Rapport 18/2022 • Utgitt Juli 2022

Utnyttelse av restråstoff fra makrell og sild, ekstraksjon av fosfolipider

Faglig sluttrapport

Illustrasjon: Nofima

Åge Oterhals, Lars Thoresen og John-Erik Haugen

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA

Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø

Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger

Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra

Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS

Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

Rapportnummer:	ISBN:	ISSN:
18/2022	978-82-8296-720-4	1890-579X
Dato:	*Antall sider + sider vedlegg:*	*Prosjektnummer:*
6. juli 2022	70 + 8	12492

Tittel:
Utnyttelse av restråstoff fra makrell og sild, ekstraksjon av fosfolipider - Faglig sluttrapport

Title:
Utilization of residual raw material from mackerel and herring, extraction of phospholipids – Final report

Forfatter(e):
Åge Oterhals, Lars Thoresen og John-Erik Haugen

Avdeling:
Ernæring og fôrteknologi

Oppdragsgiver:
Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)

Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:
FHF 901504 / Lars Lovund

Stikkord:
Fosfolipider, ekstraksjon, prosessutvikling, restråstoff makrell og sild, umoden silderogn

Sammendrag/anbefalinger:
I prosjektet er det studert egnethet til restråstoff fra filetering av makrell og sild til ekstraksjon av fosfolipider. Makrellavskjær er funnet lite egnet sammenlignet med sild og spesielt umoden silderogn. Konsentrasjon av fosfolipider på tørrstoffbasis kan økes ved å foreta en varmebehandling og pressing/separasjon for fjerning av olje (triglyserider) i samfengt restråstoff. Det er utviklet en prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider basert på etanolekstraksjon av spraytørket umoden silderogn. Fremgangsmåten gir høyt utbytte av lipidekstrakt med >65 % fosfolipider og 31 % n-3 PUFA. Optimale betingelser er funnet å være 11,3 % vann i etanolfasen med ingen effekt av temperatur i området 20-60 °C. Direkte ekstraksjon av våt rogn gir 25 % lavere utbytte sammenlignet med spraytørket rogn. Ekstraktet har en lys farge, lavt oksidasjonsnivå og nivå av uønskede forbindelser godt under gjeldende grenseverdier. Effekt på viskositet ved tilsetting av raffinert makrellolje er dokumentert. Forsøk på stabilisering av lipidekstraktet har ikke dokumentert effekt av tilsetting av naturlige tokoferoler eller rosmarinekstrakt. Rapporten gir også en oversikt over patenter med relevans for den anvendte teknologi.

English summary/recommendation:
The project has studied extraction of phospholipids from residual raw materials from filleting of mackerel and herring. Mackerel residuals are less suitable compared to herring, and especially herring roe. Increased level of phospholipids can be achieved by heat treatment and pressing/separation to remove oil (triglycerides). A process has been developed for cost-effective ethanol extraction of phospholipids from spray-dried immature herring roe. The process gives high yield of extract with >65 % phospholipids and 31 % n-3 PUFA. Optimal conditions have been found to be 11.3 % aqueous ethanol with no effect of temperature in the range 20-60 °C. Direct extraction of wet roe gives 25 % lower yield compared to spray-dried roe. The extract has a light color, low oxidation level, and undesirable compounds below current limits. Effect on viscosity by addition of mackerel oil has been documented. Addition of natural tocopherols or rosemary extract has not given increased oxidative stability. The report also provides an overview of patents relevant to the applied extraction technology.

Innhold

1	**Sammendrag**	**1**
2	**Innledning**	**3**
2.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	3
2.2	Prosjektets omfang	3
2.3	Prosjektorganisering	3
3	**Problemstilling og formål**	**5**
3.1	Prosjektets effektmål	5
3.2	Prosjektets resultatmål	5
3.2.1	Hovedmål	5
3.2.2	Resultatmål	5
3.2.3	Industrirettede leveranser	6
4	**Prosjektgjennomføring**	**7**
5	**Materialer og metoder**	**8**
5.1	Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter (Nofima rapport 11/2021)	8
5.1.1	Materialer	8
5.1.2	Prosessbetingelser	8
5.1.3	Analysemetoder	8
5.2	Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn (Nofima rapport 10/2022)	9
5.2.1	Materialer	9
5.2.2	Metoder	9
5.2.3	Spraytørking av silderogn	9
5.2.4	Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser	9
5.2.5	Sammenligning ekstraksjon av våt og tørket silderogn	10
5.2.6	Reintroduksjon av lipidekstrakt i makrellolje	10
5.2.7	Analysemetoder	10
5.2.8	Statistiske metoder	10
5.3	Oksidasjonsstabilitet av fosfolipider ekstrahert fra silderogn (Nofima rapport 14/2022).	11
5.3.1	Fremstilling av lipidekstrakt	11
5.3.2	Antioksidanter	11
5.3.3	Dosering av antioksidant	11
5.3.4	Lagringsbetingelser og prøveuttak	12
5.3.5	Peroksidtall	13
5.3.6	Flyktige komponenter	13
6	**Prosessutvikling og produktkarakterisering**	**14**
6.1	Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat	14
6.1.1	Industriell opparbeidelse av makrellavskjær	14
6.1.2	Laboratorieskala opparbeidelse av restråstoff sild	18
6.2	Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider i silderogn	24

6.2.1	Sammensetning silderogn	24
6.2.2	Innledende screeningforsøk	26
6.2.3	Optimaliseringsdesign	28
6.2.4	Responsflatemodellering	29
6.2.5	Utbytte individuelle fosfolipider	31
6.2.6	Teoretisk utbytte ved vask av filterkake	34
6.3	Farge og struktur på frysetørket ekstrakt fra silderogn	36
6.4	Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje	38
6.5	Direkte ekstraksjon av umoden silderogn	40
6.6	Nivå organiske miljøgifter og tungmetaller	43
7	**Patentsøk**	**46**
8	**Oksidasjonsstabilitet**	**53**
8.1.1	Valg av flyktige forbindelser for å følge oksidasjonsforløp	53
8.1.2	Screening forsøk uttesting av antioksidanter	54
8.1.3	Peroksidtall	61
8.1.4	Optimalisering av nivå rosmarinekstrakt	62
9	**Konklusjoner**	**65**
9.1	Resultatmål	65
9.1.1	Fosfolipidnivå i avskjær fra makrell og sild, silderogn, grakse, limvann og råolje	65
9.1.2	Prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider	65
9.1.3	Utbytte for produksjon av fosfolipider	65
9.1.4	Stabilisering av fosfolipider i ren form	66
9.1.5	Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje	66
9.1.6	Farge og oksidasjonstall i ekstraherte fosfolipider, samt nivå av aktuelle uønskede stoffer	66
10	**Hovedfunn**	**67**
11	**Leveranser**	**68**
11.1	Rapporter, foredrag, faktaark	68
11.2	Industrirettede leveranser	68
12	**Referanser**	**69**
13	**Vedlegg**	**i**

1 Sammendrag

I prosjektet er det undersøkt egnethet til restråstoff fra makrell og sild til ekstraksjon av fosfolipider. Restråstoff makrell ga et høyt oljeutbytte, men lave nivå av polare lipider i fettfase fra mellomproduktene presskake (3,4 %), grakse (9,1 %) og konsentrat (2,2 %). Nivå i fraseparert olje var 0,8 %. Makrell gyter vår-forsommer og fangstsesongen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gytesesong slik tilfelle er for sild. Samlet vurdert er restråstoff makrell lite egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider.

Restråstoff sild viser en betydelig økning av nivå polare lipider i fettfase fra presskake/grakse sammenlignet med råstoffet. Effekten er høyest for en hydrolyseprosess (3-4 dobling) med oppnådde nivå i grakse på 22,1 % for NVG-sild og 17,7 % for Nordsjøsild. En fiskemelprosess ga en presskake/grakse med hhv. 8 % og 5 % lavere nivå. Ved å ta utgangspunkt i buklist-rogn-melke-fraksjonen kan nivå polare lipider økes fra 19,6 % til 47 % i presskake/grakse basert på en fiskemelprosess.

Forsøkene bekrefter at de polare lipidene primært følger den partikulære proteinfraksjonen. Ved å varmebehandle og mekanisk separere råstoffet kan en stor andel av vann og nøytrale lipider (triglyserider) fjernes før ekstraksjon av de polare lipidene. Dette vil muliggjøre bruk av restråstoff med relativt lave nivå polare lipider inn i en ekstraksjonsprosess.

Umoden silderogn inneholder høye nivåer av fosfolipider og omega-3-fettsyrer og er et godt utgangspunkt for utvikling av produkter rettet mot kosttilskudd og helsekostmarkedet. Det er i prosjektet optimalisert en prosess for ekstraksjon av fosfolipider fra tørket rogn basert på etanol-vann ekstraksjon. Optimal vann% i etanolfasen er funnet å være 11,3 %. Det ble ikke funnet effekt av temperatur i området 20-60 °C. Høyeste oppnådde utbytte av fosfolipider ved bruk av ett ekstraksjonstrinn er 83 %. Etanolekstraksjon gir økende co-ekstraksjon av salt og protein med økende vann%, men ingen effekt på farge. Lipidekstraktet har høy viskositet som kan reduseres ved tilsetting av makrellolje. Direkte ekstraksjon av våt rogn ga 25 % lavere utbytte sammenlignet med spraytørket rogn. Nivå av organiske miljøgifter (POPs) og tungmetaller i lipidekstraktet er lave og godt under gjeldende grenseverdier.

Gjennomgang av patentlitteratur med relevans for den studerte teknologi har avdekket at det anvendte hovedprinsipp, ekstraksjon av tørket rogn med etanol, er nevnt i patentkrav. Patentlitteraturen beskriver kun lavtemperatur tørking (frysetørking eller <70 °C) av rogn før ekstraksjon. Den her anvendte tørketeknologi (spraytørking) anvender høy temperatur (220 °C) og er dokumentert å gi betydelig økt utbytte sammenlignet med direkte ekstraksjon av våt rogn.

Etanolekstrakt fra silderogn inneholder høye nivå fosfolipider og flerumettede n-3 fettsyrer. Stabilisering ved tilsetting av naturlige tokoferoler og rosmarinekstrakt er undersøkt i et faktorielt forsøksdesign. Best resultat er oppnådd med rosmarinekstrakt med dårligere eller ingen tilleggseffekt ved tilsetting av tokoferol alene eller i kombinasjon med rosmarin. Kontrollprøve uten tilsatt antioksidant kom dårligst ut, men viste en uvanlig lav og lineær utvikling av peroksider. Forsøk på å finne et optimum for dosering av rosmarinekstrakt ga ikke et entydig svar. Ingen av prøvene tilsatt rosmarinekstrakt kom bedre ut enn kontrollprøven etter 28 dagers lagring ved 40 °C. Prøve tilsatt 935 ppm rosmarinekstrakt kom like godt ut som kontroll, men ga ingen tilleggseffekt på stabilitet. Sammenlignes kontrollprøver uten antioksidant fra screening- og optimaliseringsforsøket viser sistnevnte bedre stabilitet. Årsak til dette er ikke kjent, men en viktig faktor kan være de anvendte ekstraksjonsbetingelser ved fremstilling av de to lipidekstraktene, hhv 100 % etanol og etanol med 11,3 % vann. Dette har gitt høyere nivå co-ekstrahert protein i sistnevnte prøve (hhv. 1,4 og 7,0 %) og kan være en faktor med betydning for oksidasjonsstabilitet.

English summary

Assessment of the suitability of mackerel and herring residuals as source for phospholipid extraction has been carried out. Mackerel gave low levels of polar lipids in the fishmeal/hydrolysis intermediate products and is less suitable for extraction of phospholipids. Herring shows a significant increase in polar lipids from presscake/decanter solids with obtained levels up to 22.1 %. Based on the belly flap-roe-milt fraction, the level could be increased to 47 %. The experiments confirm that the polar lipids primarily follow the solid protein fraction. By heat treatment and mechanical separation of the raw material, a large proportion of water and neutral lipids (triglycerides) can be removed before extraction of polar lipids. This could enable the use of residual raw materials with relatively low levels of polar lipids into an extraction process.

Immature herring roe contains high levels of phospholipids and omega-3 fatty acids and is a good starting point for the development of products in the dietary supplements and health food market. The project has optimized a process for the extraction of phospholipids from dried roe using aqueous ethanol. Optimal water content in the ethanol phase was found to be 11.3 %. No effect of temperature in the range 20-60 °C was observed. The highest achieved yield of phospholipids using one extraction step is 83 %. Ethanol extraction gives increasing co-extraction of salt and protein with increasing water content, but no effect on colour. The lipid extract has a high viscosity which can be reduced by blending with mackerel oil. Direct extraction of wet roe gave 25 % lower yield compared to spray-dried roe. The level of organic pollutants (POPs) and heavy metals in the lipid extract are low and well below current maximum levels.

A review of patent literature with relevance to the studied technology has revealed that the applied main principle, i.e., extraction of dried roe using ethanol, is mentioned in patent claims. The patent literature only describes the use of low temperature drying (freeze drying or <70 °C) of roe before extraction. The applied drying technology (spray drying) uses high temperature (220 °C) and is documented to give significantly increased yield compared to direct extraction of wet roe.

Ethanol extract from herring roe contains high levels of phospholipids and polyunsaturated n-3 fatty acids. Stabilization of the lipid extract by the addition of natural tocopherols and rosemary extract has been investigated in a factorial design experiment. Best results were observed with rosemary extract. Tocopherols alone or in combination with rosemary gave less or no additional effects. Control samples without added antioxidant showed poorest stability, however, an unusually low and linear development of peroxide value (PV). Attempts to find an optimum dosing of rosemary extract did not provide clear answers. None of the samples with added rosemary extract came out better than the control sample after 28 days of storage at 40 °C. Sample added 935 ppm rosemary extract was equal to the control, however, gave no additional effect on stability. Comparing control samples without antioxidant from the screening and optimization experiment shows better stability of the latter. The reason for this is unknown, however, an important factor may be the extraction conditions used in the preparation of the two lipid extracts, 100 % ethanol and aqueous ethanol (11.3 %), respectively. This has resulted in higher levels of co-extracted protein in the latter sample (1.4 and 7.0 %, respectively) and may be a factor of importance for oxidation stability.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

FHF har siden 2015 arbeidet systematisk og målrettet med utvikling av kunnskap og teknologi for økt bearbeiding av makrell. Satsingen kalles «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell». Bakgrunnen for igangsetting var en meget lav bearbeidelsesgrad i Norge der bare 2–4 % av makrellen ble foredlet 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 høyt 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 ønsket på overordnet nivå å få gjennomført et prosjekt som skulle kartlegge mulighetene for å ekstrahere fosfolipider fra graksemel etter makrelloljeproduksjon. Fosfolipidene skulle deretter reintroduseres i råolje eller stabiliseres i ren form.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet har hatt et totalt budsjett på 2,5 mill. NOK, fullfinansiert av FHF, med en varighet på 3,5 år. Prosjektet har omfattet 6 hovedaktiviteter: Kartlegging av nivå fosfolipider, utvikling og optimalisering av ekstraksjonsprosess, beregning av utbytte, stabilisering av lipidekstrakt, reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje, kartlegging av farge, oksidasjonstall og uønskede stoffer.

2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet er ledet av Nofima med en intern faggruppe bestående av PhD Åge Oterhals (prosjektleder), PhD Lars Thoresen og PhD John-Erik Haugen.

Nøkkelkompetanse til personer i faggruppen:
Oterhals: utnyttelse av restråstoff, prosess-, ekstraksjon- og raffineringsteknologi, og oljekvalitet. Thoresen: ekstraksjon, oljekvalitet og prosessering.

Haugen: oljekvalitet, lukt/smakskjemi og lipidoksidasjon.

Ansvar og roller:
Oterhals har hatt overordnet ansvar for forsøksplanlegging, uttak av råstoff/mellomprodukter ved fileteringsanlegg og fiskemelfabrikk, fremskaffing av silderogn, forsøksdesign og rapportering. Thoresen har vært ansvarlig for gjennomføring av ekstraksjonsforsøk og fremstilling av prøver til analyser og oksidasjonsstabilitet. Haugen har vært ansvarlig for gjennomføring av analyser på headspace GC-MS. Senioringeniør Elin-Merete Wetterhus har bidratt til analyse på oksidasjonsstabilitet og personell ved Nofima BioLab til diverse andre kjemiske analyser.

Sentrale industripartnere:
Pelagia og Epax AS, som besitter bred kompetanse innen foredling av pelagisk fisk og utnyttelse av restråstoff, raffinering av marine oljer og oljekvalitet.

Styringsgruppe:
Jørgen Seliussen (Pelagia AS), Alexander Krokedal (Pelagia AS), Raja Rathore (Pelagia AS; deler av prosjektperioden), Ola Flesland (Vedde Sildoljefabrikk AS og senere Pelagia AS), Kurt Jakobsen (Nils Sperre AS; deler av prosjektperioden), Iren Stoknes (EPAX) og Lars R. Lovund (FHF).

3 Problemstilling og formål

3.1 Prosjektets effektmål

Norge er et av de ledende land i verden innen raffinering av marine lipider rettet mot helsekost, nutraceutical og medisinske markedssegmenter. Med unntak av raffinert torskeleverolje (hovedsakelig tranprodukter) er industrien basert på import av utenlandske oljer med høyt naturlig innhold av n-3-fettsyrene EPA og DHA. Norsk fiskeolje basert på pelagisk fisk og restråstoff anvendes fortsatt primært til fiskefôr og utvikling av teknologi og nye produkter rettet mot andre markeder vil kunne bidra til økt verdiskapning. Næringen har, i samarbeid med FHF, etablert en produksjonslinje for prosessering av makrell restråstoff ved ett av de pelagiske anleggene (Pelagia, Måløy). Dette anlegget vil levere råolje fra makrell restråstoff for videreforedling til en høykvalitetsolje til humant konsum. Utvikling av kunnskap og teknologi for ekstraksjon, raffinering og stabilisering av makrellolje er utviklet gjennom to tidligere FHF-prosjekter: «Foredling av råolje av restråstoff fra makrell til høykvalitetsprodukt for humant konsum» (prosjekt 901370) og «Kvalitet på olje produsert av restråstoff fra fersk og frosset makrell» (prosjekt 901317).

