet til ca 40°C med bruk av «elektrisk magebelte» og oljen ble homogenisert med bruk av lanse med kraftig nitrogenblåsing i bunnen av kontaineren. Det ble tatt ut representative prøver til NOFIMA 3. mai 2018 (id: F18-167) som ble sendt til Nofima 29. mai 2018.

Det samme prøvematerialet ble analysert i QC-laboratoriet til Epax for noen kvalitetsparametere og med følgende resultater:

Prøve-id: F18-167 (uten antioxidant, analysert hos Epax)

- Anisidintall: 7,4
- Peroksid tall: 0,9 meq/kg
- Totox: 9,2 (Totox=PVx2+AV)
- Syretall: 1,2 mg KOH/g

Følgende resultater foreligger fra tidligere uttak og analyser av makrellråoljen:

Etter filtrering av råoljen 7.12.2017.

Prøve-id: F17-368 (uten antioxidant, analysert hos Epax)

- Anisidintall: 6,6
- Peroksid tall: 0,5
- Totox: 7,6
- Syretall: 1,4

Prøveuttak fra 29.01.2018. Denne prøven er fra kontainer tilsatt mix tokoferol

Prøve-id: A18-041 (med mix tokoferol, analysert hos Epax)

- Anisidintall: 4,4
- Peroksid tall 1,1 meq/kg
- Totox: 7
- Syretall: 1,0

Tilsvarende prøve analysert hos BioLab (Nofima) (A18-041, se **Vedlegg**):

Prøve-id: A18-041 (med mix tocoferol, analysert hos Nofima)

- Anisidintall: 3,4
- Peroksid tall 3,3 meq/kg
- Totox: 10,0
- Syretall: 1,0

## **6.2 Metoder**

### **6.2.1 Peroxid og anisidin tall (PV og AV)**

PV og AV verdier er et mål på harskningsgrad/oksidasjon i en olje. Vi skiller mellom oljens primære oksidasjonsprodukter (PV) og de sekundære oksidasjonsprodukter (anisidintall, AV). Lave verdier betyr at man har liten oksidasjon i oljen og høye verdier betyr at man har mye oksidasjon i oljen. Oksidasjonsskalaen går fra 1- 70 for PV og 1-100 for AV. Det er ønskelig med så lave PV og AV verdier som mulig.

Bestemmelse av Peroksid tall ble utført i henhold til metoden AOCS Cd 8b-90 ved Nofima Biolab i Bergen. Denne metoden kan anvendes på vegetabiliske, marine og animalske oljer og fett med peroksid tall <70. Prinsippet for metoden er bestemmelse av forbindelser som oksiderer kaliumjodid ved betingelser gitt av metoden. Disse forbindelsene er antatt å være peroksider eller andre lignende produkter fra fettoksidasjon. Det ble analysert 5 gram med to gjentak per prøve.

Bestemmelse av Anisidintall ble utført etter metoden AOCS Cd 18-90 ved Nofima Biolab i Bergen. Anvendelsesområdet for denne metoden er for vegetabiliske, marine og animalske oljer og fett. Metoden kan ikke anvendes på oljer eller fett som er tilsatt smak av sitron, appelsin og «tuttifrutti». Disse tilsetningsstoffene interferer med analysen og gir sterkt forhøyede analyseresultat. Prinsippet for metoden er å bestemme reaksjonsproduktene som dannes mellom aldehyder (særlig 2-alkenaler) og p-Anisidin. Innholdet av reaksjonsproduktene bestemmes ved UV-absorpsjon. Anisidintall er definert som 100 ganger netto økning i absorpsjon v/350 nm, etter reaksjon mellom olje og p-Anisidin i en 1 % løsning av olje i isooktan. Det ble analysert 4 gram med to gjentak per prøve.

### **6.2.2 Gardner fargemåling**

Gardner er en visuell basert fargestandard som man ved hjelp av en Lovibond komparator bestemmer fargen på oljen med. Det ble benyttet en kyvette med 10 mm lysvei ved sammenlikning mot standard farge- filtre fordi styrken på fargefilterne (Gardnerskalaen) er avstemt etter dette.

Gardner fargetall oppgis vanligvis i hele tall. Fargetall på 1 og 2 er en veldig lys olje og først ved et fargetall på 3, er det lett å se forskjell. To personer vurderte fargen på prøvene ved bestemmelse av fargetall. Prøver som ble vurdert til å ha litt mer farge enn 1, men nærmere 1 enn 2 ble vurdert til 1,3. Prøver som ble vurdert til nærmere 2 men ikke heilt 2 ble gitt en verdi på 1,7, dette for å prøve å skille mellom nyansene.

### 6.2.3 Spektrofotometriske målinger

De spektrofotometriske målingene er utført på instrumentet SPECTROSTAR Nano fra BMG LabTech med UV/Vis Absorbans detektor. Absorbansen i oljeprøvene ble målt i forhold til en blank luftreferanseprøve, i samme type kyvette som oljeprøvene ble målt i. Det ble brukt engangs plastkyvetter (BRAND PS 1,5 ml semi-micro. 12,5 x 12,5 x 45 mm. Cat.No 759015). Følgende absorpsjonsbølglengder ble målt for karotenoider; 450, 460 og 474 nm.

### 6.2.4 Differensial scanning kalorimetri (DSC)

I differensial skannekalorimetri (DSC) måles temperaturen og entalpien ved faseoverganger, kjemiske reaksjoner, og andre endo- og eksotermiske prosesser. DSC kan gi et raskt estimat av andelen fast (stearin) og flytende fett (olein) i oljer over et stort temperaturområde med ett eksperiment. Hvis man antar at den spesifikke smelteentalpien er konstant over hele smeltekurven, er området under kurven opp til temperaturen av interesse delt på området under hele kurven, lik andelen fast fett i oljen ved den temperaturen. Det kan diskuteres hvorvidt DSC gir et reelt bilde av fast fett fraksjonen for oljer med høy andel av PUFA (Tolstorebrov m.fl. 2014; Márquez m.fl. 2013). Det bør også påpekes at det kan bli en viss variasjon i fast fett estimatene avhengig av hvordan man integrerer DSC smeltekurvene (manuell versus programstyrt). Uansett kan metoden gi et godt estimat av minimumstemperaturen der oljen er 100 % flytende.

### 6.2.5 Fettsyrer

Fettsyreprofilen viser til fettsyresammensetningen som finnes i oljen det måles på. Bestemmelse av fettsyreprofilen ble utført etter metoden AOCS Ce 1b-89 Fettsyresammensetning, ved Nofima Biolab i Bergen. Denne metoden kan anvendes på marine, vegetabiliske og animalske oljer og fett. Prinsippet for metoden er at fettsyrene i prøven, bundet i lipider eller frie, esterifiseres til metylestere og analyseres ved bruk av gaskromatografi og flammeionisasjonsdeteksjon (FID). Kvantifisering av de ulike fettsyrene er basert på bruk av 23:0 - fettsyremetylestere som intern standard og til beregning av empirisk responsfaktor. Fettsyrer blir kvantifisert i absolutte mengder av fettsyrer i prøve, beregnet som fettsyremetylestere. Det ble analysert 20-35 mg olje av hver prøve.

### 6.2.6 Flyktige forbindelser

Det er analysert flyktige forbindelser ved bruk av dynamisk headspace gaskromatografi massepektrometri (HS-GC/MS) for identifisering av komponenter bidrar til smaken til råoljen. To ulike metoder er benyttet.

#### Gassprøvetaking

Forut for den gaskromatografiske analysen ble de flyktige komponenter samlet opp på en adsorbent. To metoder ble benyttet.

#### Metode 1 (Avsnitt 6.1)

To gram prøve ble tilsatt i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe, og en løsning av etylheptanoat (> 99 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i metanol (pa, Merck GmbH, Darmstadt, Tyskland) ble tilsatt som en intern standard (400 ng). Prøvene ble oppvarmet til 70 °C i et vannbad og gjennomblåst med 100 ml/min nitrogen gjennom et Drechsel-hode i 20 minutter. Flyktige forbindelser ble dynamisk

ekstrahert (totalt 2 liter gassprøve) og samlet opp på aktivt kull (Tenax GR, kornstørrelse 60/80 mesh, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) som adsorbent.

#### *Metode 2 (Avsnitt 6.2.1.3, 6.2.2.3, 6.4.1.3 og 6.5.2)*

Det ble analysert flyktige forbindelser ved bruk av en automatisert dynamisk headspace termisk desorpsjonsenhet integrert med et gasskromatografi massespektrometer (Gerstel DHS-TDU-MPS, Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim, Tyskland).

Ett gram olje ble overført til et 20 ml prøveglass, flushet med nitrogen og korket med skrukork med teflon pakning, og overført på prøveveksleren til analyseinstrumentet (HS-GC/MS). Oppsamling av flyktige forbindelser ble foretatt automatisk etter inkubering ved 70 °C i 10 minutter på adsorbenttrør med aktivt kull (Tenax GR, kornstørrelse 60/80 mesh, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) i 2 minutter med 100 ml/min, totalt 200 ml gassvolum.

### **GC-MS analyse**

#### *Metode 1 (Avsnitt 6.1)*

Flyktige forbindelser ble overført til en gasskromatograf (Agilent 6890 GC, Agilent, Palo Alto, CA, USA) ved termisk desorpsjon med en Agilent 5973 Masseselektiv detektor (et kvadrupol basert massefilter) i elektron ionisasjon (EI) modus ved 70 eV ionisasjonsenergi og måling av positive ionefragmenter. Forbindelsene ble separert på en polar DB-WAXetr gasskromatografi kolonne fra J & W Scientific/Agilent (0,25 mm i.d., 0,5 µm film, 30 m). Helium (99,9999 %) ble brukt som bærerergass.

#### *Metode 2 (Avsnitt 6.2.1.3, 6.2.2.3, 6.4.1.3 og 6.5.2)*

Absorbenttrør med gassprøve ble overført til en automatisk prøveveksler forbundet med en gasskromatograf der de kull-adsorberte forbindelser ble desorbert ved 250 °C i 5 minutter i en Markes Unity / Ultra automatisk termisk desorpsjonsenhet (Markes International Ltd, Llantisant, England) og overført til en Agilent 6890 gasskromatograf (GC, Agilent, Palo Alto, CA, USA) med en Agilent 5973 Masseselektiv detektor (et kvadrupol basert massefilter) i elektron ionisasjon (EI) modus ved 70 eV ionisasjonsenergi og måling av positive ionefragmenter. Forbindelsene ble separert på en polar DB-WAXetr gasskromatografi kolonne fra J & W Scientific/Agilent (0,25 mm i.d., 0,5 µm film, 30 m). Helium (99,9999 %) ble brukt som bærerergass.

Integrasjonen av toppareal og identifisering av forbindelser (Metode 1 og 2) ble utført med HP Chemstation programvare (G1701CA versjon C.00.00, Agilent Technologies). Identifikasjon av forbindelsene ble bekreftet ved sammenligning av de målte massespektraene av GC-toppene med de rene standarder i henhold til NIST014 massespektralbiblioteket (versjon 2, 2005, US, Agilent).

### **Identifisering og kvantifisering**

Integrasjonen av toppareal og foreløpig identifisering av forbindelser ble utført med HP Chemstation programvare (G1701CA versjon C.00.00, Agilent Technologies). Identifikasjon av forbindelsene ble bekreftet ved sammenligning av de målte massespektraene av GC-toppene med de rene standarder i henhold til NIST014 massespektralbiblioteket (versjon 2, 2010, US/Agilent).

Konsentrasjonen av de enkelte flyktige forbindelsene ble beregnet til ng pr. gram prøve basert på intern standard tilsatt før gassprøvetaking. Analysen ble utført i duplikat for alle prøver. Systemytelsen ble sjekket med blind- og kontrollprøver før, under og etter GC analyse av prøveserien. Presisjonen på parallellene var mindre enn 10 %.

## 6.3 Bleking

Hensikten med bleke-trinnet er å fjerne fargestoffer, oksidasjonsprodukter, spormetaller, fosfolipidrester og rester av såpe og vann fra oljen. Fjerning av fargestoffene er meget viktig siden de ikke elimineres i de etterfølgende raffineringstrinnene. Den konvensjonelle metoden er å benytte adsorbenter i form av leirmineraler (blekejord) eller kull eller kombinasjon av begge, som blandes inn i oljen under omrøring, oppvarming og vakuu. Etter blekingen fjernes adsorbentene mekanisk fra oljen ved filtrering. Effekten av adsorbent er bestemt av type blekjord, hvordan den har blitt aktivert, dosering i oljen, vanninnholdet i oljen, bleketid og bleketemperatur. På grunn av lavt syretall i råoljen (**Vedlegg**), har det ikke vært behov for å avsyre oljen før bleking.

### 6.3.1 Screening forsøk

Syv kommersielle typer blekejord fra tre leverandører ble testet i labskala (**Tabell 2**) i henhold til oppsettet i **Figur 2**. 100 g olje ble varmet til 70 °C i 30 minutter, 130 rpm, under vakuu (1 mBar) for fjerning av vann-rester i en 250 ml filtrerings glasskolbe. Deretter ble råoljen tilsatt 2 % blekejord under omrøring (130 rpm). Temperatur på oljen ble holdt på 70 °C under vakuu (1 mBar) og det ble benyttet en bleketid på 30 minutter. Deretter ble blekejorden filtrert fra oljen ved bruk av en vakuu nutch med Whatman 55 mm Ø, 6 µm filterpapir. Oljen ble filtrert med vakuu på 1 mBar. Nitrogengass ble tilført med svakt overtrykk gjennom slange på toppen av lokk og over bleket olje under filtreringen (**Figur 3**).

Det ble utført to gjentak for hver type blekejord.

Tabell 2 Kommersielle blekejordtyper testet under screening

Blekjord	Type	Leverandør
Perform	5000	OIL-DRI, USA
Perform	6000	OIL-DRI, USA
Select	350	OIL-DRI, USA
TONSIL SUPREME	114F	CLARIANT, USA
TONSIL SUPREME	112F	CLARIANT, USA
CelaClear	160	Engineered Clays, USA
CelaClear	105SF	Engineered Clays, USA

Effektiviteten til blekejorden ble bestemt mht. fargereduksjon ved bruk av spektrofotometrisk UV absorpsjonsmåling og oksidasjonsprodukter (peroksid og anisidin tall og flyktige komponenter) i forhold til råoljen.



Figur 2 Apparatur for filtrering av blekjord

### 6.3.2 3-faktorielt design forsøk

Råolje ble fordelt på 250 ml glasskolber, flushet med nitrogen og fryst ved -20 grader inntil blekeforsøk ble utført (1-3 uker). En flaske ble tint for hvert forsøk. Oljen ble tint i varmt vann til all råolje var flytende. Det ble veid inn 100 g råolje for hvert forsøk. I **Tabell 3** gjengis forsøksoppsettet, et 3-faktorielt CCD («central composite design») forsøk, der mengde blekejord, aktivt kull og bleketid varierer, i alt 19 forsøk. Forsøkene ble utført i randomisert rekkefølge og med fem gjentak av senterpunktet. Etter utført bleking, ble oljen filtrert under vakuum ved 9 mBar.

Tabell 3 Oversikt over forsøksoppsett med ulik mengde blekjord (BJ), aktivt kull (AK) og bleketid BT)

Forsøk	BJ %	AK %	BT min
1	1,41	0,28	36,28
2	4,09	0,28	36,28
3	1,41	0,82	36,28
4	4,09	0,82	36,28
5	1,41	0,28	98,72
6	4,09	0,28	98,72
7	1,41	0,82	98,72
8	4,09	0,82	98,72
9	0,50	0,55	67,50
10	5,00	0,55	67,50
11	2,75	0,10	67,50
12	2,75	1,00	67,50
13	2,75	0,55	15,00
14	2,75	0,55	120,0
15	2,75	0,55	67,50
16	2,75	0,55	67,50
17	2,75	0,55	67,50
18	2,75	0,55	67,50
19	2,75	0,55	67,50

## 6.4 Vinterisering

Vinterisering, også kalt koldklaring, betyr separering av høyt og lavt-smeltende fraksjoner med den hensikt å produsere en olje som holder seg klar og flytende ved kjølelagring. Utrykket kommer av det fenomen at noen oljer delvis krystalliserer ved nedkjøling og en flytende fraksjon kan separeres. Denne prosessen kalles også tørrfraksjonering—fraksjonert krystallisering av oljen uten bruk av løsemidler. Den faste fraksjonen blir ofte kalt stearin selv om den ikke nødvendigvis inneholder mye stearinsyre og den flytende fraksjonen kalles olein (igjen uten at det har noen sammenheng med innholdet av oleinsyre). Vanligvis oppnår man faktisk en ganske beskjeden konsentrering av (fler)umettede fettsyrer i oleinfraksjonen og av mettede fettsyrer i stearinfraksjonen (se for eksempel Crexi et al 2010). En ofte brukt spesifisering på en vinterisert olje (Cold test) er at oljen holder seg klar og flytende i 3 eller 5,5 timer ved 0 °C (AOCS 2017).

Ved tørrfraksjonering er separasjonseffektiviteten (definert som prosent av stearin i den separerte fastfasen) begrenset fordi en del av oleinfraksjonen alltid vil følge med stearinfraksjonen i form av en flytende fase mellom krystallene. Det vil si at utbytte av olein også er begrenset. Det er forholdsvis



enkelt å skille stearin og oleinfraksjonene ved sentrifugering og dekantering i lab skala. I produksjonskala brukes ofte filterpresser, som kan være problematisk ved høye stearinnivå

#### **6.4.1 Tørrfraksjoneringsforsøk**

Råoljen var nedkjølt gradvis fra 30 °C ( $T_1$ ) over 15 timer ned til 4 ulike temperaturer ( $T_2$ ) og holdt ved krystalliseringstemperaturen i 4 timer. Etter sentrifugering ble oleinfraksjonen dekantert.

#### **6.4.2 Flertrinns-tørrfraksjonering**

Hvis for mye stearin felles ut kan oljen bli ufiltrerbar. En løsning er å dele prosessen opp i flere trinn slik at mindre stearin felles ut i hver krystallisering. Råoljen ble nedkjølt fra 30 °C til 10 °C, 15 °C til 5 °C, og til slutt 10 °C til 0 °C med sakte omrøring og nitrogenatmosfære. Stearinfasen ble fjernet ved vakuumfiltrering mellom hvert trinn.

### **6.5 Pilotskala raffinering av makrellolje**

#### **6.5.1 Makrellolje**

50 kg fryst makrell råolje ble fraktet til Gembloux uken før forsøket. Transporten tok tre dager og oljen var delvis tint, men fortsatt kjølig ved mottak. Oljen ble lagret på frys ved TERRA, overført til kjølerom (4 °C) dagen før og deretter tint i varmt vann samme dag som gjennomføring av bleketrinnet.

#### **6.5.2 Blekebetingelser**

Optimalisering av betingelser for bleking av makrelloljen er beskrevet i Nofima rapport (Haugen et. al, 2019). Hensikten med bleking er å fjerne fargestoffer, oksidasjonsprodukter, spormetaller, fosfolipidrester og rester av såpe og vann i oljen.

Pilotanlegg ved TERRA Teaching av Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech består av en blekereaktor og deodorisator med kapasitet på hhv. 25 og 12 liter (**Figur 3**). Anlegget er designet og levert av DeSmet Ballestra (Brüssel, Belgia).

Basert på tidligere optimaliseringsforsøk (Haugen m.fl. 2019) ble følgende betingelser valgt under blekeprosessen:

Mengde råolje: Batch 1: 15 kg; Batch 2: 18,5 kg  
Blekejord: 3,5% TONSIL SUPREME 114F (CLARIANT, USA).  
Aktivt kull: 0,5% Norit SA 4 PAH HF.  
Temperatur: 70 °C (Batch 1: 68-73 °C; Batch 2: 69-72 °C)  
Holdetid: 30 minutter  
Vakuum: 12-15 mbar



Figur 3 Pilotskala anlegg for raffinering av olje ved TERRA Teaching and Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech. Til venstre: reaktor for avsyring og bleking. Til høyre: deodorisator

Etter blekeprosessen ble vakuemet brutt med nitrogen gass og oljen filtrert over en filterpresse (FILTROX Novox 200 ST) med bruk av filterpapir av typen AF31H. De første par liter med olje ble ført tilbake til reaktor for å sikre at filtrert olje ikke inneholdt rester av blekejord og aktivt kull. Det ble ikke anvendt poleringsfilter i tillegg. Filtrert olje ble overført til 10 L PE-kanner, flushet med nitrogen og oppbevart på kjøll før deodorisering de to påfølgende dager.

### 6.5.3 Deodoriseringsbetingelser

Det ble gjennomført to deodoriseringsforsøk basert på olje fra hver av de to batchene med bleket olje. Det første deodoriseringsforsøket ble primært brukt til å teste anlegget og optimalisere betingelser anvendt ved deodorisering av batch 2. Deodoriseringsbetingelser var 175 °C og 1% strippedamp per time. Vakuumnivå for batch 1 (12,0 kg olje) var 1,1 mbar og for batch 2 (12,15 kg olje) 0,9-1,1 mbar. Strippedamp ble dosert inn ved bruk av en peristaltisk doseringspumpe og fordampner. Mengde tilsatt vann ble målt kontinuerlig på vekt. Vannet ble kokt på forhånd for å fjerne rester av oksygen. For batch 2 ble det i tillegg boblet nitrogen gjennom vannet hver halvtime for å sikre dette punkt.

Det ble tatt ut en oljeprøve via sideport (**Figur 3**) hver time for å sjekke nivå av peroksid og evaluere smaks kvalitet på oljen. For begge batchene ble det anvendt en deodoriseringstid ved 175 °C på 3 timer. For batch 1 ble oljen kjølt ned under lav dampstripping til 130 °C, og deretter med lav nitrogenstripping (vakuum 0,7 mbar) til 60 °C før vakuum ble brutt med nitrogen. Oljen ble tappet ut via bunnventil etter at denne var flushet med ca. 1,5 liter olje som ble kastet.

For batch 2 ble oljen kjølt ned til 100 °C med opprettholdelse av strippedamp på 1%/h. Dette ga noe raskere nedkjøling til 100 °C (40 minutter) og tilsvarende økt dampstripping. Oljen ble kjølt videre ned til 60 °C med bruk av kraftig nitrogenstripping (vakuum 9-10 mbar) før vakuum ble brutt med nitrogen. Mesteparten av oljen ble tappet ut via sideport (ca. 7,2 liter). Resten ble tappet ut via bunnventil etter at denne var flushet med ca. 1,5 L olje som ble kastet.

Deodorisert olje ble overført direkte til 1 L aluminiumsflasker og frosset inn. Merknad: Flaske #8 fra batch 2 inneholder ca. 20 % tappet via sideventil og rest fra bunn.

#### 6.5.4 Sensorisk analyse

Det er blitt utført sensorisk analyse på den raffinerte oljen fra det andre pilotskala deodoriseringsforsøket ved bruk av et trent smakspanel hos Nofima, Ås.

Til den sensoriske analysen ble det benyttet fersk raffinert makrellolje, fersk raffinert makrellolje tilsatt 1,25 promille rosmarinekstrakt (tilsvarende tilsetning av 50 ppm av antioksidantene karnosol og karnosinsyre), fersk raffinert tran (CLO) fra Vesteraalens og en kommersiell raffinert soya stekeolje (Eldorado) (**Figur 4**). Vesteraalens tran ble valgt som en «referanse» da den er en av de mest smaksnøytrale kommersielle fiskeoljer på markedet og i tillegg ble en soyaolje tatt med som en referanse på en smaksnøytral vegetabilsk olje.



Figur 4 Oljeprøver til sensorisk bedømmelse. Fra venstre: soya, tran (CLO), makrellolje (MKR) og makrellolje tilsatt rosmarinekstrakt (Rosmarin)

Det ble utført beskrivende test i henhold til ISO 13299:2016 «General Guidance for establishing a sensory profile» bestående av et trent sensorisk panel på 9 personer. Dommerne er valgt ut på grunnlag av sine lukt og -smaksevner som tilfredsstillende krav i ISO 8586:2012 «General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors». Det sensoriske panelet blir trent, testet og kontrollert regelmessig.

For beskrivende test, ble 3 sorter bedømt i to gjentak. Totalt 6 prøver i 2 serveringsomganger.

Før hovedforsøket startet ble det sensoriske panelet kalibrert gjennom forforsøk med prøvene SOYA og CLO. Panelet ble trent i bruk av de valgte egenskapene og intensiteten av disse. Flasker med oljer ble tint over natt dagen før analyse. Før servering ble flaskene vendt noen ganger. Hver dommer fikk servert 10 ml prøve i plastglass merket med en tilfeldig tresifret kode, dekket med metalllokk. Serveringstemperatur på prøven var  $19\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dommerne nøytraliserte munnen med nøytrale kjeks og kaldt og varmt vann mellom prøvene.

22 sensoriske egenskaper for Beskrivende test (**Vedlegg**) ble benyttet med en skala fra 1 (ingen intensitet) til 9 (tydelig intensitet):

**Lukt:** Total luktintensitet, Syrlig, Gress, Fiske, Smør, Metall, Frukt, Nøtte, Kjemikalie, Prosess, Medisin, Fermentert, Harsk

**Smak:** Syrlig, Bitter, Gress, Fiske, Smør, Nøtte, Kjemikalie, Prosess, Fermentert, Harsk

**Munnfølelse:** Pungent

Variansanalyse (ANOVA) ble benyttet på de sensoriske resultatene for å kartlegge om det er signifikante forskjeller mellom gruppene for hver av de sensoriske egenskapene. I denne rapporten betyr signifikant forskjell at det er signifikant forskjell på 5% nivå ( $p=0,05$ ). For de egenskapene hvor det er signifikante forskjeller, utføres i tillegg Tukey's multiple sammenligningstest for å avgjøre hvilke prøver som er forskjellige. Hvis differansen mellom to middelveier er større enn den kritiske verdien testen beregner, betyr det at disse to gruppene er signifikant forskjellige. Resultatene er oppsummert ved hjelp av middelveier og p-verdier. Middelveiene er et gjennomsnitt av dommere og to gjentak.

Dataprogrammene som ble benyttet var:

*EyeQuestion (Logic8 BV, Utrecht, Nederland)*

*Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)*

*EyeOpenR® (Logic8 BV, Utrecht, Nederland)*

*PanelCheck V.1.4.2, (Nofima AS, Ås, Norge)*

## 6.6 Produktstabilitet

### 6.6.1 Makrellolje

Til det akselererte lagringsforsøket ble det benyttet raffinert makrellolje produsert i pilotskala under delmål 4 (Nofima prosjektrapport 5/2020: Haugen og Oterhals, 2020). Den raffinerte oljen ble lagret på frys under nitrogendeckning inntil oppstart av lagringsforsøket.

### 6.6.2 Antioksidanter

Det er benyttet to kommersielle naturlige antioksidanter levert fra Danisco til det akselererte lagringsforsøket (**Figur 5**): mixed tokoferol (Guardian TOCO 70 IP) og rosmarinekstrakt (Guardian Rosmary Extract 201). For spesifikasjoner se **Vedlegg**.



Figur 5 Kommersielle naturlige antioksidanter benyttet i det akselererte lagringsforsøket

### 6.6.3 Dosering av antioksidant

Den raffinerte makrelloljen ble tilsatt to ulike konsentrasjoner av hver av antioksidantene og en blanding av begge i henhold til et faktorielt forsøksdesign gjengitt i **Tabell 4**. Det er tatt høyde for at rosmarinekstraktet inneholder ca. 4 % av de to aktive antioksidantene (**Vedlegg**). Rosmarinekstrakt doseringen svarer da til henholdsvis 25 og 50 ppm karnosol og karnosinsyre. Sistnevnte er maksimum tillatt nivå i henhold til Europeisk næringsmiddelregulering.

Tabell 4 Forsøksdesign og antioksidant dosering (ppm) til raffinert makrellolje og olje uten tilsatt antioksidant (MOU)

Oljeprøve Id.	Faktorielt nivå		Reelt nivå	
	Rosmarinekstrakt	Mixed tokoferol	Rosmarin ekstrakt	Mixed tokoferol
MOU	0	0	-	-
R1	1	0	625	-
R2	2	0	1250	-
T1	0	1	-	750
T2	0	2	-	1500
R1T1	1	1	625	750
R1T2	1	2	625	1500
R2T1	2	1	1250	750
R2T2	2	2	1250	1500

#### 6.6.4 Tilsetting av antioksidant

800 til 900 ml tint fersk raffinert olje med romtemperatur ble overført til 1 liter filterflaske med nitrogentilførsel. Antioksidant ble tilsatt under omrøring (150 rpm) i 7 min.

#### 6.6.5 Akselerert lagringsforsøk

Den raffinerte oljen uten tilsatt antioksidant ble fordelt på 12 stk. 100 ml glass. Tre av disse (0-prøve) ble flushet med nitrogen, forseglet med skrulokk og lagret på -80 °C frem til analyse av alle prøveuttakene. De resterende glassene ble satt i varmeskap med løst skrulokk med tilgang på luft og oppbevart opp til fire uker mørkt og ved 40 °C (**Figur 6**). Det ble laget tre parallelle prøver av hver til lagringsforsøket. Det ble tatt ut prøver etter 2, 3 og 4 uker i henhold til oppsett i **Tabell 5**.