I en tradisjonell fiskemelprosess blir råstoffet varmebehandlet og olje separert fra gjennom mekanisk pressing og separasjon av væskefasen. Fiskeoljen består hovedsakelig av triglyserider og de polare lipidene (fosfolipider) følger med i presskake/grakse-fasen som tørkes til fiskemel. Mellomproduktene presskake/grakse i en fiskemelprosess kan derfor danne et godt utgangspunkt for ekstraksjon av lipider med et høyt nivå av fosfolipider. Egnethet til disse mellomproduktene fremstilt basert på restråstoff fra filetering av makrell er ikke tidligere undersøkt og ønsket utredet i dette prosjektet.

Ekstraksjon av fiskemel er tidligere forsøkt industrialisert i Norge på 70-tallet for å imøtekomme den tids utfordringer med innblanding av fiskemel i fôr til husdyr (Opstvedt og Hansen, 1977), og i nyere tid i Danmark for å fjerne organiske miljøgifter (Knutsen et al., 2018). I begge tilfeller er det anvendt heksan til ekstraksjon av restfett i melet. Heksan anvendes også industrielt til ekstraksjon av planteoljer og er best egnet til å hente ut de nøytrale lipidene (triglyserider) fra råstoffet. En dedikert ekstraksjonsprosess for ekstraksjon av polare lipider (fosfolipider) må baseres på et polart løsemiddel. Etter fjerning av løsemiddelet vil presskake/grakse kunne anvendes på vanlig måte som proteinkilde i fôr til fisk og husdyr. Det er stor interesse for fosfolipider innen helsekost- og nutraceuticals-markedet og en slik økt utnyttelse av pelagisk råstoff vil kunne skape ny industriutvikling og verdiskapning innen pelagisk sektor. Arbeidet som er gjennomført og resultatene som er oppnådd i dette prosjektet danner et godt grunnlag for beslutningsprosesser for videre industrielle satsingen på området.

3.2 Prosjektets resultatmål

3.2.1 Hovedmål

Hovedmål med prosjektet er å utvikle en prosess for ekstraksjon av fosfolipider fra restråstoff av makrell og sild.

3.2.2 Resultatmål

1. Kartlegge fosfolipidnivå i avskjær fra makrell og sild, silderogn, grakse, limvann og råolje.
2. Utvikle prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider.
3. Beregne utbytte for produksjon av fosfolipider.
4. Stabilisere fosfolipider i ren form.
5. Reintroduksjon av fosfolipider i råolje og omega-3 oppkonsentrert makrellolje og lage prøver av dette.
6. Kartlegge farge og oksidasjonstall i ekstraherte fosfolipider, samt undersøke nivå av aktuelle uønskede stoffer.

3.2.3 Industrirettede leveranser

1. Nivå og variasjon i fosfolipidnivå i restråstoff, silderogn, grakse, limvann og råolje.
2. Fordeling av fosfolipider i grakse, limvann/hydrolysat og råolje basert på konvensjonell og hydrolysebasert nedstrømsprosess.
3. Prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider.
4. Utbytte av fosfolipider og innhold av andre lipidklasser.
5. Nivå og variasjon i farge, oksidasjonstall og uønskede stoffer i fosfolipider.
6. Prosessoppskrift for reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje.
7. Prosessoppskrift for stabilisering av fosfolipider.
8. Gjennomgang av patentlitteratur for å evaluere mulige IPR-konflikter.

4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet har vært inndelt i 6 hovedaktiviteter: 1) Kartlegging av fosfolipidnivå i restråstoff fra filetering av makrell og sild, silderogn, og mellomprodukter (presskake, grakse, limvann) og mel ved opparbeidelse av restråstoff, 2) Utvikling av en prosess for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider, 3) Gjennomgang av patentlitteratur, 4) Stabilisering av lipidekstrakt med høyt nivå av fosfolipider, 5) Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje og 6) Kartlegging av farge og oksidasjonstall i lipidekstrakt, samt undersøke nivå av uønskede stoffer.

Aktivitet 1 ble gjennomført i industriell skala ved fiskemelfabrikk under prosessering av makrellavskjær. Dette ga et mest mulig realistisk bilde av masse- og komponentbalanser, sammensetning (inklusivt nivå av fosfolipider) av de respektive mellomprodukter og mulighet for å avdekke nye problemstillinger. I tillegg er det gjennomført tilsvarende studier i laboratorieskala på opparbeidelse av restråstoff fra sild ved bruk av konvensjonell fiskemelprosess og en hydrolysebasert prosess.

Basert på resultater fra aktivitet 1 ble det konkludert med at restråstoff fra makrell er lite egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider. Grakse opparbeidet basert på buklist med rogn og melke fra sild ga betydelig høyere nivå av fosfolipider. I samråd med referansegruppen og FHF ble det besluttet å videreføre prosjektet basert på silderogn som råstoff.

I aktivitet 2 er det gjennomført faktorielle forsøk i laboratorieskala for å undersøke effekt av temperatur og vannprosent i etanolfasen på utbytte og sammensetning av lipidekstrakt. Basert på forsøkene er det identifisert optimale betingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn. I tillegg er det undersøkt effekt av å fjerne vann i silderogn ved bruk av forutgående tørking eller ved bruk av overskudd ren alkohol under ekstraksjonsprosessen.

I aktivitet 3 er det gjennomført et patentsøk i databasen Espacenet for å få frem en oversikt over relevante patenter og en første avklaring av mulige IPR-konflikter ved industriell anvendelse av den fremgangsmåte som prosjektet har kommer frem til.

Aktivitet 4 er gjennomført basert på lipidekstrakt fra silderogn og med tilsetting av antioksidantene rosmarinekstrakt og naturlige tokoferoler. Enkelt- og kombinasjonseffekter av disse er først undersøkt i et screeningforsøk og i et etterfølgende forsøk er det forsøkt å finne frem til optimalt nivå for tilsetting av rosmarin.

I aktivitet 5 er det gjennomført studier på å blande lipidekstrakt fra sild med raffinert makrellolje for å redusere viskositeten og håndterbarheten til produktet. To tilnærminger for innblanding av olje er forsøkt, hhv. mekanisk og som del av ekstraksjonsprosessen. Viskositet ved forskjellige blandingsforhold mellom lipidekstakt og makrellolje er undersøkt.

I aktivitet 6 er det undersøkt farge, oksidasjonsnivå og uønskede forbindelser i lipidekstrakt fra silderogn. Førstnevnte er gjennomført basert på ekstrakter fra optimaliseringsforsøk under aktivitet 2. Oksidasjonsnivå er undersøkt i forbindelse med uttesting av antioksidanter. Uønskede forbindelser er undersøkt i silderogn fra 2020 og 2021 for å fange opp eventuelle variasjoner.

5 Materialer og metoder

5.1 Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter (Nofima rapport 11/2021)

5.1.1 Materialer

Restråstoff fra filetering av sild og makrell er levert fra Pelagia sine anlegg i Norge:

- Makrell 3/8-18: Samfengt restråstoff levert direkte i bulk til fiskemelfabrikk.
- NVG-sild 26/1-20: Samfengt restråstoff med noe melke; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.
- Nordsjøsild 3/10-19: Samfengt restråstoff med noe rogn; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.
- NVG-sild 26/1-20: Buklapp-rogn-melke-fraksjon; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.

5.1.2 Prosessbetingelser

Det er gjennomført forsøk med prosessering av makrellavskjær ved fiskemelfabrikk primo oktober 2018. Fabrikken hadde en konvensjonell kontinuerlig prosesslinje bestående av skrukoker, sil/presse, dekantersentrifuge, oljeseparator, inndamper og tørke. Prøve av råstoff, mellomprodukter og mel ble frosset inn lokalt før forsendelse til Nofima i Bergen.

Sildeavskjær er opparbeidet i laboratorieskala ved Nofima sin avdeling i Bergen. Frosset råstoff ble delvis tint over natten ved 2-3 °C og malt på kjøttkvern (6 mm hullskive). Buklapp med melke og rogn ble kvernet i frosset tilstand.

Konvensjonell lab-skala opparbeidelse til fiskemel og -olje er gjennomført ved bruk av en batch-koker. Formalt råstoff (1000 g) ble tilsatt 250 g vann, varmet opp til 85 °C under kontinuerlig omrøring, og holdt ved denne temperaturen i 10 minutter. Kokt råstoff ble deretter mekanisk avvannet i en presse. Pressvæsken ble separert i en sentrifuge ved 20 000 x g i 10 minutter. Væske- (limvann) og olje-fase ble dekantert over i en skilletrakt for separasjon. Sediment (tilsvarer dekantergrakse) ble blandet med presskaken og homogenisert i en foodprosessor. Prøver ble oppbevart på frys inntil analyse.

Lab-skala enzymatisk hydrolyse ble gjennomført i en batchreaktor. Kvernet råstoff (1000 g) ble tilsatt vann (1000 g) og varmet opp til 55 °C under kontinuerlig omrøring. FoodPro enzymløsning (1,0 g) ble tilsatt og hydrolysen kjørt i 60 min. Temperaturen ble økt til 90 °C og holdt ved denne temperaturen i 10 minutter for inaktivering av enzym, og blandingen deretter kjølt ned til romtemperatur før separasjon ved 20 000 x g i 10 minutter. Væske- (hydrolysat) og olje-fase ble dekantert over i en skilletrakt for separasjon. Sediment (tilsvarer dekantergrakse) ble manuelt homogenisert før uttak av prøve. Prøver ble oppbevart på frys inntil analyse.

5.1.3 Analysemetoder

Analyse av sammensetning, fettsyrer og lipidklasser er gjennomført ved Nofima BioLab, Bergen. Analyse av fosfolipider basert på ^{31}P-NMR er gjennomført hos Spectral Service AG, Köln, Tyskland.

Tørrstoff ble målt gravimetrisk etter tørking av prøven i ovn ved 103 °C i 4,5 timer eller over natt dersom vanninnholdet var >15 % (ISO 6496). Aske ble bestemt gravimetrisk i henhold til ISO 5984:2002. Fett-nivå ble målt basert på kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959). Råprotein (N x 6,25) ble målt ved bruk av Kjeldal metode (ISO 5983-2:2009). Vannløselig råprotein ble bestemt etter ekstraksjon av en 10 g prøve med 150 ml kokende destillert vann i 30 minutter og filtrering gjennom et Whatman 589/1 black ribbon paper (Whatman, Dassel, Germany). Fettsyreprofil ble analysert med bruk av gasskromatografi i henhold til AOCS-metode Ce 1b-89. C23:0 metylester ble tilsatt som internstandard.

Lipidklasser ble analysert ved bruk av HPLC og Corona Plus charged aerosol detektor (Oterhals et al., 2010). Innhold av fosfolipider basert på ^{31}P-NMR ble gjennomført i henhold til Zailer et al. (2018).

5.2 Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn (Nofima rapport 10/2022)

5.2.1 Materialer

Umoden og renset blokkfrosset silderogn produsert i 2020 (batch #0441; 2/2-20) og 2021 (batch #1157; 27/1-21) ble levert fra Pelagia Liavåg. Raffinert makrellolje ble levert fra EPAX (Ålesund). Etanol anvendt i ekstraksjonsforsøk var av typen Absolutt alkohol prima 99,9 % (Kiilto, Finland). Alle kjemikalier anvendt under ekstraksjon av fosfolipider var av næringsmiddelkvalitet.

5.2.2 Metoder

5.2.3 Spraytørking av silderogn

En blokk med rogn (20 kg batch #0441) ble tint over natten og tilsatt 5 kg vann før tørking i en GEA Niro P 6,3 spraytørke ved innløps/utløps-temperatur på hhv. 212 og 94-96 °C. Tørket rogn ble homogenisert, vakuumpakket i mindre porsjoner, og oppbevart i -80 °C frys inntil analyse og bruk i ekstraksjonsforsøk.

5.2.4 Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser

Innledende ekstraksjonsforsøk ble gjennomført ved romtemperatur basert på 100 % etanol tilsatt økende mengde ionebyttet og filtrert vann på hhv. 0, 10, 20, 30, 40 og 50 % (w/w). 10 g spraytørket silderogn ble tilsatt 100 g etanol/vann-fase ved romtemperatur og blandet ved bruk av en T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet (IKA Werke, Germany) i 5 minutter ved 6500 rpm. Løsemiddelfasen var tilsatt 0,8 mg per 100 g av antioksidanten TBHQ tilsvarende ca. 400 ppm på fettbasis. Blandingen ble deretter vakuum-filtrert gjennom et GF/C glassfiberfilter (Whatman International, England). Oppsamlet løsemiddelfase ble dampet inn under vakuum i en rotavapor (BÜCHI Labortechnik, Sveits) v/35 °C og 80 mbar. Ekstraktet ble deretter slemmet opp i 50 g vann og frysetørket for å fjerne rester av løsemiddel.

Tabell 1 Kodet og eksperimentelt nivå i det anvendte optimaliseringsdesignet (2-faktoriell CCD)

	Kodet nivå		Design nivå	
Forsøk #	Vann (%)	T (°C)	Vann (%)	T (°C)
1	-1,00	-1,00	5,8	25,8
2	-1,00	1,00	5,8	54,2
3	1,00	-1,00	34,2	25,8
4	1,00	1,00	34,2	54,2
5	-1,41	0,00	0	40
6	1,41	0,00	40	40
7	0,00	-1,41	20	20
8	0,00	1,41	20	60
9	0,00	0,00	20	40
10	0,00	0,00	20	40
11	0,00	0,00	20	40

Optimaliseringsforsøk ble gjennomført basert på et 2-faktorielt central composite design (CCD) med variablene vann% (0-40 % (w/w) i etanolfasen) og temperatur (20-60 °C) (Tabell 1). Mengdeforholdet mellom tørket rogn og etanolfase ble holdt konstant lik 1:10 ved bruk av 30 g spraytørket rogn og 300 g løsemiddelfase. Etanolfasen ble forvarmet til nivå gitt i design (Tabell 1) før tilsetting av spraytørket rogn

og homogenisering ved bruk av T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet i 5 minutter ved 6500 rpm. Løsemiddelfasen var tilsatt 0,8 mg per 100 g av antioksidanten TBHQ tilsvarende ca. 400 ppm på fettbasis. Etanolfasen ble fjernet ved vakuumfiltrering gjennom PALL T2600 dybdefilter, ekstraktet konsentrert på rotavapor (35 °C, 80 mbar), og deretter slemmet opp i ca. 150 g vann og frysetørket for å fjerne rester av løsemiddel.

5.2.5 Sammenligning ekstraksjon av våt og tørket silderogn

Våt eller spraytørket rogn (batch #0441, 2020), tilsvarende 30 g tørrstoff, ble tilsatt etanol eller etanol og vann slik at den endelige vannprosenten var 11,3 wt%. Våt rogn (100,7 g) ble tilsatt 555 g etanol. Spraytørket rogn (30 g) ble tilsatt en mengde etanol med 11,3 % vann slik at forholdet mellom tørrstoff og løsemiddelfase var likt (1:20,8) i begge forsøk. Blandingen ble homogenisert ved romtemperatur i 5 minutter med bruk av T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet (13 500 rpm). Etanolfasen ble fjernet ved vakuumfiltrering gjennom PALL T2600 dybdefilter. Ekstraktene ble konsentrert på rotavapor (35 °C, 80 mbar). Ca. 150 ml vann ble tilsatt og prøven frysetørket. Det er gjennomført tre eksperimentelle gjentak.

5.2.6 Reintroduksjon av lipidekstrakt i makrellolje

Lipidekstrakt og makrellolje ble blandet mekanisk ved bruk T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet i 2 x 2 minutter med bruk av hastighet 3 (13 500 rpm). Ved tilsetting i etanolfase ble tørket lipidekstrakt løst opp i ca. 30 ml etanol før tilsetting av makrellolje. Etanolfasen ble deretter fjernet under vakuum på rotavapor og siste rest ved bruk av frysetørking.

5.2.7 Analysemetoder

Analyse av sammensetning, fettsyrer og lipidklasser er gjennomført ved Nofima BioLab, Bergen. Analyse av fosfolipider basert på 31P-NMR er gjennomført hos Spectral Service AG, Köln, Tyskland. Tørrstoff ble målt gravimetrisk etter tørking av prøven i ovn ved 103 °C i 4,5 timer eller over natt dersom vanninnholdet var >15 % (ISO 6496). Aske ble bestemt gravimetrisk i henhold til ISO 5984:2002. Fett-nivå ble målt basert på kloroform-metanol (B&D) ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959). Råprotein (N x 6,25) ble målt ved bruk av Kjeldahl metode (ISO 5983-2:2009). Protein ble bestemt basert på analyse av aminosyrer ved bruk av HPLC-metode (Liu et. al, 1995). Salt (NaCl) ble bestemt basert på innhold av klorid-ioner ved bruk av Vollharts metode (Haouet 2006). Fettsyreprofil ble analysert med bruk av gass-kromatografi i henhold til AOCS-metode Ce 1b-89. C23:0 metylester ble tilsatt som internstandard. Lipidklasser ble analysert ved bruk av HPLC og Corona Plus charged aerosol detektor (Oterhals et al., 2010). Analyse av fosfolipider basert på 31P-NMR ble gjennomført i henhold til Zailer et al. (2018). Miljøgiftanalyser er gjennomført ved Forskningsgruppe for Massespektrometri, SINTEF Industri basert på GC-MS/MS (POPs) og ICP-MS/MS (tungmetaller).