Figur 6 Akselerert lagringsforsøk av oljeprøver i varmeskap

Tabell 5 Prøveuttaksplan med antall paralleller for akselerert lagringsforsøk. MOU=makrellolje uten antioksidant, FMO=fersk makrellolje

Oljeprøve	Uttak 0	Uttak 1	Uttak 2	Uttak 3	Antall glass
Id.	0-tid	2 uker	3 uker	4 uker	
M0U	FMO	MOU2	MOU3	MOU4	12
R1	-	R12	R13	R14	9
R2	-	R22	R23	R24	9
T1	-	T12	T13	T14	9
T2	-	T22	T23	T24	9
R1T1	-	R1T12	R1T13	R1T14	9
R1T2	-	R1T22	R1T23	R1T24	9
R2T1	-	R2T12	R2T13	R2T14	9
R2T2	-	R2T22	R2T23	R2T24	9
Total					84

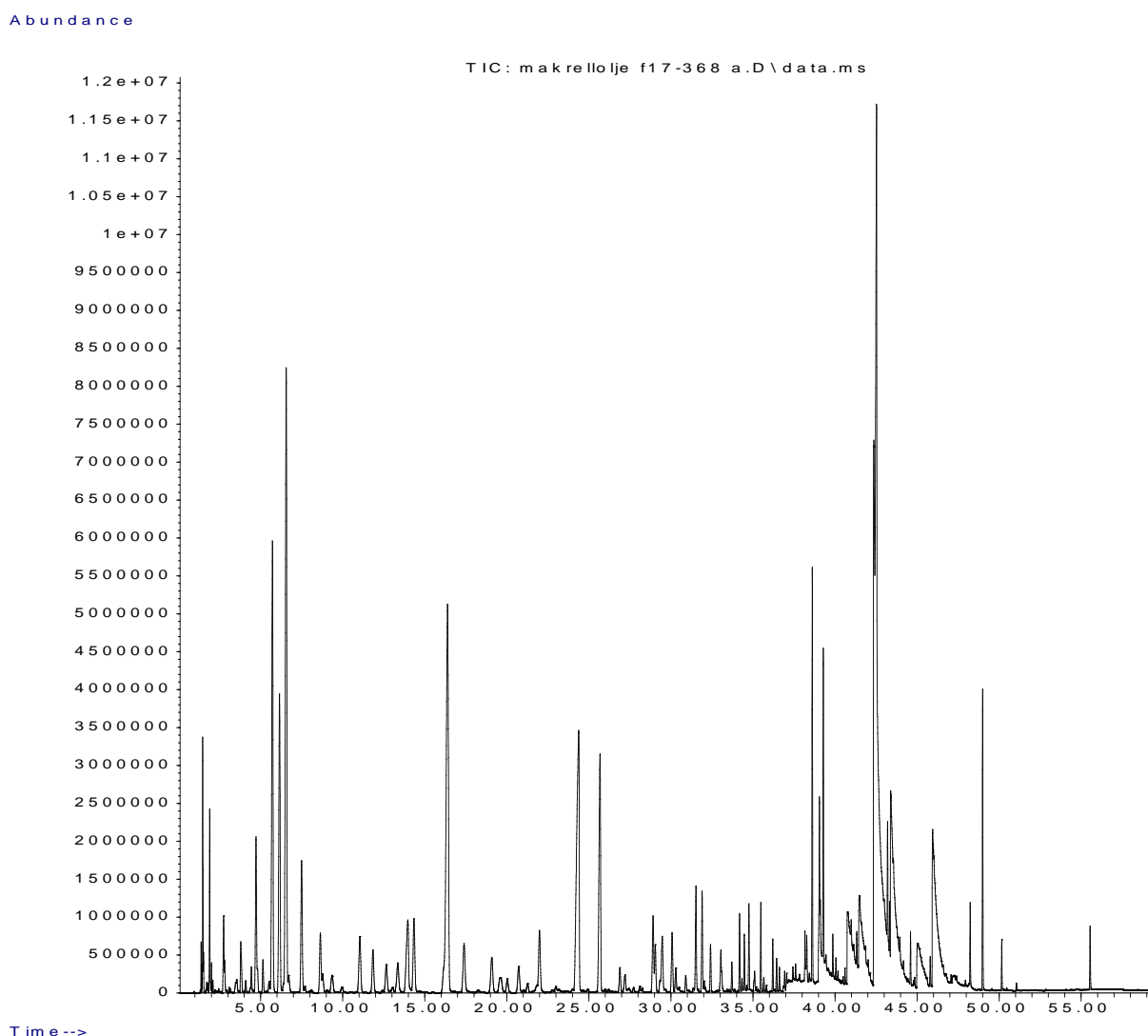


## 7 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### 7.1 Komponenter i råolje fra makrell restråstoff som bidrar til lukt og smak

#### 7.1.1 Identifiserte forbindelser

Gass kromatogram fra HS-GC/MS analysen av den ene parallellprøven (A) er vist i **Figur 7**. Ca. 100 flyktige forbindelser ble funnet hvorav ca. 96 % av komponentene kunne identifiseres med høy sikkerhet (se **Tabell 6A** og **6B**). De fleste av forbindelsene er også tidligere påvist i marine råoljer (Taati et al, 2017; Song et al 2018).



**Figur 7** Gasskromatogram (TIC) fra headspace GC/MS analyse av makrell råolje. X-aksen gjengir retensjonstid i minutter og y-aksen mengden av respektive gasskromatografisk separerte forbindelser/topper. Til sammenligning, Tabell 1A og B, med komponenter identifisert og respektive retensjonstider.

Det ble funnet mest hydrokarboner (41,3 %), derav flest enumettede hydrokarboner, alkoholer (17,2 %), syrer (15,3 %), aldehyder (9,3 %), sulfider/tioler (8 %), ketoner (2,8 %), furaner (1,8 %), aromater (2,1 %) og 1,9 % andre forbindelser der 3 forbindelser ikke lot seg identifisere entydig (**Tabell 7**).

Tabell 6A Flyktige komponenter påvist etter økende gasskromatografisk retensjonstid (Ret.tid) i minutter, navnet på forbindelsen, CAS-nummer, MS bibliotek Match % og konsentrasjon. Økende Match % innebærer en høyere sikkerhet på identifisering av komponent. Erfaringsmessig representerer en Match % større enn 65 % en entydig identifisering av forbindelsen

Komp. Nr.	Ret.tid	MS bibliotek Id.	CAS Nr.	Match %	ng/g
1	1,37	Pentane	000109-66-0	91	0,34
2	1,43	1-Pentene	000109-67-1	87	0,24
3	1,47	2-Pentene, (Z)-	000627-20-3	91	2,55
4	1,53	Hexane	000110-54-3	90	0,23
5	1,90	Heptane	000142-82-5	95	1,61
6	2,00	2,4-Hexadiene, (Z,Z)-	006108-61-8	94	0,23
7	2,09	2,4-Hexadiene	000592-46-1	94	0,11
8	2,74	Heptane, 2,4-dimethyl-	002213-23-2	72	1,07
9	2,81	Propanal	000123-38-6	78	0,24
10	3,47	1-Octene	000111-66-0	96	0,16
11	3,79	2-Propenal	000107-02-8	86	1,12
12	4,09	2-Octene, (E)-	013389-42-9	95	0,20
13	4,43	Butanal	000123-72-8	91	0,36
14	4,72	Cyclopentane, 2-propenyl-	003524-75-2	58	3,02
15	5,14	2-Butanone	000078-93-3	90	0,58
16	5,52	Butanal, 2-methyl-	000096-17-3	38	0,22
17	5,72	3,5-Octadiene, (Z,Z)-	007348-80-3	86	9,94
18	6,15	Cyclohexene, 3-methyl-	000591-48-0	68	6,74
19	6,56	1,3-Pentadiene, 2,4-dimethyl-	001000-86-8	94	15,36
20	6,71	Benzene	000071-43-2	70	0,41
21	7,50	Furan, 2-ethyl-	003208-16-0	91	3,06
22	7,69	Propanoic acid, ethyl ester	000105-37-3	64	0,14
23	8,07	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	000097-62-1	91	0,11
24	8,64	3-Pentanone	000096-22-0	80	1,53
25	9,36	Decane, 2,4,6-trimethyl-	062108-27-4	64	0,64
26	9,95	5,5-Dimethyl-1,3-hexadiene	001515-79-3	91	0,20
27	11,05	5,5-Dimethyl-1,3-hexadiene	001515-79-3	91	1,96
28	11,85	1-Penten-3-one	001629-58-9	72	1,43
29	12,66	2-Butanol	000078-92-2	83	1,07
30	13,36	2-Butenal	004170-30-3	68	1,22
31	13,98	1-Propanol	000071-23-8	78	3,91
32	14,35	Unknown	010304-16-2	43	2,34
33	16,39	Disulfide, dimethyl	000624-92-0	97	15,97
34	17,39	Hexanal	000066-25-1	91	1,75
35	19,09	1-Propanol, 2-methyl-	000078-83-1	90	1,36
36	19,60	1,3-trans,5-cis-octatriene	040087-61-4	87	0,38
37	20,03	2-Pentenal, (Z)-	001576-87-0	70	0,48
38	20,73	3-Pentanol	000584-02-1	83	0,89
39	21,26	Propane, 2-methyl-2-(methylthio)-	006163-64-0	59	0,26
40	21,99	2-Pentenal, (E)-	001576-87-0	94	1,90
41	22,99	1-Undecene	000821-95-4	83	0,14
42	24,38	1-Butanol	000071-36-3	91	11,73
43	25,68	1-Penten-3-ol	000616-25-1	72	6,57
44	26,89	Heptanal	000111-71-7	95	0,58
45	27,20	D-Limonene	005989-27-5	94	0,38
46	27,72	Butanethioic acid, S-methyl ester	002432-51-1	91	0,11
47	28,10	trans,trans-2,9-Undecadiene	022057-21-2	74	0,14
48	28,24	1-Undecene-9-methyl	074630-41-4	47	0,09
49	28,91	Formic acid, heptyl ester	000112-23-2	72	1,80
50	29,05	2-Hexenal	000505-57-7	95	0,94

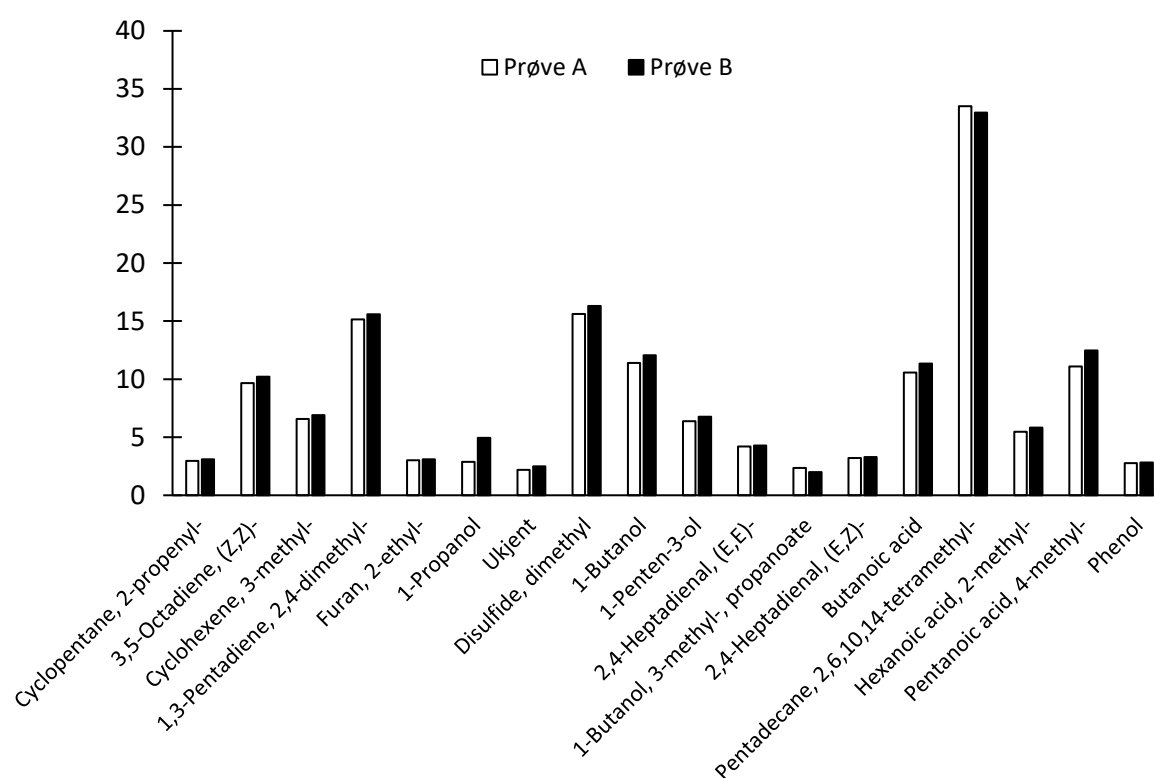


Tabell 6B Flyktige komponenter påvist etter økende gasskromatografisk retensjonstid (Ret.tid) i minutter, navnet på forbindelsen, CAS-nummer, MS bibliotek Match % og konsentrasjon. Økende Match % innebærer en høyere sikkerhet på identifisering av komponent. Erfaringsmessig representerer en Match % større enn 65 % en entydig identifisering av forbindelsen

Komp. Nr.	Ret.tid	MS bibliotek Id.	CAS Nr.	Match %	ng/g
51	29,34	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylpropyl ester	000097-85-8	64	0,19
52	29,48	Allylidencyclohexane	005664-10-8	46	1,40
53	30,07	Cyclopropane, 1-ethenyl-2-hexenyl-, [1.alpha.,2.beta.(E)]-(./-./-)	022822-99-7	43	1,37
54	30,30	Cyclopentene,1-(2-propenyl)-	037689-19-3	50	0,49
55	30,91	4-Heptenal, (Z)-	006728-31-0	91	0,31
56	31,53	1-Pentanol	000071-41-0	90	1,75
57	31,90	Bicyclo[3.3.0]oct-2-en-7-one, 6-methyl-	1000150-437	47	1,57
58	32,02	2(3H,4H)-Cyclopenta[b]furanone, 3a,6a-dihydro-	1000197-37-2	49	0,16
59	32,42	1,3-Cyclooctadiene, (Z,Z)-Spiro[cyclopropane-1,2'-[6.7]diaz	003806-59-5	58	0,73
60	33,05	Octanal	000124-13-0	96	0,93
61	33,72	cis-2-(2-Pentenyl)furan	070424-13-4	97	0,42
62	34,19	1-Pentanol, 4-methyl-	000626-89-1	53	0,98
63	34,33	1-Hexene, 3,5-dimethyl-6-Oxabicyclo[3.1.0]hexane	007423-69-0	38	0,16
64	34,47	2-Penten-1-ol, (E)-	001576-96-1	64	0,69
65	35,10	3-Heptanol, 4-methyl-	014979-39-6	78	0,34
66	35,48	1-Hexanol	000111-27-3	90	1,01
67	35,67	3,3-Dimethylbutane-2-ol	000464-07-3	53	0,17
68	36,21	Dimethyl trisulfide	003658-80-8	97	0,59
69	36,44	3-Hexen-1-ol, (Z)-	000928-96-1	60	0,45
70	36,61	Nonanal	000124-19-6	90	0,30
71	36,93	2,4-Hexadienal, (E,E)-	000142-83-6	46	0,22
72	37,05	Hexanal, 2-ethyl-	000123-05-7	47	0,18
73	37,44	1-Propene, 1-methoxy-1,5-Hexadiene-3,4-diol, 2,5-dimeth	007319-16-6	58	0,16
74	37,60	1,5-Hexadiene-3,4-diol, 2,5-dimethyl-	004723-10-8	37	0,18
75	38,17	1-Octen-3-ol	003391-86-4	47	0,51
76	38,28	Heptanol	053535-33-4	53	0,50
77	38,62	2,4-Heptadienal, (E,E)-	004313-03-5	94	4,25
78	39,05	1-Butanol, 3-methyl-, propanoate	000105-68-0	43	2,18
79	39,29	2,4-Heptadienal, (E,E)-	004313-03-5	94	3,24
80	39,87	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	030086-02-3	70	0,50
81	40,05	Benzaldehyde	000100-52-7	93	0,21
82	40,61	Formic acid, octyl ester	000112-32-3	64	0,16
83	40,76	Propanoic acid	000079-09-4	90	1,02
84	41,32	2,6-Nonadienal, (E,Z)-	000557-48-2	43	0,37
85	41,48	Propanoic acid, 2-methyl-	000079-31-2	62	1,11
86	42,37	Butanoic acid	000107-92-6	91	10,96
87	42,53	Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	001921-70-6	62	33,23
88	43,20	4,6-Heptadien-1-ol, (Z)-	118495-96-8	41	1,17
89	43,33	Unknown	000107-92-6	18	0,46
90	43,39	Hexanoic acid, 2-methyl-	004536-23-6	83	5,65
91	44,60	2-Heptene, 5-methyl-	022487-87-2	50	0,52
92	45,04	Pentanoic acid	000109-52-4	83	0,65
93	45,80	2-Nonen-4-yne, (Z)-	056392-46-2	43	0,34
94	45,95	Pentanoic acid, 4-methyl-	000646-07-1	90	11,79
95	48,24	2-Methylbutanoic anhydride	001468-39-9	40	1,07
96	48,99	Phenol	000108-95-2	94	2,79
97	50,16	Phenol, 4-methyl-	000106-44-5	97	0,46
98	55,54	Indole	000120-72-9	97	0,75

Tabell 7 Andelen ulike flyktige stoffklasser i makrell råoljen

Stoffklasse	%	Antall
Hydrokarboner	41,3	30
Alkoholer	17,5	20
Syrer	15,3	7
Aldehyder	9,3	19
Sulfider/tioler	8,0	4
Ketoner	2,8	6
Furaner	1,8	2
Aromater	2,1	4
Andre	1,9	5



Figur 8 Konsentrasjonen (ng/g) av flyktige hovedkomponenter i makrell råolje

18 komponenter med høyest konsentrasjon er gjengitt i **Figur 8** og utgjør hele 75 % av total konsentrasjonen flyktige forbindelser målt. Høyest forekomst ble funnet for 2,4,6,10-pentadekan (trivialnavn: pristan), som utgjorde 33 % av totalkonsentrasjonen flyktige forbindelser. Deretter følger dimetyldisulfid, 2,4-dimetyl-1,3-pentadien, 1-butanol, 4-metyl-pentansyre og cis, cis-3,5-oktadien.

Pristan har tidligere blitt påvist i fiskeoljer, spesielt i uraffinerte råoljer (Sørensen and Mehlum 1948; Sørensen and Sørensen 1949) fra fisk og som kommer fra inntak av alger (McKenna og Kallio 1971; Reid and Budge 2015). Pristan finnes i de fleste petroleumsprodukter og kan også indikere petroleumsforurensning (Volkman m.fl. 1992).

De fleste påviste hydrokarboner, aldehyder, ketoner, syrer (C2-C5), furaner og enkelte av alkoholene er sekundære oksidasjonsprodukter fra peroksidering av de flerumettede omega-3 og omega-6 fettsyrene som finnes i oljen (**Vedlegg**). I tillegg kan noen av de flyktige syrene også stamme fra bakterievekst i råstoffet, som også sulfidene kan indikere, som dannes fra både bakteriell nedbrytning av svovelholdige aminosyrer i råstoffet eller termisk kjemiske reaksjoner under råstoffbehandlingen. Flere av de påviste esterene kan også være bakterielle sekundære metabolitter. Typiske markører for lipid oksidasjon i marine oljer ble funnet, som propanal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, tr, tr-heptadienal og 2-etylfulan.

De fleste av de påviste stoffene, bortsett fra noen av hydrokarbonene, er luktaktive stoffer, har ulik luktkarakter, og som til sammen bidrar til lukt og smak. Det er imidlertid flere forhold som har betydning for i hvilken grad flyktige forbindelser bidrar til lukt/aroma og smak i fiskeoljer: Det er ikke nødvendigvis forbindelsene med høyest konsentrasjon som bidrar mest til lukten og smaken til fiskeoljer, men den såkalte *luktværdien* (eng. *Odour Activity Value, OAV*), som er definert ved konsentrasjonen til den luktaktive forbindelsen, delt på den empiriske luktterskelen. Luktterskelen er igjen bestemt av prøvetype/matriks, som bestemmer retensjon og frigjøring av de flyktige forbindelsene. Dermed vil fettløselige flyktige forbindelser ha økt løselighet i en olje, som bidrar til en større retensjon i fettfasen og høyere luktterskel, enn om de hadde forekommet i vann, og omvendt for vannløselige flyktige forbindelser. De empiriske lukttersklene til de ulike stoffklassene påvist (**Tabell 8**), varierer, og i en olje vil de derfor ha en økende luktterskler med økende løselighet i oljen/fettfasen: Aromater > hydrokarboner > furaner > sulfider > alkoholer > aldehyder > ketoner og syrer. Siden aldehyder, ketoner og syrer har lavest luktterskel av de påviste stoffklassene, vil de også gi større bidrag til lukten og smaken av makrell råoljen. De ulike forbindelsene innen hver stoffklasse (**Tabell 7**) vil igjen ha ulike luktterskler i en olje, som vist for aldehydene i **Tabell 8**. Men det er spesielt aldehydene som bidrar til den karakteristiske harske lukt og smak i fiskeoljer, selv etter raffinering. Den karakteristiske fiskelukt/smak i fiskeoljer kommer mest sannsynligvis fra heksanal, og 1-penten-3-ol i henhold til litteraturen. Flyktige aminer som f.eks. trimetylamin vil oftest også bidra til fiskelukt/smak i både rå og raffinerte fiskeoljer, men disse kunne ikke påvises i råoljen.

Bidraget av flyktige komponenter til den samlede lukt og smak til råoljen kan evalueres ved bestemmelse av andelen av de flyktige luktaktive komponenter i råoljen og de sensoriske luktterskler. Det foreligger imidlertid ikke sensorisk data fra denne råoljen til sammenligning med de målte flyktige forbindelsene. Bruk av de empiriske lukttersklene for beregning av de respektive luktværdiene, vil derfor kun gi et estimat på hvilke forbindelser som vil bidra mest til lukten og smaken til oljen. Empiriske luktterskler finnes for en del av de påviste forbindelsene, men selv data publisert for oljer, viser ofte luktterskler for enkeltforbindelser over et større konsentrasjonsområde, selv for de samme forbindelsene. Dessuten finnes ikke tilstrekkelige data på luktterskler i olje/fettfase på mange av de påviste forbindelsene. I denne rapporten har vi tatt utgangspunkt i data fra Belitz and Grosch 1999, Shahidi 2001 og Frankel 2005. På grunn av manglende data på empiriske luktterskler i olje/fettfase av mange av de påviste forbindelsene, har det ikke latt seg gjøre å foreta en kvantifisering av luktværdier for alle forbindelsene for å komme frem til de viktigste aromakomponentene i oljen. Med utgangspunkt i de målte konsentrasjoner, fettløselighet til stoffene, eksisterende luktterskler og

litteratordata på tilsvarende flyktige forbindelse påvist i marine råoljer, kan man konkludere at det vil være de flyktige aldehydene og syrene som vil bidra mest til lukt og smak av råoljen. Av aldehydene var det 2-rpopenal og butanal som hadde de høyeste luktverdiene, etterfulgt av heksanal, tr,2-pental, oktanal, 2-butenal og tr, cis-2,4-heptadienal.

*Tabell 8 Empiriske luktterskler for de dominerende flyktige forbindelser som kam forekomme i marine oljer (fra Frankel 2005). Stoffklassene 1-6 representerer typiske markører for autooksidasjon av flerumettede  $\omega$ -3 fettsyrer: 1) 2-Etylfuran, 2) 1-penten-3-ol, 3) 2-Pental, 4) Propanal, 5) tr2, tr4-Heptadienal og 6) 1-Penten-3-on representerer (fra Belitz, and W. Grosch 1999)*

Stoffklasse	Luktterskel (mg/kg)
Hydrokarboner	90-2150
Substituerte furaner <sup>1</sup>	2-27
Vinyl alkoholer <sup>2</sup>	0,5-3
1-Alkener	0,02-9
2-Alkenaler <sup>3</sup>	0,04-2,5
Alkanaler <sup>4</sup>	0,04-1,0
Trans, trans-2,4-alkadienaler <sup>5</sup>	0,04-0,3
Isolerte alkadienaler	0,002-0,3
Isolerte cis-alkadienaler	0,0003-0,1
Trans, cis-alkadienler	0,002-0,006
Vinyl ketoner <sup>6</sup>	0,00002-0,007

### 7.1.2 Konklusjon

Det er analysert flyktige forbindelser i råolje fra makrell restråstoff for å påvise komponenter som kan bidra til lukt og smak i råoljen. For analyse av flyktige komponenter ble det benyttet dynamisk headspace gasskromatografi massespektrometri (DHS-GC/MS). Det ble samlet opp 2 liter gass på aktivt kull ved 70 °C under nitrogen i 20 minutter som ble overført via automatisk termisk desorpsjon til en gasskromatograf, etterfulgt av gasskromatografisk separasjon av de flyktige forbindelsene og identifisering ved hjelp av massespektrometri.

Det ble funnet mest hydrokarboner (41,3 %), derav flest enumettede hydrokarboner, alkoholer (17,2 %), syrer (15,3 %), aldehyder (9,3 %), sulfider/tioler (8 %), ketoner (2,8 %), furaner (1,8 %), aromater (2,1 %) og 1,9 % andre forbindelser der 3 forbindelser ikke lot seg identifisere. 18 komponenter med høyest konsentrasjon utgjorde hele 75 % av total konsentrasjonen flyktige forbindelser målt. Høyest forekomst ble funnet for 2,4,6,10-pentadekan (trivialnavn: pristan), som utgjorde 33 % av totalkonsentrasjonen flyktige forbindelser. Deretter fulgte dimetyldisulfid, 2,4-dimetyl-1,3-pentadien, 1-butanol, 4-metyl-pentansyre og cis, cis-3,5-oktadien.

De fleste påviste hydrokarboner, aldehyder, ketoner, syrer (C2-C5), furaner og enkelte av alkoholene er sekundære oksidasjonsprodukter fra peroksidering av de flerumettede omega-3 og omega-6 fettsyrene som finnes i oljen. I tillegg kan noen av de flyktige syrene også stamme fra bakterievekst i råstoffet, f.eks. sulfid som dannes fra både bakteriell nedbrytning av svovelholdige aminosyrer i

råstoffet eller termisk kjemiske reaksjoner under råstoffbehandlingen. Flere av de påviste esterene kan også være bakterielle sekundære metabolitter. Typiske markører for lipid oksidasjon i marine oljer ble funnet, som propanal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, tr, tr-heptadienal og 2-etylfuran.

De fleste av de påviste stoffene, bortsett fra noen av hydrokarbonene, er luktaktive stoffer, har ulik luktkarakter, og som tilsammen vil bidra til lukt og smak av råoljen. Men pga manglende data på empiriske luktterskler i olje/fettfase av mange de påviste forbindelsene, har det ikke latt seg gjøre å foreta en kvantifisering av luktverdier for alle forbindelsene for å komme frem til de viktigste aromakomponentene i oljen. Med utgangspunkt i de målte konsentrasjoner, fettløselighet til stoffene, eksisterende luktterskler og litteraturodata på tilsvarende flyktig forbindelse påvist i marine råoljer, kan vi konkludere at det vil være aldehydene og syrene som vil bidra mest til lukt og smak av råoljen. Av aldehydene var det 2-rpopenal og butanal som hadde de høyeste luktverdiene, etterfulgt av heksanal, tr, 2-pentenal, oktanal, 2-butenal og tr, cis-2,4-heptadienal.

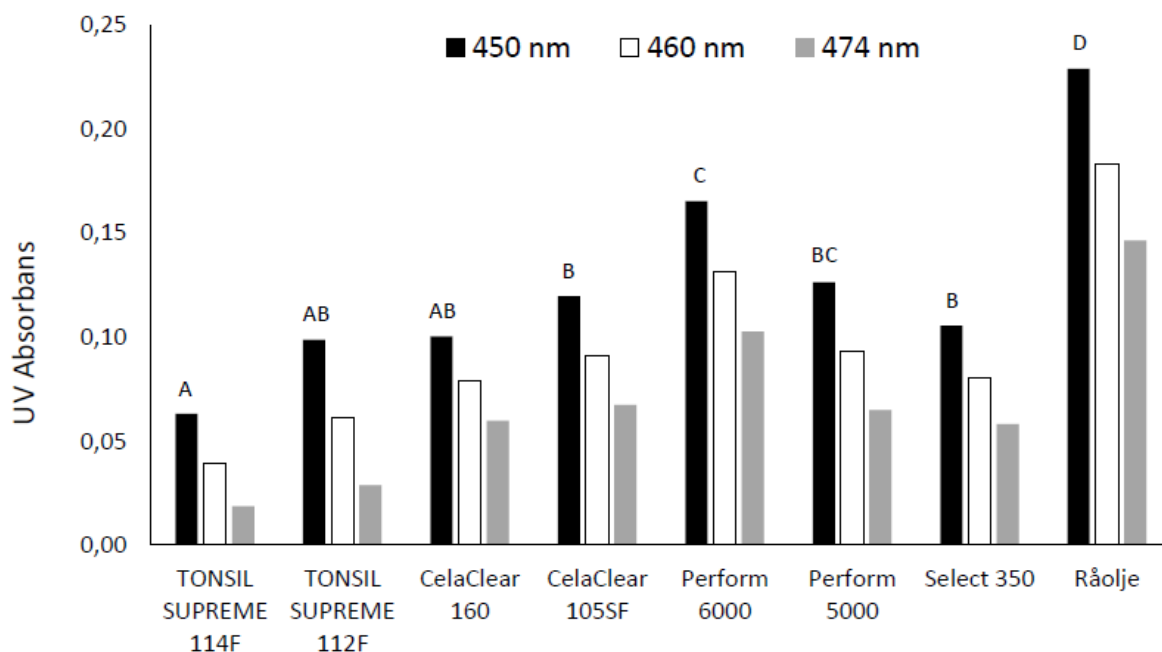
## **7.2 Bleking labskala**

### **7.2.1 Screening forsøk**

Det ble innledningsvis gjennomført en screening av effekten av 7 ulike kommersielle blekejordtyper basert på duplikate tester. Etter gjennomført bleking og fjerning av blekejord ved filtrering, ble det utført spektrofotometriske målinger, måling av peroksid- og anisidintall og flyktige forbindelser.

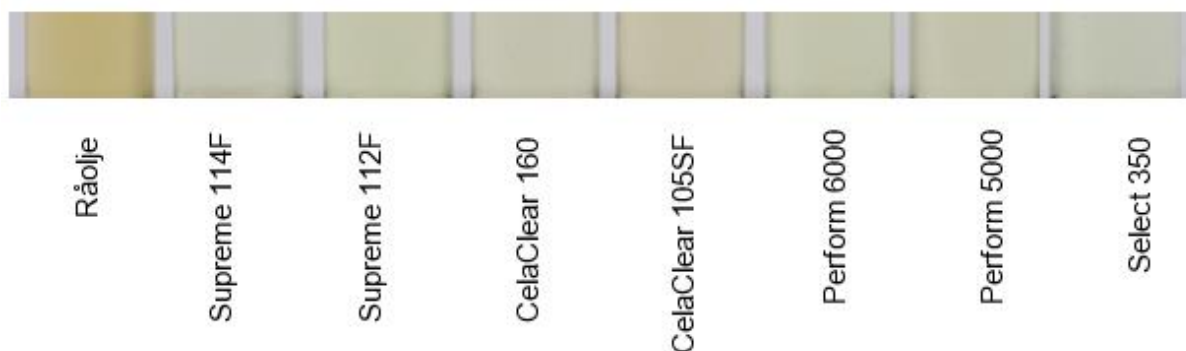
### **7.2.2 Spektrofotometriske målinger**

UV absorbanverdiene for karotenoidbølgelengdene i oljene etter bleking og filtrering sammen med råoljen er gjengitt i **Figur 9**. Samtlige blekejordstyper ga en signifikant bedring i farge målt basert på absorban. Blekejord med lavest endring av karotenoid absorban (28 %), dvs minst fjerning av karotenoider, ble i dette forsøket Perform 6000. Best blekeeffekt (79 %) ble oppnådd med TONSIL Supreme 114F, men effekten er ikke signifikant bedre sammenlignet med SUPREME 112F og CelaClear.



Figur 9 Karotenoid absorbans i makrell råolje etter bleking og filtrering. Forskjellig bokstav over søyler for 450 nm angir signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) mellom prøvene

Det ble tatt bilde av oljene (**Figur 10**) etter blekeforsøkene, samt råoljen for å vise fargeforskjellene på oljene etter bleking. Råoljen, vist til venstre i figuren, har tydelig sterkere gul farge sammenlignet med de blekede oljene til høyre for råoljen. Ut fra visuell vurdering, ser det ut til at Tonsil Supreme 114 F er den blekejorden som kommer ut best i dette forsøket. Dette stemmer også godt overens med absorbansmålingene, der Tonsil Supreme 114 F hadde størst reduksjon i absorbans.

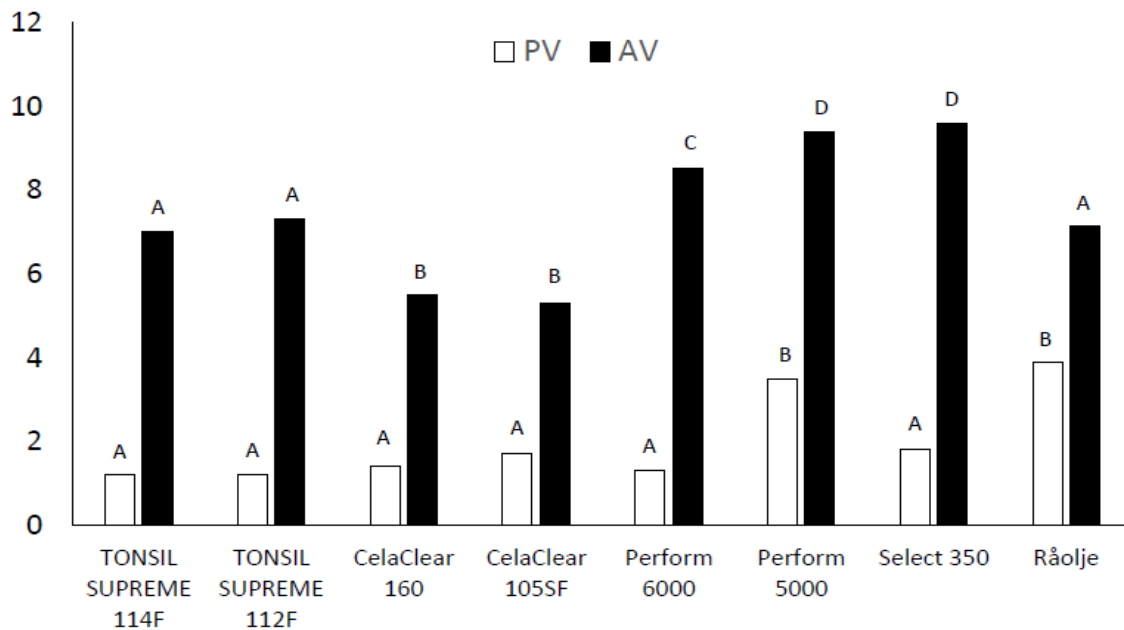


Figur 10 Foto av råolje og blekede oljer behandlet med hhv syv ulike blekejordtyper

### 7.2.3 Peroxid og anisidin tall (PV og AV)

**Figur 11** viser målte PV og AV verdier i råoljen og de blekede filtrerte oljene. PV verdien på makrell råoljen har økt noe (fra 2,1 til 4,0) fra den ble mottatt, til råoljen ble analysert på nytt i forbindelse med blekeforsøkene (**Vedlegg**), som kan skyldes at den hadde blitt oppbevart en tid ved 4 °C forut for

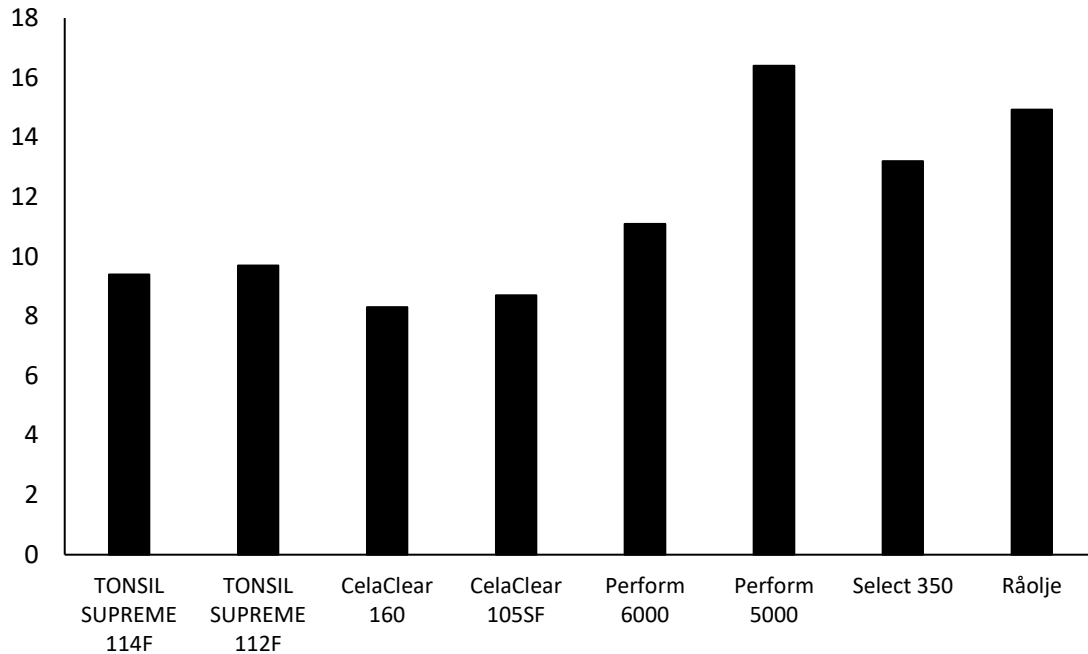
blekeforsøkene. TONSIL-produktene ga størst reduksjon i peroksidtall (69 %), men forskjellene er små og ikke signifikant bedre enn de andre med unntak av Perform 5000.



Figur 11 PV (mEq/kg) og AV verdier målt i bleket filtrert makrell råolje. Forskjellig bokstav over søyler for hhv. PV og AV angir signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) mellom prøvene

CelaClear-produktene ga en signifikant og størst reduksjon i anisidintall, (26 %). Perform 6000, Perform 5000 og Select 350 ga en signifikant økning i anisidintall, mens ingen signifikant endring kunne påvises med TONSIL SUPREME 114F og 112F i forhold til råoljen.

TOTOX verdiene ( $2 \times PV + AV$ ) er gjengitt i **Figur 12**. Alle oljene bortsett fra oljen behandlet med Perform 5000 viser en nedgang i TOTOX verdi. Best effekt viste CelaClear, etterfulgt av TONSIL med de laveste TOTOX verdier, mens Perform 5000 og Select 350 ga de høyeste TOTOX verdiene.



Figur 12 TOTOX verdier i bleket og filtrert makrell råolje

Ved screening av de ulike blekjordtypene ble det målt relativt høye verdier av PV og AV etter blekeprosessen (ingen nedgang i PV og AV verdier). Under gjennomføring av bleking i labskala er det vanskelig unngå helt at oljen kan bli eksponert for oksygen. Dette kan være en mulig forklaring på de observerte relativt høye PV og AV verdier etter bleking og filtrering. For å bedre dette, ble det i forbindelse med det påfølgende designete forsøket (avsnitt 6.1.2) gjort noen tekniske forbedringer for å redusere oksygeneksponering av oljen: Det ble satt på et «gummilokk» med kontinuerlig nitrogentilførsel slik at det ble opprettholdt et nitrogen overtrykk ved overføring av bleket olje til filterapparat (Figur 2).

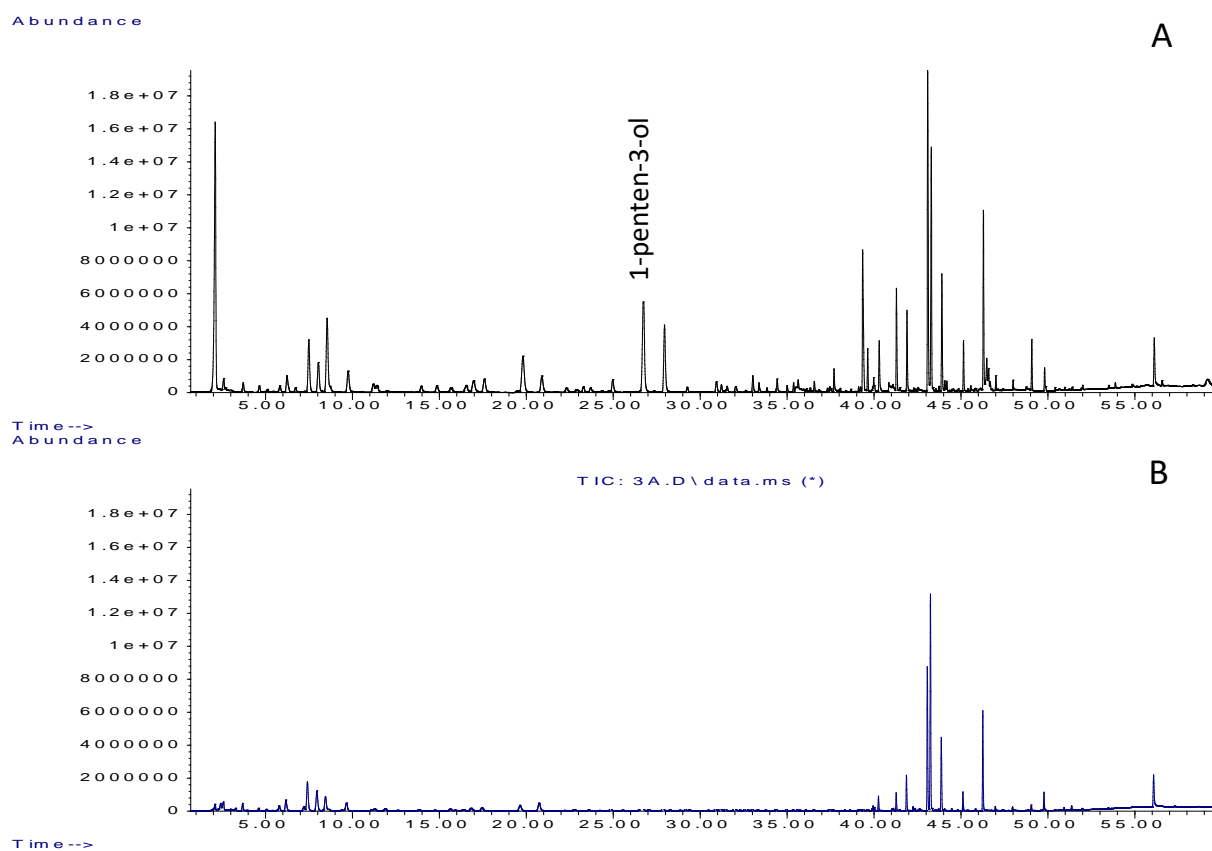
#### 7.2.4 Flyktige forbindelser

I råoljen ble det som tidligere vist (se avsnitt 6.1) funnet mest hydrokarboner, derav flest enumettede hydrokarboner, etterfulgt av alkoholer, syrer, aldehyder, sulfider/tioler, ketoner, furaner og aromater. De fleste påviste hydrokarboner, aldehyder, ketoner, syrer (C2-C5), furaner og enkelte av alkoholene er sekundære oksidasjonsprodukter fra peroksidering av de flerumettede omega-3 og omega-6 fettsyrene som finnes i råoljen. I tillegg kan noen av de flyktige syrene også stamme fra bakterievekst i råstoffet, som også sulfidene kan indikere, som dannes fra både bakteriell nedbrytning av svovelholdige aminosyrer i råstoffet eller termisk kjemiske reaksjoner under råstoffbehandlingen. Flere av de påviste esterene kan også være bakterielle sekundære metabolitter. Typiske markører for lipid oksidasjon i marine oljer ble funnet, som propanal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-on, tr, tr-heptadienal og 2-etyl furan. De blekede oljene viste en høy korrelasjon mellom anisidintall og typiske flyktige markører for lipidoksidasjon, f.eks. 1-penten-3-ol ( $r=0,98$ ,  $p<0,0001$ ).

Figur 13 viser effekten av bleking ved sammenligning av et gasskromatogram av råoljen med en bleket og filtrert råolje. Under de anvendte blekebetingelser, ble mengden flyktige komponenter redusert med opptil 70 % i forhold til råoljen. Blekingen viser en tydelig reduksjon i flyktige komponenter og flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter (eks. 1-penten-3-ol) fra flerumettede omega-3 fettsyrer



i marine oljer. Resultatene viste høyere nivå av flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter i oljer med høyere anisidintall, og lavere nivå i oljer med lavere anisidintall, som forventet.



Figur 13 Gasskromatogram av makrell råolje (A) og råolje bleket med CelaClear 160 (B)

## 7.2.5 Optimalisering av blekebetingelser

Tabell 9 Resultater på fargetall, PV, AV, TOTOX, Absorbans (450 nm) og flyktige sekundære oksidasjonsprodukter

Forsøk	Fargetall	PV	AV	TOTOX	Abs 450 nm	1-penten-3-ol Areal	2-etylfuran Areal	2-heksenal Areal
1	2,3	2,2	8,7	13,1	0,1336	6302945	7886329	4511865
2	0,7	1,3	3,8	6,4	0,0112	2180899	2392919	3259357
3	2,3	3,1	9,5	15,7	0,0757	8870939	10102215	5455919
4	0,7	1,5	3,7	6,7	0,0027	2435305	3346116	2209870
5	2,7	1,9	11,8	15,6	0,0790	6852356	9952145	7923845
6	1,0	1,6	2,3	5,5	0,0102	1631695	1664425	921763
7	1,7	1,8	6,7	10,3	0,0540	4692731	10960770	6054660
8	1,3	1,7	3,5	6,9	0,0180	2997195	3881761	2119129
9	3,7	2,6	8,7	13,9	0,1733	12798968	13620507	4043236
10	1,0	1,9	3,0	6,8	0,0004	1643322	2829018	1440243
11	1,7	1,8	6,9	10,5	0,0754	1629004	3725517	5160385
12	1,0	1,6	3,7	6,9	0,0146	1612527	3469926	2521739
13	1,3	1,1	7,9	10,1	0,0304	5154076	6326983	5278532
14	1,3	1,6	4,4	7,6	0,0585	2754230	4250098	3594293
15	1,3	2,6	5,5	10,7	0,0267	5138250	5540737	4265895
16	2,0	1,7	7,0	10,4	0,0835	3480767	5784814	6215924
17	1,7	1,2	4,1	6,5	0,0219	3265521	6155224	3252256
18	1,3	1,6	5,9	9,1	0,0391	2657444	5905896	4478363
19	1,3	2,0	5,4	9,4	0,0257	3619063	7718437	3768771
Crude	4,7	4,7	7,3	16,7	0,2584	14775964	5915422	5114682

Resultatene fra screening av adsorbenter ble diskutert med EPAX/Pelagia, og ut fra en samlet vurdering av effekt på bleking og oksidasjon, ble Tonsil Supreme 114F valgt ut for bruk i et 3-faktorielt optimaliseringsforsøk for å definere optimale blekebetingelser (**Tabell 3**). I optimaliseringsforsøket ble det valgt å anvende industrielt relevante nivåer av blekejord, aktivt kull og bleketid. Det aktive kullet som ble benyttet var NORIT SA 4 PAH-HF levert fra Brenntag. Dette er en type kull som er laget for fjerning av persistente organiske miljøgifter (POP'r) i oljen og ikke fargestoffer.

Resultater fra måling av Fargetall, PV, AV, TOTOX, absorbans (450 nm) og flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter er gjengitt i **Tabell 9**.

Tabell 10 Responsflatemodeller basert på 3-faktorielt forsøksdesign (Tabell 2). Ikke-signifikante variable er fjernet i modelleringen

	PV		Reduksjon				
	Fargetall	(mekvperokid/kg)	AV	450 nm (%)	1-penten-3-ol (areal)	2-etylfulan (areal)	2-heksenal (areal)
Intercept	4,114	3,193	12,185	16,266	11446790	12430177	4222942
BJ (%)	-1,450	-0,675	-1,804	29,667	-5941998	-5172113	
BJ (%)^2	0,165			-3,119	720175	485378	
AK (%)				19,526	13525986	13397785	
AK (%)^2					-9637522	-10697177	
BT (min)							42198
BT (min)^2		-0,142E-3					
BJ (%)*AK (%)							
BJ (%)*BT (min)		0,671E-2					-16411
AK (%)*BT (min)			-0,351E-1		-35230		
R <sup>2</sup>	0,83	0,47	0,77	0,82	0,90	0,93	0,60
Lack of fit	0,53	0,87	0,32	0,76	0,36	0,44	0,49

Basert på responsflatemodellering ble det funnet signifikante modeller som beskriver effekten av de anvendte prosessvariable (Tabell 10). Forklart varians varierte fra 47 til 93 %. For alle modellene ble det funnet en ikke-signifikant «lack of fit».

### Absorbansmålinger

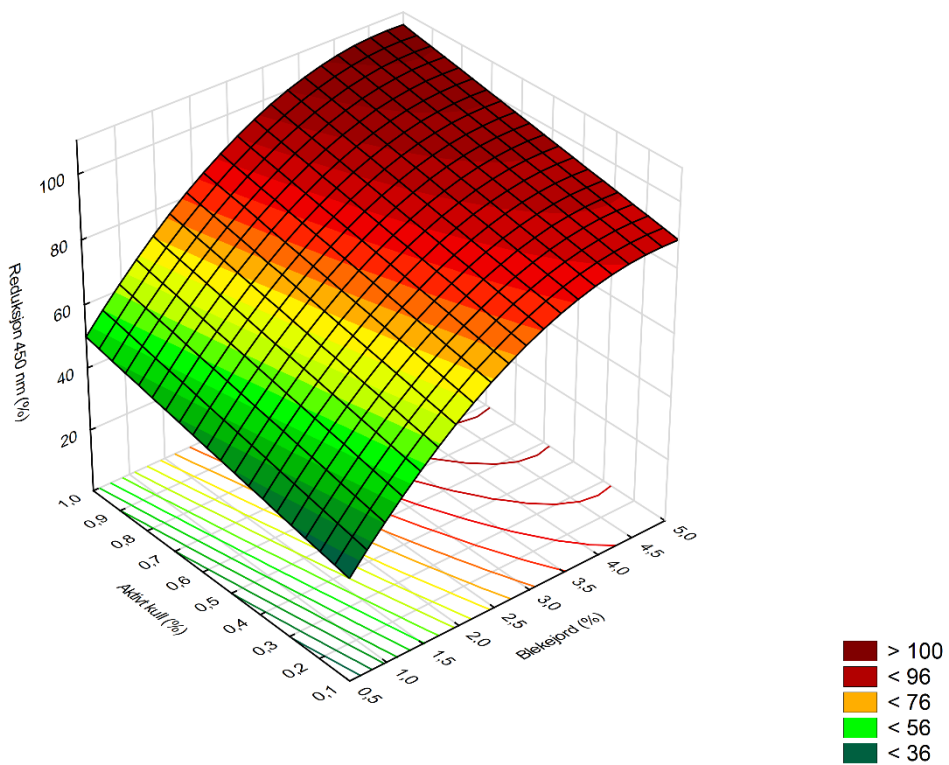
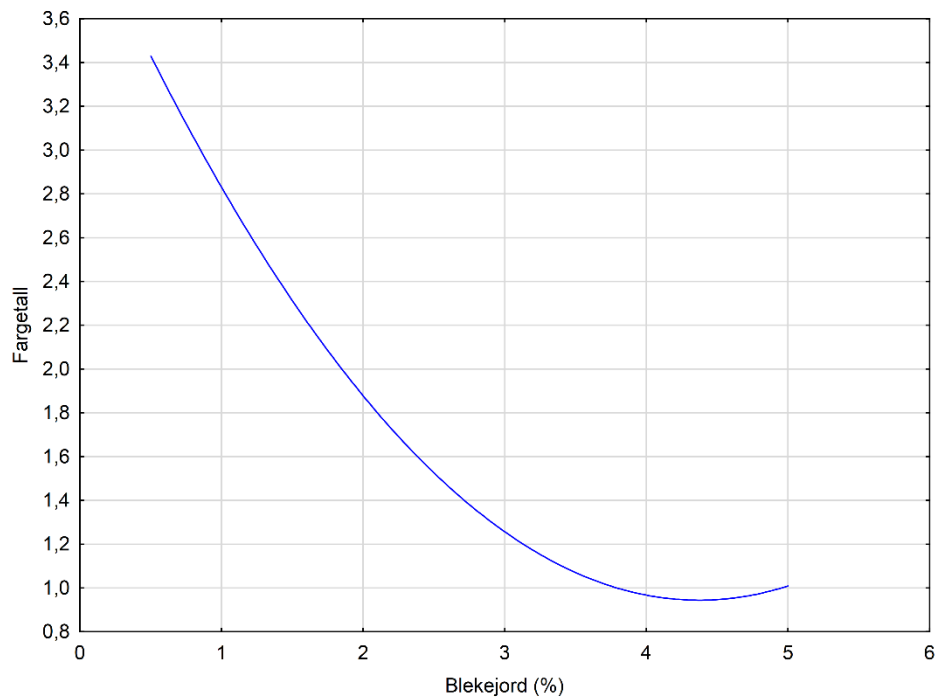
Fargetall og UV absorbans måleverdiene ved 450 nm er gitt i Tabell 8. Måleverdiene for de andre to karotenoid bølgelengdene (460 og 474 nm) viste samme fordeling mellom prøvene, men 10-25 % lavere enn for 450 nm. Det er funnet god overenstemmelse mellom absorbans-målingene og fargetall ( $r=0,95$   $p<0,0001$ ) og fargen på bildene (Figur 14).



Figur 14 Foto av råolje og blekede oljer behandlet med TONSIL Supreme 114F og aktivt kull. Tallene svarer til forsøksbetingelsene gjengitt i Tabell 3

Blekeeffekt målt basert på fargetall viste en reduksjon fra 4,7 i råoljen ned til 0,7 ved de beste eksperimentelle betingelser (Forsøk 2 og 4; **Tabell 3**). Kun mengde blekejord ble funnet å gi en signifikant blekeeffekt basert på måling av fargetall (**Figur 15**). Måling av absorbans ved 450 nm gir et mer sensitivt mål på fjerning av pigmenter og her er det funnet effekt også av aktivt kull tilsetning, men uten noen interaksjon med blekejord. Økende mengde blekejord gir som forventet størst effekt ved lave nivå for deretter å flate ut ved rundt 4 % dosering og 85 % reduksjon av absorbans. Ytterligere

effekt er kun oppnådd i kombinasjon med aktivt kull. Den additive effekten av aktivt kull er lineær og tilsvarer 20 % reduksjon av adsorbans ved 450 nm ved 1 % dosering (**Tabell 3**). Det er ikke funnet noen effekt av bleketid innenfor det studerte variasjonsområdet (15 – 120 minutter). Dette bekrefter at adsorpsjon av pigmenter skjer meget raskt og at det oppnås en likevekt mellom adsorbent og løst pigment i løpet av under 15 minutter.



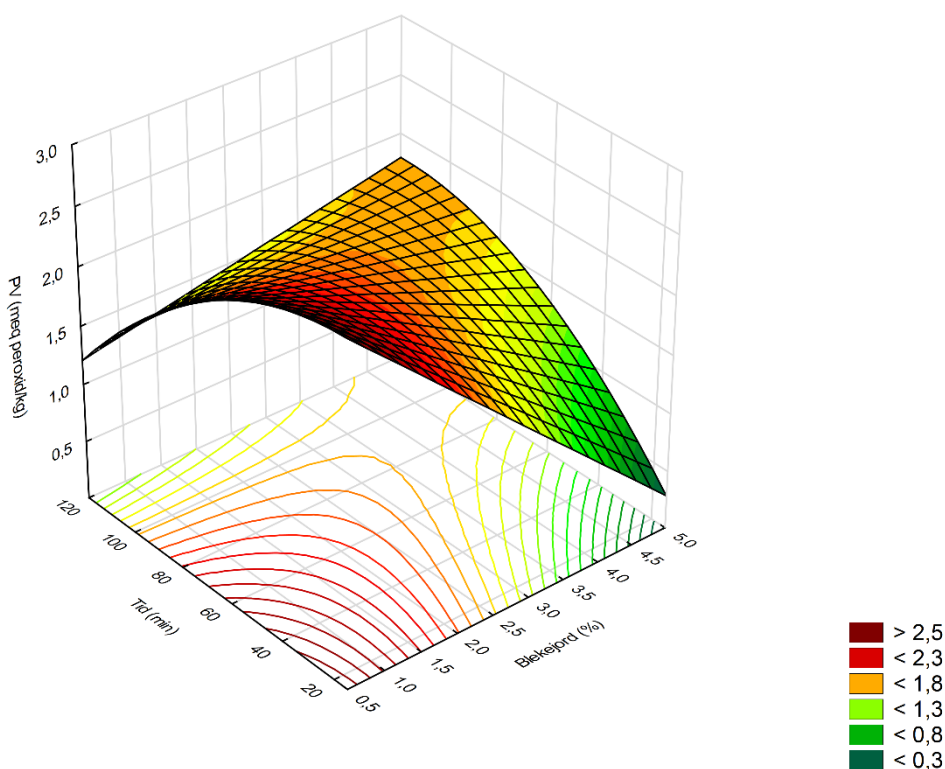
Figur 15 Responsflateplott for effekt på fargetall (øverst) og reduksjon av farge målt ved 450 nm (nederst). Responsflatemodellene er gitt i **Tabell 10**

## PV og AV verdier

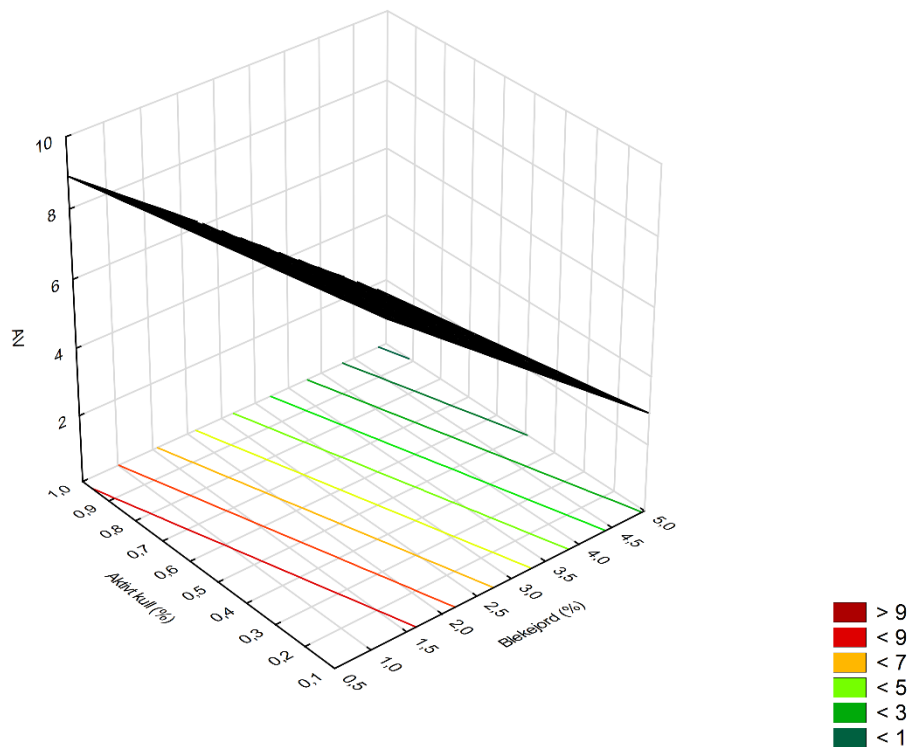
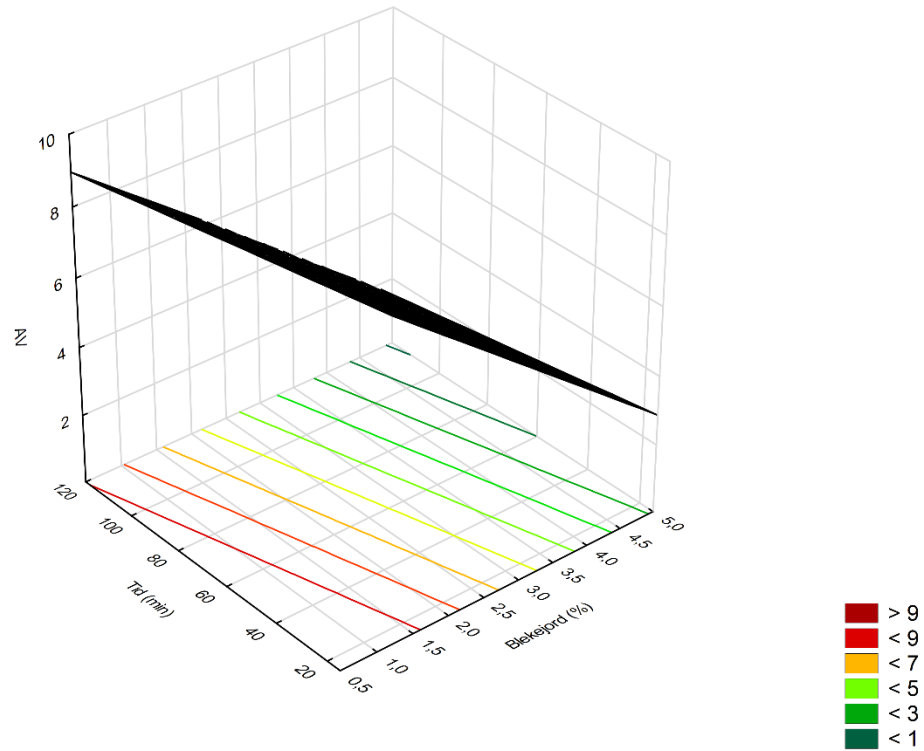
Bleking ved bruk av TONSIL Supreme 114F har gitt en positiv effekt på reduksjon av PV i oljen (**Tabell 8, Figur 16**).