5.2.8 Statistiske metoder

Resultater i fra forsøkene ble behandlet i programmene Excel og Statistica. Responsflatemodellering ble gjennomført ved å tilpasse den uavhengige variabelen basert på multippel regresjon til følgende generelle modell:

$$y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_i x_i + \beta_{ij} x_i x_j + \beta_{ii} x_i^2 + \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \qquad [1]$$

I modellen er y den estimerte responsen (dvs. utbytte ekstrakt, fosfolipider, salt, protein, farge), β_0 krysningspunktet med y-aksen, β_i, β_j, β_{ij}, β_{ii} og β_{jj} regresjonskoeffisientene for hhv. hver enkelt faktor, kvadratisk ledd og interaksjonen mellom dem, ε er residualet (error), og x_i og x_j de uavhengige variablene vann% i etanolfasen og temperatur (°C). Den beste reduserte modellen ble identifisert basert på «forward» og/eller «backward» fjerning av ikke-signifikante variable ($p > 0,05$). Kvaliteten på de tilpassede modellene ble evaluert basert på ANOVA, F-statistikk og regresjonskoeffisient (R^2).

Parvis sammenligning av responser ble gjennomført basert på Student t-test med 5 % signifikansnivå.

5.3 Oksidasjonsstabilitet av fosfolipider ekstrahert fra silderogn (Nofima rapport 14/2022).

5.3.1 Fremstilling av lipidekstrakt

Optimale betingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra umoden silderogn er tidligere studert i prosjektet og beskrevet i Nofima rapport 10/2022 (Oterhals og Thoresen, 2022). I det innledende screeningforsøket ble det anvendt ekstraksjon med 100 % etanol. I optimaliseringsforsøk basert på rosmarinekstrakt ble det anvendt de optimaliserte betingelsene for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn (etanol med 11,3 % vann).

5.3.2 Antioksidanter

Det er benyttet to kommersielle naturlige antioksidanter levert fra Danisco til de akselererte lagringsforsøkene (Figur 1): mixed naturlige tokoferol (Guardian TOCO 70 IP) og rosmarin ekstrakt (Guardian Rosmary Extract 201) (spesifikasjoner for disse er gitt i bilag).

Figur 1 Kommersielle naturlige antioksidanter benyttet i det akselererte lagringsforsøket

5.3.3 Dosering av antioksidant

Lipidekstraktet ble tilsatt to ulike konsentrasjoner av hver av antioksidantene og en blanding av begge i henhold til et faktorielt forsøksdesign gjengitt i Tabell 2. Det er tatt høyde for at rosmarinekstraktet inneholder ca. 4 % av de to aktive antioksidantene (Bilag 1-2). Rosmarinekstrakt doseringen svarer da til henholdsvis 25 og 50 ppm karnosol og karnosinsyre. Sistnevnte er maksimum tillatt nivå i henhold til Europeisk næringsmiddellovgivning.

Tabell 2 Forsøksdesign og antioksidant dosering (ppm) til lipidekstrakt.PLU = fosfolipid uten antioksidant, R = rosmarin, T = tokoferol

	Faktorielt nivå		Reelt nivå (ppm)	
Oljeprøve Id.	Rosmarin ekstrakt	Mixed tokoferol	Rosmarin ekstrakt	Mixed tokoferol
PLU	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

Lipidekstrakt (1,00 g) ble overført til 20 ml spesialglassrør for måling av flyktige komponenter og antioksidant tilsatt i form av en løsning i 1,0 ml metanol. Glassrøret ble ristet inntil det var oppnådd en homogen blanding. Metanolen ble fjernet ved bruk av en strøm av nitrogengass direkte ned i hvert rør inntil alt var fordampet. Prøvene ble deretter tørket videre under vakuum (0,2 mbar) over natt. Det ble laget 12 prøver av ekstrakt uten antioksidant og 9 prøver for hver kombinasjon av tilsatt antioksidant (Tabell 3).

I optimaliseringsforsøk ble det anvendt samme fremgangsmåte for tilsetting av antioksidant. Følgende nivå rosmarinekstrakt ble tilsatt: 0 (kontroll) - 310 – 625 – 935 – 1250 ppm.

5.3.4 Lagringsbetingelser og prøveuttak

Glassrørene ble lagret uten skrukork i mørke v/40 °C i opptil 4 uker. 3 prøveglass fra hver kombinasjon ble tatt ut etter 0, 1, 2 og 4 uker (Tabell 3), flushet med nitrogengass, og forseglet med skrukork med teflonpakning før overføring til -80 °C frys inntil analyse av flyktige komponenter i prøven (HS-GC-MS). Nullprøve uten tilsatt antioksidant (Tabell 2; PLU) ble overført direkte til frys. På grunn av tekniske problemer med det anvendte varmeskapet økte temperaturen til 50 °C en gang etter 14 dager uttaket. Når dette inntraff, er ikke registrert.

Optimalisering av nivå rosmarinekstrakt ble gjennomført ved samme betingelser. Temperatur i varmeskapet ble logget kontinuerlig og varierte med 40 ±0,5 °C.

Tabell 3 Prøveuttaksplan med antall paralleller for akselerert lagringsforsøk. Koding av prøver er gitt i Tabell 2. Tall etter kode angir lagringstid i dager.

Oljeprøve Id.	Uttak 0 0-tid	Uttak 1 1 uker	Uttak 2 2 uker	Uttak 3 4 uker	Antall glass
PLU	PLU-0	PLU-7	PLU-14	PLU-28	12
R1	-	R1-7	R1-14	R1-28	9
R2	-	R2-7	R2-14	R2-28	9
T1	-	T1-7	T1-14	T1-28	9
T2	-	T2-7	T2-14	T2-28	9
R1T1	-	R1T1-7	R1T1-14	R1T1-28	9
R1T2	-	R1T2-7	R1T2-14	R1T2-28	9
R2T1	-	R2T1-7	R2T1-14	R2T1-28	9
R2T2	-	R2T2-7	R2T2-14	R2T2-28	9
Totalt					84

5.3.5 Peroksidtall

Peroksidtall ble analysert i henhold til AOCS-metode Cd 8b – 90 med bruk av kloroform som løsemiddel.

5.3.6 Flyktige komponenter

For hvert tidspunkt for prøveuttak (Tabell 3) ble det tatt ut 3 prøver for hver av de testede kombinasjoner av antioksidanter. En av prøvene ble anvendt som backup og/eller analysert for peroksidtall (PV) og to anvendt for analyse av flyktige komponenter (reelle replikater fra lagringsstudiet). Metode for kvantifisering av flyktige komponenter basert på headspace GC-MS teknikk er tidligere beskrevet i Nofima-rapportene 40/2018 (Haugen, 2018) og 37/2019 (Haugen m.fl., 2019).

6 Prosessutvikling og produktkarakterisering

6.1 Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat

6.1.1 Industriell opparbeidelse av makrellavskjær

Formålet med undersøkelsen var å kartlegge sammensetning og fosfolipidnivået i samfengt makrellavskjær og i mellomprodukter fra en konvensjonell fiskemelprosess etter koking og separering til presskake, grakse, limvann og olje (Tabell 4). Råstoffet hadde god kvalitet med et flyktig N-nivå på 33 mg N/100 gram, og et TMAO og TMA nivå på hhv. 1 og 10 mg N/100g.

Fettnivået i makrell restråstoffet var høyt (20,9 %; Tabell 4) og dette ga et estimert oljeutbytte på 17 kg per 100 kg råstoff (Figur 2). Fettnivået i melet ble relativt høyt (19,7 %) og dette gjenspeiles også i fett på ts-basis i presskake, grakse og blanding av mellomproduktene. Det må her anmerkes at fettnivået er målt basert på kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh&Dyer-ekstraksjon) for å kvantifisere totale lipider i prøvene. Dette gir et litt høyere fettnivå enn Soxhlet-ekstraksjon (petroleumseter) som normalt anvendes for å angi fettnivå i fiskemel. Det er funnet noe avvikende nivå fett i limvann og konsentrat. Dette skyldes trolig variasjon i prosessen og prøveuttak. Nivå i limvannet var svært lavt, og konsentratet ligger nærmere det som normalt kan forventes. Sistnevnte er derfor brukt i diskusjonen nedenfor. Massebalansen (Figur 2) viser at totale lipider i råstoffet fordeler seg med 3,1 kg (15 %) i presskake/grakse, 0,6 kg (3 %) i konsentrat, og 17,0 kg (81 %) i oljen.

Formål med prosjektet er å evaluere egnethet til makrellavskjær som råstoff for ekstraksjon av fosfolipider fra graksemel etter makrelloljeproduksjon. Kvantifisering av fosfolipider i lipidekstrakt fra råstoff, mellomprodukter, mel og olje viser store variasjoner (Tabell 5) Koking og mekanisk avvanning i en fiskemelprosess fjerner primært triglyserider fra råstoffet. Fraseparert fiskeolje vil hovedsakelig bestå av triglyserider og kun inneholde lave nivå av polare lipider (fosfolipider), i dette tilfellet målt til 0,8 % (Tabell 5). Polare lipider er membranbundne og vil følge proteinfasen i prosessen. Dette har medført at nivå polare lipider på fettbasis øker betydelig fra 1,5 % i råstoffet til hhv. 3,4 %, 9,1 % og 2,2 % i mellomproduktene presskake, grakse og konsentrat (Tabell 5). Høyest nivå i graksefasen kan trolig forklares med at dette hovedsakelig består av partikulært muskelprotein som separeres fra sil/pressvæske i en dekantersentrifuge. Dette vil gi lavere nivå av separerbar fettfraksjon (triglyserider) sammenlignet med presskake og limvannkonsentrat. For å verifisere nivåene av fosfolipider i lipider ekstrahert fra presskake/grakse, er det gjennomført analyser også ved Spectral Service i Tyskland. Sistnevnte laboratorium anvender ^{31}P-NMR-metode mens Nofima BioLab bruker en HPLC metode. NMR gir et noe lavere kvantifiseringsgrense og noen ekstra lipidklasser (sphingomyelin, lyso-PE, N-acetyl-phospatidylethanolamine, andre PL; alle med meget lave nivå og ikke angitt i Tabell 5). HPLC-metoden gir på den andre siden info om andre lipider som mono-, di- og triglyserider, kolesterol og kolesterolestere. Nivå av fosfolipider i presskake/grakse-prøven er kvantifisert til 8,9 % (av ekstrahert fett) basert på ^{31}P-NMR. Sammenlignet med polare lipider i silderogn som kan være >70 % (Moriya et al., 2007), er dette lavt og bekrefter at makrellavskjær er mindre egnet for ekstraksjon av fosfolipider sammenlignet med alternativt råstoff.

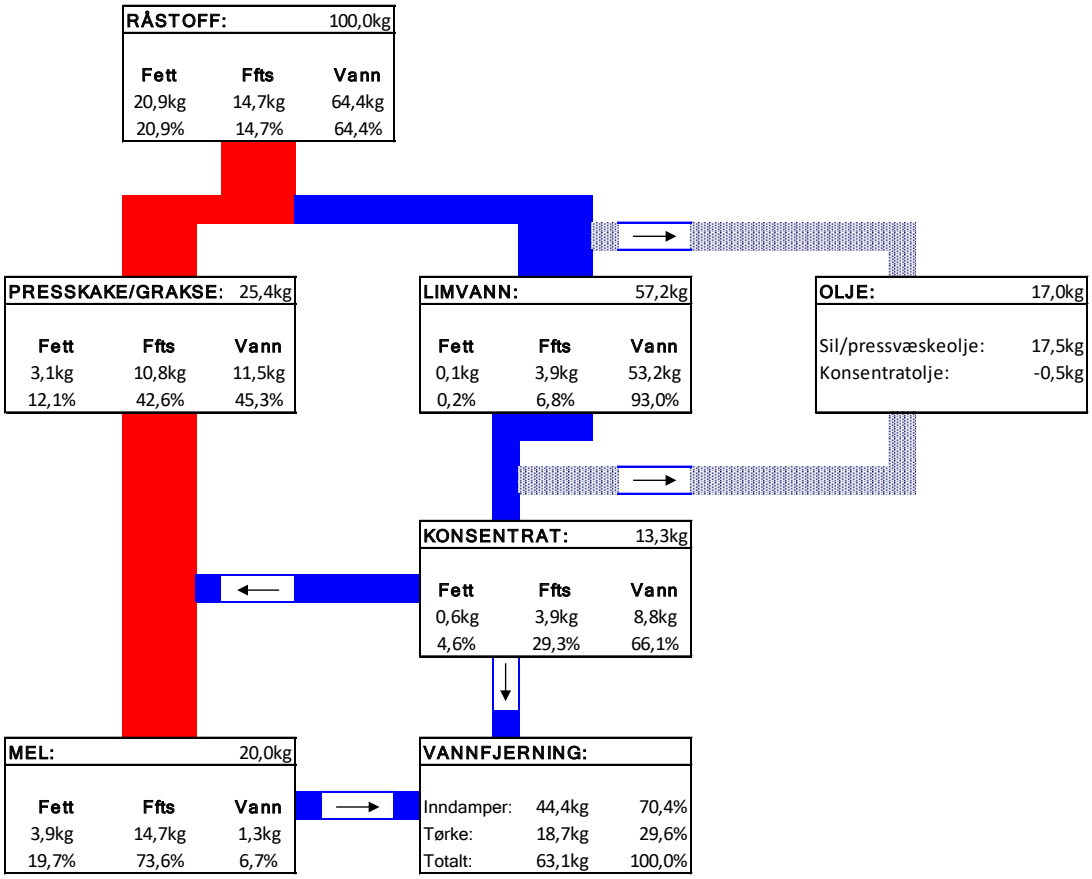
Det ble oppnådd et oljeutbytte på 17,0 kg/100 kg restråstoff, tilsvarende 81 % av totale lipider. Dette er betydelig høyere enn tidligere rapportert (4,8-6,6 %) i FHF-prosjekt 901317 «Kartlegging av oksidasjonsstatus i råolje produsert fra makrellavskjær» (Kjerstad et al., 2019) basert på makrellavskjær fra samme tidsperiode (oktober måned). Fett-nivå i råstoff og mellomprodukter er ikke angitt i denne rapporten og det er derfor vanskelig å si om dette skyldes råstoff-sammensetning og/eller dårligere fettseparasjon. Oksidasjonsnivået i makrellolje fra industriskala forsøk (Tabell 4) er høyere enn rapportert i pilotskala basert på termisk prosess (totox 8,5; Kjerstad et al., 2019). Peroksidnivået (PV) var sammenlignbart i de to forsøkene, mens anisidinverdien (AV) var betydelig høyere i det her

rapporterte industriskala forsøk. Dette er som forventet og kan forklares med en kombinasjon av råstoffkvalitet og høyere varmebelastning (tid-temperatur) og luftesponering i fabrikkskala sammenlignet med det aktuelle pilotanlegg. Totox-nivå oppnådd i industriskala er likevel sammenlignbart med det som er rapportert basert på en hydrolyseprosess i pilotskala (totox 22,5; Kjerstad et al., 2019).

Tabell 4 Sammensetning råstoff og mellomprodukter, og oksidasjonsnivå i restfett og olje under opparbeidelse av makrell restråstoff

	Råstoff	Press-kake	Grakse	Presskake /grakse	Limvann	Konsentrat	Mel	Olje
Råprotein (N*6,25) (%)	13,0	27,2	24,2	33,5	5,3	24,0	59,4	---
Vlp[1] (g/100 g protein)	44,9	8,3	16,8	19,9	98,6	76,6	28,4	---
Fett (Bl&D) (%)	20,9	12,5	5,6	12,1	0,2	4,6	19,7	---
Fett/Ts-basis (%)	58,6	24,8	17,0	22,1	2,9	13,4	21,1	---
Aske (%)	3,5	9,6	2,3	8,6	1,7	6,0	15,3	---
Vann (%)	64,4	49,8	66,9	45,3	93,0	66,1	6,7	---
Ts (%)	35,6	50,2	33,1	54,7	7,0	33,9	93,3	
PV (m.ekv./kg)	37	---	---	488	---	---	---	2,2
AV	54	---	---	309	---	---	---	19
Frie fettsyrer (%)	---	---	---	---	---	---	---	2,5

Vlp – vannløselig protein, Ts – tørrstoff, PV – peroksidtall, AV - anisidinverdi



Figur 2 Estimert masse- og komponentbalanse per 100 kg råstoff under opparbeidelse av makrell restråstoff i industriell skala

Det ble registrert kun mindre forskjeller i sum PUFA n-3 fettsyrer i lipider ekstrahert fra makrell restråstoffet og makrelloljen (Tabell 5). I mellomprodukter og mel er det imidlertid påvist en betydelig nedgang i flerumettede fettsyrer. Dette skyldes trolig oksidasjon og indikerer at restråstoff fra makrell gir svært reaktive mellomprodukter og et fiskemel som er vanskelig å stabilisere. Det ble ikke tilsatt antioksidant til råstoff, mellomprodukter eller mel, og slik tilsetting kan forventes å gi effekt på oksidasjonsnivået. Alle prøver ble frosset ned direkte etter uttak, men dette har likevel ikke vært tilstrekkelig for å unngå oksidasjon. Høyt oksidasjonsnivå er også bekreftet ved måling av peroksidtall og anisidinverdi i ekstrahert fett fra presskake/grakse (Tabell 4). For å etterprøve om dette kan skyldes oksidasjon under selve ekstraksjonen er det gjennomført en parallell ekstraksjon med tilsetting av antioksidant. Dette ga samme nivå og vi kan konkludere med at selve ekstraksjonsbetingelsene ikke kan forklare det høye nivået. Høyt oksidasjonsnivå i prøvene ble også kommentert av Spectral Service uten at vi ba spesifikt om at dette ble undersøkt. En konsekvens av denne oksidasjonen er tap av EPA og DHA og trolig intakte fosfolipider. Her er det store forskjeller mellom resultater fra BioLab (HPLC) og Spectral Service (^{31}P-NMR). Slik vi tolker forskjellene er at dannelse av peroksider og dimere/polymere i mindre grad vil påvirke kvantifisering basert på ^{31}P-NMR, men i sterk grad basert på HPLC. Førstnevnte er basert på kjemisk skift i fosfatidyl sidekjeden. Sistnevnte er basert på en partisjon av molekyler i en kolonne ved bruk av en elueringsgradient, og dannelsen av dimere og polymere forbindelser vil kunne endre på elueringsmønsteret til disse fosfolipidene og dermed kvantifiseringen.