Nivået er i alle forsøkene betydelig redusert i forhold til råoljen (4,7 mekv. peroksid/kg) med det laveste eksperimentelle nivå på 1,1 (forsøk 13; **Tabell 9**). Bleketiden viser en kurvatur som er vanskelig å forklare, men indikerer at det ikke er noen effekt av å øke bleketiden utover det laveste nivå på 15 minutter som er anvendt i dette forsøksdesignet. Generelt ble det oppnådd en relativt dårlig modell for PV ( $R^2 = 0,47$ ; **Tabell 10**) og en detaljert tolkning av resultater bør derfor gjøres med forsiktighet.

Et tilvarende bilde er oppnådd for AV. Økende mengde blekejord gir en reduksjon i AV, men de eksperimentelle resultatene viser nivå både over og under råoljen ( $AV = 7,3$ , **Tabell 9**). Dette kan delvis forklare med at spaltning av peroksider som gir opphav til sekundære oksidasjonsprodukter. Aktivt kull og bleketid kommer ut med en signifikant interaksjon i modellen, men effekten av disse variablene på AV er marginal som vist i **Figur 17**.



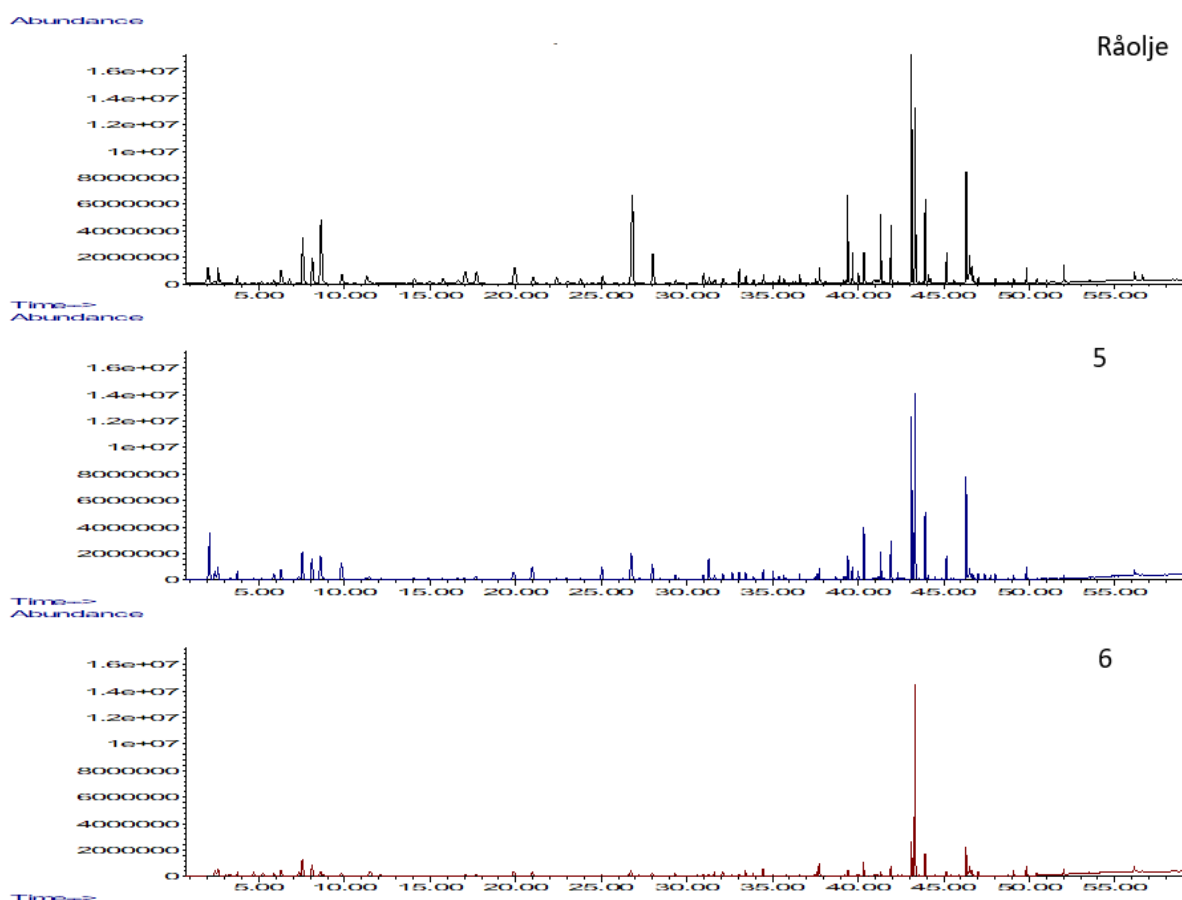
Figur 16 Responsoverflatemodell for PV i oljen etter bleking. Responsoverflatemodellen er gitt i **Tabell 10**



Figur 17 Responsflateplott for AV-nivå i oljen etter bleking. Nivå av tredje variabel i plottene er lik senterpunkt i designet (Tabell 2). Responsflatemodellene er gitt i **Tabell 10**

## Flyktige forbindelser

De flyktige forbindelsene var dominert av sekundære lipid oksidasjonsprodukter, som er i samsvar med hva som ble funnet under screeningen (avsnitt 3.1.1) som viste størst andel av flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter. Tilsvarende som i screeningforsøket er det funnet høye nivå av flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter i oljer med høyt anisidintall, og lave nivå i oljer med lavt anisidintall. **Figur 18** viser gasskromatogram fra råoljen og oljer fra blekeforsøk nr. 5 og 6 som viste henholdsvis høyest (nr. 5) og lavest (nr. 6) anisidintall (hhv. 11,8 og 2,3; **Tabell 9**). Kromatogrammene visere en betydelig reduksjon i flyktige forbindelser som er en effekt av at de blir adsorbent til blekejorden og fjernet ved filtrering. Mengden flyktige oksidasjonsprodukter viste også en høy signifikant korrelasjon med anisidintall: 2-heksenal ( $r=0,90$ ,  $p<0,0001$ ), 1-penten-3-ol ( $r=0,83$ ,  $p<0,0001$ ) og 2-etyl-furan ( $r=0,84$ ,  $p<0,0001$ ).

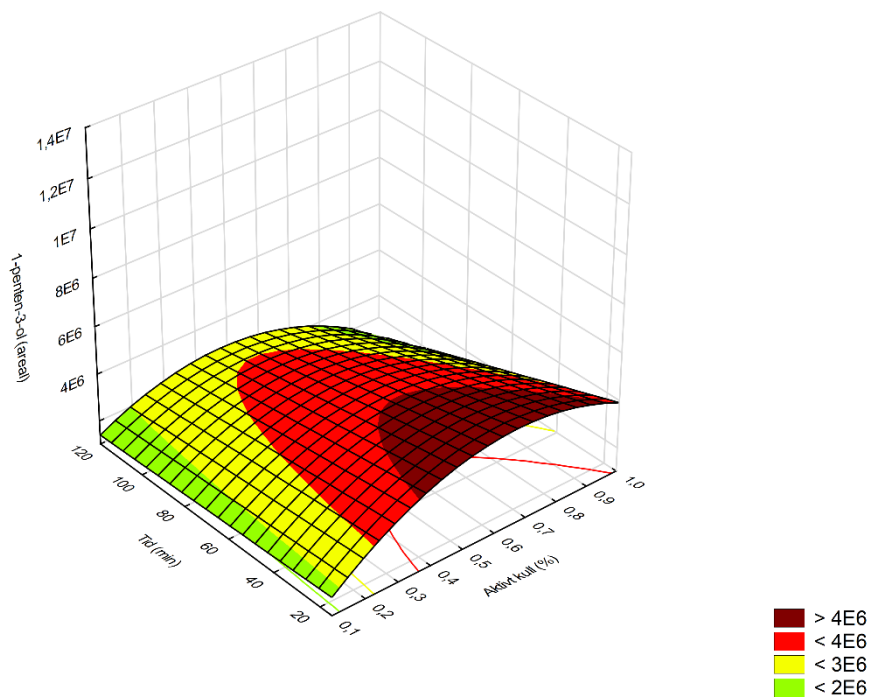
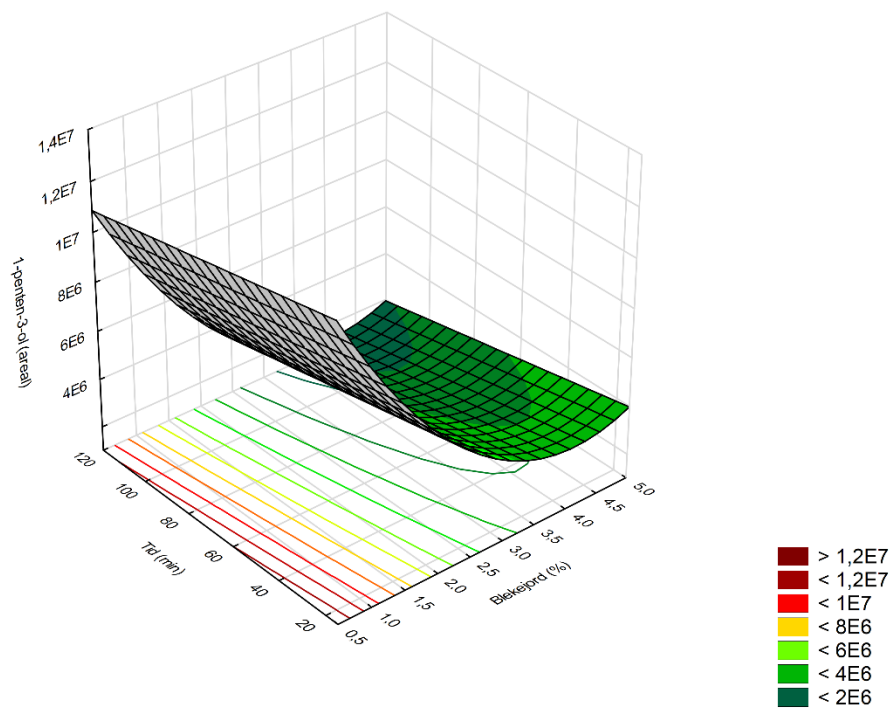


Figur 18 Gasskromatogram av makrell råolje og to blekede oljer fra forsøk 5 og 6

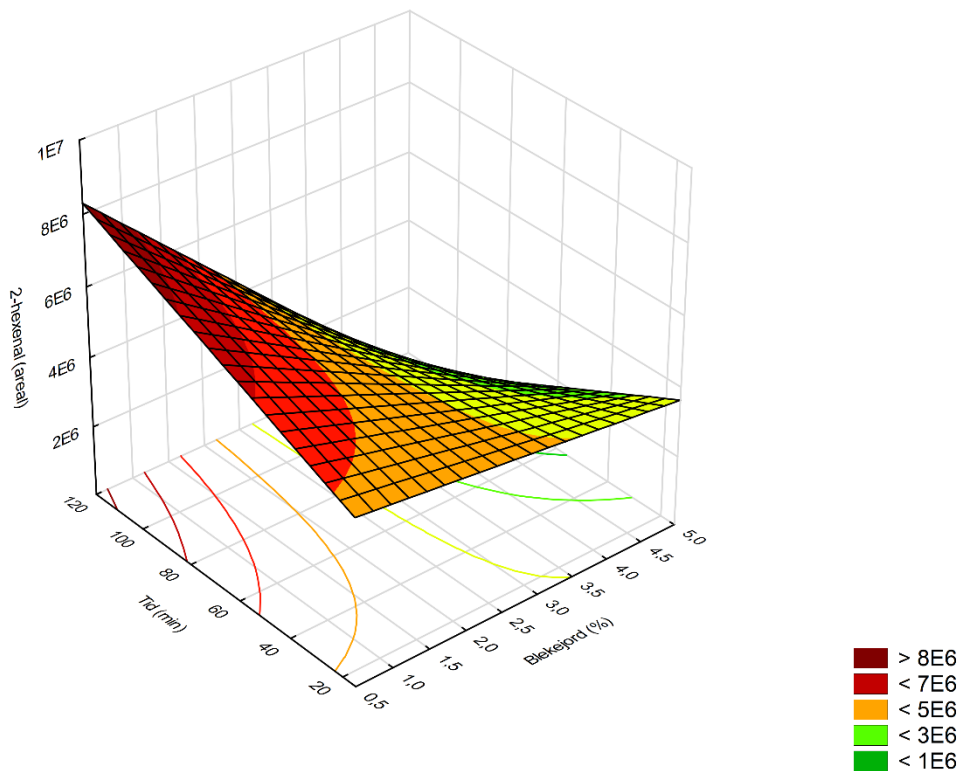
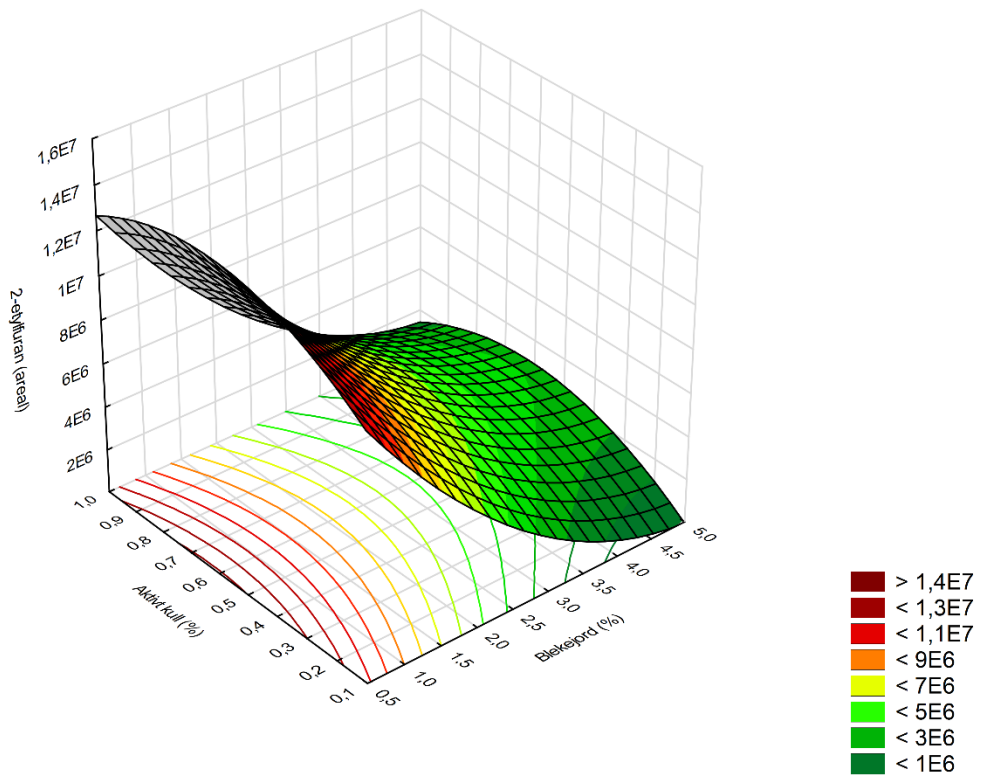
For reduksjon av 1-penten-3-ol er det funnet en betydelig effekt av økende aktivt kull dosering (**Figur 19**). Nivået er redusert fra  $1,5 \times 10^7$  i råoljen til  $10^6$  – nivåer etter bleking. Også her er det funnet marginal effekt av økt bleketid. Aktivt kull har gitt en svakt negativ effekt, men marginalt sammenlignet med blekejord. Det er funnet en svak interaksjon mellom aktivt kull og bleketid, men denne er marginal. Det er derfor lite å oppnå ved bruk av lang bleketid på reduksjon av 1-penten-3-ol i oljen.



Bleketrinnet har også hatt effekt på reduksjon av 2-etylfulran og 2-hexenal (**Figur 20**), men for begge disse flyktige komponentene er det funnet nivå både over og under det som er observert i råoljen. Økende nivå blekejord har gitt en reduksjon, mens bleketid over 15 minutter er av mindre betydning.



Figur 19 Responsflateplott for 1-penten-3-ol (areal) i oljen etter bleking. Nivå av tredje variabel i plottene er lik senterpunkt i designet (Tabell 2). Responsflatemodellene er gitt i **Tabell 10**



Figur 20 Responsflateplott for 2-etyl-furan (øverst) og 2-hexenal (nederst) i oljen etter bleking. Nivå av tredje variabel i plottene er lik senterpunkt i designet (Tabell 2). Responsflatemodellene er gitt i Tabell 10

## 7.2.6 Konklusjon

Syv ulike kommersielle blekemidler fra tre leverandører er blitt testet ut på råolje fra makrell restråstoff med en dosering på 2 % blekejord, ved 70 °C i 30 min under vakuüm. Tonsil Supreme 114F gav best blekeeffekt på den testede makrell råoljen, med 79 % fargereduksjon, mens Perform 6000 gav minst effekt med 28 % fargereduksjon.

Analyse av primære og sekundære oksidasjonsprodukter (PV, AV og flyktige sekundære oksidasjonsprodukter) ble målt i råoljen og bleket olje. Resultatene viste at TONSIL blekejord ga lavest PV, mens CelaClear ga lavest AV og flyktige sekundære oksidasjonsprodukter.

Ut fra en samlet vurdering av effekten av bleking og oksidasjon, ble TONSIL 114F valgt ut for videre testing basert på et 3-faktorielt design med variablene mengde blekjord, aktivt kull og bleketid. Resultatene viste at blekeeffekten økte med mengden blekjord, men flatet ut ved nivåer over 3,5-4%. Tilsetning av aktivt kull ga en uavhengig effekt uten interaksjon med blekejord, men effekten var mye lavere relativt til mengde adsorbent. Det ble påvist marginal effekt av en økning i bleketid utover det laveste nivået som er anvendt i optimaliseringsforsøket (15 min).

## 7.3 Vinterisering lanskala

### 7.3.1 Tørrfraksjoneringsforsøk

Fire krystalliseringstemperaturer ble forsøkt i labskala. Råoljen (ca 27 g) ble gradvis nedkjølt fra 30 °C ( $T_1$ ) til  $T_2$  over 15 timer uten omrøring og holdt ved krystalliseringstemperaturen ( $T_2$ ) i 4 timer. Etter sentrifugering ble oleinfraksjonen dekantert fra. Som ventet går utbytte av olein nedover i takt med  $T_2$ . I tillegg går separasjonseffektiviteten ned slik at mer olein blir liggende igjen i stearinen (se **Tabell 11** og avsnitt om DSC nedenfor).

Tabell 11 Utbytte ved tørrfraksjonering av makrellolje F17-368

Startmateriale	$T_1$ (°C)	$T_2$ (°C)	Utbytte olein	Utbytte stearin	Andel flytende fett i oljen ved $T_2$ (DSC)
26,46 g	30	15	25,65 g (97%)	0,68 g (2,6%)	95 %
26,88 g	30	10	18,91 g (70%)	7,65 g (28,5%)	85 %
26,97 g	30	5	13,55 g (50%)	13,14 g (48,7%)	73 %
26,90 g	30	0	10,64 g (40%)	16,18 g (60,1%)	62 %

Tørrfraksjonering i 10x skala ga omtrent likt utbytte: 261,1 g råolje var nedkjølt fra 30 °C til 5 °C med sakte omrøring og nitrogendekning over 15 timer (1.67 °C/time) og holdt ved 5 °C i 4 timer. Etter vakuümfiltrering i kjølerom (5 °C) gjennom glass-sinter filtertrakt ble utbytte 117,8 g stearin (45 %) og 123,7 g olein (47 %). Etter tørrfraksjonering ved 0 °C var det ikke praktisk å filtrere den tykke massen med glass-sinter filtertrakt selv om sentrifugering etterfulgt av dekantering var mulig.

Det var gjort ett forsøk på å vurdere effekten av lengre nedkjølingstid: Tørrfraksjonering var utført fra 30 °C til 5 °C over 75 timer (0.33 °C/time). Vurdert visuelt ga dette større krystaller sammenlignet med

bruk av nedkjølingshastighet på 1.67 °C/time. Det ble gjort innledende forsøk på å kvantifisere denne forskjellen med bruk av mikroskopi uten at vi lykkes med dette. Etablering av slik metodikk vil kreve mer tid enn det som har vært til rådighet innenfor dette prosjektet.

### 7.3.2 Flertrinns-tørrfraksjonering

Dersom mye stearin felles ut kan oljen bli vanskelig å filtrere. En løsning er å dele prosessen opp i flere trinn slik at mindre stearin felles ut i hver krystallisering. Dette prinsippet ble testet ut ved å kjøle ned råoljen i tre trinn: 1) fra 30 °C til 10 °C; 2) fra 15 °C til 5 °C; og 3) fra 10 °C til 0 °C, med sakte omrøring og nitrogenatmosfære. Stearinfasen var fjernet ved vakuumfiltrering mellom hvert trinn. Resultatene er gjengitt i **Tabell 12**. Sammenlagt utbytte av olein var 39%, omtrent som ved ett-trinns tørrfraksjonering ved 0 °C (40 %). Filtrering var derimot ikke praktisk mulig ved bruk av en ett-trinns fraksjonering ved 0 °C og olein ble her skilt fra ved bruk av sentrifugering.

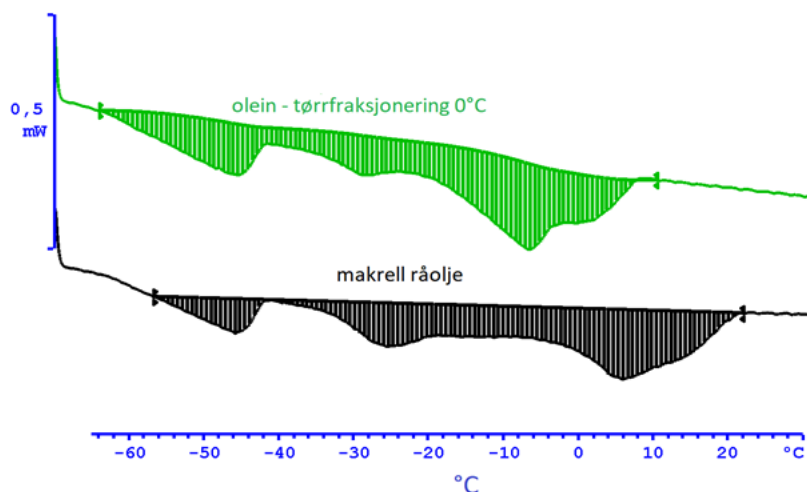
Tabell 12 Utbytte ved bruk av flertrinns-tørrfraksjonering

Trinn	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	Utbytte olein	Akkumulert utbytte olein	Utbytte stearin
1	30	10	231 g (66%)	66 %	102 g (29%)
2	15	5	182 g (79%)	52 %	28 g (12%)
3	10	0	137 g (75%)	39 %	27 g (15%)

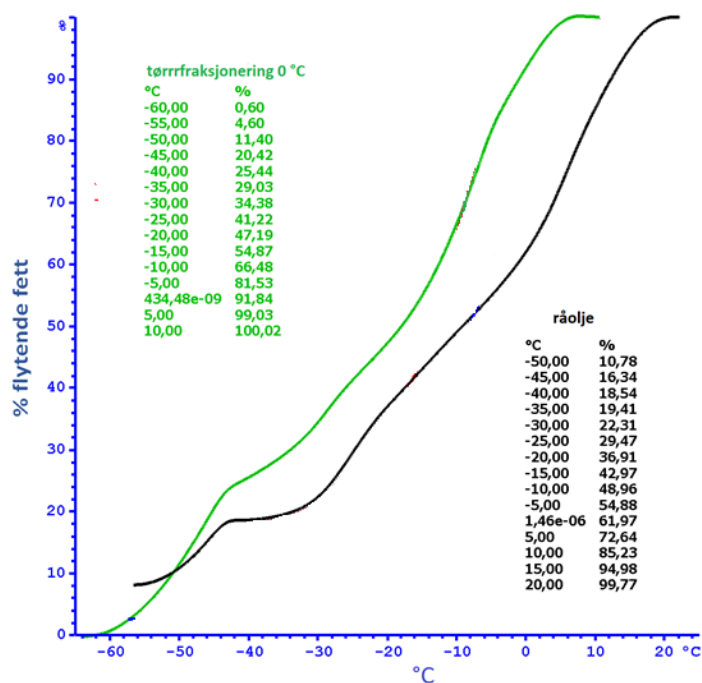
### 7.3.3 Differensial skannekalorimetri (DSC)

I DSC analysene ble prøvene (ca 7 mg) kjølt ned fra 40 °C til -70 °C (1 °C/min), holdt ved -70 °C i 5 minutter, og så varmet fra -70 °C til 40 °C (1 °C/min). Kurvene i **Figur 21** viser bare smeltekurvene (den siste gradienten fra -70 °C til 40 °C). Arealet under (egentlig over, siden endotermiske kurver per konvensjon er tegnet med toppene pekende nedover) kurvene tilsvarende integralene i **Figur 22** er farget inn.

Integrering av smeltekurvene ble brukt til å estimere fastfettandelen (stearin) i råoljen og fraksjoneringsproduktene (se **Figur 22**). Det viser at råoljen inneholder 100 % flytende fett ved 20 °C (i samsvar med hva man observerer—at råoljen er flytende og gjennomsiktig ved 20 °C) og 48 % fast fett ved 0 °C. Olein fra tørrfraksjonering ved 0 °C har en fastfettandel på 8 % ved 0 °C. Dette bekreftes med at noe stearin felles ut når denne oljen blir plassert i isbad. Koldklaring noen grader under null kan derfor være nødvendig for å klare denne testen.



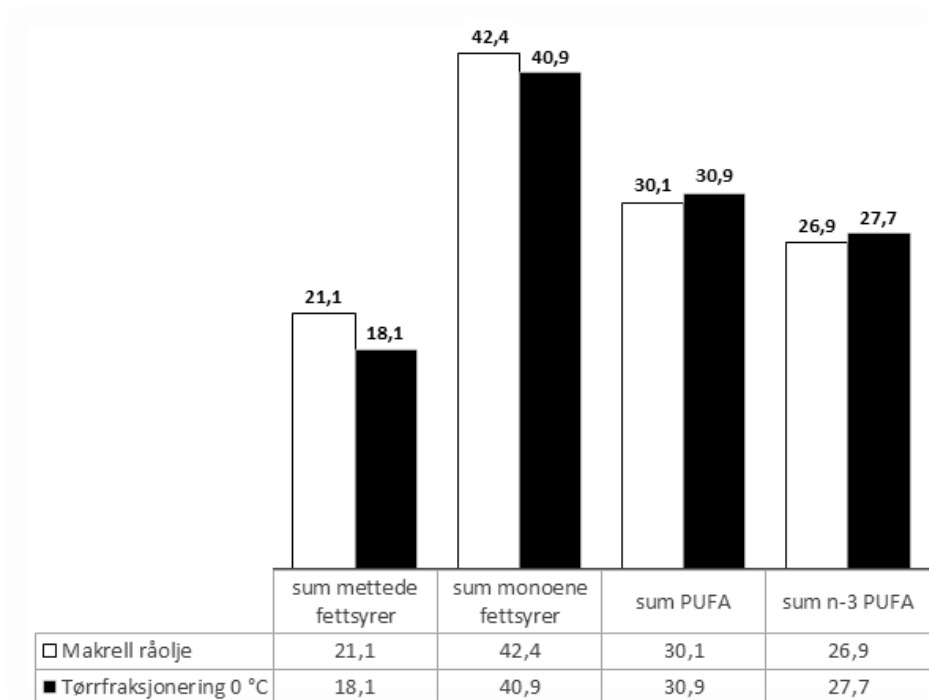
Figur 21 DSC smeltekurver for oleinfraksjonen og råoljen



Figur 22 Integrering av smeltekurver viser flytende fett andel i oleinfraksjoner og råoljen

### 7.3.4 Fettsyrer

Som man ser av **Figur 23** og **Tabell 13**, får man en liten oppkonsentrering av PUFA og en liten reduksjon av mettet fett ved tørrfraksjonering. Resultater fra fettsyreanalysene fra vinteriseringsforsøkene er gjengitt i **Vedlegg**. Fordi så mye stearin felles ut (eller så mye olein blir igjen i stearinfraksjonen) ved tørrfraksjonering ved 0 °C, får man et utbytte av olein på 40 % og et utbytte av PUFA på 31 %. Det vil si at mer en halvparten av PUFA ender opp i stearinfraksjonen.