Det er også observert store forskjeller i nivået av fosfolipider i presskake sammenlignet med graksefasen i prosessen (Tabell 5). Graksen vil i en konvensjonell fiskemelprosess utgjøre en mindre andel sammenlignet med presskaken, men resultatene indikerer at graksen er mer stabil overfor oksidasjon. Det samme bildet kan sees basert på nivået av EPA+DHA (Tabell 6). Blanding av presskake /grakse ble samlet opp fra overløp transportskrue etter tilførsel av grakse fra dekanter. Det ble ikke foretatt noen ytterligere homogenisering av denne massestrømmen og det er derfor knyttet en viss usikkerhet til hvor representativ mindre prøveuttak er for hele massestrømmen. Nivå fosfolipider i presskake/grakse basert på ^{31}P-NMR stemmer godt overens med nivå i grakse basert på HPLC. En mulig bias effekt er derfor mulighet for høyere andel grakse i presskake/grakse-prøve sendt inn til analyse hos Spectral Service. Resultatene bør derfor reproduseres før det kan trekkes en sikker konklusjon på forskjeller i nivå fosfolipider mellom grakse og presskake. Mel ble tatt ut før mølle og uten tilsetting av antioksidant. Melet virket noe tørkeskadet og dette har trolig også bidratt til reduksjon i nivå fosfolipider og EPA+DHA (Tabell 5 og Tabell 6). Lav mengde råstoff i forhold til fabrikkens normale kapasitet har her trolig bidratt til lang oppholdstid i tørken.

Uttak av presskake/grakse var tiltenkt brukt til gjennomføring av delmål 2 i prosjektet: Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser. Det observerte nivå på 8,9 g/100 g (basert på ^{31}P-NMR; Tabell 5) er et lavt utgangsnivå for etablering av en prosess for ekstraksjon av fosfolipider. Makrell gyter på vår-forsommer og fangstsesongen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gytesesong slik tilfelle er for sild. Lipidfraksjonen i rogn og melke inneholder høye nivå av fosfolipider og vil bidra betydelig til nivå i et samfengt restråstoff. Lavt nivå av fosfolipider i makrell restråstoff er derfor biologisk bestemt. Kombinert med at makrellen også har et høyt fettnivå, medfører dette at fosfolipidnivået på fettbasis blir lavt. Ved bruk av etanolekstraksjon vil triglyseridene helt eller delvis bli co-ekstrahert med de polare lipidene og gi et produkt med lavt nivå fosfolipider sammenlignet med konkurende produkter i markedet. En etterfølgende konsentrering av fosfolipider vil være nødvendig basert på et slikt utgangspunkt. Kombinert med de observerte utfordringer knyttet til oksidasjon og stabilisering av mellomprodukt og mel gjør restråstoff fra makrell mindre attraktivt som utgangspunkt for industriell ekstraksjon av marine fosfolipider.

Tabell 5 Lipidklasser (g/100 g ekstrahert fett) i restråstoff, mellomprodukter og olje fra industriell opparbeidelse av restråstoff makrell. Dersom ikke annet er angitt er prøvene analysert basert på HPLC-metode

				Presskake/grakse				
	Råstoff	Presskake	Grakse	HPLC	^{31}P-NMR	Konsentrat	Mel	Olje
Triacylglycerol (TAG)	97	62	49,5	57	---	72,5	45,5	99
Diacylglycerol (DAG)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	---	0,6	1,4	<0,5
Monoacylglycerol (MAG)	<1	<1	<1	<1	---	<1	<1	<1
Frie fettsyrer (FFA)	1,1	1,65	1,05	1,35	---	0,85	<0,5	0,75
Kolesterol	<0,5	1,7	1,95	1,5	---	0,65	2,05	<0,5
Kolesterolester	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	---	<0,5	<0,5	<0,5
Fosfatidyletanolamin (PE)	1,05	2,45	1,55	1,35	1,57	1,45	1,3	0,65
Fosfatidylinositol (PI)	<1	<1	<1	<1	0,91	<1	<1	<1
Fosfatidylserin (PS)	<1	<1	<1	<1	ND	<1	<1	<1
Fosfatidylcholin (PC)	<1	<1	6,6	2,1	5,95	<1	<1	<1
Lyso-fosfatidylcholin	0,7	0,9	1,5	1,35	0,50	0,8	<0,5	<0,5
Totale polare lipider	1,5	3,4	9,1	4,9	8,93	2,2	1,6	0,8
Totale neutrale lipider	98,6	65,7	52,5	60,5	---	74,8	49,1	100,2
Total sum lipider	100,1	69,1	61,5	65,3	---	77,0	50,7	100,9

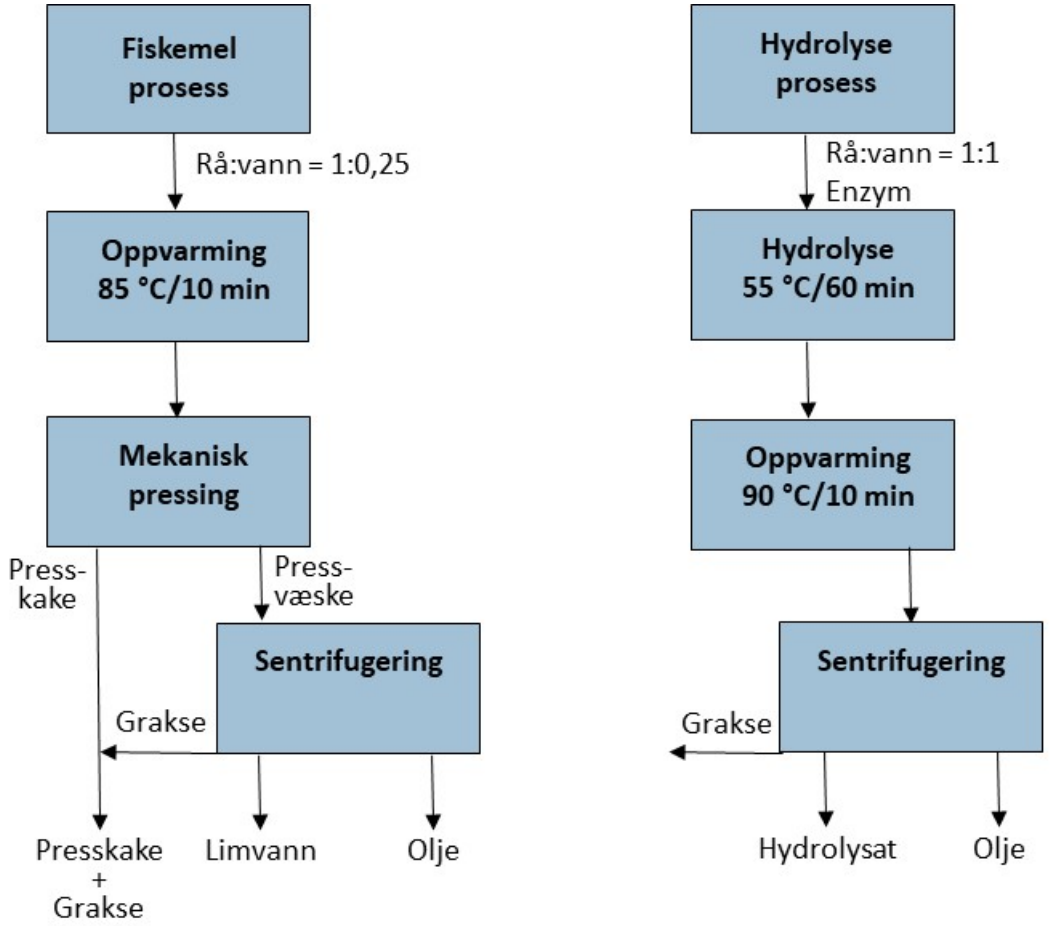
Tabell 6 Fettsyresammensetning i restråstoff, mellomprodukter og olje fra industriell opparbeidelse av restråstoff makrell

Fettsyrer (g/100 g ekstrahert fett)	Råstoff	Presskake	Grakse	Presskake/ grakse	Konsentrat	Mel	Olje
C14:0	6,4	5,3	4,2	5,6	5,3	5,2	6,3
C16:0	13,0	12,2	11,3	11,9	11,6	11,4	12,1
C16:1 n-7	3,5	3,1	2,1	3,1	2,8	2,8	3,2
C16:2 n-4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3
C16:3 n-4	0,1	0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C18:0	2,1	2,3	2,6	2,0	2,2	1,9	1,9
C18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	12,8	10,6	10,8	10,2	11,6	9,8	12,6
C18:2 n-6	1,5	1,1	1,1	1,1	1,3	1,0	1,5
C18:3 n-3	1,4	0,8	0,8	0,8	1,1	0,6	1,4
C18:3 n-6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C18:4 n-3	4,3	2,1	2,2	2,0	3,4	1,4	4,4
C20:0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:1 (n-9)+(n-7)	9,9	7,9	6,9	8,6	8,1	7,9	9,7
C20:2 n-6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C20:3 n-3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C20:3 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-3	1,1	0,6	0,7	0,6	0,9	0,4	1,1
C20:4 n-6	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,4
C20:5 n-3 (EPA)	7,6	4,0	4,7	3,9	6,3	2,5	7,3
C21:5 n-3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,5
C22:0	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	0,1	0,1
C22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	14,8	12,7	9,8	13,6	12,3	12,5	14,3
C22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:5 n-3 (DPA)	1,4	0,8	1,1	0,7	1,3	0,5	1,3
C22:6 n-3 (DHA)	11,5	5,9	9,5	5,7	10,6	3,7	11,0
C24:1 n-9	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8
Sum mettede fettsyrer	21,6	20,1	18,2	19,8	19,2	18,7	20,3
Sum monoumettede fettsyrer	42,0	35,2	30,4	36,2	35,5	33,8	40,5
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	2,5	1,8	2,0	1,8	2,1	1,6	2,5
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	27,7	14,5	19,3	14,0	24,0	9,3	27,1
Sum total-PUFA fettsyrer	30,6	16,6	21,5	16,1	26,4	11,1	30,0
omega-6/omega-3 ratio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Sum EPA + DHA	19,0	9,9	14,2	9,6	16,9	6,2	18,3
Sum identifiserte fettsyrer	94,2	71,9	70,1	72,1	81,1	63,5	90,8
Sum uidentifiserte fettsyrer	5,6	5,7	5,0	5,3	5,8	4,9	6,4

6.1.2 Laboratorieskala opparbeidelse av restråstoff sild

Fiskemelprosessen kan karakteriseres som en mekanisk-termisk separasjonsprosess for å fjerne olje og vann fra råstoffet. Mellomproduktene presskake, grakse og limvann vil ha et redusert fettnivå på ts-basis. Det er hovedsakelig triglyserider som fjernes i prosessen, dvs. kun små mengder av fosfolipider

i råstoffet ender opp i den fraseparerte oljen (Tabell 5 Young 1986). Fosfolipidene vil følge proteinfasen og en effekt av dette vil være en økning av fosfolipid-nivået på fettbasis i mellomproduktene. Separert limvann vil hovedsakelig inneholde vannløselig protein og lave nivå av partikulært bundet protein. Tilsvarende vil separert hydrolysat fra en hydrolyseprosess inneholde lave nivå av partikulært protein. Mesteparten av fosfolipidene vil derfor ende opp i presskake/dekantergrakse basert på førstnevnte prosessdesign og i dekantergraksen fra sistnevnte. For å kvantifisere denne effekten er det gjennomført forsøk i laboratorieskala basert på simulering av en konvensjonell fiskemelprosess og hydrolyseprosess (Figur 3). I fiskemelprosessen ble råstoffet tilsatt vann (1:0,25) før oppvarming til 85 °C etterfulgt av mekanisk pressing og sentrifugering. Dette vil gi en presskake og et sediment etter sentrifugering som vil representere hhv. presskake og grakse i en industriell fiskemelprosess. Hydrolyse ble gjennomført på råstoff tilsatt vann (1:1) og 1 % protease (FoodPro PNL) på råstoffbasis. Etter 60 minutter hydrolyse ble massen sentrifugert. Sedimentet vil her tilsvare graksefasen i en industriell prosess.



Figur 3 Forenklet prosessflytskjema for labskala simulering av fiskemel- og hydrolyseprosess. Rå = råstoff

Opparbeidelse av restråstoff sild viste en normal prosentfordeling (80:20) av fettfritt tørrstoff mellom presskake/grakse og limvann (Tabell 7). Buklapp-rogn-melke avvek fra dette med en litt lavere andel i limvannet (75:16). Hydrolyse av råstoffet forskjøv denne balansen mot væskefasen med 36-39 % av fettfritt tørrstoff i hydrolysatet. Fettseparasjon i laboratorieskala kan forventes å være bedre enn i industriskala grunnet høyere g-kraft og tid. Dette bekreftes av lave nivå fett på ts-basis i limvann- og hydrolysat-prøvene. Fersk sild kan gi utfordringer med høye nivå fett i presskake/grakse fasen. Dette er også tilfelle her med nivå på 13 og 17 %. Her må det legges til at den anvendte ekstraksjonsmetode for kvantifisering av lipider (kloroform-metanol ekstraksjon) gir 1-2 % høyere fettnivå i en presskake-prøve

sammenlignet med den industrielt anvendt Soxhlet-metoden (petroleumseter ekstraksjon; Oterhals og Nygård, 2008). På ts-basis tilsvarer dette 2-4 % høyere fettnivå og de her oppnådde resultater kan derfor sies å ligge innenfor det som forventes industrielt. Hydrolyse av råstoffet ga en graksefase som var betydelig lavere i ts (26-27 %), og høyere i fett på ts-basis (21-22 %). Proteinet fulgte som forventet i store trekk fett-fritt ts balansen i prosessen. Nivå vannløselig protein er lavt i presskake/grakse fra melprosess og noe høyere i grakse fra hydrolyseprosessen. Sistnevnte er primært forårsaket av et lavere ts-nivå i graksen. Opparbeidelse av buklist-rogn-melke ga emulsjonsproblemer under separasjon av limvannet. Dette har gitt seg utslag i en del tap i prosess-apparatur og en dårligere kvantifisering av massefordelingen. De oppnådde resultater for fettfritt ts og protein er tilnærmet lik som for samfengt restråstoff. Størst avvik er observert for fettbalansen. En noe større andel endte opp i limvannfasen hvilket skyldes de nevnte emulsjonsproblemer. En noe høyere andel fett er også observert i presskake/grakse fasen og dette skyldes trolig primært at en større andel av fettet er knyttet til rogn og melke i form av polare lipider og at disse strukturene ikke ødelegges gjennom koke- og presse-prosessen.

En hypotese som ønsket prøvd ut i disse forsøkene var i hvilken grad fosfolipidene fulgte den ikke-løselige proteinfasen i prosessene og om nivået ville øke i graksefasen etter hydrolyse. Nivå fosfolipider i råstoff og presskake/grakse-fase fra mel- og hydrolyseprosess (Tabell 8) viser et økt nivå av polare lipider (PL) i presskake/grakse sammenlignet med råstoffet. Dette er en effekt av at fiskemelprosessen primært fjerner de nøytrale lipidene (triglyserider). Sammenlignet med nivå i råstoffet er det her oppnådd en 3-4 dobling av nivå polare lipider i presskake/grakse med høyest nivå i graksefase fra hydrolyseprosess.

Andel restfett i limvannet er svært lavt (2-3 %) og utgjør <10 % av restfett i presskake/grakse (Tabell 7). Nivå fosfolipider i separert olje er ikke kvantifisert, men er tidligere rapportert å ligge svært lavt (5-100 ppm P; Young, 1986). Fosfolipider har både hydrofil og hydrofob karakter og vil danne emulsjoner i olje (vann i olje emulsjon) og vann (olje i vann emulsjon). Nivået av fosfolipider i en olje vil derfor avhenge av hvor effektiv separasjon av vann og protein har vært, om oljen er polert (vann-vasket) eller ikke, og om det i prosessen er blitt dannet emulsjonsfase som er vanskelig å separere. Eksempel på sistnevnte problem ble observert ved prosessering av buklist-rogn-melke-råstoffet. Her ble det dannet en emulsjonsfase som det ikke var mulig å separere ved sentrifugering. Emulsjonsfasen (25 g) inneholdt 30,5 % ts hvorav 23,7 % var lipider, 6,3 % protein og 1,0% aske. Lipidfasen viste nivå av polare lipider (Tabell 8) tilsvarende som i råstoffet og sammenlignbart med graksefase fra hydrolyseprosess.

Rogn og melke er kjent for å ha høye nivå av fosfolipider. I fileteringsprosessen blir rogn og melke tatt ut sammen med buklist og videre prosessert for separasjon av rogn som anvendes direkte til konsum eller ekstraksjon av fosfolipider. En direkte anvendelse av restråstoff-fraksjonen buklist-rogn-melke til ekstraksjon av fosfolipider kan være et interessant alternativt råstoff for ekstraksjon av fosfolipider idet man unngår et ekstra trinn for separasjon av rogn og forenkler prosessen. Nivå polare lipider i ekstrahert fett fra dette råstoffet var 19,6 % og dette ble økt med en faktor på 2,4 i presskake/grakse-fasen til 47 % (Tabell 8). Sammenlignet med det resterende samfengte restråstoffet (hode, rygg, hale, slo) vil dette være det klart beste utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider. Nivå polare lipider i fett ekstrahert fra silderogn er tidligere rapportert til 73,6 % (Moriya et al., 2007).

Tabell 7 Sammensetning og massefordeling under opparbeidelse av silderåstoff basert på fiskemel- og hydrolyseprosess (jfr. Figur 3).

	NVG-sild restråstoff		Nordsjøsild restråstoff		NVG-sild buklapp-rogn-melke
Vekt/sammensetning	Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess	Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess	Fiskemel prosess
Råstoff (g)	1000	1000	1000	1000	1000
Tørrstoff (%)	26,5	26,5	27,1	27,1	31,0
Fett (%)	8,5	8,5	9,6	9,6	9,7
Protein (%)	14,9	14,9	14,5	14,5	21,8
Aske (%)	3,9	3,9	4	4	1,8
Limvann (g)	725	1358	727	1319	300
Tørrstoff (%)	5,0	5,2	5,3	4,8	11,1
Fett (%; ts-basis)	4,0	3,8	3,8	4,2	18,2
Protein (%; ts-basis)	80	87	74	85	70
Vannløselig protein (%; ts-basis)	82	88	77	88	32
Aske (%; ts-basis)	22	12	25	13	10
Presskake (g)	285	na	190	na	164
Grakse (g)	118	537	183	512	468
Presskake+grakse (g)	403	537	373	512	632
Tørrstoff (%)	42,1	26,7	45,1	25,5	31,8
Fett (%; ts-basis)	13	21	17	22	21
Protein (%; ts-basis)	71	60	66	60	81
Vannløselig protein (%; ts-basis)	7,1	13,5	5,5	13,3	7,5
Aske (%; ts-basis)	17	20	17	20	7
Olje (g)	63,0	54,7	67,0	63,5	25,0
Fettbalanse (%)					
Limvann	2	3	2	3	6
Pressskake+Grakse	26	36	29	29	43
Olje	74	64	70	66	32
Sum	102	104	100	98	81
Fettfritt ts-balanse (%)					
Limvann	20	39	22	36	16
Pressskake+Grakse	82	63	80	59	75
Sum	102	102	102	95	90
Protein-balanse (%)					
Limvann	19	41	20	37	11
Pressskake+Grakse	81	58	76	54	75
Sum	100	99	96	91	86

Tabell 8 Lipidklasser i totalfett ekstrahert fra råstoff og mellomprodukter basert på restråstoff fra NVG- og Nordsjøsild

	NVG sild - restråstoff			Nordsjøsild - restråstoff			NVG sild - buklapp-rogn-melke		
Lipidklasser		Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess		Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess		Fiskemel prosess	
g/100 g ekstrahert fett	Råstoff	Pk/Gr	Gr	Råstoff	Pk/Gr	Gr	Råstoff	Pk/Gr	Emulsjon
Triacylglycerol	86,0	38,0	66,0	90,0	38,0	60,0	59,0	32	50,0
Diacylglycerol	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Monoacylglycerol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Frie fettsyrer	1,3	0,5	0,6	5,3	2,0	2,2	2,1	2	0,6
Kolesterol	1,0	2,1	1,6	1,0	2,0	2,6	3,6	6,2	3,9
Kolesterolester	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Phosphatidyletanolamin	<0,5	0,7	2,3	0,7	1,0	2,7	0,6	11	5,4
Phosphatidylinositol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Phosphatidylserin	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Phosphatidylcholin	4,2	13,0	19,0	4,1	13,0	15,0	19,0	37	19,0
Lyso-Phosphatidylcholin	1,1	0,5	0,8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Total polare lipider	5,3	14,2	22,1	4,8	14,0	17,7	19,6	47	24,4
Total neutrale lipider	88,36	40,6	68,2	96,3	42,0	64,8	64,7	40,2	54,5
Total sum lipider	93,6	54,8	90,3	101,1	56	82,5	84,3	87,2	78,9

Nivå n-3 PUFA i råstoff og presskake/grakse viser et annet bilde enn nivå polare lipider (Tabell 9). Her er det observert en liten reduksjon i restfett presskake/grakse-fase fra melprosess, og en tilsvarende økning på 2-4 % i graksefase fra hydrolyseprosess. Den underliggende årsaken til dette er ikke kjent, men stemmer overens med det noe lavere nivået av polare lipider som ble observert i presskake/grakse fra industriell prosessering av restråstoff makrell (jfr. pkt. 6.1.1).

Tabell 9 Fettsyresammensetning i totalfett ekstrahert fra råstoff og mellomprodukter basert på restråstoff fra NVG- og Nordsjøsild

	NVG sild - restråstoff			Nordsjøsild - restråstoff			NVG sild - buklapp-rogn-melke		
Fettsyrer		Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess		Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess		Fiskemel prosess	
g/100 g ekstrahert fett	Råstoff	Pk/Gr	Gr	Råstoff	Pk/Gr	Gr	Råstoff	Pk/Gr	Emulsjon
14:0	6,5	5,3	5,9	6,1	5,3	5,3	5,7	3,4	5,2
16:0	9,9	10,5	10,8	11,2	11,0	11,1	11,6	11	10,1
16:1 n-7	3,0	2,7	2,8	3,3	2,9	2,8	3,0	2,1	2,8
16:2 n-4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2
16:3 n-4	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
18:0	1,0	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,0	1,0	0,9
18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	9,9	9,8	9,9	8,7	7,8	7,5	11,1	9,2	9,8
18:2 n-6	0,8	0,7	0,8	1,1	0,9	0,9	0,9	0,7	0,8
18:3 n-3	0,5	0,4	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5
18:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1
18:4 n-3	1,2	0,6	1,1	2,0	1,2	1,5	1,1	0,9	1,2
20:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	<0,1	0,1
20:1 (n-9)+(n-7)	14,0	11,3	12,3	9,7	8,3	7,7	11,7	5,8	10,7
20:2 n-6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3 n-3	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20:3 n-6	0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20:4 n-3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4
20:4 n-6	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2
20:5 n-3 (EPA)	3,3	2,5	4,3	5,2	3,8	5,2	4,4	6,2	4,7
21:5 n-3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
22:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	23,4	17,6	19,8	18,7	15,6	15,3	17,1	8,0	15,9
22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
22:5 n-3	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	1,0	0,7
22:6 n-3 (DHA)	4,1	3,4	7,2	7,3	6,4	9,6	7,1	13,4	7,6
24:1 n-9	0,9	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,7	0,4	0,6
Sum mettede	17,7	17,3	18,2	18,9	18,0	18,2	18,4	15,4	16,3
Sum monoumettede	51,2	42,4	45,8	41,2	35,6	34,3	43,6	25,5	39,8
Sum PUFA (n-6)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4	1,6	1,3	1,1	1,2
Sum PUFA (n-3)	10	7,6	14,1	16,6	12,9	18,4	14,4	22,4	15,2
Sum total-PUFA	11,5	8,8	15,6	19,1	14,8	20,5	15,9	23,7	16,7
omega-6/3 ratio	0,12	0,14	0,09	0,1	0,11	0,09	0,09	0,05	0,08
Sum EPA + DHA	7,4	5,9	11,5	12,5	10,2	14,8	11,5	19,6	12,3
Identifiserte fettsyrer	80,4	68,5	79,6	79,2	68,4	73	77,9	64,6	72,8
Ikke-identifiserte	4,7	4,3	5,0	4,4	4,4	4,3	4,6	3,7	4,6

6.2 Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider i silderogn

6.2.1 Sammensetning silderogn

Sammensetning på umoden silderogn fra 2020 og 2021 viser små variasjoner (Tabell 10). Viktigste forskjell er innhold av vann som påvirker de andre komponentene i negativ retning med unntak av salt som øker litt. På tørrstoffbasis blir disse forskjellene minimale.

Tabell 10 Sammensetning av umoden rogn fra 2020 og 2021 før og etter tørking

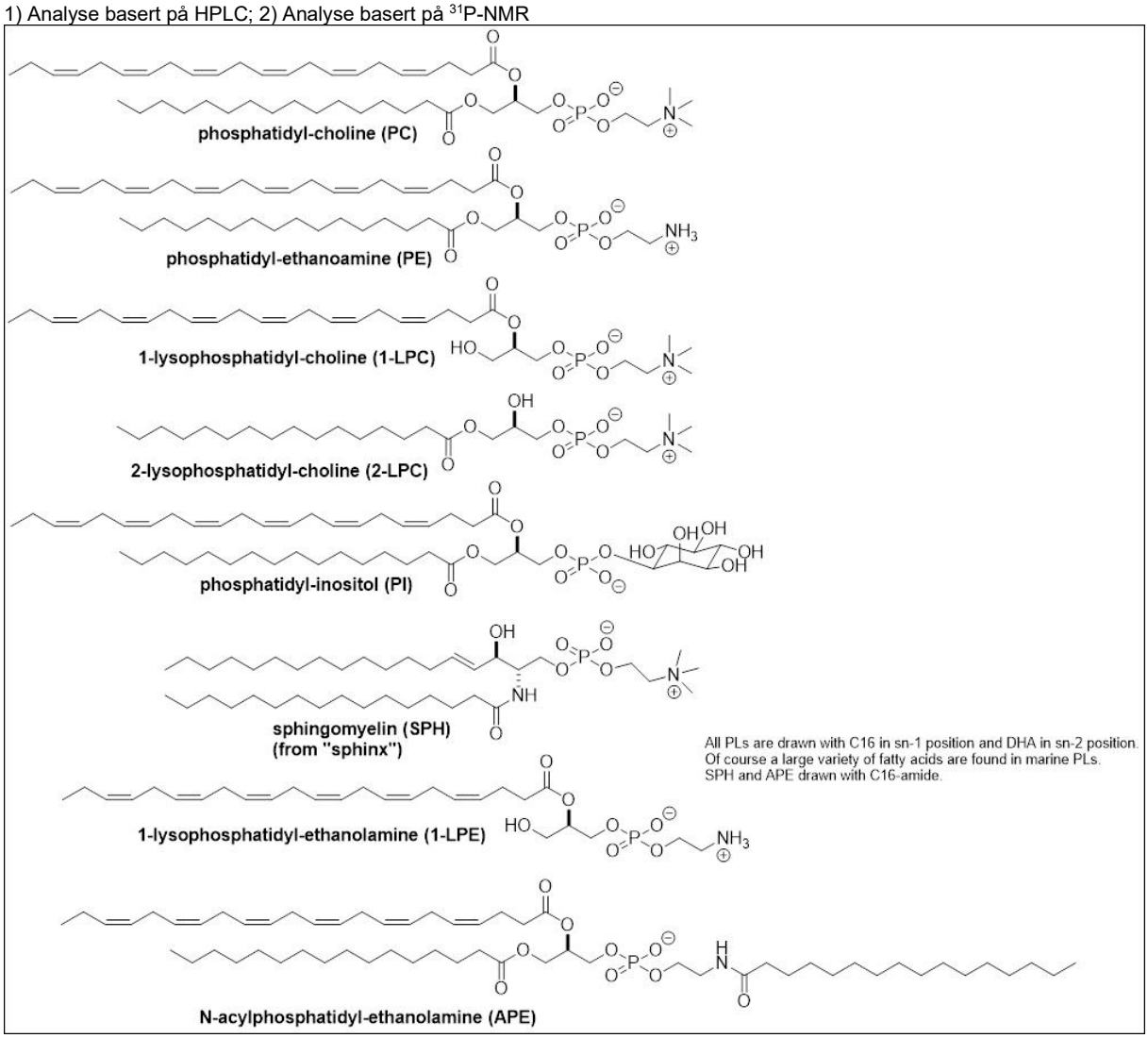
Vekt%	Rogn batch #0441 2020	Rogn batch #1157 2021	Spraytørket rogn batch #0441*	Frysetørket rogn batch #0441*	Frysetørket rogn batch #1157*
Vann	70,2	72,5	3,5	1,0	2,1
Aske	2,2	2,2	7,1	7,3	7,8
NaCl	1,9	2,1	6,2	6,3	7,5
Fett (B&D ekstrakt)	5,4	5,1	17,5	17,9	18,2
Protein (Nx6,25)	21,5	19,5	69,6	71,4	69,4
Protein (sum aminosyrer)	22,0	20,9	71,2	73,0	74,2

*) Sammensetning beregnet basert på tørrstoff nivå relativt til våt rogn.

Tabell 11 Lipidklasser (HPLC) og fosfolipider (^{31}P-NMR) i våt og tørket rogn. Navn og kjemisk struktur for de respektive fosfolipider er gitt i Figur 4.

Lipidklasse	g/100 g B&D-ekstrahert lipid			g/100 g prøve	
	Rogn batch #0441[1)]	Rogn batch #1157[1)]	Spraytørket rogn batch #0441[2)]	Frysetørket batch #0441[2)]	Frysetørket batch #1157[2)]
TAG	21	20	---	---	---
DAG	<0.5	<0.5	---	---	---
MAG	<1	<1	---	---	---
FFA	0,7	0,8	---	---	---
Kolesterol	6,3	6,1	---	---	---
Kolesterol estere	<0.5	<0.5	---	---	---
PE	10	9,2	7,76	0,92	0,98
LPE	---	---	0,11	0,03	0,01
APE	---	---	0,37	n.d.	n.d.
PI	<1	<1	0,66	0,18	0,20
PS	<1	<1	n.d.	n.d.	n.d.
PC	58	57	60,8	7,44	8,59
LPC	1,5	0,9	---	---	---
1-LPC	---	---	0,17	0,03	0,03
2-LPC	---	---	0,70	0,18	0,11
SPH	---	---	1,56	0,24	0,33
Andre PL	---	---	0,4	0,06	0,11
Polare lipider	69,5	67,1	9,08	9,07	10,36
Nøytrale lipider	28,0	26,9	---	---	---
Sum lipider	97,5	94,0	---	---	---

1) Analyse basert på HPLC; 2) Analyse basert på ^{31}P-NMR



Figur 4 Navn og kjemisk struktur for de respektive fosfolipider

Rognen ble spraytørket før ekstraksjonsforsøk. Dette ga et fint, lyst gult pulver med relativt gode flytegenskaper og et vanninnhold på 3,5 %. Smak og lukt var nøytral uten antydning til oksidasjon etter spraytørking. Pulveret ble straks etter tørking vakuumpakket i mindre porsjoner og oppbevart på -80 °C frys inntil bruk.

Lipidklasser og fosfolipider er kvantifisert ved bruk av HPLC og ^{31}P-NMR (Tabell 11). Det er funnet små forskjeller mellom de to metodene, men ^{31}P-NMR ansees å være den mest presise for kvantifisering av fosfolipider og er anvendt for å måle utbytte etter ekstraksjon i dette studiet. En fordel med HPLC basert metode er at den også gir informasjon om andre lipidklasser. Det er kun små forskjeller mellom nivå lipidklasser (Tabell 11) og fettsyrer (Tabell 12) for batchene fra 2020 og 2021 og datagrunnlaget gir ikke tilstrekkelig informasjon til å si noe om eventuelle variasjoner.

Tabell 12 Nivå fettsyrer (g/100 g) i B&D-ekstrakt fra umoden silderogn

Fettsyre	Rogn batch #0441	Rogn batch #1157
C14:0	2,9	2,5
C16:0	12,9	14
C18:0	0,9	1,1
C20:0	<0.1	<0.1
C22:0	<0.1	<0.1
C16:1 n-7	2,6	2,6
C18:1	10,3	11,1
C20:1	1,9	1,4
C22:1	0,7	0,6
C24:1 n-9	0,3	0,3
C16:2 n-4	0,1	0,1
C16:3 n-4	0,1	0,2
C18:2 n-6	0,8	0,8
C18:3 n-6	<0.1	<0.1
C20:2 n-6	0,1	0,1
C20:3 n-6	<0.1	0,1
C20:4 n-6	0,3	0,3
C22:4 n-6	<0.1	<0.1
C18:3 n-3	0,7	0,7
C18:4 n-3	0,9	0,7
C20:3 n-3	<0.1	<0.1
C20:4 n-3	0,5	0,5
C20:5 n-3 (EPA)	8,4	7,8
C21:5 n-3	0,1	0,1
C22:5 n-3	0,8	0,8
C22:6 n-3 (DHA)	20,4	20,9
Sum mettede	16,7	17,6
Sum monoene	15,8	16
PUFA n-6	1,3	1,3
PUFA n-3	31,7	31,5
PUFA totalt	33,3	33,1
Sum EPA+DHA	28,8	28,7
Identifiserte	70,4	70,8
Uidentifiserte	4,7	4,1

6.2.2 Innledende screeningforsøk

For å kartlegge effekt av et bredt område vann% i etanolfasen ble det innledningsvis gjennomført en forsøksserie med 0-50 % vann. Resultatene bekreftet at man kan anvende høyt vanninnhold i etanolfasen uten at dette reduserte utbytte av ekstrakt og fosfolipider (Tabell 13 og Figur 5). Først ved vann% i etanolfasen >30 % ble det observert en betydelig reduksjon i utbytte. Økt tilsetting av vann medfører at løsemiddelfasen får høyere polaritet. En negativ effekt av dette er at det co-ekstraheres andre vannløselige komponenter som frie aminosyrer, protein, salt etc. Det er her observert en eksponentiell sammenheng mellom vann% i etanolfasen og nivå protein i ekstraktet (Tabell 13 og Figur 5).

Det ble i forsøkene ikke anvendt vasking av filterkaken etter filtreringstrinnet. Filterkaken vil inneholde en del løsemiddel og det ble observert en økt svelling av rognen ved høyere vann% i etanolfasen (Tabell 13). Ved å anta at denne løsemiddelresten inneholder det samme nivå av fosfolipider som målt i den filtrerte etanolfasen, kan det beregnes et teoretisk korrigert utbytte dersom dette kvantitativt hentes

ut ved vask av filterkaken. Det er estimert et potensielt økt utbytte på mellom 11-22 % ved bruk av en slik metodikk og et korrigert utbytte av fosfolipider med nivåer tilnærmet det som er oppnådd basert på referansemetoden kloroform-metanol ekstraksjon (Tabell 13).

Innhold av de individuelle fosfolipidene (Tabell 14) viser at PC er den dominerende komponenten. Inklusiv lyso-variantene 1-LPC og 2-LPC er det funnet nivåer opptil 53 % av ekstraktet. Sekundært er det PE som dominerer og med mindre mengder PI og SPH. Kjemisk struktur og fullt navn på de respektive fosfolipidene er gitt i Figur 4.

Tabell 13 Utbytte av lipidekstrakt og fosfolipider (PL) sammenlignet med referansemetoden kloroform-metanol ekstraksjon (B&D), korrigert utbytte basert på restmengde løsemiddel i våt filterkake, og proteinnivå i frysetørket ekstrakt.