Figur 23 Fettsyrefordeling (vektprosent) i makrell råoljen og vinteriserte oljer

Tabell 13 Fettsyrefordeling i makrell råolje og fraksjoneringsprodukter

Fettsyrer	Makrell råolje	Tørrfraksjonering olein 0 °C	Tørr-fraksjonering stearin 0 °C
Mettede	21,1	18,1	22,9
Monoene	42,4	40,9	42,0
Flerumettede	30,1	30,9	26,7
n-3 flerumettede	26,9	27,7	23,8
EPA + DHA	18,2	18,8	16,1
Utbytte (%)	100,0	39,6	60,1

### 7.3.5 Konklusjon

Forskjellige temperaturer under vinterisering (koldklaring) ved bruk av tørrfraksjonering er undersøkt. Tørrfraksjonering ved 0 °C ga et utbytte av olein på 40 % og det ble ikke produsert en olje som passerte AOCS Cold test (AOCS 2017). Men tørrfraksjonering ved 0 °C ga en olje som holdt seg flytende og klar ved 4 °C (kjøleskap temperatur). Utbyttet av PUFA i oleinfraksjonen var 41 %.

Vinteriseringsforsøkene er utført på råolje fra makrell restråstoff. Det kan muligens forventes en bedre dannelse av store krystaller og enklere filtrering ved bruk av en avsyret og bleket olje. Dette gjøres normalt i industriell skala og må verifiseres gjennom nye forsøk. Det har ikke vært rom innenfor rammen av dette prosjektet å gjennomføre en optimalisering av betingelsene for vinterisering. Dette

vil omfatte ytterligere testing av ulike nedkjølingshastigheter. Filtreringshastighet bør også undersøkes basert på den teknikk som anvendes industrielt, dvs. filterpresse.

## 7.4 Pilotraffinerer

### 7.4.1 Gardner fargemåling

**Figur 24** viser råoljen før og etter bleking (forsøk 1) og deodorisering (forsøk 1 etter 3 timer). Råoljen hadde Gardner fargetall på 4,7 (se også tidligere Nofima rapport 37/2019, Haugen m.fl. 2019), den blekede oljen og den deodoriserte oljen hadde fargetall på 1,0. Deodoriseringen bidro også til en svak blekeeffekt, som resulterte i en noe lysere/blankere olje sammenlignet med etter bleking (**Figur 24**). Gardner fargeskalaen er relativt grov og denne forskjellen kommer ikke til uttrykk på fargetallet, selv om dette skulle tilsi et fargetall på mindre enn 1,0.



Figur 24 Makrell råolje før og etter bleking forsøk 1 (B1) og deodorisering forsøk 1 etter 3 timer (D1.3)

### 7.4.2 Peroksid og anisidin tall (PV og AV)

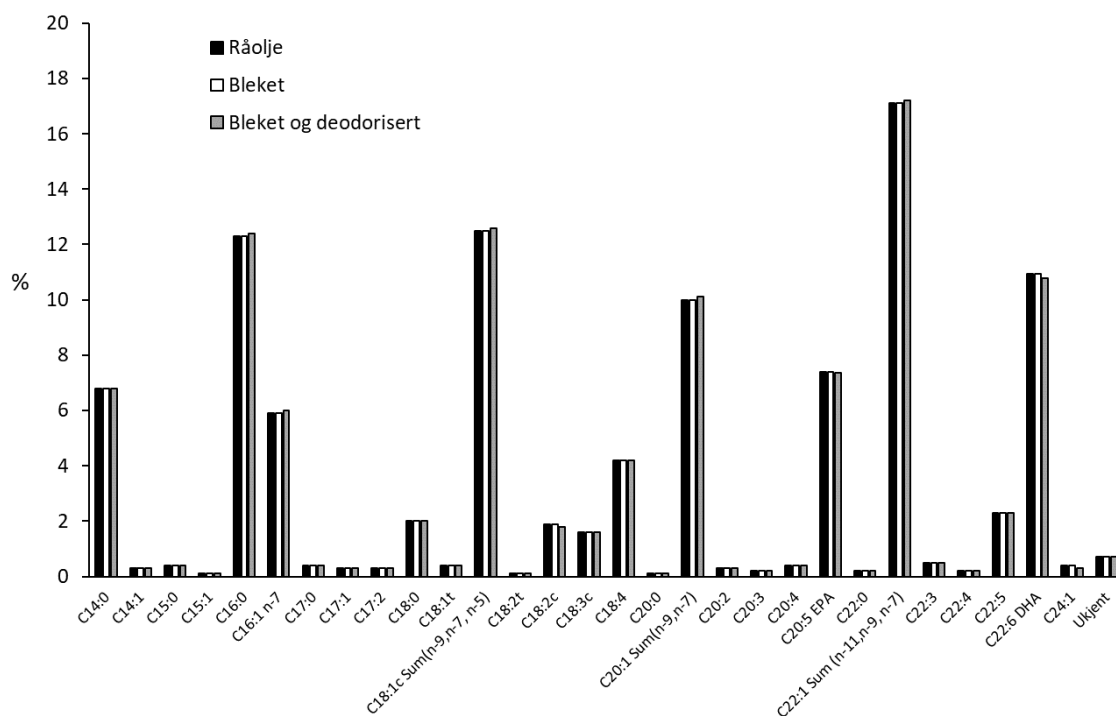
Resultater fra analyse av peroksid og anisidintall av råoljen, etter bleking og deodorisering er gjengitt i **Tabell 14**. Blekettrinnet har størst effekt på reduksjon av PV, fra 2,8 i råoljen til 0,47 (B1) og 0,4 (B2), tilsvarende hhv. 83 % (B1) og 86 % (B2) reduksjon i PV. Reduksjon i AV er også betydelig og på hhv. 34 % (B1) til 50 % (B2). Deodoriseringen førte til en ytterligere nedgang i PV, til henholdsvis 0,06 (D1) og 0,00 (D2) etter tre timer. AV gikk ned til henholdsvis 3,1 (D1) og 2,6 (D2) etter tre timer, hvilket indikerer at det fortsatt er små mengder med sekundære lipidoksidasjonsprodukter igjen i oljen. Analysene bekreftet også at de endringer i deodoriseringsbetingelser som ble gjort etter forsøk 1 (jfr. 2.3 Deodoriseringsbetingelser) har gitt påviselige resultater på PV og AV nivået.

Tabell 14 Peroksid tall (PV) og anisidintall (AV) for råolje og etter bleking og deodorisering. PT er prosess tid i timer, B1 og B2 svarer til bleking batch 1 og 2, og D1 og D2 til deodorisering batch 1 og 2

Oljeprøve	PT t	PV	AV
Råolje	-	2,80	7,0
B1	0,5	0,47	4,6
B2	0,5	0,40	3,5
D1	1,0	0,24	3,7
D1	2,0	0,22	3,5
D1	3,0	0,06	3,1
D2	1,0	0,27	3,3
D2	2,0	0,20	3,1
D2	3,0	0,00	2,6

### 7.4.3 Fettsyreprofil

Resultater fra fettsyreanalyse i råolje, etter bleking og etter tre timers deodorisering er gjengitt i **Figur 25**. Resultatene viste ingen signifikant reduksjon av fettsyrer på grunn av termisk nedbrytning eller isomerisering.



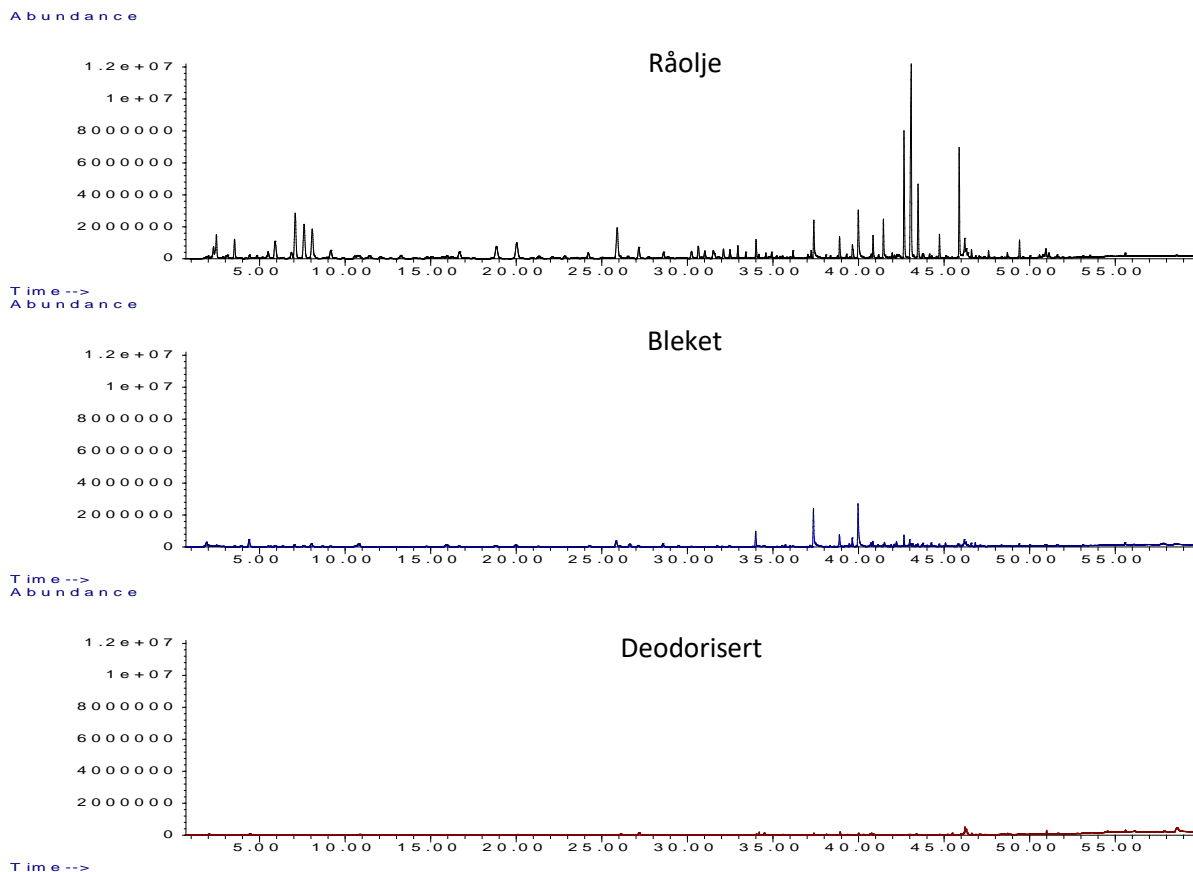
Figur 25 Fettsyresammensetning i råoljen, etter bleking og etter deodorisering



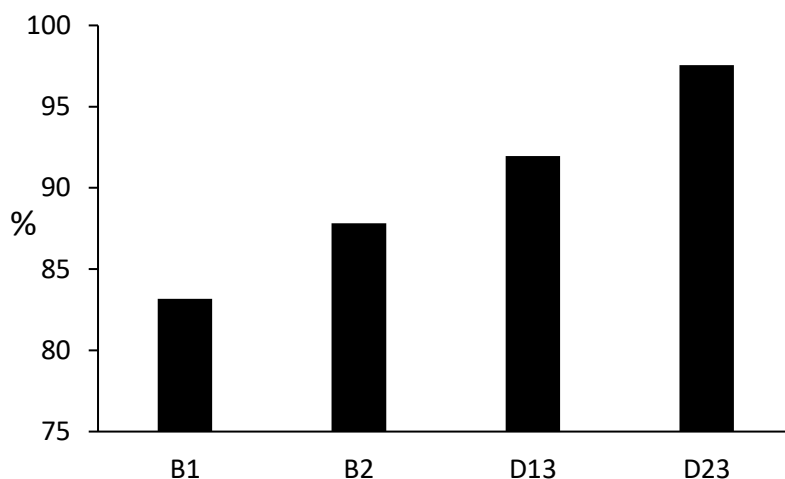
#### 7.4.4 Flyktige forbindelser

Gass kromatogram av råoljen, bleket og deodorisert olje er gjengitt i **Figur 26**. Råoljen inneholder mye flyktige forbindelser med en stor andel sekundære lipidoksidasjonsprodukter som tidligere omtalt (Haugen 2018). Bleking fører til en betydelig reduksjon av flyktige forbindelser, henholdsvis 83 % etter den første blekingen og 88 % etter den andre blekingen (**Figur 27**). Dette er i samsvar med det som ble funnet under blekeforsøkene i lab skala (Haugen 2018) der det bla. finner sted en betydelig reduksjon av sekundære lipidoksidasjonsprodukter som bidrar til harsk lukt og smak. Deodorisering av den blekede oljen førte til en ytterligere reduksjon i flyktige forbindelser. Den totale reduksjonen av flyktige forbindelser som effekt av bleking og deodorisering var henholdsvis 92 og 98 % (**Figur 27**).

Reduksjonen av flyktige forbindelser viser også en høy korrelasjon med nedgang i anisidintall ( $r=0,98$ ,  $p<0,001$ ), som er å forvente, siden mye av de flyktige forbindelsene er sekundære lipid oksidasjonsprodukter (Haugen 2018).



Figur 26 Gass kromatogram av makrell råoljen før og etter bleking og deodorisering



Figur 27 Reduksjon av flyktige forbindelser etter de to blekeforsøkene (B1 og B2) og de to deodoriseringsforsøkene (D13 og D23)

#### 7.4.5 Sensorisk analyse

##### Under deodorisering

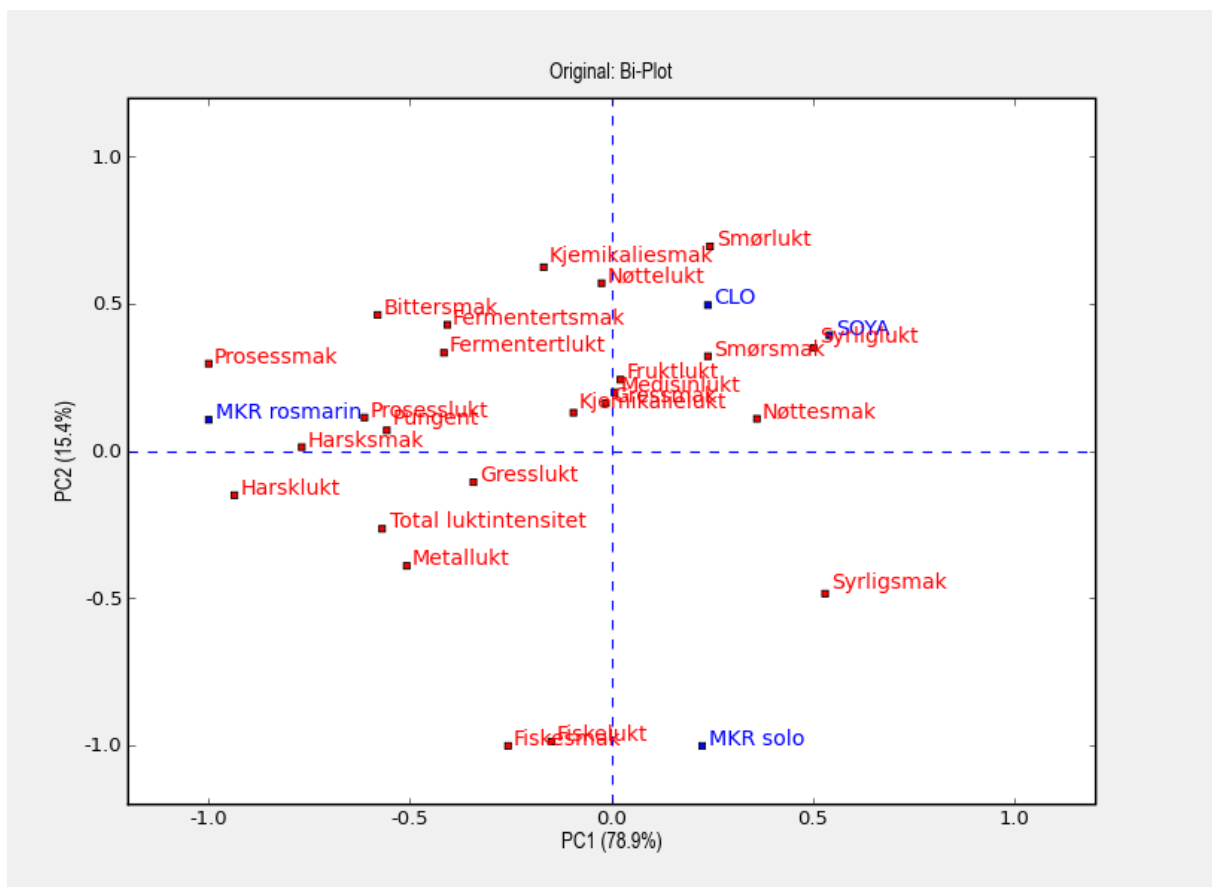
Begge deodoriseringsforsøk viste en betydelig nedgang i lukt og smak i oljen etter 1 time. Sensorisk kvalitet ble ytterligere forbedret etter 2 og 3 timer deodorisering, men forskjellene var relativt små. Kommentarer som ble gitt til oljekvaliteten var at den var så å si luktfri, ingen antydning til fiskelukt, men med en svak nøtteaktig ettersmak.

##### Ferdig raffinert olje

Resultatene fra den sensoriske bedømmelsen er gjengitt i **Tabell 14**. Makrelloljen har lav intensitet på de fleste egenskaper, og for 15 av egenskapene er den mere nøytral (lavere intensitet) i lukt og smak enn tranen og for 13 av egenskapene er den mere nøytral enn soyaoljen. Men den har relativ høy intensitet av metallukt og fiskelukt og -smak (se egenskapsbeskrivelsen i **Vedlegg**). Tran og soyaolje har relativt høy intensitet av smørlukt og -smak. Makrelloljen med rosmarinekstrakt har i tillegg til høyest total luktintensitet, en høy *pungent* smak og en relativ høy intensitet av harsk lukt og smak, prosesslukt og -smak, metallukt og bittersmak. PV og AV verdiene og flyktige komponenter av denne oljen viste ingen forskjell i graden av lipidoksidasjon sammenlignet med den rene makrelloljen, noe som tyder på at tilsetning av rosmarin kan endre den sensoriske profilen mot harske egenskaper slik de er definert her. Dette ser også ut til å være tilfellet for en rekke av de andre egenskapene for makrellolje tilsatt rosmarin-ekstrakt, som f.eks. prosess lukt og mak. Tranen har relativt lav intensitet av total luktintensitet, fiskelukt og -smak, metallukt og harsklukt. Soyaoljen har relativt lav intensitet av total luktintensitet, fiskelukt og -smak, prosesslukt og -smak og harsklukt. Oljene i forsøket er generelt beskrevet med lave intensiteter i egenskapene som ble undersøkt, med noen unntak: total luktintensitet, metallukt, bittersmak, nøttesmak og *pungent*.

Variasjonen i den sensoriske profilen basert på resultatene i **Tabell 15** er gjengitt i form av et todimensjonalt prinsipalkomponentanalyse (PCA) bi-plot (**Figur 28**), som viser sammenhengen mellom de sensorisk bedømte egenskapene og oljeprøvene. Tatt i betraktning signifikante egenskaper grupperer torskelleveroljen og soyaoljen seg sammen og har relativt høy intensitet av syrliglukt, smørlukt og -smak. Makrelloljen skiller seg fra de andre oljene ved at den har relativt høy intensitet av

fiskelukt og fiskesmak (for egenskapsbeskrivelse, se **Vedlegg**). Tilsetningen av rosmarinekstrakt Makrelloljen har tydelig bidratt til å endre karakteren til den raffinerte makrelloljen, og ligger langt til venstre i figuren, karakterisert ved prosess og harsk lukt og smak. Siden antioksidanten ble tilsatt under vakuum, skulle man ikke forvente at oljen er mere harsk enn makrelloljen uten tilsatt antioksidant. Analyse av flyktige forbindelser bekreftet også at oljen tilsatt rosmarinekstrakt ikke hadde høyere nivå av sekundære lipid oksidasjonsprodukter. Den påviste harske lukt og smak kan dermed tyde på at luktaktive forbindelser i rosmarinekstraktet, som blant annet inneholder mye terpen, kan bidra til en harsk karakter til tross for at oljen ikke kjemisk sett er harsk. En lignende interaksjonseffekt kan muligens også ha bidratt til prosess lukt og smak.



**Figur 28** Prinsipalkomponent (PC) biplot basert på sensoriske egenskaper gitt i Tabell 2. MKR solo – makrellolje uten antioksidant; MKR rosmarin – makrellolje med tilsatt rosmarinekstrakt; CLO – raffinert torskoleverolje; SOYA – raffinert soyaolje. 79 % av variasjonen forklares langs PC1 og 15 % langs PC2. Prøver som ligger nær sensoriske egenskaper i figuren, er prøver som i høy grad innehar disse egenskapene. Samtidig har de i liten grad de egenskapene som ligger langt unna i kartet

Tabell 15 *Middelverdier av intensiteten til de bedømte sensoriske egenskapene (skala 1-9). Hvis p-verdien er lavere enn 0,05 er det en signifikant forskjell mellom prøvene på 5 % nivå for denne egenskapen. Tall med ulike bokstaver vier prøver som er signifikant forskjellige basert på Tukey's test. Noen egenskaper viser p-verdi <0,05, men slår ikke ut i Tukey's test. Vær oppmerksom på at skala ikke bør tolkes direkte, tabellen illustrerer kun forholdet mellom prøver og egenskaper*

<b>Egenskap</b>	<b>Makrell</b>	<b>Tran</b>	<b>Soya</b>	<b>Rosm</b>	<b>p-verdi</b>
<b>Lukt</b>					
Total luktintensitet	4,30 AB	3,82 B	4,01 B	5,20 A	0,016
Syrliglukt	2,41 A	2,59 A	3,20 A	1,85 A	0,093
Gresslukt	1,69 AB	1,29 B	1,77 AB	2,34 A	0,072
Fiskelukt	2,91 A	1,81 B	1,96 B	2,44 AB	0,015
Smørlukt	1,03 A	1,87 A	1,70 A	1,09 A	0,049
Metallukt	3,19 AB	2,63 B	2,74 AB	3,87 A	0,032
Fruktlukt	1,11 A	1,21 A	1,54 A	1,32 A	0,558
Nøttelukt	1,55 A	2,18 A	2,06 A	2,03 A	0,536
Kjemikalielukt	1,97 A	2,34 A	1,78 A	2,15 A	0,601
Prosesslukt	1,87 AB	2,09 AB	1,56 B	3,02 A	0,048
Medisinlukt	1,01 A	1,25 A	1,18 A	1,14 A	0,606
Fermentertlukt	1,29 A	1,69 A	1,36 A	2,28 A	0,095
Harsklukt	2,33 B	2,16 B	1,75 B	3,91 A	0,004
<b>Smak</b>					
Syrligsmak	2,84 A	2,58 A	2,34 A	1,42 A	0,082
Bittersmak	3,47 B	3,80 AB	3,81 AB	4,93 A	0,035
Gresssmak	1,79 A	1,94 A	1,96 A	1,95 A	0,969
Fiskesmak	2,98 A	2,02 B	1,78 B	2,63 AB	0,004
Smørsmak	1,21 AB	1,47 AB	1,74 A	1,07 B	0,04
Nøttesmak	2,86 A	2,83 A	3,30 A	2,35 A	0,424
Kjemikaliesmak	1,87 A	2,45 A	2,48 A	2,68 A	0,513
Prosesssmak	2,04 B	2,48 AB	1,69 B	4,02 A	0,007
Fermentertsmak	1,17 A	1,72 A	1,27 A	2,19 A	0,080
Harsksmak	2,45 A	2,34 A	2,23 A	3,89 A	0,038
<b>Munnfølelse</b>					
Pungent	3,85 A	4,11 A	3,44 A	4,84 A	0,082

### 7.4.6 Utbytteberegninger

En prosess for fullraffinering av spiseoljer består av flere trinn der det er uunngåelig å få et tap av olje. Råoljen anvendt i dette prosjektet inneholdt et meget lavt nivå av frie fettsyrer på 0,5 % og det ble besluttet å ikke gjennomføre en alkaliraffinering for å redusere dette. Fjerning av fettsyrer gjennomføres ved at oljen tilsettes en svak lutløsning som omdanner de frie fettsyrene til natrium-såper som kan fjernes i et etterfølgende vasketrinn. Det brukes normalt et lite overskudd med lut og i prosessen vil det også kunne skje en svak hydrolyse av triglyseridene i oljen. Dersom oljen inneholder mye slam og proteinrester kan det dannes emulsjoner som øker tap av olje under det etterfølgende vasketrinn. Bruk av batch-apparatur vil gi større tap enn en kontinuerlig prosesslinje. Et estimert utbyttetap ved bruk av alkaliraffinering er 1,5 x % frie fettsyrer i oljen. I dette tilfellet 0,75 %.

Under bleketrinnet tilsettes oljen blekejord og aktivt kull. Basert på innledende tester i labskala ble det besluttet å anvende 3,5 % blekejord og 0,5 % aktivt kull. Tap av olje i dette prosesstrinn vil være avhengig av apparatur (dvs. tap av rester i reaktor, pumpe, rørgate, filter etc.) og olje absorbert i filterkaken. Normalt settes utbyttetapet lik mengde adsorbent, dvs. i dette tilfellet 4 %. Det er trolig mulig å redusere mengde adsorbent noe gjennom videre optimalisering av prosessen.

Vinterisering av oljen er ikke gjennomført i pilotforsøkene, men basert på tidligere forsøk med koldklaring av oljen er det oppnådd et oleinutbytte på 40 % (Haugen m.fl., 2019). I våre forsøk ble det anvendt filternutch med vakuumbesug for å fjerne stearinfraksjonen. Industrielt finnes det filterpresser med mulighet for å presse olein ut av stearinfraksjonen ved å komprimere filterkaken etter endt filtreringssyklus. Hvor stor effekt som kan oppnås på utbytte av olein må testes og optimaliseres.

Under deodorisering av oljen kan det forventes noe tap ved at flyktige komponenter stripes av ved at damp blåses gjennom oljen under vakuumbesug. Betingelsene som ble anvendt ved pilotraffinering av makrelloljen tilsvarer 62 m<sup>3</sup>/kg olje. Den store dampmengden medfører også risiko for at små oljedråper rives med i dampstrømmen og over i vakuumbesuglinjen. Mengden vil være avhengig av design på apparaturen, men kan estimeres til 2 %.

Estimert utbyttetap i de enkelte prosesstrinn ved fullraffinering av 100 kg makrellolje er gjengitt i **Tabell 16**. Det desidert største tapet er ved koldklaring av oljen og det er på dette trinnet det er mest å hente ved en videre optimalisering av prosessen.

Tabell 16 Estimert utbyttetap i de enkelte prosesstrinn ved fullraffinering av 100 kg makrellolje

Prosesstrinn	Utbyttetap (%)	Oljeutbytte (kg)
Råolje		100
Avsyring	2	98,0
Bleking	4	94,1
Vinterisering	60	37,6
Deodorisering	2	36,9

## 7.4.7 Konklusjon

Det er gjennomført pilotskala raffineringforsøk på råolje fra makrell restråstoff basert på betingelser utviklet i labbskala som omfatter bleking og deodorisering. Bleking av makrell råoljen ga en olje med fargetall 1,0, peroksidtall på 0,4 og anisidintall på 4,6. Deodorisering av den blekede råoljen ga en ytterligere reduksjon i farge, og et peroksidtall på 0,0 og anisidintall på 2,6. Analyse av flyktige komponenter av bleket og deodorisert råolje viste 98 % reduksjon av de flyktige komponentene i råoljen, som var dominert av sekundære lipidoksidasjonsprodukter, og hadde en positiv korrelasjon med reduksjon i anisidintall ( $r=0,98$ ,  $p<0,001$ ).

Det er blitt utført sensorisk profilering av den raffinerte makrelloljen i sammenligning med en fersk makrellolje tilsatt antioksidanter i form av rosmarinekstrakt, en kommersiell fersk raffinert tran (CLO) og en kommersiell raffinert vegetabilsk soyaolje. 13 lukt- og 11 smaksegenskaper ble bedømt av et trent sensorisk panel. Oljene i forsøket ble generelt beskrevet med lave sensoriske intensiteter i egenskapene som ble undersøkt, med noen unntak: total luktintensitet, metall lukt, bitter, nøtte og pungent smak. Den ferske makrelloljen var svært nøytral på lukt og smak, der 15 av egenskapene var mere nøytrale (lavere intensitet) i lukt og smak enn tranen (CLO), og 13 av egenskapene var mere nøytrale enn soyaoljen, men var karakterisert av noe høyere fiskelukt og smak.