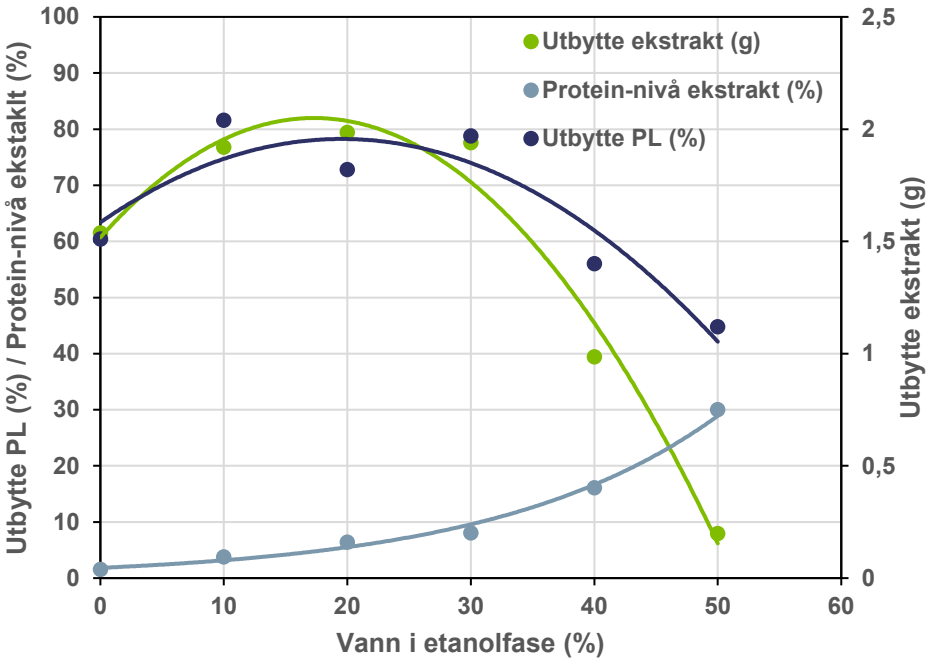
Vann etanolfase (%)	Utbytte ekstrakt (g)	Utbytte PL (g)	PL nivå ekstrakt (%)	Utbytte PL (%)	Våt filterkake (g)	Korr. utbytte PL (%)	Proteinnivå Ekstrakt (%)
B&D	2,03	1,47	72,6	100[1]	---	---	---
0	1,51	0,91	60,0	61,5	18,6	68,4	1,6
10	2,04	1,13	55,4	76,8	22,9	90,2	3,8
20	1,82	1,17	64,3	79,4	27,3	98,1	6,4
30	1,97	1,14	58,0	77,6	26,3	94,9	8,1
40	1,4	0,58	41,5	39,4	27,9	48,9	16,1
50	1,12	0,12	10,4	7,9	26,4	9,6	30,0

1) Kvantitativ lipidekstraksjon, dvs. utbytte satt til 100%.

Tabell 14 Nivå (%) individuelle fosfolipider i ekstrakt etter etanol-vann ekstraksjon av frysetørket silderogn. Kloroform-metanol ekstraksjon (B&D) er tatt med som kvantitativ referansemetode. Kjemisk struktur og fullt navn på de respektive fosfolipider er gitt i Figur 4.

Vann etanolfase (%)	PC	1-LPC	2-LPC	PI	SPH	PE	LPE	APE	Andre PL	Sum PL
B&D	60,8	0,17	0,7	0,66	1,56	7,76	0,11	0,37	0,39	72,6
0	51,8	0,19	0,76	0,42	1,42	4,77	0,12	0,23	0,27	60,0
10	45,3	0,16	0,68	1,39	1,41	5,49	0,14	0,29	0,59	55,4
20	52,1	0,28	0,81	1,74	1,6	6,43	0,17	0,41	0,72	64,3
30	47,9	0,22	0,73	1,5	1,3	5,47	0,17	0,12	0,58	58,0
40	35,9	0,21	0,88	0,63	0,65	2,71	0,18	n.d	0,31	41,5
50	8,5	0,21	0,68	0,15	0,18	0,53	0,12	n.d.	n.d.	10,4

n.d. – ikke detektert



Figur 5 Utbytte ekstrakt, utbytte fosfolipider (PL) relativt til B&D-ekstraksjon, og proteinnivå i ekstrakt etter etanol-vann ekstraksjon av frysetørket silderogn

6.2.3 Optimaliseringsdesign

Basert på resultater fra innledende screeningforsøk ble det gjennomført et 2-faktorielt «central composite» (CCD) optimaliseringsdesign med vann etanolfase i området 0-40 % og temperatur i området 20-60 °C (Tabell 15). Vann-nivå etanolfase ble basert på høyt utbytte opp til 30 % vann. Høyeste temperatur-nivå ble bestemt ut ifra en praktisk vurdering relativt til kokepunkt for etanol (78 °C). De innledende forsøkene viste at temperaturen steg noe under Ultra-Turrax homogeniseringen. I praksis må en akseptere noen grader økning på grunn av mekanisk energioverføring. For å kompensere for dette ble start-temperatur satt litt under design-temperatur og oppnådd snitt-temperatur (Tabell 15) anvendt i modellering av responsflater.

Tabell 15 Forsøksdesign (2-faktoriell CCD) med eksperimentelle forsøksbetingelser for vann i etanolfasen (%) og temperatur (T, °C)

Forsøk	Design faktor		Design nivå		Eksperimentelt nivå	
#	Vann	T	Vann	T	Vann	T1)
1	-1,0	-1,0	5,8	25,8	5,8	25,6
2	-1,0	1,0	5,8	54,2	5,8	54,6
3	1,0	-1,0	34,2	25,8	34,2	26,6
4	1,0	1,0	34,2	54,2	34,2	54,6
5	-1,41	0	0	40	0	39,7
6	1,41	0	40	40	40	40,2
7	0	-1,41	20	20	20	22,4
8	0	1,41	20	60	20	59
9	0	0	20	40	20	39,9
10	0	0	20	40	20	38,9
11	0	0	20	40	20	41,0

1) Snitt temperatur for gjennomføring av Ultra-Turrax homogenisering.

6.2.4 Responsflatemodellering

Responsflatemodellering basert på resultater gitt i Tabell 16 avdekket at temperatur ikke hadde noen signifikant innflytelse på utbytte ekstrakt og fosfolipider. Best kurvetilpasning ble oppnådd basert på «forward inclusion» av variable og dette ga en 2. ordens modell med kun vann% etanolfase som signifikant variabel (Tabell 18). Høyest utbytte av totale fosfolipider er oppnådd ved en vann% i etanolfasen på 11,3 %. Ved å øke signifikansnivået til $p<0,10$ ble temperatur inkludert i modellen, men med positiv effekt kun på høyt nivå av vann i etanolfasen (figur ikke inkludert). Denne modellen ga kun marginalt bedre tilpasning til utbytterespons sammenlignet med modell basert kun på vann% etanolfase; hhv. R^2 = 0,90 og 0,89. Kurvetilpasning anvendt i figurer er basert på sistnevnte modellering.

Senterpunktet i designet er reprodusert eksperimentelt tre ganger og viser god reproduserbarhet på forsøkene med CV i området 1,4-5,0 %.

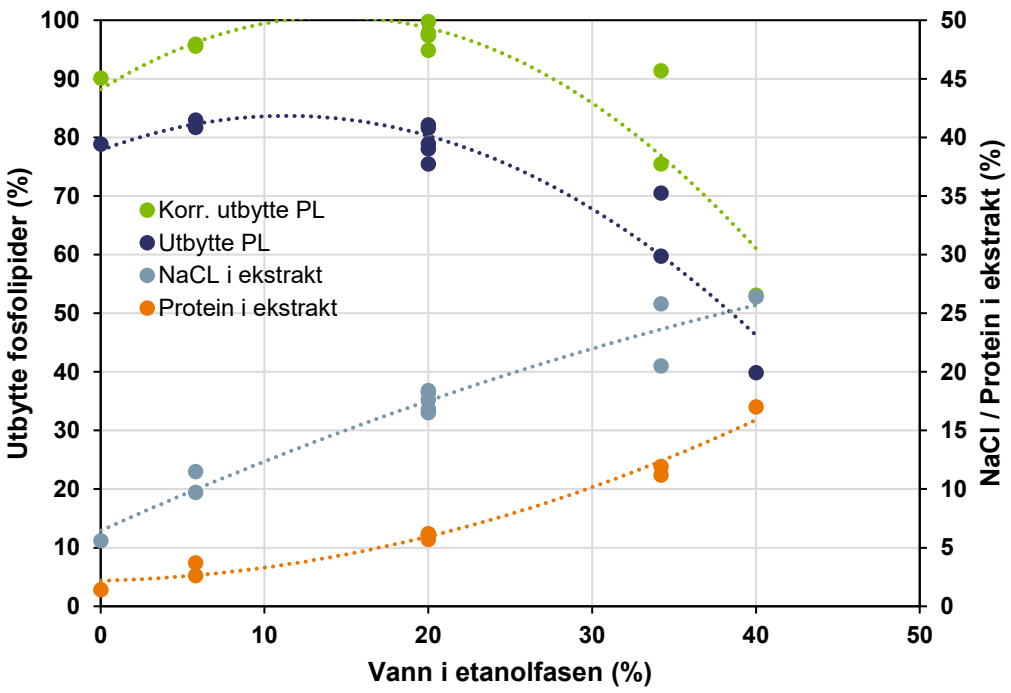
Økt temperatur kan teoretisk tenkes å ha gunstig effekt på ekstraksjonen ved at det senker viskositeten og øker løselighet av lipider i etanolfasen. For høye temperaturnivå vil imidlertid også kunne medføre denaturering av proteiner og dermed muligens mindre tilgjengelighet for ekstraksjon av fosfolipider. Basert på resultater oppnådd i dette forsøket kan det konkluderes med at temperatur ikke har noen signifikant effekt på ekstraksjon av fosfolipider innenfor optimalt området for vann% i etanolfasen (Tabell 18). Dette vil også være fordelaktig prosessteknisk idet man slipper å varme opp etanolfasen under ekstraksjonsprosessen.

De anvendte ekstraksjonsbetingelser (Tabell 15) har gitt et utbytte av ekstrakt i området 4,2 - 6,0 g/30 g spraytørket silderogn (Tabell 16 og Figur 7) eller 140 – 200 g/kg. Høyest utbytte av lipidekstrakt er oppnådd ved en vann% på 13,9 %. Nivå fosfolipider varierte fra 42,2 – 65,1 %, i god overensstemmelse med observasjoner fra de innledende forsøkene (Tabell 13). De frysetørkede ekstraktene absorberte noe vann ved eksponering mot luft og innhold av flyktige komponenter (primært vann) ble målt gravimetrisk til 1,0 – 2,5 % basert på tørking i 4,5 timer ved 103 °C (Tabell 16).

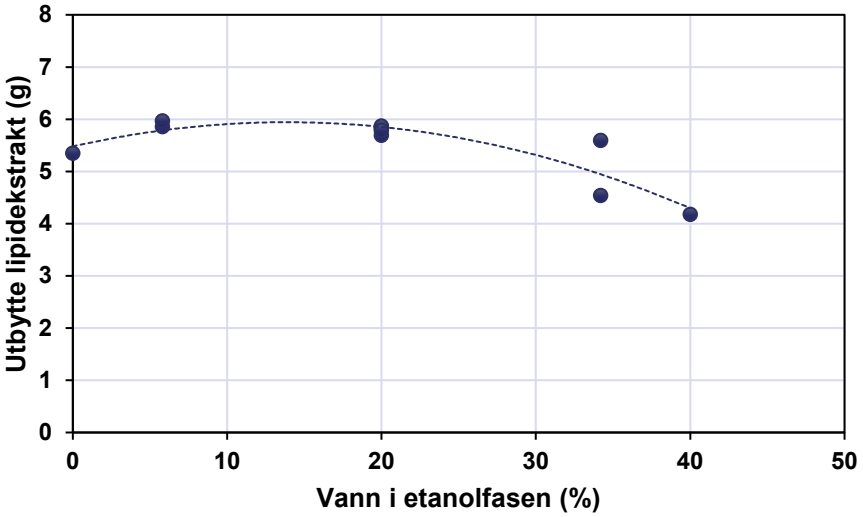
Co-ekstraksjon av protein ble funnet å øke eksponentielt med økende vann% i etanolfasen; i samsvar med funn fra det innledende forsøket (Tabell 13 og Figur 5). Til sammenligning viste co-ekstraksjon av salt en lineær sammenheng. Dersom co-ekstraksjon av slike komponenter ønskes å holdes på et minimum, må det anvendes lavest mulig vann% i etanolfasen under ekstraksjonen. I forsøk #5 (ekstraksjon med ren alkohol) er det funnet et saltnivå på 5,6 % og et proteinnivå på 1,4 % (Tabell 16).

Tabell 16 Nivå fosfolipider, tørrstoff, salt og protein i frysetørkede ekstrakter. Utbytte PL i gram er basert på 30 g frysetørket silderogn og i prosent relativt til kloroform-etanolekstraksjon.

Forsøk #	Utbytte ekstrakt (g)	PL-nivå ekstrakt (%)	Tørrstoff (%)	NaCl (%)	Protein (%)	Utbytte PL (g)	Utbytte PL (%)
1	5,9	62,6	97,5	9,7	2,6	3,7	82,9
2	6,0	60,5	97,8	11,5	3,7	3,6	81,7
3	4,5	58,2	98,1	25,8	11,9	2,6	59,8
4	5,6	55,7	97,5	20,5	11,2	3,1	70,5
5	5,4	65,1	99,0	5,6	1,4	3,5	78,9
6	4,2	42,2	97,7	26,4	17,0	1,8	39,9
7	5,8	61,9	98,0	18,4	6,1	3,6	81,6
8	5,8	57,0	97,8	16,8	6,1	3,3	75,5
9	5,9	61,9	97,9	16,5	5,7	3,6	82,1
10	5,7	60,6	98,1	18,2	6,0	3,4	78,0
11	5,8	60,3	97,8	17,6	6,2	3,5	78,9



Figur 6 Oppnådd utbytte av fosfolipider basert på etanolekstraksjon og etter korreksjon basert på restmengde etanolfase i filterkake. Referanse er kvantitativ analytisk ekstraksjon med kloroform-metanol.



Figur 7 Oppnådd utbytte av lipidekstrakt basert på ekstraksjon av 30 g spraytørket silderogn

6.2.5 Utbytte individuelle fosfolipider

Utbytte av individuelle fosfolipider relativt til kloroform-metanol (BI&D) ekstraksjon varierte betydelig (Tabell 17 og Figur 8) og dette ga forskjellig 2. ordens modell-tilpasning (Tabell 18). For de fleste modeller er det funnet en meget god tilpasning til datapunktene med R^2 >0,78. Felles for de modellene som har lavere R^2 (0,63 – 0,74) er et lavt kvantitativt utbytte, dvs. at analyseusikkerhet vil gi større bidrag til reproduserbarhet og spredning av datapunkter. Høyest utbytte av hovedkomponenten PC oppnås ved bruk av 9,7 % vann i etanolfasen, mens lysofosfolipidene 1-LPC og 2-LPC krever høyere vann% (Tabell 18). Det samme mønsteret er funnet for PE og LPE og kan indikere en korrelasjon mellom polaritet for de respektive fosfolipider og optimalt vann% i etanolfasen.

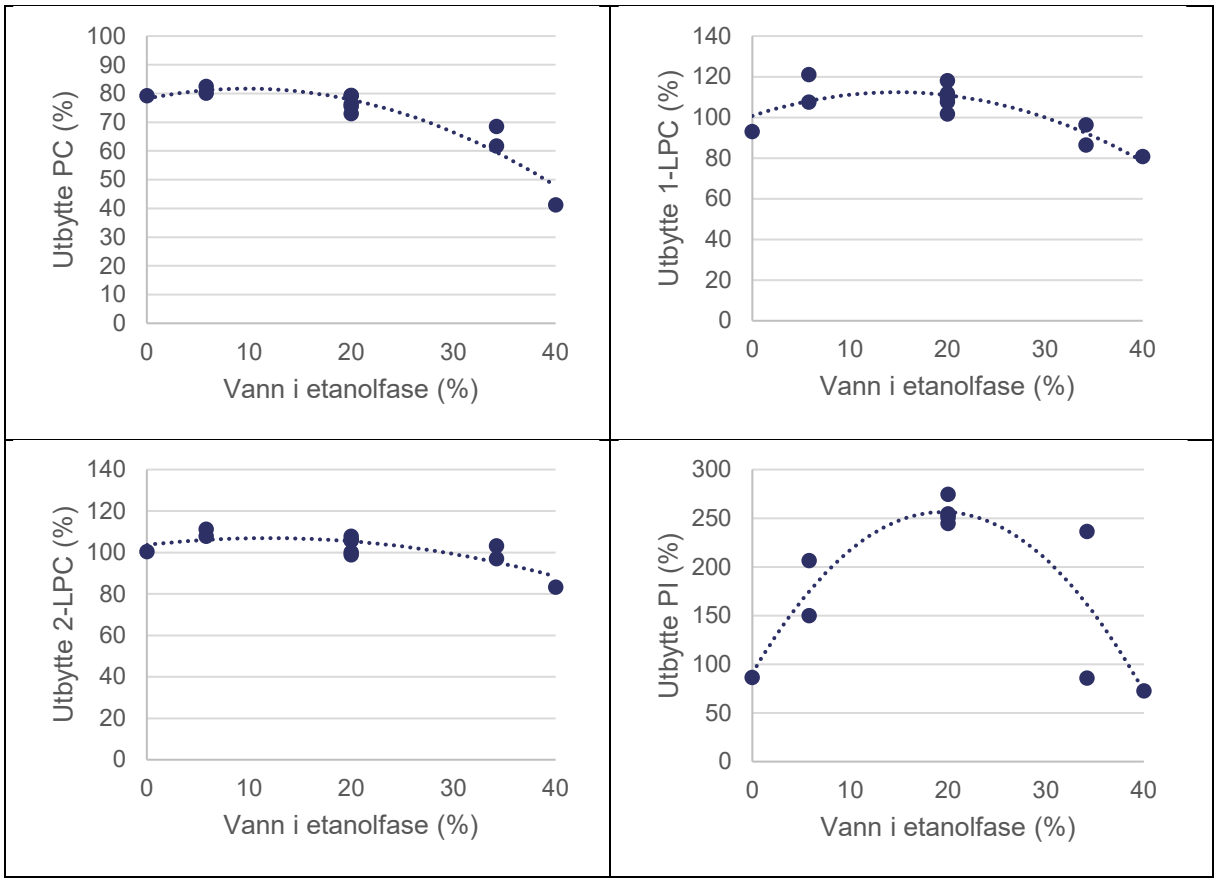
Tabell 17 Utbytte (% av totalt ekstrakt, Tabell 16) av individuelle fosfolipider. Forkortelser er angitt i Figur 4. B&D = referansemetode basert på kloroform-metanol ekstraksjon.

Forsøk #	PC	1-LPC	2-LPC	PI	SPH	PE	LPE	APE	Andre PL	Sum PL
B&D	60,8	0,17	0,7	0,66	1,56	7,76	0,11	0,37	0,39	72,6
1	52,1	0,19	0,81	1,03	1,96	5,84	0,11	0,26	0,25	62,6
2	49,7	0,21	0,77	1,39	1,72	5,77	0,12	0,36	0,42	60,5
3	50,4	0,22	0,97	0,76	1,19	4,08	0,16	0,00	0,46	58,2
4	45,4	0,16	0,74	1,70	1,41	5,36	0,11	0,22	0,62	55,7
5	54,9	0,18	0,80	0,65	1,88	6,03	0,11	0,30	0,31	65,1
6	36,5	0,20	0,85	0,70	0,80	2,78	0,13	0,00	0,23	42,2
7	50,4	0,21	0,79	1,69	1,55	6,16	0,19	0,32	0,63	61,9
8	46,3	0,18	0,73	1,75	1,49	5,52	0,14	0,36	0,59	57,0
9	50,1	0,19	0,77	1,88	1,68	6,00	0,16	0,43	0,65	61,9
10	49,2	0,20	0,74	1,77	1,58	5,97	0,14	0,37	0,61	60,6
11	48,9	0,20	0,80	1,80	1,60	5,90	0,10	0,40	0,60	60,3

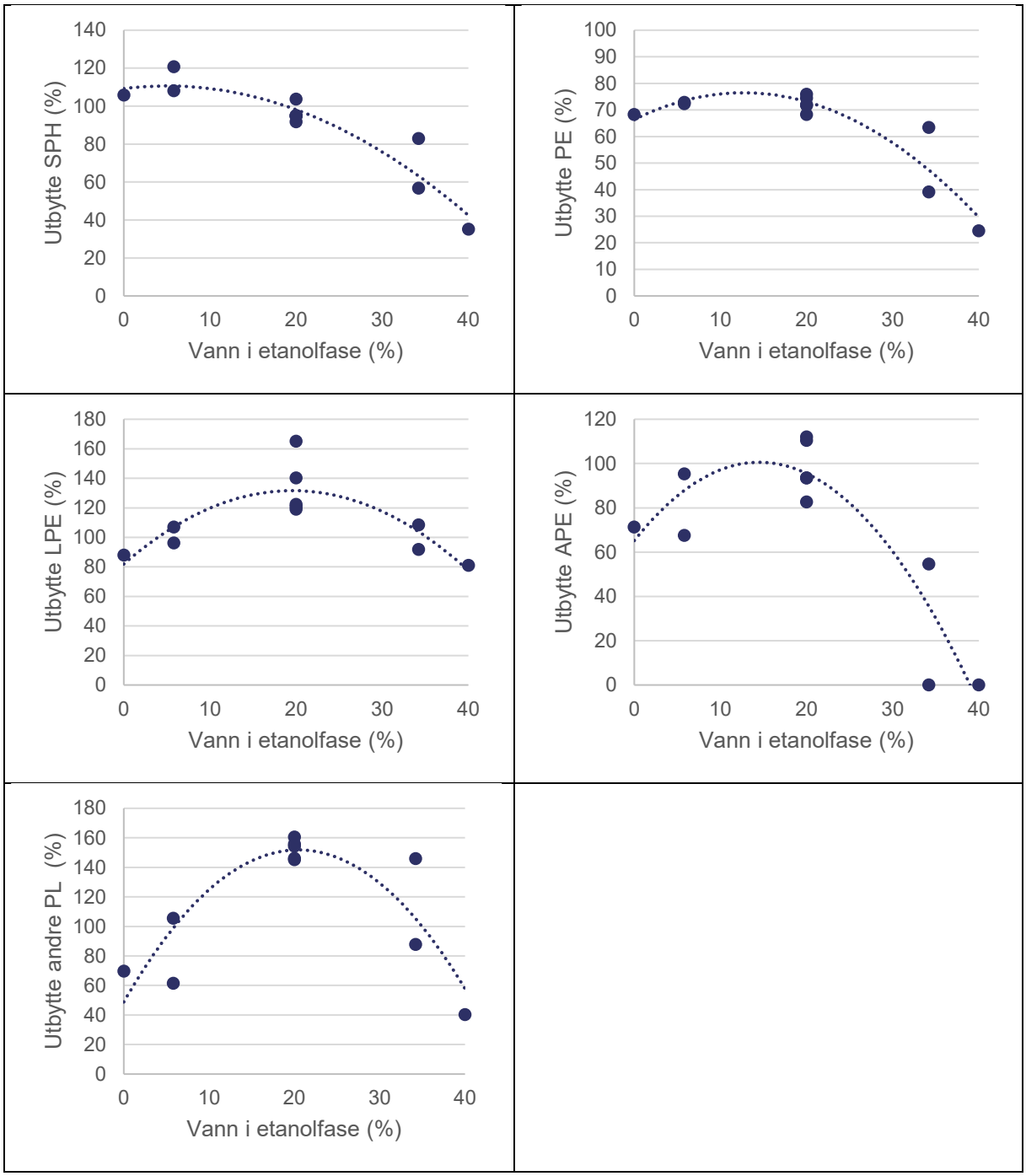
Tabell 18 Modellering av utbytte for de respektive fosfolipider, korrelasjon (R^2), og beregnet optimum vann% i etanolfasen. Forkortelser forklart i Figur 4.

	2. ordens polynom				Optimum
Respons	**x^2**	**x**	**Konstant**	**R^2**	**(vann% i etanolfase)**
Lipidekstrakt	-0,002	0,067	5,48	0,81	13,9
Totale PL	-0,046	1,035	77,8	0,89	11,3
PC	-0,037	0,718	78,2	0,88	9,7
1-LPC	-0,053	1,576	100,7	0,74	14,8
2-LPC	-0,023	0,556	103,6	0,63	11,9
PI	-0,437	17,02	90,8	0,78	19,5
SPH	-0,056	0,560	109,2	0,88	5,0
PE	-0,062	1,590	66,4	0,86	12,7
LPE	-0,129	5,077	82,0	0,69	19,6
APE	-0,168	4,877	65,2	0,81	14,5
Andre PL	-0,246	10,07	48,8	0,78	20,5

For noen av fosfolipidene er det funnet et utbytte >100 % relativt til B&D-ekstraksjon. Kloroform-metanol (B&D ekstraksjon) ansees for å være en kvantitativ ekstraksjonsteknikk og det er overraskende at det her i noen tilfeller er oppnådd betydelig høyere utbytte for noen av fosfolipidene; spesielt for PI, LPE og andre PL (Figur 8). Dette kan indikere at etanol-vann er et mer effektivt løsemiddel for enkelte av fosfolipidene, men dette må reproduseres og sjekkes mer grundig før en slik konklusjon kan fremmes.



Figur 8 Utbytte av de respektive fosfolipider relativt til kloroform-metanol-ekstraksjon som funksjon av vann% i etanolfasen



Figur 8 (forts.). Utbytte av de respektive fosfolipider relativt til kloroform-metanol-ekstraksjon som funksjon av vann% i etanolfasen

6.2.6 Teoretisk utbytte ved vask av filterkake

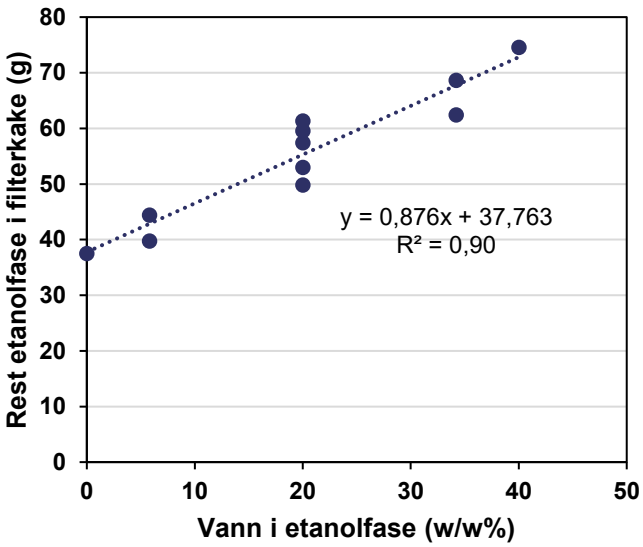
I referansemetoden kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959) blir mengde fett i kloroformfasen beregnet basert på inndampet delprøve korrigert for total mengde kloroform tilsatt under ekstraksjonen, dvs. eventuelle kloroformrester i filter og filterkaken påvirker ikke beregning av lipid-utbyttet. I de gjennomførte etanolekstraksjoner er lipidutbyttet basert på mengde i oppsamlet løsemiddelfase og det ble ikke anvendt vask av filterkaken etter ekstraksjonen. Mengde etanol i filterkaken økte lineært med økende vann (Tabell 19 og Figur 9), trolig grunnet økt hydratisering og dermed svelling av rognpulveret. Antar man at denne etanolfasen har tilsvarende sammensetning som filtratet, kan det beregnes et teoretisk korrigert utbytte av fosfolipider basert på vasking av filterkaken (Tabell 19 og Figur 6). Modellering av denne responsen ($y = 88{,}21 + 1{,}723 \cdot x - 0{,}06 \cdot x^2$; $R^2 = 0{,}85$) viste

samme trend som for eksperimentelt oppnådd ekstrakt. Teoretisk kan utbyttet av fosfolipider økes med 14-33 % basert på et slikt prinsipp og gi tilnærmet kvantitativ ekstraksjon av fosfolipider basert på optimale betingelser. I praksis vil dette ikke være lønnsomt å gjennomføre. En total utvasking av fosfolipider vil kreve betydelig økte mengder etanol og dermed økte driftsbetingelser i industriell skala. Her må det etableres en balanse mellom økt utbytte av å vaske filterkaken og økte driftskostander.

Basert på de innledende forsøkene ble tid ikke inkludert i optimaliseringsdesignet. Forsøkene ble gjennomført basert på 5 minutter homogenisering. I tillegg vil filtreringstrinnet bidra noe til økt kontakttid med ekstraksjonsmiddel. Det tilnærmet kvantitative korrigerte ekstraksjonsutbyttet indikerer at anvendt tid er tilstrekkelig for en effektiv ekstraksjon av fosfolipidene basert på den anvendte fremgangsmåte. Om det er mulig å redusere kontakttiden er ikke undersøkt i dette studiet.

Tabell 19 Mengde og rest av etanol i filterkake og teoretisk korrigert utbytte av PL basert på vasking av filterkaken

Forsøk	Filter kake	Etanol i filterkake	Teoretisk korrigert utbytte PL	Teoretisk økt utbytte PL
#	(g)	(g)	(%)	(%)
1	63,9	39,7	95,6	15,3
2	68,4	44,4	95,9	17,4
3	87,9	62,4	75,5	26,3
4	93,0	68,6	91,4	29,6
5	62,1	37,5	90,1	14,3
6	100,4	74,5	53,1	33,1
7	74,0	49,8	97,8	19,9
8	85,5	61,3	94,8	25,7
9	77,1	53,0	99,8	21,4
10	83,8	59,5	97,3	24,7
11	81,6	57,4	97,6	23,7



Figur 9 Rest av etanolfase i filterkake avhengig av nivå vann i etanolfasen

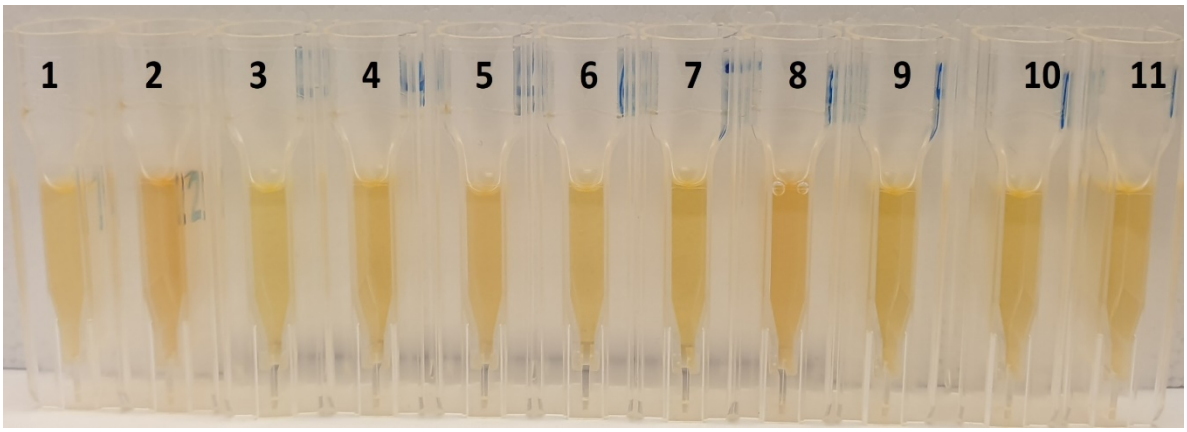
Ved oppskalering av ekstraksjonsprosessen vil det også være av interesse å se på forholdet mellom rogn og løsemiddel relativt til bruk av vasking av filterkaken. I tillegg vil et optimum på 11,3 % vann i etanolfasen muliggjøre en prosess der silderogn kontaktes direkte med etanolfasen uten forutgående tørking (jfr. 6.5 Direkte ekstraksjon av umoden silderogn).

6.3 Farge og struktur på frysetørket ekstrakt fra silderogn

Etter frysetørking av ekstraktene ble det oppnådd et lyst gulorange til fløtehvitt pulver (Figur 10). Visuelt er det ekstrakt basert på ren etanol og nest laveste nivå vann i designet (5,8 %; Tabell 15) som har sterkest farge. Grad av agglomerering samsvarer også med vann% i etanolfasen; høyest for ren alkohol (forsøk 5) og 5,8 % vann i etanolfasen (forsøk 1 og 2). Ved bruk av 40 % vann i etanolfasen ble det oppnådd et melkehvitt pulver, men denne prøven hadde også det laveste nivå av fosfolipider (forsøk 6; Tabell 15 og 16).

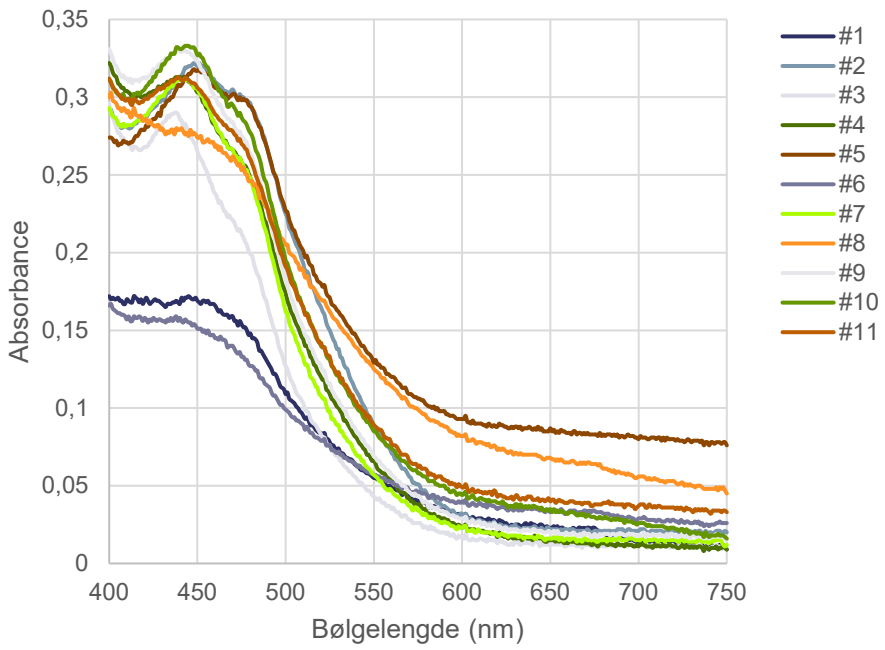
Figur 10 Bilde av frysetørkede lipidekstrakt oppnådd basert på betingelser i CCD. Nummerering av prøvene (LATH-2-57-##) angir forsøksnummer gitt i Tabell 15.

Visuell sammenligning av farge på ekstrakt oppsluttet i metanol ga ikke et like entydig bilde av fargeforskjeller (Figur 11). Her kan det virke som prøve #2 og #8 har mørkest farge. Fargeforskjeller på frysetørket pulver kan derfor skyldes en kombinasjon av reell farge, protein og pulverstruktur (et fint pulver oppfattes visuelt som lysere i fargen sammenlignet med et grovt pulver).