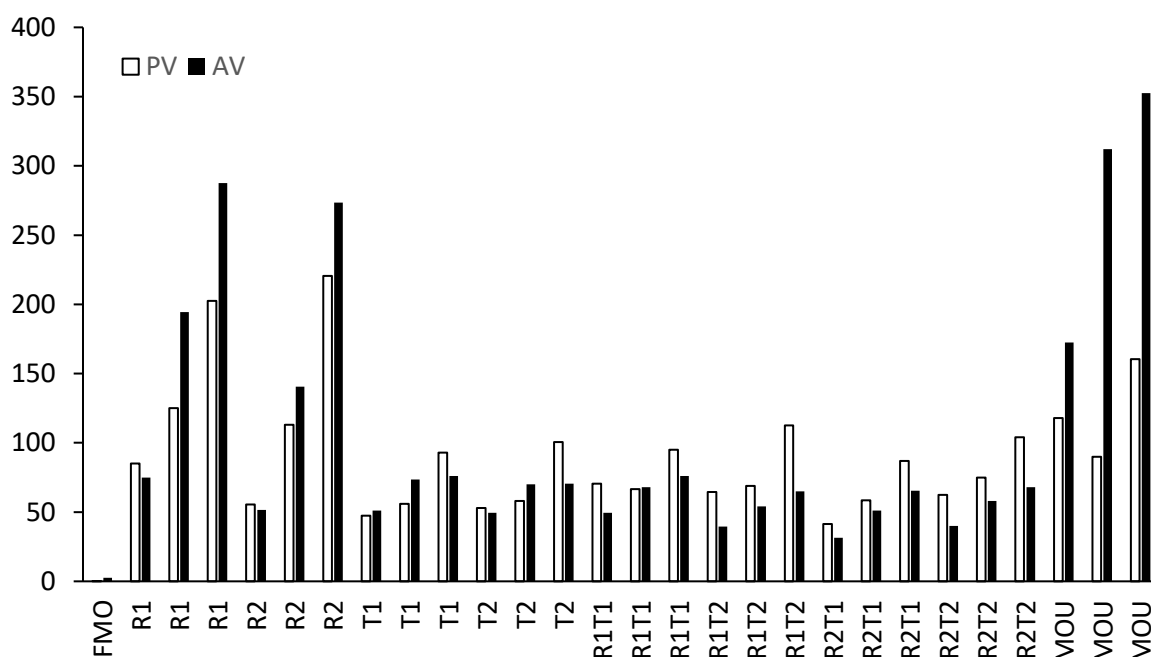
Nøyaktig måling av utbytte har ikke vært mulig i de gjennomførte pilotforsøkene og vil uansett være avhengig av den prosessapparaturløsning som anvendes. Det er her foretatt et estimat basert på tidligere gjennomførte labforsøk på bleking og vinterisering og generelle erfaringstall. Analysen viser et utbytte ved fullraffinering av makrellolje på kun 37 %. Det klart største tapet skjer ved vinterisering av oljen (40 % utbytte) og det anbefales videre optimalisering av dette raffineringstrinnet for å øke utbyttet.

## 7.5 Produktstabilitet

### 7.5.1 Peroksid og anisidin tall (PV og AV)

Resultater fra analyse av peroksid- og anisidintall av fersk makrellolje som ikke har vært lagret og olje med og uten tilsatt antioksidant er gjengitt i **Figur 29**. Presisjonen på de 2 replikate PV og AV målingene varierte fra 1-15 %. Som forventet vises størst forskjell mellom den ferske makrelloljen og lagret makrellolje uten antioksidant, der den lagrede oljen har PV opp til 173 og AV opp til 353 etter 4 uker lagring, som indikerer at de er svært harske. Harsk lukt (maling) ble observert allerede etter 2 ukers lagring i noen av prøvene, også i oljer som var tilsatt antioksidant. Imidlertid finner det sted en nedgang i PV etter 3 ukers lagring i makrelloljen uten tilsatt antioksidant, etterfulgt av en økning igjen etter 4 uker, noe som ikke er observert i de andre oljene tilsatt antioksidant. Det er vel kjent at peroksidtallet, som er et mål på mengden primære oksidasjonsprodukter (dvs. hydroperoksider), vil ha et forløp der verdiene vil øke under tidlig fase av oksidasjonen, men som etter en stund vil nå et toppunkt, etterfulgt av avtagende verdier. Alle de andre oljene bortsett fra oljen uten tilsatt antioksidant viser en økning i både PV og AV med økende lagringstid. Nedgangen i hydroperoksider skjer når nedbrytningshastigheten til de sekundære oksidasjonsproduktene overstiger hydroperoksid-dannelsesgraden. Følgelig vil de primære oksidasjonsproduktene dominere i det tidlige stadiet og sekundære oksidasjonsprodukter vil dominere i senere stadier av oksidasjonsprosessen. Sekundære lipid oksidasjonsprodukter begynner å dannes nesten umiddelbart etter initieringsreaksjonen. Dette kan forklare den observerte nedgangen etter 3 uker lagring for makrelloljen uten antioksidant. Imidlertid

finner det sted en økning igjen etter 4 uker, som indikerer dannelse av nye peroksider, som igjen bidrar til sekundære oksidasjonsprodukter parallelt med en økning i anisidintall.

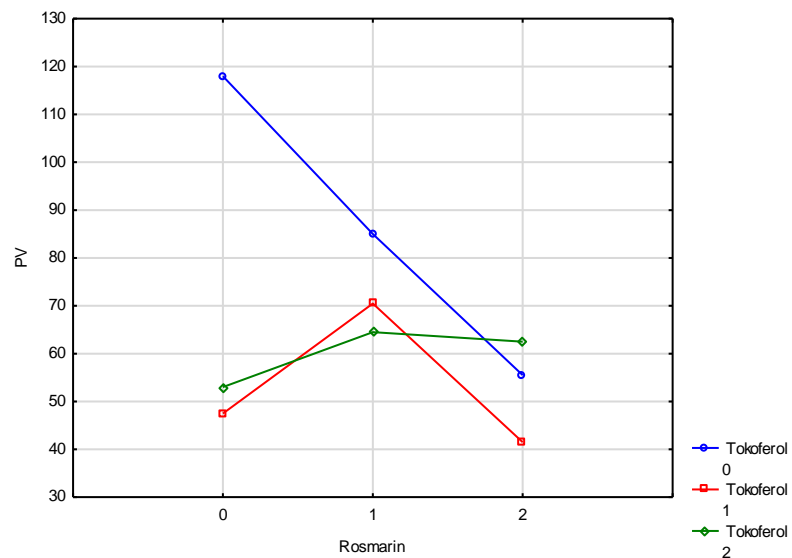


Figur 29 PV (meq peroxide/kg olje) og AV for de lagrede oljene sammenlignet med fersk makrellolje (FMO). De tre etterfølgende prøver med samme navn svarer til 2, 3 og 4 uker lagring. For forklaring på prøvenavn, se Tabell 2

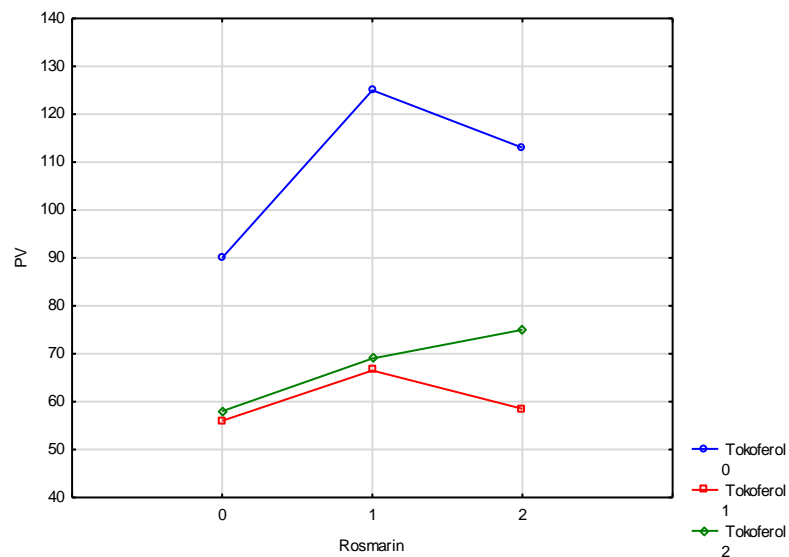
Oljeprøvene tilsatt antioksidant som viser de laveste PV og AV verdiene gjenspeiler en god stabiliseringseffekt på oljen mht. harskning, mens de med høye PV og AV tall gjenspeiler en dårlig antioksidant effekt. Tilsetning av kun en antioksidant viser at tokoferol gir best effekt på stabilisering av oljen. Det er funnet signifikante interaksjonseffekter mellom antioksidantene og tilsetning av en kombinasjon forbedrer stabiliteten relativt til tokoferol alene (**Figur 30 og 31**). For PV er effektene komplekse og varierende fra uke 2-4. Etter 2 uker er tilsetning av rosmarin alene positiv, mens det etter uke 3 og 4 kan virke som at rosmarin har en prooksidativ effekt. AV (**Figur 31**) viser en systematisk forbedring. Ut fra PV og AV tallene, gir mixed tokoferol en klart bedre holdbarhet over 4 uker sammenlignet med rosmarinekstrakt. De høye PV og AV i oljen tilsatt rosmarinekstrakt viser at denne antioksidanten har liten effekt på stabilisering av oljen utover 2 uker. Dette kan indikere at de aktive komponentene i rosmarinekstraktet er brukt opp allerede etter 3 ukers lagring. Dette bør evt. undersøkes nærmere. Tilsetning av mixed tokoferol alene viser en god antioksidant effekt, med lave PV og AV verdier, men ingen signifikant forskjell i effekten mellom lav og høy dose. Ved å kombinere de to antioksidantene, holder PV og AV seg fortsatt på lave nivå tilsvarende oljen tilsatt kun tokoferol. Dette viser at det er tokoferol som bidrar i vesentlig grad til antioksidanteffekten. Lavest PV har oljen tilsatt høyt nivå rosmarinekstrakt og lavt nivå mixed tokoferol (R2T1), dvs. at kombinasjonen av de to antioksidantene gir en signifikant tilleggseffekt. Basert på AV er forskjellene mindre, men tilsetning av rosmarinekstrakt til tokoferol gir en signifikant positiv effekt med lavere dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter. Både mixed tokoferol og kombinasjonen rosmarinekstrakt og mixed tokoferol ser ut til å gi en god langtidseffekt over 4 uker lagringstid mht. oksidasjon under de anvendte

lagringsbetingelser. Basert PV og AV analyser viser kombinasjonen av lavt nivå tokoferoler og høyt nivå rosmarinkstakt best effekt.

Det bør imidlertid gjøres oppmerksom på at resultater oppnådd fra et akselerert lagringsforsøk ikke nødvendigvis er representative for mer normale lagringsbetingelser. Supplerende lagringsforsøk ved romtemperatur bør gjennomføres for å bekrefte de funn som her er gjort.

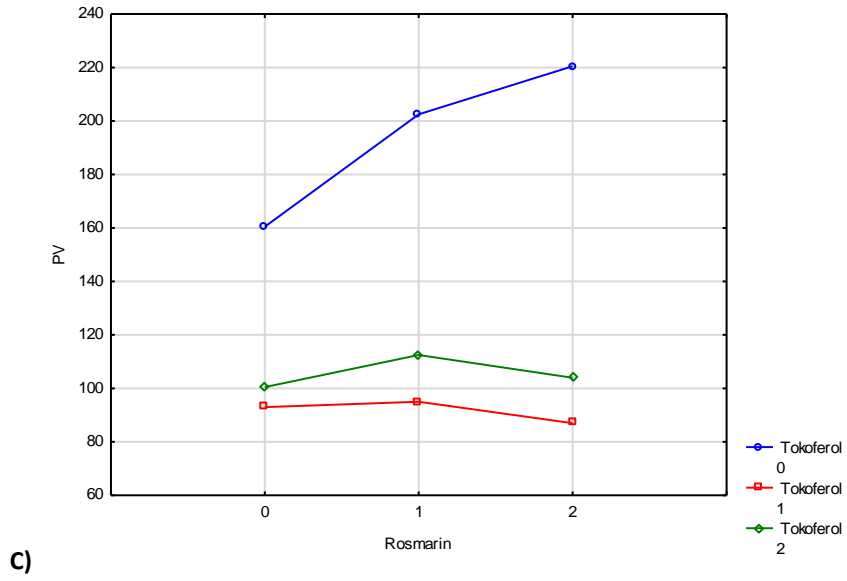


A)

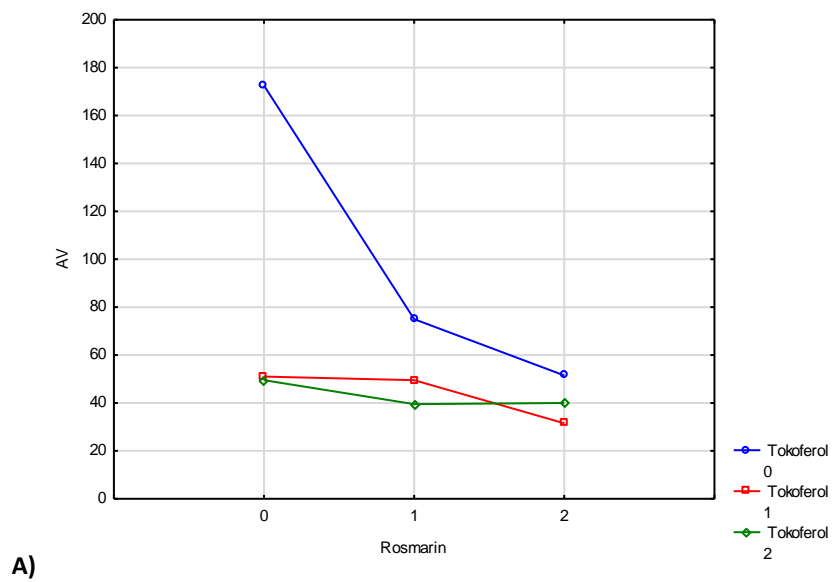


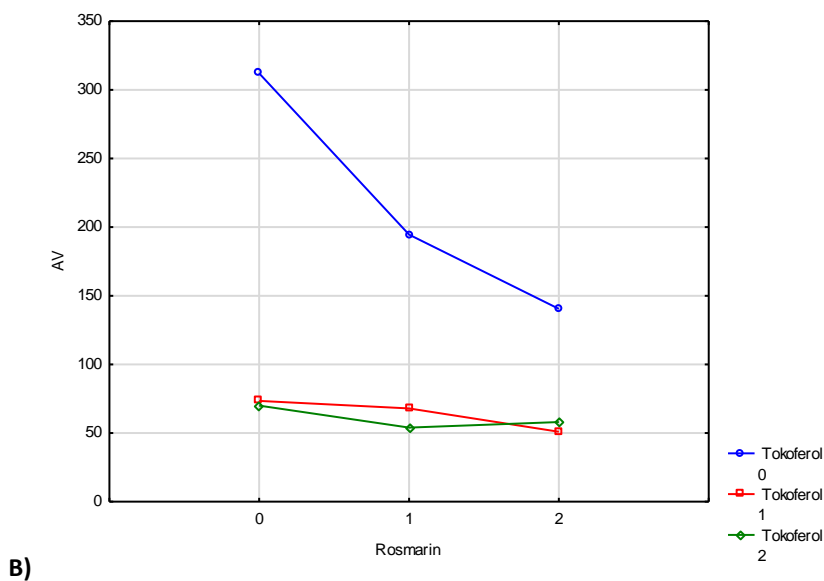
B)



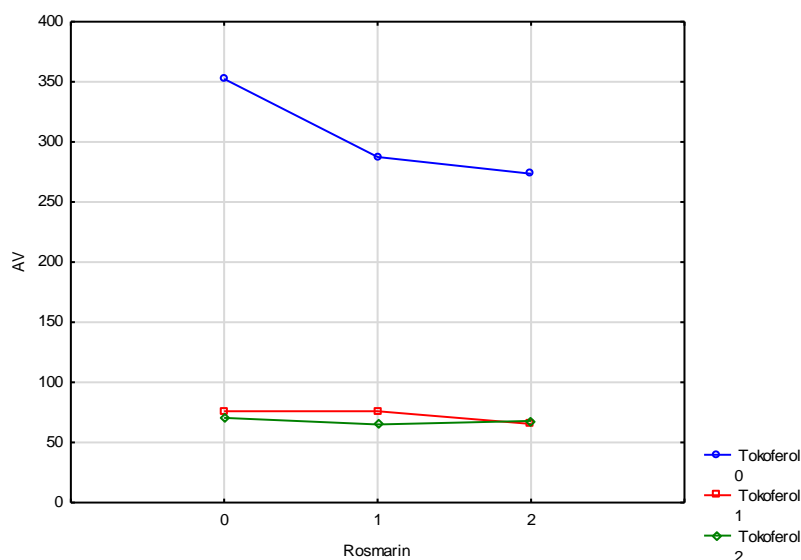


Figur 30 **A)** PV (meq peroxide/kg olje) i de lagrede oljene etter 2 uker v/40 °C. Nivå 1 og 2 av tilsatte antioksidanter er gitt i Tabell 2. **B)** PV etter 3 uker v/40 °C. **C)** PV etter 4 uker v/40 °C.





B)



C)

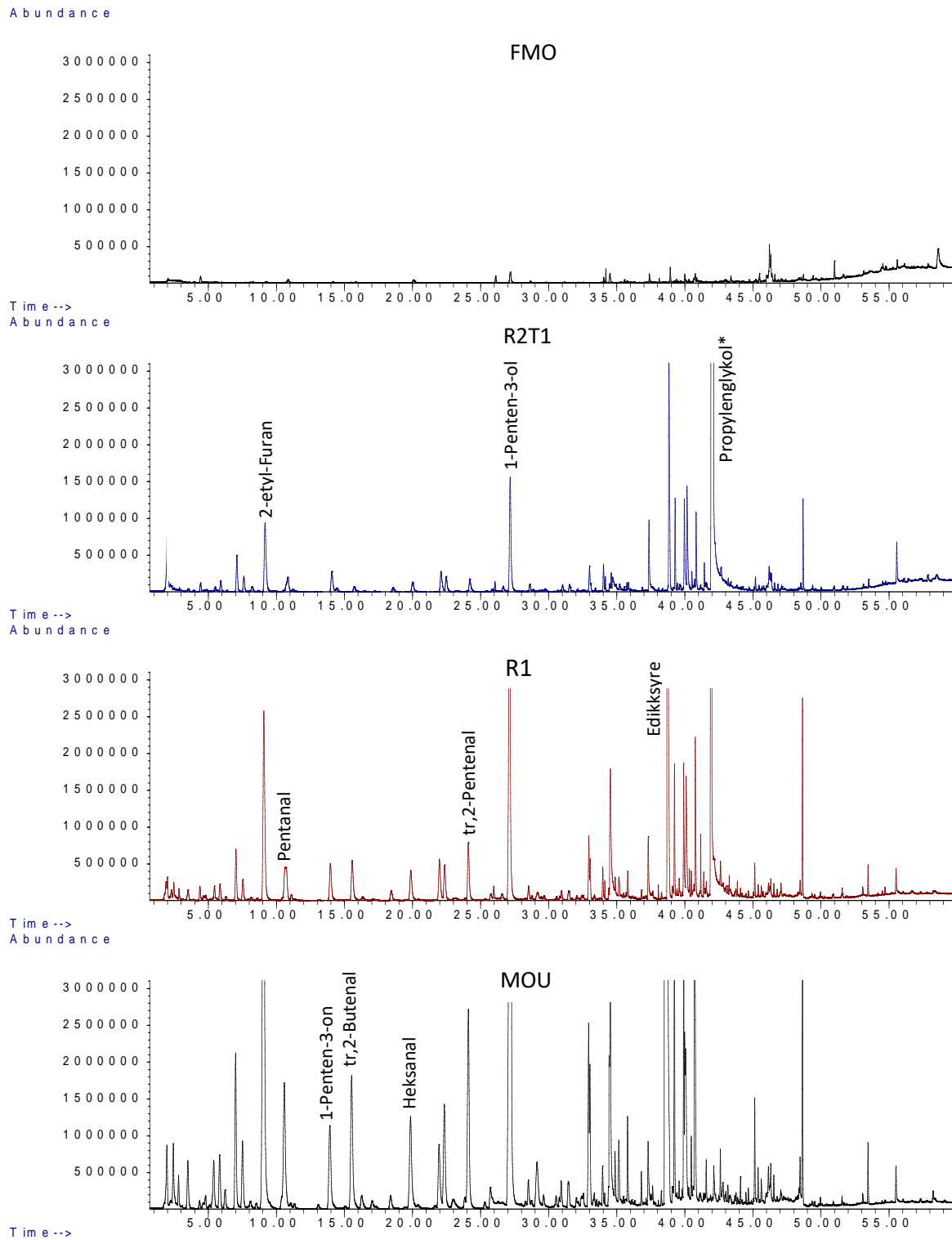
Figur 31 A) AV (anisidintall) i de lagrede oljene etter 2 uker v/40 °C. Nivå 1 og 2 av tilsatte antioksidanter er gitt i Tabell 2. B) AV etter 3 uker v/40 °C. C) AV etter 4 uker v/40 °C

## 7.5.2 Flyktige forbindelser

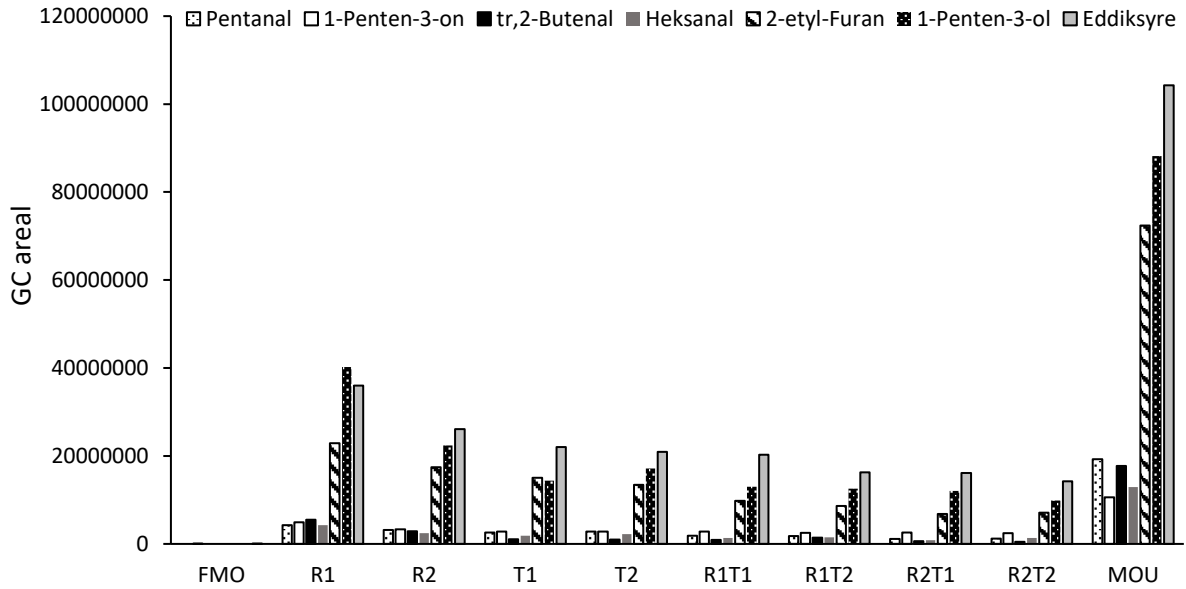
Gasskromatogram av fersk raffinert olje, to oljer tilsatt antioksidant og olje uten tilsatt antioksidant etter to ukers lagring er gjengitt i **Figur 32**. Presisjonen på GC topp arealene til de to parallelle analysene var innenfor 15 %. De flyktige komponentene er dominert av sekundære lipid oksidasjonsprodukter, der 2-etyl-furan, 1-penten-3-ol og eddiksyre til sammen utgjør 30-60 % av total mengden flyktige komponenter. 2-etyl-furan og 1-penten-3-ol er typiske sekundære produkter dannet fra oksidasjon av  $\omega$ -3 flerumettede fettsyrer i makrelloljen. Mens pentanal og heksanal (**Figur 32**) er typiske sekundære oksidasjonsprodukter fra  $\omega$ -6 flerumettede fettsyrer i makrelloljen.

I tillegg viser oljene tilsatt rosmarinekstrakt betydelig mengde med propylenglykol (GC topp rundt 41 min, R2T12 og R1, **Figur 32**), som er anvendt som løsemiddel i rosmarinekstrakt produktet (se **Vedlegg**). Typiske flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter er gjengitt i **Figur 33** etter stigende anisidintall. Oljene gjengitt i **Figur 31** har anisidintall på henholdsvis 0 (FMO), 42 (R2T1), 85 (R1) og 118 (MOU), som også gjenspeiles i økende mengde flyktige komponenter, og som er dominert av lipidoksidationsprodukter. Mengden av de enkelte sekundære lipidoksidationsprodukter viste en positiv korrelasjon med anisidintall ( $r>0,9$   $p<0,0002$ ), som viser at det er god overenstemmelse mellom oksidasjonsforløpet mellom disse to målemetodene (**Figur 34**), og gjenspeiler en både lineær og ikke-lineær oksidasjonskinetikk.

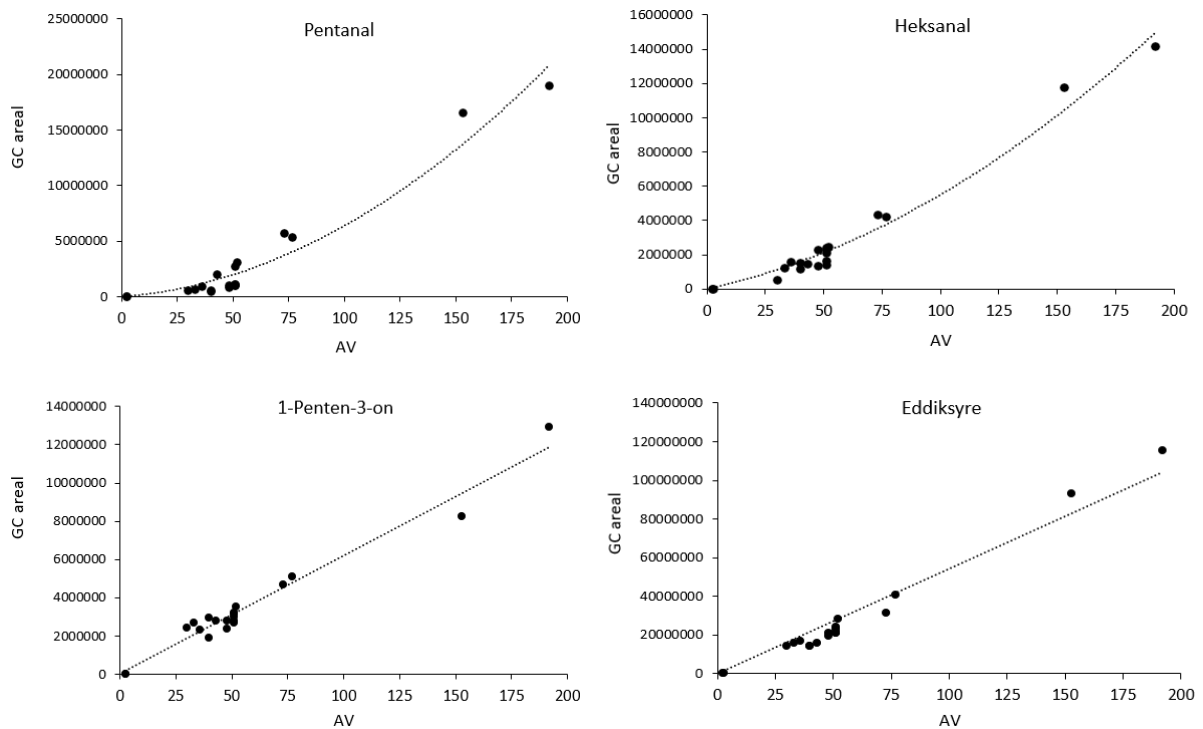
ANOVA for alle de gitte flyktige forbindelsene bekrefter en signifikant effekt av tilsetning av både naturlige tokoferoler og rosmarinekstrakt, samt en signifikant positiv interaksjonseffekt mellom disse. Effekten etter 2 ukers lagring er systematisk for alle de angitte flyktige komponentene (**Figur 35**). Tilsetning av tokoferol alene er mer effektivt enn rosmarin alene. Det er imidlertid etter 2 ukers lagring liten effekt av å øke doseringen av tokoferoler fra lavt til høyt nivå. For rosmarinekstrakt alene er det funnet en signifikant effekt av å doble doseringen. Kombinert gir tilsetning av rosmarinekstrakt til tokoferol en liten positiv effekt både ved lavt og høyt nivå. Basert på analyserte flyktige forbindelser etter 2 uker, vil best stabilitet oppnås ved tilsetning av høyt nivå rosmarinekstrakt i kombinasjon med lavt eller høyt nivå tokoferoler. Dette er også i god overenstemmelse med PV og AV analyser etter 2-4 ukers lagring (**Figur 29**).



Figur 32 Gasskromatogram av fersk raffinert makrell (FMO), olje med høyt nivå rosmarinekstrakt og lavt nivå mixed tokoferol (R2T1), lavt nivå rosmarinekstrakt (R1) og uten antioksidant (MOU) etter ukers lagring. \*Propylenglykol er et løsemiddel brukt i rosmarinekstrakt

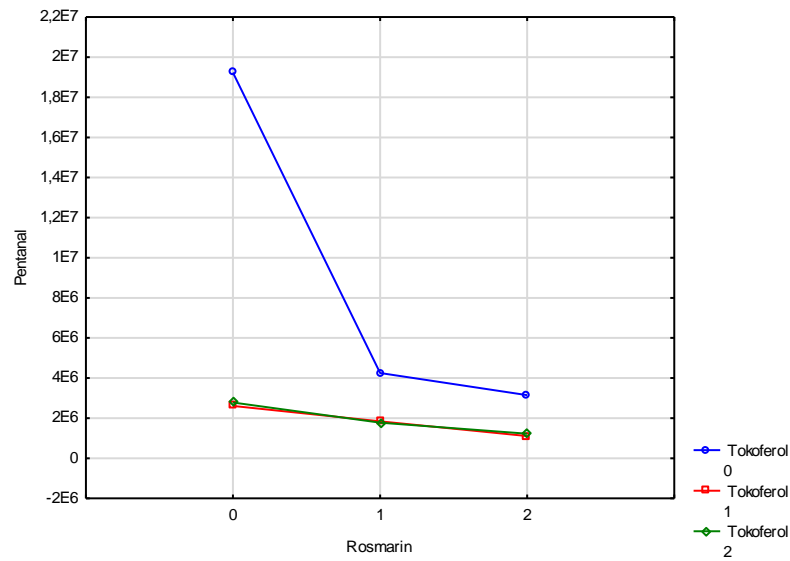


Figur 33 Mengden (GC areal) av typiske sekundære lipid oksidasjonsprodukter i fersk raffinert makrellolje (FMO), oljer tilsatt antioksidanter og olje uten tilsatt antioksidant (MOU) etter to ukers lagring og etter stigende anisidintall. For forklaring på prøvenavn, se Tabell 2

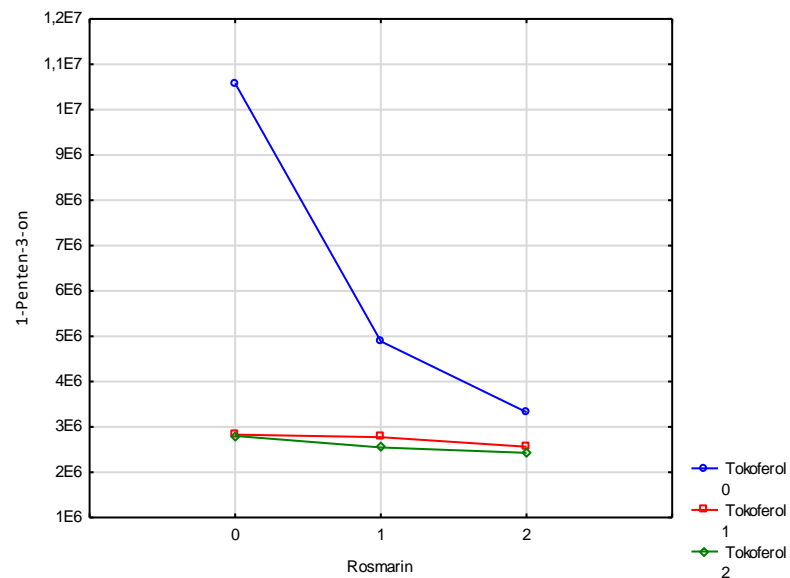


Figur 34 GC-areal vs anisidintall for fire flyktige sekundære lipid oksidasjonsprodukter, pentanal ( $r=0,98$ ,  $p<0,0002$ ), heksanal ( $r=0,99$ ,  $p<0,0002$ ), 1-penten-3-on ( $r=0,97$ ,  $p<0,0002$ ) og eddiksyre ( $r=0,97$ ,  $p<0,0002$ )

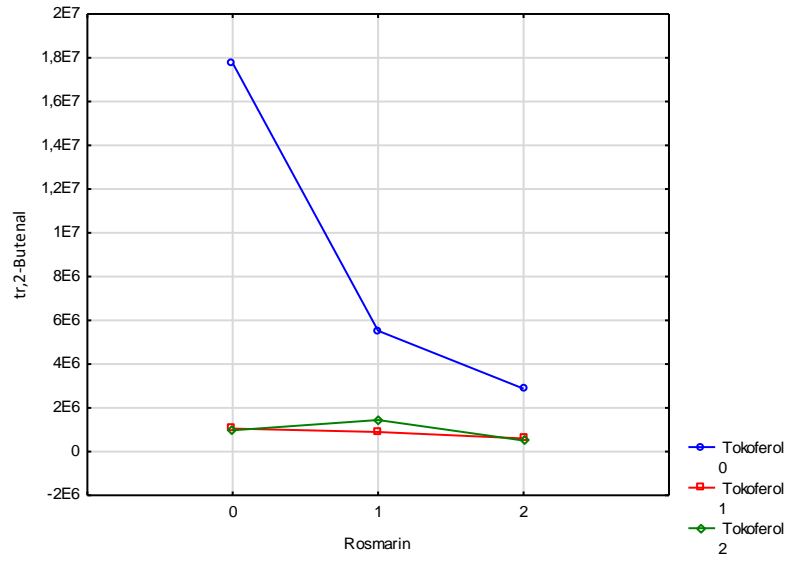
rosmarinekstrakt i kombinasjon med lavt eller høyt nivå tokoferoler. Dette er også i god overensstemmelse med PV og AV analyser etter 2-4 ukers lagring (**Figur 29 og 30**).



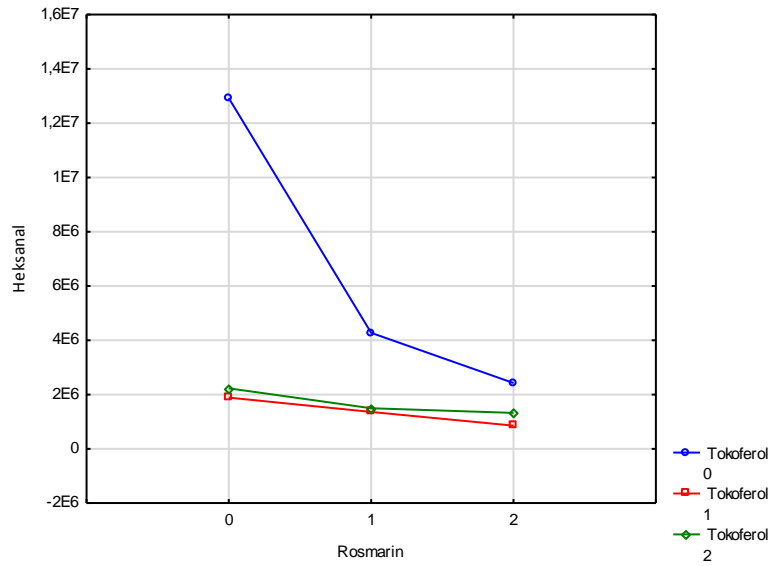
A)



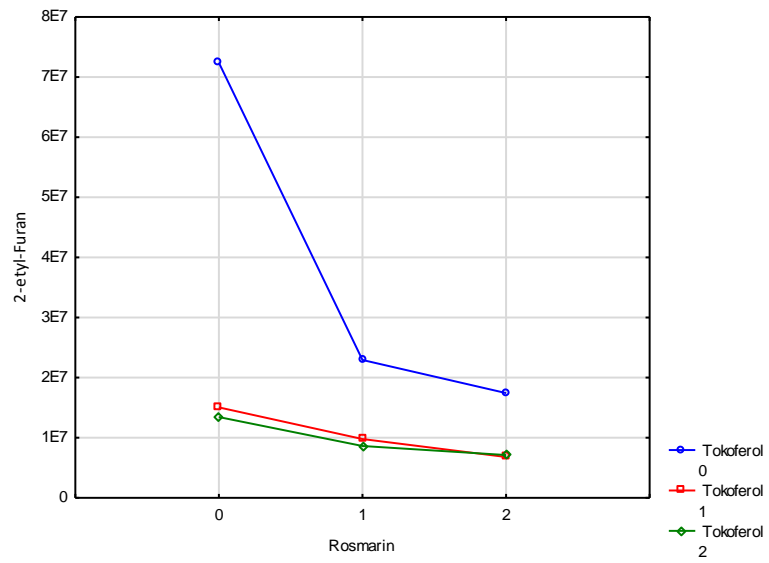
B)



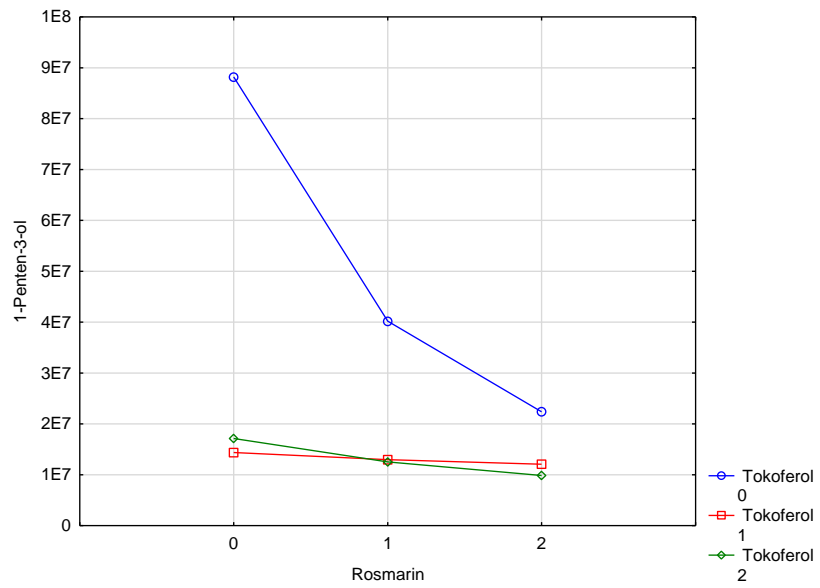
C)



D)

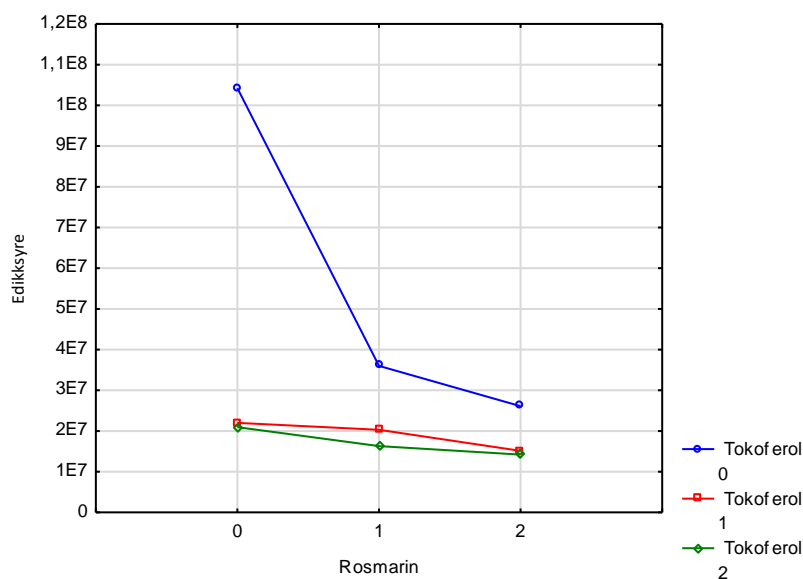


E)



F)





G)

Figur 35 **A)** Pentanal i oljer (GC areal) tilsatt antioksidanter etter lagring i 2 uker v/40 °C. Nivå 1 og 2 av tilsatte antioksidanter er gitt i Tabell 2. **B)** 1-Penten-3-on i oljer (GC areal). **C)** tr,2-Butenal i oljer (GC areal). **D)** Heksanal i oljer (GC areal). **E)** 2-etyl-Furan i oljer (GC areal). **F)** 1-Penten-3-ol i oljer (GC areal). **G)** Eddikksyre i oljer (GC areal)

### 7.5.3 Konklusjon

Etter 2 uker har høyt nivå av rosmarinekstrakt omtrent samme effekt som mixed tokoferol på stabilisering av makrelloljen, men det var ingen signifikant forskjell mellom de to nivåene tilsatt mixed tokoferol. Etter 3 og 4 uker har mixed tokoferol klart best effekt på stabilisering av makrelloljen. Ved tilsetning av rosmarinekstrakt til mixed tokoferol får man en liten synergieffekt på PV og AV etter 3 og 4 uker, men best effekt på stabilisering har mixed tokoferol.

Flyktige komponenter var dominert av sekundære lipid oksidasjonsprodukter hvorav 2-etyl-furan, 1-penten-3-ol og eddikksyre utgjorde 30-60 % av total mengden flyktige komponenter. De sekundære lipid oksidasjonsproduktene viste en signifikant korrelasjon med anisidintall ( $r > 0,9$ ,  $p < 0,0002$ ).

En samlet vurdering av resultatene tilsier at tokoferol tilsatt raffinert makrellolje i en mengde på 750 ppm gir en god lagringsstabilitet på oljen mht. harskning.

Best effekt på stabilisering av makrellolje er oppnådd ved å kombinere mixed tokoferol og rosmarinekstrakt på hhv lavt (750 ppm) og høyt (1250 ppm) nivå.

## 8 Hovedfunn

- Bleking ga en fargeløs makrellolje (Gardner < 1,0) som ble oppnådd etter kun 15 min. bleketid.
- Vinterisering av makrellolje ved tørrfraksjonering gir et lavt utbytte av olein på kun 40 %.
- Det er foretatt en vellykket oppskalering fra lab til pilotskala raffinering.
- Bleking og deodorisering fjernet effektivt opp til 98 % av de flyktige komponentene i oljen.
- Det er blitt produsert en fargeløs og smaksnøytral makrellolje som oppfyller kravene til humant konsum.
- Best effekt på stabilisering av raffinert makrellolje er oppnådd ved å kombinere mixed tokoferol og rosmarinekstrakt på hhv lavt (750 ppm) og høyt (1250 ppm) nivå.

## 9 Leveranser

### Presentasjoner på møter og konferanser

Haugen, .J.E., Meisland, A. and Å Oterhals 2019. Bleaching of crude oil from mackerel byproducts -effect on removal of volatile secondary lipid oxidation products. *17<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress*, 20-23 October 2019, Sevilla, Spain

Haugen, J.E. 2019. Raffinering av makrellolje til humant konsum. *Seminar Pelagisk Løft – økt bearbeiding av makrell*, 7. januar 2020 Radisson Blu Royal Hotel, Bergen.

Faktaark april 2020. *Foredling av råolje fra makrell restråstoff til høy-kvalitetsprodukt for humant konsum.*

Populærvitenskapelig artikkel april 2020. *Foredling av råolje fra makrell restråstoff til høy-kvalitetsprodukt for humant konsum.*

## 10 Referanser

- Adeniyi, O.D. and A.A. Bawa 2006. Mackerel (*Scomber Scrombrus*) Oil Extraction and Evaluation as Raw Materials for Industrial Utilization, *Leonardo Journal of Sciences* Issue 8, 33-42, ISSN 1583-0233.
- Aidos, I. 2002. Production of High-Quality Fish Oil from Herring Byproducts. PhD Thesis, University of Wageningen, The Netherlands, ISBN: 90-5808-728-X.
- Aloo, J. O. 2014. Development of refined oil from Lake Victoria Nile perch (*Lates niloticus*) viscera. PhD Thesis, Dept. Food Science, Nutrition and Technology, University of Nairobi, Kenya.
- AOCS Lipid library, Oil refining <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=39212>
- AOCS 2017. Cold Test For Fats And Oils. *American Oil Chemists Society Official Method* Cc 11-53.
- Ayorinde, F.O. and M. Hassan 1993. Deacidification of vegetable oils. Patent US005414100A.
- Aursand, M., Mozuraityte, R., Hamre, K., Knutsen, H., Maage, A. and A. Arukwe 2011. Description of the process 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 (VKM), ISBN 978-82-8259-035-8, 147 p.
- Bailey's industrial oil and fat products 2005. Print ISBN: 9780471384601, Online ISBN: 9780471678496 DOI: 10.1002/047167849X
- Bansal, R.C., Goyal and M., 2005. Activated Carbon Adsorption. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 497.
- Belitz, H.D. and W. Grosch 1999. Food Chemistry, Springer Verlag, München. ISBN 10: 3540646922
- Bhattacharyya, S. and D.K. Bhattacharyya 1989. Biorefining of high acid rice bran oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 66, 1809–1811.
- Bhosle, B.M. and R. Subramanian 2005. New approaches in deacidification of edible oils – a review. *Journal of Food Engineering*, 69, 481–494.
- Bimbo, A. 2017. Marine oils. *AOCS Lipid Library*: <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40332>
- Breivik, H., 2007. Long-Chain Omega-3 Speciality Oils. The Oily Press, Bridgwater, England, pp. 299.
- Carbonnelle, S., Eppe, G., Hellebosch, L., De Meulenaer, B., Vila Ayala, J., De Greyt, W., Verhe, R., De Pauw, E. and L. Goeyens 2006. Removal of PCDD/Fs and DL-PCBs from fish oils by volatilisation procedures. *Organohalogen Compd.* 68, 620–623.
- Chapman, D.M. and E.A. Pfannkoch 1992. Thermodynamic limitations for pigment adsorption during the bleaching of triglyceride oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, 69, 1009–1014.
- Charanyaa, S., Belur, P.D. and I. Regupathi 2017. A New Strategy to Refine Crude Indian Sardine Oil. *Journal of Oleo Science* 66(5), 425-434.
- Chen, C.R., Wang, C.H., Wang, L.Y., Hong, Z.H., Chen, S.H., Ho, W.J. and C.M.J. Chang 2008. Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil. *The Journal of Supercritical Fluids* 45(3), 322-331.
- Cheng, M. and D. Lixiang 2013. Production method and system of deacidification of rice bran oil. Chinese Patent CN 102618383B.
- Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, (2nd ed) pp. 406-413.
- Cho, S.Y., Kwon, T.W. and S.H. Yoon, 1990. Selective removal of free fatty acids in oils using a microorganism. *Journal of American Oil Chemists Society*, 67, 558–560.
- Chung K.H and K.Y. Lee 2009. Removal of trimethylamine by adsorption over zeolite catalysts and deodorization of fish oil. *J. Hazard Mater.* 172(2-3), 922-927.

- Chung, T.W., W. Y.L. Wu and S.H. Hsu 2018. Removal of Free Fatty Acid from Plant Oil by the Adsorption. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 362
- Cmolik, J. and J. Pokorny, 2000. Physical refining of edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 472–486.
- Coutinho, C.M., Chiu, M.C., Basso, R.C., Ribeiro, A.P.B., Goncalves, L.A.G. and L.A. Viotto 2009. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: a review. *Food Research International*, 42, 536–550.
- Cunha, D.C., Crexi, V.T. and L.A.A. Pinto 2009. Winterization of fish oil with solvent. *Food Science and Technology* vol.29, n.1, pp.207-213.
- Crexi, V.T., Monte, M.L. and L.A. de Souza Soares 2010. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry* 119, 945–950.
- Cvengros, J. 1995. Physical refining of edible oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, 72, 1193–1196.
- Decap, P., Braipson-Danthine, S., Vanbrabant, A., De Greyt, W. and C. Deroanne 2004. Comparison of steam and nitrogen in the physical deacidification of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81:611-617.
- De Greyt, W. F. J., 2012. Current and Future Technologies for the Sustainable and Cost-Efficient Production of High Quality Food Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114(10), 1126-1139.
- de Moraes Coutinho, C., Chiu, M.C., Basso, R.C., Badan Ribeiro, A.P., Gonçalves, L.A.G. and L.A.. Viotto 2009. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A Review. *Food Research International* 42, 536–550.
- De Greyt, W.F. 2012. Current and future technologies for the sustainable and cost-efficient production of high quality food oils. *Eur. J. Lipid Science and Technology* 114, 1126-1139.
- Dedhia, C. and J.R Chunduri 2015. Biological Refining: Novel Technique to Reduce the Rancidity of used Edible Oil. *International Journal of Biotech Trends and Technology* Vol. 13 (1), 14-19.
- de Oliveira, D.A.s.b., Minozzo, M.G., Licodiedoff, S., and N. Waszczynskyj 2016. Physicochemical and sensory characterization of refined and deodorized tuna (*Thunnus albacares*) by-product oil obtained by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry* 207, 187–194.
- Dijkstra, A.J. 2009. Recent developments in edible oil processing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 857–864.
- Dijkstra, A.J. 2013. The purification of edible oils and fats. *Lipid Technology* December 2013, 25, No. 12, 271-273.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011. Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. *EFSA Journal* 2011, 9(5):2156. [274 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2156. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2017.
- El-Hamidi, M. and F.H. Zaher 2016. Comparison between common clays as adsorbents of carotenoids, chlorophyll and phenolic compounds from vegetable oils. *American Journal of Food Technology* 11(3), 92-99.
- El-Salam, A.S.M.A, Doheim, M.A., Sitohy, M.Z and M.F. Ramadan 2011. Deacidification of High-acid Olive Oil. *Journal of Food and Processing Technology*, S5-001. doi:10.4172/2157-7110.S5-001, 2-7.
- Essid, K., Trabelski, M. and M.H. Frikha 2016. Oxidative stability of neutralized oils bleached with clays activated with ultrasound. *International Crops and Products* 89, 268-272.

- Fang, Y., Gu, S., Zhang, J., Liu, S., Ding, Y and J. Liu 2017. Deodorisation of fish oil by nanofiltration membrane process: focus on volatile flavor compounds and fatty acids composition. In. *Journal of Food Science and Technology*. Doi: 10.1111/ijfs.13644.
- Fernandez-Gonzalez, R.; Yebra-Pimentel, I.; Martinez-Carballo, E., and J. Simal-Gandara 2014. Decontamination Solutions for Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Raw Fish Oils From Environmentally Contaminated Sea Fishes. *Science of the Total Environment* 468:1007-1013.
- Feryana, I.W.K. and S.H.S. Nurjanah 2014. *Refining of Mackerel Fish Oil from Fish Meal Processing Byproduct with Alkali Neutralization*. *Journal of Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, Volume 17 Nr 3, 207-214.
- Fournier, V., Destailats, F., Juanéda, P., Dionisi, F., Lambelet, P., Sébédió, J.L. and O. Berdeaux 2006. Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **108**, 33-42.
- Fournier, V., Destailats, F., Lambelet, P., Dionisi, F., Sebedio, J.L. and O. Berdeaux, 2007. Degradation products formed from long chain PUFA during deodorization of fish oil. *Lipid Technology*, 19, 9–11.
- Frankel, E.N. 2005. *Lipid Oxidation*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge UK, ISBN 978-0-9531949-8-8.
- Garcia-Moreno, P.J., Guadix, A., Gomez-Robledo, L., Melgosa, M. and E.M. Guadix 2013. Optimization of bleaching conditions for sardine oil. *Journal of Food Engineering*, 116, 606–612.
- Ghazani, S.M. and A.G. Marangoni 2013. Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: a review. *Journal of American Oil Chemists Society*, 90, 923–932.
- Hamm, W., 2009. Processing of fish oil. In: B. Rossell (Ed.) *Fish oils*. Bckwell Publ. Ltd, London, ISBN 978-1905224-63-0, 81-97.
- Hamm, W 1992. *Science and practice of liquid liquid extraction*. Thornton, J.D. ed., Oxford, Claredon Press, 309-352.
- Haugen J.E., Thoresen, L., Meisland, A. og Å. Oterhals 2019. Bleking og vinterisering av råolje fra makrell restråstoff, Nofima rapport 37/2019, 41 s.
- Haugen, J.E. og Å. Oterhals 2020. Pilotskala raffinering av makrellolje ra restråstoff. Nofima rapport 5/2020, 19 s.
- Hernandez, E. and S.J. Rathbone 2002. Refining of glyceride oils by treatment with silicate solutions and filtration. Patent US006448423B1.
- Hilbert G., Lillemark L., Balchen, S. and C.S. Højskov 1998. Reduction of organochlorine contaminants from fish oil during refining. *Chemosphere* 37(7), 1241-1252.
- Irianto, H.E. 1992. Fish oil: Refining, stability and its use in canned fish for the Indonesian market. PhD Thesis, Massey University New Zealand.
- Ivanovs, K. and D. Blumberga 2017. Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review. *Energy Procedia* 128, 477-483.
- Jensen, B., Kuznetsova, T., Kvamme, B., and Å. Oterhals, 2011. Molecular dynamics study of selective adsorption of PCB on activated carbon. *Fluid Phase Equilibria* 307:58-65.
- Joas, R., Portrykus, A. and G. Chambers 2001. Effects on the Fisheries Industry of the Commission Proposals (SANCO) on Dioxin Content of Fish, Fish Oil and Fish Meal as Part of Animal Feed Regulations. Scientific and Technological Options Assessment Series, STOA 101 EN. European Parliament, Directorate-General for Research, Luxembourg.
- Kannan, P.K.P. and G.K.A. Gundappa 2014. Impact of different deacidification methods on quality characteristics and composition of olein and stearin in crude red pal oil. *Journal of Oleo Science* 63 (12), 1209-1221.

- Karahadan, C. and R.C. Lindsay 1990. Low temperature deodorizations of fish oils with volatile acidic and basic steam sources. *Journal of American Oil Chemists Society*, 67(2), 85-91.
- Kawashima, A., Watanabe, S., Iwakiri, R. and K. Honda 2009. Removal of dioxins and dioxin-like PCBs from fish oil by countercurrent supercritical CO<sub>2</sub> extraction and activated carbon treatment. *Chemosphere* 75, 788-794.
- Kreulen, H. P. 1976. Fractionation and winterization of edible fats and oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, 53:393-396.
- Krishna Kumar, N. S., and D.N. Bhowmick, 1996. Separation of fatty acids/triacylglycerol by membranes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, 399–401.
- Kundrot, R.A. 1984. Deacidification of library materials. Patent US004522843.
- Latondress, E.G. 1984. *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 61, no. 8, 1380-1382.
- León-Camacho, M., Ruiz-Méndez, M.V. and E. Graciani Constante 1999. Changes in olive oil components during deodorization and/or physical refining at the pilot plant scale using nitrogen as stripping gas. *Fett/Lipid*, **101**, 38-43.
- León-Camacho, M. V. Ruiz-Méndez, M. M. Graciani Constante and E. Graciani Constante 2001. Kinetics of *cis-trans* isomerization of linoleic acid in the deodorization and/or physical refining of edible fats. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2001, 103, 85–92.
- León-Camacho, M., Ruiz-Méndez, M.V. and E.C. Constante 1999. Changes in olive oil components during deodorization and/or physical refining at the pilot plant scale using nitrogen as stripping gas. *Lipid* 101 (1), 38–43.
- Lin, C. F., Hsieh, T. C. Y., Crowther, J. B. and A.P. Bimbo 1990. Efficiency of removing volatiles from menhaden oils by refining, bleaching and deodorization. *Journal of Food Science*, 55, 1669–1972.
- Maes, J., De Meulenaer, B., Van Heerswynghels, P., De Greyt, W., Eppe, G., De Pauw, E. and A. Huyghebaert 2005. Removal of dioxins and PCB from fish oil by activated carbon and its influence on the nutritional quality of the oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 593–597.
- Mariam, K. and B. Fatima 2017. Reduction of Free Fatty Acid Content of Crude Sardine Oil by Enzymatic Esterification at Laboratory Scale. *International Journal of Biological Chemistry* 11, 23-29.
- Márquez, A.L., Pérez, M.P. and J. R. Wagner 2013. Solid Fat Content Estimation by Differential Scanning Calorimetry: Prior Treatment and Proposed Correction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90, 467-473.
- McKenna EJ and Kallio RE, Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane 1071. *Proceedings of National Academy of Science USA* 68:1552–1554.
- Mezouari, S., Eichner, K., Kochhar, P., Brühl, L. and K. Schwarz 2006. Effect of the full refining process on rice bran oil composition and its heat stability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **108**, 193-199.
- Mjøs, S. and Solvang 2006. Geometrical isomerisation of eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acid at high temperatures. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 589–597.
- Monte, M.L., Pohndorf, R.S., Crexi, V.T. and L.A.A. Pinto 2015. Bleaching with blends of bleaching earth and activated carbon reduces color and oxidation products of carp oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 829–836.
- Niazmand, R., Farhoosh, R., Razavi, S.M.A., Mousavi, M. and M.S. Noghabi 2011. Investigation of quality and stability of canola oil refined by adding chemical agents and membrane processing. *Procedia Food Science*, 1, 90–94.

- Ortiz, X., Carabellido, L., Marti, M., Marti, R., Tomas, X., and J. Diaz-Ferrero 2011. Elimination of Persistent Organic Pollutants From Fish Oil With Solid Adsorbents. *Chemosphere* 82(9):1301-1307.
- Oterhals, Å., Solvang, M., Nortvedt, R. and M.H.G Berntssen 2007. Optimization of activated carbon-based decontamination of fish oil by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 691-705.
- Oterhals, Å., Kvamme, B. and M.H.G. Berntssen 2010a. Modeling of a short-path distillation process to remove persistent organic pollutants in fish oil based on process parameters and quantitative structure properties relationships. *Chemosphere* 80, 83-92.
- Oterhals, Å., 2011. Decontamination of persistent organic pollutants in fishmeal and fish oil - Process optimization and modeling. PhD thesis, Department of physics and technology, University of Bergen, Norway. ISBN 978-82-308-1830-5.
- Oterhals, Å. And G. Vogt 2013. Impact on extraction, refining and concentration stages on the stability of fish oil. In: Jacobsen, C.; Skall Nielsen, N.; Frisenfeldt Horn, A., and Moltke Sørensen, A.-D., Eds. *Food Enrichment with omega-3 fatty acids*: Woodhead Publishing Ltd, UK; pp. 111-129.
- Patterson, H.B.W. 2009. Basic components and procedures. In: List, G.R. Ed. *Bleaching and purifying fats and oils, theory and practice*, ISBN 978 1-893397-91-2, AOCS Press Urbana, Illinois, USA, 1-52.
- Pereira, C.G. and M.A.A. Meireles 2007. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 407–413.
- Raman, L.P., Cheryan, M. and N. Rajagopalan 1996. Deacidification of soybean oil by membrane technology. *Journal of American Oil Chemists Society*, 73, 219–224.
- Rossell, B. 2009. *Fish Oils*. Leatherhead Publishing and Blackwell Publishing, Leatherhead, UK.
- Rossi, M., Gianazza, M., Alamprese, C. and F. Stanga, 2003. The role of bleaching clays and synthetic silica in palm oil physical refining. *Food Chemistry* 82 (2), 291–296.
- Ruiz-Mendez, M.V. and M.C. Dobarganes. DOI: 10.21748/lipidlibrary.39212.
- Ruiz-Méndez, M.V., Márquez-Ruiz, G. and M.C. Dobarganes 1996. Comparative performance of steam and nitrogen as stripping gas in physical refining of edible oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 1641-1645.
- Sampaio, K.A., Zyaykina, N., Wozniak, B., Tsukamoto, J., De Greyt, W. and C.V. Stevens 2015. Enzymatic degumming: Degumming efficiency versus yield increase *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 81–86.
- Sari, R.N., Utomo, B.S.B. and J.B.E. Hastarini 2016. Refining of Pangasius Oil from Fish Smoking By-products. *JPB Kelautan dan Perikanan* Vol. 11 No. 2, 171-182.
- Sathivel, S. 2010. Fish oil extraction, purification and its properties. In: Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U. (Eds.), *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, first ed. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, pp. 423–430.
- Sengupta, R. and D.K. Bhattacharyya 1992. A comparative study between biorefining combined with other process and physical refining of high acid mohua oil. *Journal of American Oil Chemists*
- Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J.P.D. and U.N. Wanasundara 1997. Changes in edible fats *and* oils during processing. *Journal of Food Lipids* 4, 199-23 1.
- Shahidi F. (Ed.), 2005. *Bailey's industrial oil and fat products*, Vol. 5: Edible oil and fat products: Processing technologies. ISBN ISBN: 978-0-471-38460-1, John Wiley & Sons Inc. New York.
- Soleimanian, Y., Sahari, M. A. and M. Barzegar 2015. Influence of Processing Parameters on Physicochemical Properties of Fractionated Fish Oil at Low Temperature Crystallization. *Nutrition & Food Science* 45(1), 2-19.



- Srimati, M., Kushartoa, C.M., Tanzihaa, I. and S.H. Suseno 2013. Effect of Different Bleaching Temperatures on the Quality of Refined Catfish (*Clarias gariepinus*) Oil. *Procedia Food Science* 3, 223 – 230.
- Su, D., Xiao, T., Gu, D., Jin, Y., Zhang, W. and T. Wu 2013. Ultrasonic bleaching of rapeseed oil: effects of bleaching conditions and underlying mechanisms. *Journal of Food Engineering*, 117, 8–13.
- Subramanian, R., Nakajima, M., and T. Kawakatsu 1998. Processing of vegetable oils using polymeric composite membranes. *Journal of Food Engineering* 38, 41–56.
- Suseno, S.H., Tajul, A.Y. and W.A. Nadiyah 2011. Improving the quality of Lemuru (*Sardinella lemuru*) oil using magnesol XL filter aid. *International Food Research Journal* 18: 255-264.
- Suseno S.H., Tajul, A.Y., Nadiyah, W.A. and A.F. Noor 2012. Improved of color properties on *Sardinella lemuru* oil during adsorbent refining using Magnesol XL. *International Food Research Journal* 19(4), 1383-1386.
- Suseno, S.H., Nurnafisah, I., Jacob, A.M., Izaki, I. and A.F. Izaki 2015. Optimization of Bleaching Condition for Sardine Oil from Fish Meal By-Product. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 7 (4): 334-340.
- Suseno, S.H., Sintoko, E.D.P., Jacob, A.M. and N. Fitriana 2017. Sardine Oil Purification with Winterization. *Oriental Journal Of Chemistry* 33(6), 3150-3159.
- Søbstad, G. E. 1992. Marine oil separation, purification technology. *INFORM* 3:827-830.
- Sørensen, N.A. and J. Mehlum 1948. *Acta Chimica Scandinavica* 2, 140.
- Sørensen, J. and N.A. Sørensen 1949. *Acta Chimica Scandinavica* 3, 939.
- Taati, M.M., Shabanpour, B. and O. Mehdi 2017. Extraction of oil from tuna by-product by supercritical fluid extraction (SFE) and comparison with wet reduction method. *AAFL Bioflux*, 2017, Volume 10, Issue 6.
- Taylor, D. 2009. Adsorbents. In List, G.R. Ed. "Bleaching and Purifying Fats and Oils, Theory and Practice, AOCS Press USA, ISBN 978-1893997-91-2, 69-95.
- Temelli, F. 2009. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids* 47, 583-590.
- Tolstorebrov, I., Eikevik, T.M. and A. Bantle 2014. DSC study of phase transition in muscle and oil of the main commercial fish species from the North-Atlantic. *Food Res Int* 55, 303-310.
- Tres, M.V., Ferraz, H.C., Dallago, R.M., Luccio, M.D. and J.V. Oliveira 2010. Characterization of polymeric membranes used in vegetable oil/organic solvents separation. *Journal of Membrane Science*, 362, 495–500.
- Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P.D. and I. Regupathi 2015. Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies *International Journal of Food Science and Technology* 50, 13–23.
- Vázquez, L., Hurtado-Benavides, A.M., Reglero, G., Fornari, T., Ibáñez, E. and F.J. Señoráns 2009. Deacidification of olive oil by countercurrent supercritical carbon dioxide extraction: Experimental and thermodynamic modeling *Journal of Food Engineering* 90, 463–470.
- WO 2017/009874. Winterization of fish oil. Yebra-Pimentel, I., Fernandez-Gonzalez, R., Martinez-Carballo, E., and J. Simal-Gandara 2014. Optimization of Purification Processes to Remove Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Polluted Raw Fish Oils. *Science of the Total Environment* 470:917-924.
- Young, F.V.K., Pool, C., Biermth, E., Krog, N., Davidson, N.G.J. and F.D. Gunstone 1994. Processing of fats and oils. In Gunstone, F.D. Harwood, J.L. and F.B. Padley., Eds. *The Lipid Handbook*, 2<sup>nd</sup> ed. London, Chapman and Hall, 249-276.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P. and Jr. H.J. Bavor 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Science of the Total Environment* 112:203–219.

Zschau, W. 2001. Bleaching of edible fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 505–508.

# Vedlegg

## Råstoffkvalitet

Epax Norway AS  
Postboks 2047

6028 Ålesund

Att: Beate Stokkereit



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Fyllingsdalen, 05.02.2018

Ref.: 2018/0608/0

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 31.01.2018

Analyse av: Prøve merket Makrellolje, A18-041

Ref:

Analysert: 01.02.2018 - 05.02.2018

### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab Kundens merking		2018-00608-01 A18-041		
A68 14:0	g/100g	6,7		
A68 16:0	g/100g	12,3		
A68 18:0	g/100g	1,8		
A68 20:0	g/100g	0,2		
A68 22:0	g/100g	0,1		
A68 16:1 n-7	g/100g	3,7		
A68 18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	g/100g	12,3		
A68 20:1 (n-9)+(n-7)	g/100g	10,1		
A68 22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	g/100g	15,3		
A68 24:1 n-9	g/100g	1,0		
A68 16:2 n-4	g/100g	0,4		
A68 16:3 n-4	g/100g	0,1		
A68 18:2 n-6	g/100g	1,6		
A68 18:3 n-6	g/100g	0,2		
A68 20:2 n-6	g/100g	0,3		
A68 20:3 n-6	g/100g	0,1		
A68 20:4 n-6	g/100g	0,4		
A68 22:4 n-6	g/100g	0,1		
A68 18:3 n-3	g/100g	1,3		
A68 18:4 n-3	g/100g	4,3		
A68 20:3 n-3	g/100g	0,2		
A68 20:4 n-3	g/100g	1,1		
A68 20:5 n-3	g/100g	7,4		
A68 21:5 n-3	g/100g	0,5		
A68 22:5 n-3	g/100g	1,3		
A68 22:6 n-3	g/100g	10,8		

Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.

Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.

Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

Epax Norway AS  
Postboks 2047

6028 Ålesund

Att: Beate Stokkereit

Fyllingsdalen, 05.02.2018

Ref.: 2018/0608/1

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 31.01.2018  
Analyse av: Prøve merket Makrellolje, A18-041  
Ref:

Analysert: 01.02.2018 - 05.02.2018

#### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab Kundens merking		2018-00608-01 A18-041		
A68 Sum mettede fettsyrer	g/100g	21,1		
A68 Sum monoene fettsyrer	g/100g	42,4		
A68 Sum PUFA (n-6) fettsyrer	g/100g	2,7		
A68 Sum PUFA (n-3) fettsyrer	g/100g	26,9		
A68 Sum PUFA fettsyrer totalt	g/100g	30,1		
A68 Sum identifiserte fettsyrer	g/100g	93,6		

Fettsyreresultatene er beregnet som fettsyremetylestere.

  
Jarle Wang Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.  
Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.  
Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

Epax Norway AS  
Postboks 2047

6028 Ålesund

Att: Beate Stokkereit

Fyllingsdalen, 06.02.2018

Ref.: 2018/0608/2

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 31.01.2018  
Analyse av: Prøve merket Makrellolje, A18-041  
Ref.

Analysert: 05.02.2018 - 06.02.2018

#### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab Kundens merking		2018-00608-01 A18-041		
A07 Frie fettsyrer	%	0,5		
A13 Vann (Karl Fischer)	%	0,11		
A11 Smuss	%	0,02		
A09 Anisidintall		3,4		
A10 Peroksid tall	meq peroksid/kg olje	3,3		

  
Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.  
Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.  
Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

## PV og AV i bleket makrell råolje (screening og 3-faktor forsøk)



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Prosjekt 12191

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Att: John-Erik Haugen

Fyllingsdalen, 06.12.2018

Ref.: 2018/7903/0

### **ANALYSEBEVIS**

Mottaksdato: 30.11.2018  
Analyse av: Prøver merket makrelolje  
Ref:

Analysert: 03.12.2018 - 06.12.2018

### **Analyseresultater**

Journalnr.:	Prøvemerkning:	A09 Anisid.t	Peroks.t mEkv/Kg
2018-07903-01	1A	6,9	1,3
2018-07903-02	1B	7,1	1,0
2018-07903-03	2A	7,3	1,1
2018-07903-04	2B	7,2	1,2
2018-07903-05	3A	5,4	1,5
2018-07903-06	3B	5,6	1,3
2018-07903-07	4A	4,9	1,5
2018-07903-08	4B	5,6	1,9
2018-07903-09	6A	8,5	1,4
2018-07903-10	6B	8,5	1,1
2018-07903-11	7A	9,2	3,6
2018-07903-12	7B	9,5	3,3
2018-07903-13	8A	9,5	1,8
2018-07903-14	8B	9,7	1,7

  
Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Prosjekt 12191

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Att: John-Erik Haugen

Fyllingsdalen, 02.01.2019

Ref.: 2018/8223/0

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 18.12.2018  
Analyse av: Prøver merket makrellolje  
Ref:

Analysert: 02.01.2019

#### Analyseresultater

Journalnr.:	Prøvemerkning:	A09 Anisid.t	A10 Peroks.t mEkv/Kg
2018-08223-01	3A 27.11.18	5,5	<2,0
2018-08223-02	7A 20.11.18	9,2	5,7
2018-08223-03	Crude 12.11.18	7,5	11
2018-08223-04	Crude 26.11.18	6,9	4,1
2018-08223-05	Crude 29.11.18	7,0	3,9

  
Anne Mari Tveit  
Oppdragskoordinator

Prosjekt 12191

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Att: John-Erik Haugen

Fyllingsdalen, 15.02.2019

### ANALYSEBEVIS

Ref.: 2019/0857/0

Mottaksdato: 12.02.2019

Analysert: 13.02.2019 - 15.02.2019

Analyse av: 20 prøver merket makrellolje

Ref:

#### Analyseresultater

Journalnr.:	Prøvemerkning:	A09 Anisid.t	A10 Peroks.t mEkv/Kg
2019-00857-01	1	8,7	2,2
2019-00857-02	2	3,8	<2,0
2019-00857-03	3	9,5	3,1
2019-00857-04	4	3,7	<2,0
2019-00857-05	5	11,8	<2,0
2019-00857-06	6	2,3	<2,0
2019-00857-07	7	6,7	<2,0
2019-00857-08	8	3,5	<2,0
2019-00857-09	9	8,7	2,6
2019-00857-10	10	3,0	<2,0
2019-00857-11	11	6,9	<2,0
2019-00857-12	12	3,7	<2,0
2019-00857-13	13	7,9	<2,0
2019-00857-14	14	4,4	<2,0
2019-00857-15	15	5,5	2,6
2019-00857-16	16	7,0	<2,0
2019-00857-17	17	4,1	<2,0
2019-00857-18	18	5,9	<2,0
2019-00857-19	19	5,4	2,0
2019-00857-20	C1	7,3	4,7

  
Anne Mari Tveit  
Oppdragskoordinator



## Fettsyresammensetning vinterisering

Oleinfraksjon fra tørrfraksjonering ved 0 °C



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Prosjekt 12191

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Att: Lars

Fyllingsdalen, 06.12.2018

Ref.: 2018/7906/0

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 03.12.2018

Analysert: 04.12.2018 - 06.12.2018

Analyse av: Prøve merket makrellolje LATH-1-11 olein (0 grader C)

Ref:

### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab		2018-07906-01		
Kundens merking		11-olein0gr.C		
A68 14:0	g/100g	5,7		
A68 16:0	g/100g	10,6		
A68 18:0	g/100g	1,7		
A68 20:0	g/100g	0,1		
A68 22:0	g/100g	<0,1		
A68 16:1 n-7	g/100g	3,8		
A68 18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	g/100g	12,4		
A68 20:1 (n-9)+(n-7)	g/100g	9,5		
A68 22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	g/100g	14,4		
A68 24:1 n-9	g/100g	0,8		
A68 16:2 n-4	g/100g	0,4		
A68 16:3 n-4	g/100g	0,1		
A68 18:2 n-6	g/100g	1,6		
A68 18:3 n-6	g/100g	0,2		
A68 20:2 n-6	g/100g	0,3		
A68 20:3 n-6	g/100g	0,1		
A68 20:4 n-6	g/100g	0,4		
A68 22:4 n-6	g/100g	0,1		
A68 18:3 n-3	g/100g	1,3		
A68 18:4 n-3	g/100g	4,4		
A68 20:3 n-3	g/100g	0,2		
A68 20:4 n-3	g/100g	1,1		
A68 20:5 n-3 (EPA)	g/100g	7,6		
A68 21:5 n-3	g/100g	0,5		
A68 22:5 n-3	g/100g	1,4		
A68 22:6 n-3 (DHA)	g/100g	11,2		

Jarle Weng-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.

Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.

Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

## Fettsyreanalyse av oleinfraksjon fra tørrfraksjonering ved 0 °C



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Prosjekt 12191

Att: Lars

Fyllingsdalen, 06.12.2018

Ref.: 2018/7906/1

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 03.12.2018

Analysert: 04.12.2018 - 06.12.2018

Analyse av: Prøve merket makrellolje LATH-1-11 olein (0 grader C)

Ref:

### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab		2018-07906-01		
Kundens merking		11-olein0gr.C		
A68 Sum mettede fettsyrer	g/100g	18,1		
A68 Sum monoene fettsyrer	g/100g	40,9		
A68 Sum PUFA (n-6) fettsyrer	g/100g	2,7		
A68 Sum PUFA (n-3) fettsyrer	g/100g	27,7		
A68 Sum PUFA fettsyrer totalt	g/100g	30,9		
A68 omega-6/omega-3 forhold		0,10		
A68 Sum EPA + DHA	g/100g	18,8		
A68 Sum identifiserte fettsyrer	g/100g	89,9		
* A68 Sum uidentifiserte fettsyrer	g/100g	6,3		

Analysert merket med \* omfattes ikke av akkrediteringen.

Fettsyreresultatene er beregnet som fettsyremetylestere.

Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.

Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.

Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

## Fettsyreanalyse av stearinfraksjon fra tørrfraksjonering ved 0 °C



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Prosjekt 12191

Fyllingsdalen, 06.12.2018

Att: Lars

Ref.: 2018/7907/0

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 03.12.2018

Analysert: 04.12.2018 - 06.12.2018

Analyse av: Prøve merket makrellolje LATH-1-11 stearin (0 grader C)

Ref:

### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab		2018-07907-01		
Kundens merking		11-stearin0gr		
		.C		
A68 14:0	g/100g	7,2		
A68 16:0	g/100g	13,4		
A68 18:0	g/100g	2,0		
A68 20:0	g/100g	0,2		
A68 22:0	g/100g	0,1		
A68 16:1 n-7	g/100g	3,5		
A68 18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	g/100g	11,7		
A68 20:1 (n-9)+(n-7)	g/100g	10,1		
A68 22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	g/100g	15,6		
A68 24:1 n-9	g/100g	1,1		
A68 16:2 n-4	g/100g	0,3		
A68 16:3 n-4	g/100g	0,1		
A68 18:2 n-6	g/100g	1,5		
A68 18:3 n-6	g/100g	0,2		
A68 20:2 n-6	g/100g	0,3		
A68 20:3 n-6	g/100g	0,1		
A68 20:4 n-6	g/100g	0,4		
A68 22:4 n-6	g/100g	<0,1		
A68 18:3 n-3	g/100g	1,2		
A68 18:4 n-3	g/100g	3,8		
A68 20:3 n-3	g/100g	0,1		
A68 20:4 n-3	g/100g	1,0		
A68 20:5 n-3 (EPA)	g/100g	6,6		
A68 21:5 n-3	g/100g	0,4		
A68 22:5 n-3	g/100g	1,2		
A68 22:6 n-3 (DHA)	g/100g	9,5		

Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.

Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.

Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

## Fettsyreanalyse av stearinfraksjon fra tørrfraksjonering ved 0 °C



Nofima BioLab  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf +47 55 50 12 00  
www.nofima.no

Org. nr. NO 989 278 835 VAT

Prosjekt 12191

Fyllingsdalen, 06.12.2018

Att: Lars

Ref.: 2018/7907/1

### ANALYSEBEVIS

Mottaksdato: 03.12.2018

Analysert: 04.12.2018 - 06.12.2018

Analyse av: Prøve merket makrellolje LATH-1-11 stearin (0 grader C)

Ref:

### Analyseresultater

Prøvenummer BioLab		2018-07907-01		
Kundens merking		11-stearin0gr		
		.C		
A68 Sum mettede fettsyrer	g/100g	22,9		
A68 Sum monoene fettsyrer	g/100g	42,0		
A68 Sum PUFA (n-6) fettsyrer	g/100g	2,5		
A68 Sum PUFA (n-3) fettsyrer	g/100g	23,8		
A68 Sum PUFA fettsyrer totalt	g/100g	26,7		
A68 omega-6/omega-3 forhold		0,10		
A68 Sum EPA + DHA	g/100g	16,1		
A68 Sum identifiserte fettsyrer	g/100g	91,6		
* A68 Sum uidentifiserte fettsyrer	g/100g	6,5		

Analysert merket med \* omfattes ikke av akkrediteringen.

Fettsyresultatene er beregnet som fettsyremetylestere.

Jarle Wang-Andersen  
Leder BioLab

Resultatene gjelder kun de analyserte prøver. De kan ikke gjengis i utdrag uten vårt samtykke.

Vennligst kontakt oss hvis opplysninger om analyseusikkerhet ønskes tilsendt.

Metodereferanser for akkrediterte analyser: <http://nofima.no/forskningsanlegg/biolab>

## Sensoriske egenskaper

### LUKT

<b>Total luktintensitet</b>	Styrken av alle lukter i prøven Ingen intensitet = ingen syrlig lukt Tydelig intensitet = tydelig syrlig lukt
<b>Syrlig lukt</b>	Relateres til en frisk lukt som skyldes organiske syrer Ingen intensitet = ingen syrlig lukt Tydelig intensitet = tydelig syrlig lukt
<b>Gresslukt</b>	Relateres til lukt av nyslått gress, grønn tomat Ingen intensitet = ingen gresslukt Tydelig intensitet = tydelig gresslukt
<b>Fiskelukt</b>	Lukt av frisk fet fisk, skalldyr, frisk sjø Ingen intensitet = ingen fiskelukt Tydelig intensitet = tydelig fiskelukt
<b>Smørlukt</b>	Relateres til en rund, fylldig lukt av meierismør Ingen intensitet = ingen smørlukt Tydelig intensitet = tydelig smørlukt
<b>Metall lukt</b>	Relateres til lukt av metallspon, jern og blod Ingen intensitet = ingen metallukt Tydelig intensitet = tydelig metallukt
<b>Fruktlukt</b>	Relateres til en søtlig, overmoden lukt av frukt (banan, sjampagnebrus, melon, modent eple, essens) Ingen intensitet = ingen fruktlukt Tydelig intensitet = tydelig fruktlukt
<b>Nøttelukt</b>	Relateres til en lukt av ferske nøtter og frø (hasselnøtt, mandel, linfrø) Ingen intensitet = ingen nøttelukt Tydelig intensitet = tydelig nøttelukt
<b>Kjemikalielukt</b>	Relateres til lukt av plastikk, lim, syntetisk, gummi Ingen intensitet = ingen kjemikalielukt Tydelig intensitet = tydelig kjemikalielukt
<b>Prosesslukt</b>	Relateres til lukt av diesel, motorolje, brent olje, tjære, -beis, eksos Ingen intensitet = ingen prosesslukt Tydelig intensitet = tydelig prosesslukt

<b>Medisinlukt</b>	Relateres til lukt av apotek, tannlegekontor, sprit, såpe Ingen intensitet = ingen medisinlukt Tydelig intensitet = tydelig medisinlukt
<b>Fermentertlukt</b>	Relateres til lukt av tørrfisk, modnet fisk, råttent fiskeslo Ingen intensitet = ingen fermentertlukt Tydelig intensitet = tydelig fermentertlukt
<b>Harsklukt</b>	Lukt av maling, linolje, stearin Ingen intensitet = ingen harsklukt Tydelig intensitet = tydelig harsklukt
<b>SMAK</b>	
<b>Syrlig smak</b>	Relateres til en frisk smak som skyldes organiske syrer Ingen intensitet = ingen syrlig smak Tydelig intensitet = tydelig syrlig smak
<b>Bittersmak</b>	Relateres til grunnsmaken bitter (koffein) Ingen intensitet = ingen bitter smak Tydelig intensitet = tydelig bitter smak
<b>Gressmak</b>	Relateres til smak av nyslått gress, grønn tomat Ingen intensitet = ingen gressmak Tydelig intensitet = tydelig gressmak
<b>Fiskesmak</b>	Smak av frisk fet fisk, skalldyr, frisk sjø Ingen intensitet = ingen fiskesmak Tydelig intensitet = tydelig fiskesmak
<b>Smørsmak</b>	Relateres til en rund, fyldig smak av meierismør Ingen intensitet = ingen smørsmak Tydelig intensitet = tydelig smørsmak
<b>Nøttesmak</b>	Relateres til en smak av ferske nøtter og frø (hasselnøtt, mandel, linfrø) Ingen intensitet = ingen nøttesmak Tydelig intensitet = tydelig nøttesmak
<b>Kjemikaliesmak</b>	Relateres til smak av plastikk, lim, syntetisk, gummi Ingen intensitet = ingen kjemikaliesmak Tydelig intensitet = tydelig kjemikaliesmak Tydelig intensitet = tydelig kjemikaliesmak
<b>Prosessmak</b>	Relateres til smak av diesel, motorolje, brent olje, tjære, -beis, eksos Ingen intensitet = ingen prosessmak Tydelig intensitet = tydelig prosessmak

**Fermentertsmak** Relateres til smak av tørrfisk, modnet fisk, råttet fiskeslo  
Ingen intensitet = ingen fermentertsmak  
Tydelig intensitet = tydelig fermentertsmak

**Harsksmak** Smak av maling, linolje, stearin  
Ingen intensitet = ingen harsksmak  
Tydelig intensitet = tydelig harsksmak

## **MUNNFØLELSE**

**Pungent** Relateres til en stikkende, harkende hostende følelse  
Ingen intensitet = ingen harkende følelse  
Tydelig intensitet = tydelig harkende følelse

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 50232-9.0EN**

**Material no. 1208047**

**GUARDIAN™ Rosemary Extract 201**

Fat soluble; 10 kg

**Description**

GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 comprises rosemary extract and a food grade carrier system. GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is soluble in fats and oils, but insoluble in water.

**Application areas**

Vegetable and animal fats and oils, frying oils, shortenings, mayonnaise, margarine and spreads, baked products, snack foods and similar products.

**Potential benefits**

- Improvement of products by retarding lipid oxidation
- Longer shelf life of fats and oils and of processed products
- Consistent quality
- Excellent carry-through effect
- Uniform distribution of rosemary extract due to the carrier present
- Technical documentation from DuPont Nutrition Biosciences ApS on potential benefits can be provided upon request.

**Usage levels**

The recommended dosage of GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is in the range 200-1000 ppm (200-1000 g per metric ton). Exact dosage cannot be stated as it depends on the fat/oil content of the product for which it is intended.

**Directions for use**

Apply GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 to product either directly or as a fat or oil solution by spraying, dipping, kneading or injecting.

Using a presolution:  
Add 1 g GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 (20-80°C) to at least 9 g melted fat or oil (60-80°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is completely dissolved.

Directly:  
Add the calculated quantity of GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 (20-70°C) to melted fat or oil (20-70°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is completely dissolved.

If a weaker solution is required, dilute further with melted fat or oil (20-80°C). Stir until the solution is homogeneous.

**Composition**

GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is composed of:  
Extract of Rosemary (E392)  
and  
Propylene glycol (E1520)

**Physical/chemical specifications**

Carnosic acid	3.1 - 3.7 %
Total of carnosic acid and carnosol	3.5 - 4.5 %
Phenolic diterpenes* Form at 25°C	4.1 - 4.8 % liquid
Colour	brown

\*Total of carnosic acid, carnosol and 12-O-methyl carnosic acid  
Colour variations may occur from batch to batch.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.



## PRODUCT DESCRIPTION - PD 50232-9.0EN

Material no. 1208047

### GUARDIAN™ Rosemary Extract 201

Fat soluble; 10 kg

#### Storage

---

**Conditions:**

Store unopened between 15-25°C.

When opened, store between 15-25°C in original container.

GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is a concentrated solution and may therefore form precipitates or lumps on prolonged storage, especially at low temperatures. Should this occur, re-melt at 50-70°C and shake or stir before use.

**Shelf life:**

Shelf life is 18 months when stored according to recommendations.

#### Packaging

---

GUARDIAN™ Rosemary Extract 201 is available in 10 kg polyethylene cans.

Other forms of packaging may be available on request

#### Purity and legal status

---

In the United States, rosemary extract is GRAS for general use in foods under 21 CFR 182.20. Rosemary extract meets the definition of "natural flavoring" and may be labelled accordingly.

In the EU rosemary extract may be labelled as antioxidant; Extract of Rosemary or antioxidant; E 392.

Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country. Advice regarding the legal status of this product is available on request.

#### Safety and handling

---

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

#### Country of origin

---

Denmark

#### Kosher status

---

This product is certified by the Orthodox Union as kosher pareve.

#### Halal status

---

This product is certified Halal by Halal Food Council of Europe and IFANCA International.

#### GMO status

---

According to regulations EC nos. 1829/2003 and 1830/2003:

The raw materials and processing aids used in the production of this product do not contain or consist of GMOs, and are not produced from GMOs.

Questionnaire has been used as documentation.

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 202361-12.1EN

Material no. 1210905

### GUARDIAN™ TOCO 70 IP

Antioxidant, Fat soluble; 5 kg.

#### Description

GUARDIAN™ TOCO 70 IP is a highly effective antioxidant containing Identity Preserved (IP) tocopherol-rich extract with a selected food grade vegetable oil as carrier.

GUARDIAN™ TOCO 70 IP is soluble in fats and oils, but insoluble in water.

#### Application areas

Vegetable and animal fats and oils, frying oils, shortenings, margarine and spreads, mayonnaise and dressings, baked products, snack foods, meat and poultry products, sea food products, potato granules/flakes, cereal products, cosmetics, and similar products.

#### Potential benefits

- Improvement of products by retarding lipid oxidation
- Longer shelf life of fats and oils and of processed products
- A minimum of change or deterioration of taste, odour, colour, texture and nutritional value
- Consistent quality
- Excellent carry-through effect
- Excellent vitamin-based alternative to BHA and BHT based antioxidants

#### Usage levels

The recommended dosage of GUARDIAN™ TOCO 70 IP is in the range 100-500 ppm (100-500 g per metric ton). Exact dosage cannot be stated as it depends on the fat/oil content of the product for which it is intended.

#### Directions for use

Apply GUARDIAN™ TOCO 70 IP to product either directly or as a fat or oil solution by spraying, dipping, kneading or injecting.

Using a presolution:

Add 1 g GUARDIAN™ TOCO 70 IP (20-80°C) to at least 4 g melted fat or oil (40-80°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN™ TOCO 70 IP is completely dissolved.

Directly:

Add the calculated quantity of GUARDIAN™ TOCO 70 IP (20-80°C) to melted fat or oil (20-80°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN™ TOCO 70 IP is completely dissolved.

If a weaker solution is required, dilute further with melted fat or oil (20-80°C). Stir until the solution is homogeneous.

#### Composition

GUARDIAN™ TOCO 70 IP is composed of:

Tocopherol-rich extract (E306)	70 %
Vegetable oil (sunflower or IP soybean, RBD)	30 %

All percentages are by weight.

#### Physical/chemical specifications

Form at 25°C	liquid
Colour	light to dark brown

Colour variations may occur from batch to batch.

#### Heavy metal specifications

Mercury (Hg)	max. 1 mg/kg
Arsenic (As)	max. 3 mg/kg
Lead (Pb)	max. 2 mg/kg
Heavy metals (as Pb)	max. 10 mg/kg

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 202361-12.1EN

Material no. 1210905

### GUARDIAN™ TOCO 70 IP

Antioxidant, Fat soluble; 5 kg.

#### Storage

---

Conditions:

Store unopened between 15-25°C.

When opened, store between 15-25°C in original container.

Shelf life:

Shelf life is 24 months when stored according to recommendations.

#### Packaging

---

GUARDIAN™ TOCO 70 IP is available in 5 kg polyethylene cans.

Other sizes may be available on request.

#### Purity and legal status

---

The components of GUARDIAN™ TOCO 70 IP meet the EU, FAO/WHO and Food Chemicals Codex specifications. EU Regulations: Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives and Commission Regulation (EU) No 231/2012 laying down specifications for food additives as amended.

Labelling in food: "food additive category followed by the specific name or E number" as defined in Regulation (EU) No 1169/2011.

Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country. Advice regarding the legal status of this product is available on request.

#### Safety and handling

---

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

#### Country of origin

---

China

#### Kosher status

---

This product is certified by the Orthodox Union as kosher pareve.

#### Halal status

---

This product is certified Halal by Halal Food Council of Europe and IFANCA International.

#### GMO status

---

According to regulations EC nos. 1829/2003 and 1830/2003:

The raw materials and processing aids used in the production of this product do not contain or consist of GMOs, and are not produced from GMOs. The raw materials can be traced back to their origin.

Questionnaire has been used as documentation.