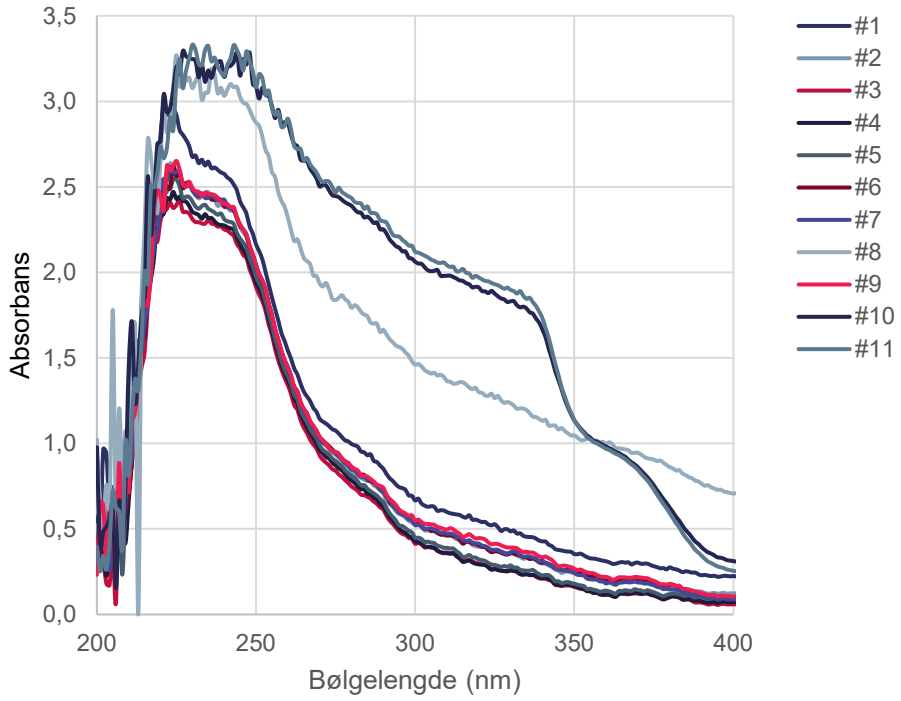


Figur 11 Visuell farge på 40 mg ekstrakt oppsluttet i 1 ml metanol og filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 15.

Prøver oppsluttet i metanol viste maksimum absorbans av synlig lys i området 440-450 nm (Figur 12). Laveste verdier er observert for prøve #1 og #6, og høyeste for prøve #9 og #10, men det er ikke funnet noen korrelasjon med de anvendte prosessvariablene. Det kan også sees en skulder i området 470 nm som anvendes for måling av astaxanthin basert på HPLC-metodikk. Absorpsjon i dette området (blått lys) og tilsvarende lavt ved lengre bølgelengder, er hovedårsaken til den gul-orange fargen på pulver og ekstrakt. I motsatt ende av skalaen (rødt lys) viser prøvene mindre forskjeller med høyest nivå i prøve #5 etterfulgt av prøve #8. UV-spekteret (Figur 13) viser også små forskjeller og heller ikke her er det funnet noen korrelasjon mot de anvendte forsøksbetingelser.



Figur 12 Absorbans i synlig lys området (400-750 nm) for ekstrakt oppsluttet i metanol. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 15.



Figur 13 Absorbans i UV lys området (200-400 nm) for ekstrakt oppsluttet i metanol. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 15.

6.4 Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje

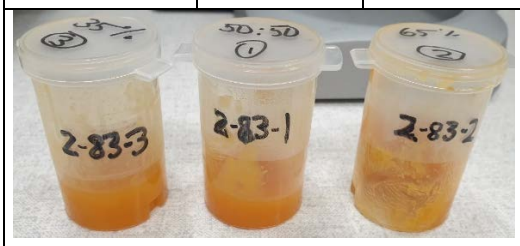
Ekstraherte fosfolipider fra silderogn har form av et høyviskøst plastisk granulat til fint pulver avhengig av vann% i etanolfasen under ekstraksjonen (Figur 10). Dette gir tekniske utfordringer i forhold til håndtering av produktet og formulering, f.eks. i form av hard eller myk gelatinkapsel. Et alternativ er å

tilsette en olje for å redusere viskositeten og dermed gjøre produktet pumpbart. Forsøk med tilsetting av en raffinert makrellolje er her gjennomført basert på to tilnærminger:

- Mekanisk innblanding ved bruk av intensiv mixing (Ultra-Turrax).
- Tilsetting til etanolekstrakt før fjerning av siste rest av etanolfasen.

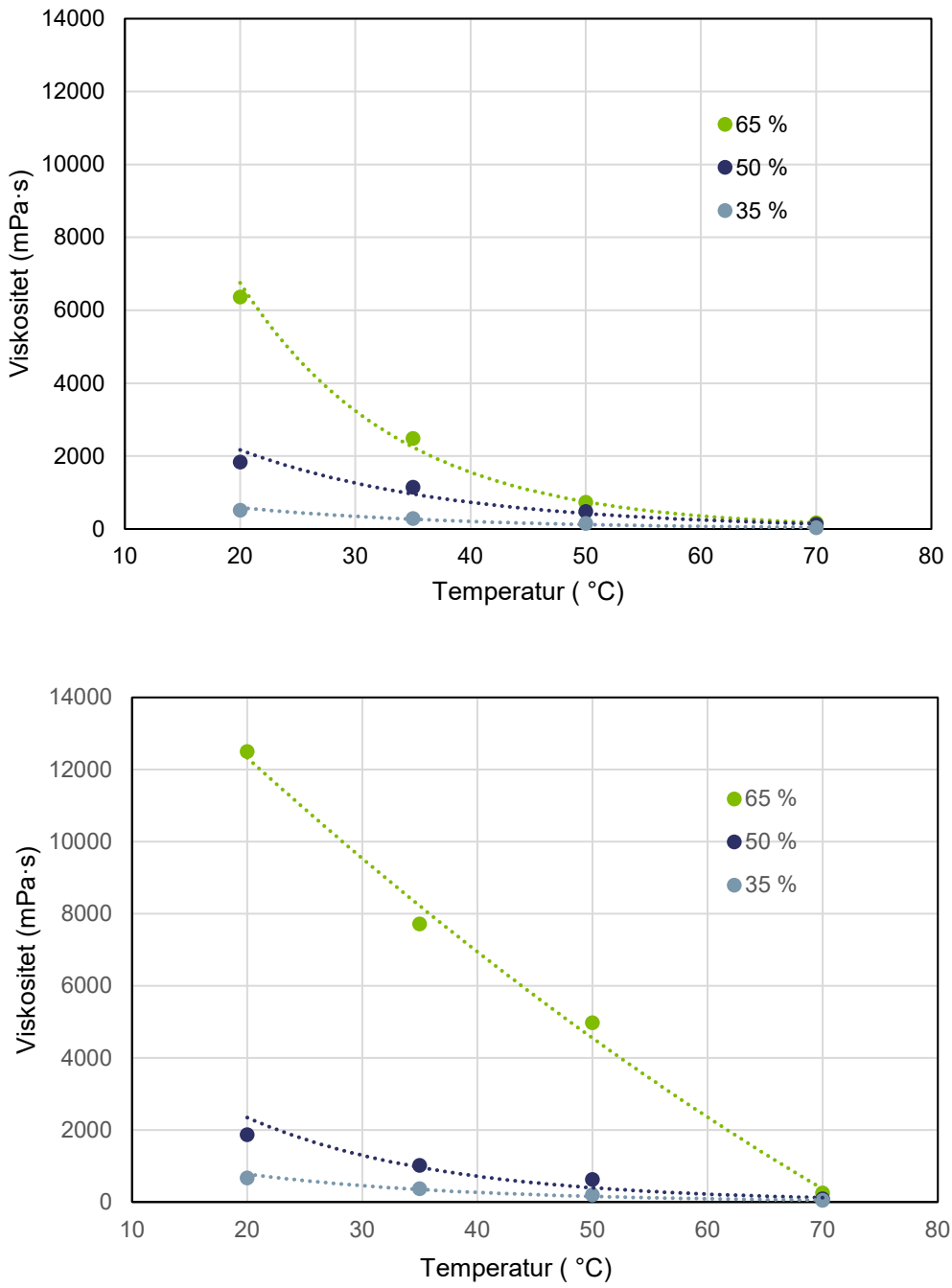
Effekt på fettsyreprofil vil avhenge av type olje som tilsettes og er ikke en del av dette prosjektet. Generelt vil tilsetting av en marin eller vegetabilsk triglyseridolje gi tilnærmet like egenskaper, og fokus i dette studiet har vært å gjennomføre innledende forsøk for å avdekke tekniske begrensinger under innblanding og effekt på reduksjon av viskositet avhengig av forholdet mellom lipidekstrakt og makrellolje, og temperatur.

Ved det høyeste nivå lipidekstrakt (80 %) var det ikke mulig å oppnå en homogen blanding ved bruk av mekanisk innblanding. Dette var også utfordrende ved en innblanding på 65 % og det ble i tillegg observert en faseskilling ved henstand av produktet. Ved tilsetting til etanolfase var det teknisk mulig å oppnå homogent produkt selv med 80 % lipidekstrakt i blandingen, men det var praktisk ikke mulig å få målt viskositet ved det høyeste nivået med bruk av det anvendte spindelviskosimeter. Bilder av de respektive produkter er gitt i Figur 14. Sammenlignes viskositetsprofilen for produkter basert på de to anvendte fremgangsmåtene, er kurvene tilnærmet like for innblandingsnivåene 35 og 50 % (Figur 15). For innblandingsnivå 65 % er det observert store forskjeller mellom teknikkene. Prøve basert på mekanisk innblanding viser en betydelig lavere viskositet og dette kan forklares ved faseskilling under målingen. En tettere og mer viskøs fase falt til bunns i viskosimeteret med en tynnere fase på toppen. Dette resulterte i lavere motstand for rotasjon av spindel og dermed lavere viskositet. 65 % blanding basert på tilsetting i etanolfasen viste svakt eksponentiell reduksjon med temperatur og det observerte nivå i temperaturområdet 20-50 °C kan sammenlignes med en konsistens som honning.

Mekanisk blanding med Ultra-Turrax homo-genisator. Mengde lipidekstrakt i			Tilsetting av makrellolje til etanolfase etter ekstraksjon. Mengde lipidekstakt i blanding:			
35 %	50 %	65 %	80 %	65 %	50 %	35 %
						

Figur 14 Bilde av blanding lipidekstrakt og makrellolje basert på mekanisk innblanding (venstre) og ved tilsetting av makrellolje til etanolfase etter ekstraksjon (høyre). Prosentnivå angir mengde lipidekstrakt i blandingen basert på vekt.

Ved innblanding av høy andel lipidekstrakt er det klart enklest å oppnå et homogent produkt ved tilsetting av olje til etanolfasen etter ekstraksjon av lipider. Dette gir et homogent produkt uten problemer med faseskilling ved henstand. Skal det anvendes lavere innblanding kan en mekanisk blandeteknikk være tilstrekkelig.



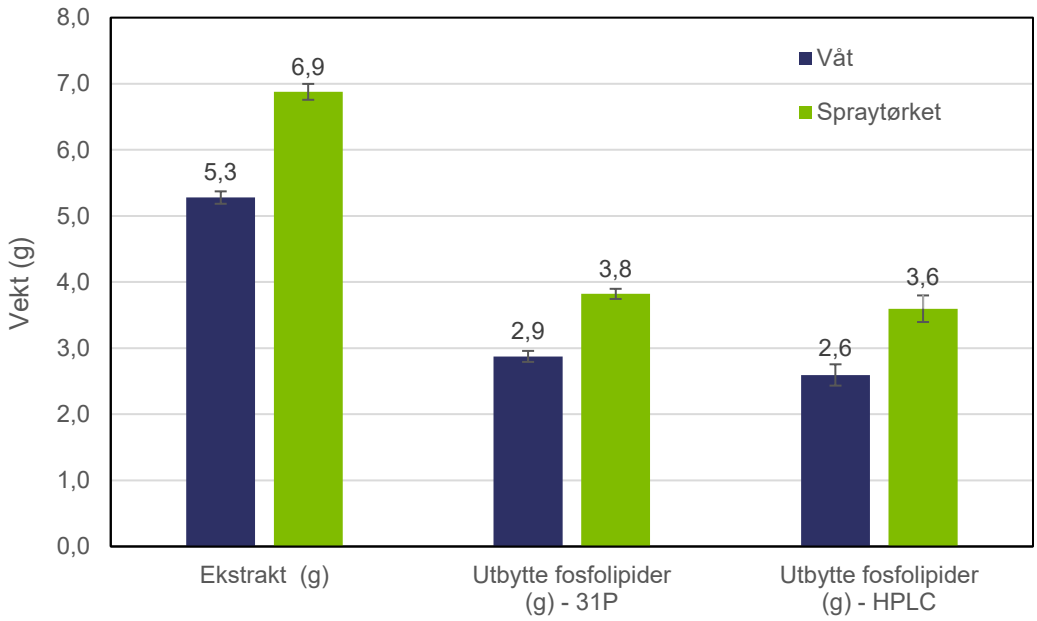
Figur 15 Effekt av nivå lipidekstrakt (vekt%) og temperatur på viskositet i blanding med makrellolje. Øverst - basert på mekanisk blanding av produktene. Nederst – basert på tilsetting av makrellolje til etanolfasen etter ekstraksjon av fosfolipider.

6.5 Direkte ekstraksjon av umoden silderogn

Det identifiserte området for optimalt vanninnhold i etanolfasen (11,3 %) muliggjør alternativt å fjerne vann ved bruk av overskudd 100 % etanol i stedet for at dette gjennomføres gjennom en forutgående tørkeprosess. Dette vil muliggjøre bruk av enda mer skånsomme prosessbetingelser ved at det unngås å eksponere rognen for høy temperatur under tørking i varmluft. For å teste om denne fremgangsmåten ga tilsvarende utbytte og kvalitet på lipidekstraktet, er det gjennomført en komparativ studie basert på likt vann-nivå i etanolfasen. Umoden rogn inneholdt 70,2 % vann (batch #0441). For å oppnå 11,3 % vann etter tilsetting av etanol måtte mengden økes til 555 g tilsvarende et forhold mellom tørrstoff og

løsemiddelfase på 1:20,8. Forsøkene er gjennomført basert på tre eksperimentelle gjentak for å muliggjøre en statistisk evaluering av resultatene.

Ekstraksjon av 30 g ts basert på våt rogn ga et signifikant lavere utbytte sammenlignet med spraytørket rogn. På vektbasis var reduksjonen på 1,6 g eller 25 % (Figur 16). Utbytte fosfolipider var også signifikant lavere og tilsvarte 0,9 og 1,0 g basert på kvantifisering med hhv. 31P-NMR og HPLC. Dette tilsvarer et redusert utbytte på hhv. 25 og 28 %. En mulig forklaring på økt utbytte er at celleveggen i rognkornene sprenges ved bruk av spraytørking og dermed blir lettere tilgjengelig for ekstraksjon. Komparative forsøk basert på frysetørket rogn er ikke gjennomført, men det er grunn til å anta at slik tørking vil bevare strukturen i rognen og være sammenlignbare med direkte ekstraksjon av våt rogn.



Figur 16 Totalt utbytte lipidekstrakt, og utbytte fosfolipider basert på kvantifisering med hhv. ^{31}P-NMR og HPLC etter ekstraksjon av 30 g tørrstoff av våt og spraytørket silderogn. Stolpe angir ±SD basert på 3 uavhengige forsøk.

De to fremgangsmåtene ga kun små forskjeller i sammensetning på lipidklasser (Tabell 20). Unntak er fritt kolesterol og frie fettsyrer der det ble funnet et hhv. signifikant ($p<0,01$) og nært signifikant ($p = 0,065$) høyere nivå i ekstrakt opparbeidet basert på våt rogn. Sistnevnte skyldes trolig tilstedeværelse av lipaseaktivitet i råstoffet som ble helt eller delvis inaktivert ved spraytørking av rognen. Årsaken til et litt høyere kolesterolnivå kan også være koblet til lipaseaktivitet med omdanning av kolesterolestere til fritt kolesterol. Kolesterolester nivået i prøven ble funnet å være under kvantifiseringsgrensen for analysemetoden (<0,5 g/100 g) og det er derfor ikke mulig å bekrefte denne hypotesen, men det samfallende høyere nivå av frie fettsyrer bekrefte indirekte en slik årsakssammenheng.

Tabell 20 Fordeling av lipidklasser (±SD; N=3) i fettfase fra lipidekstrakter basert på våt og spraytørket silderogn

	Våt rogn		Spraytørket rogn	
Lipidklasse	**Nivå**	**±SD**	**Nivå**	**±SD**
TG	19,3	0,6	22,0	2,0
DG	<0,5	---	<0,5	---
MG	<1	---	<1	---
FFA	2,8	0,9	1,5	0,1
Kolesterol	6,7	0,1	6,3	0,1
Kolesterol ester	<0,5	---	<0,5	---
PE	9,4	0,5	10,3	0,6
PI	<1		<1	---
PS	<1		<1	---
PC	58,0	4,6	59,3	4,6
LPC	<1		<1	---
Totale polare lipider	67,8	4,7	69,7	4,0
Totale nøytrale lipider	28,9	0,8	29,8	2,0
Total sum lipider	96,7	4,4	99,5	2,6

Sammenligning av fettsyresammensetning fra de to ekstraksjonsprotokollene viser også svært små forskjeller (Tabell 21). Sum identifiserte og ikke-identifiserte fettsyrer er tilnærmet likt i de to ekstraktene, men det er funnet generelt litt lavere nivå av PUFA i ekstrakt basert på spraytørket rogn. Statistiske analyser viser at nivå PUFA ikke er signifikant forskjellig ($p = 0,132$), mens nivå n-3 PUFA er nært signifikant ($p = 0,078$). For sum EPA+DHA er det funnet en signifikant forskjell mellom protokollene ($p = 0,023$). Den kvantitative forskjellen er imidlertid lav (28,6 vs. 28,0 %), men resultatene kan indikere at den anvendte spraytørkeoperasjon gir et lite tap av PUFA generelt og spesielt EPA og DHA. Tørkeprosesser generelt gir en økt risiko for lipidoksidasjon. I de gjennomførte forsøk er det ikke tilsatt antioksidanter under spraytørkingen og eventuelt tap av PUFA bør reproduseres og eventuelt sammenlignes med alternativ tørketeknologi basert på frysetørking før det kan konkluderes med behov for tiltak på dette punkt.

Tabell 21 Fettsyrenivå (g/100g ±SD; N=3) i ekstrakt basert på våt og spraytørket silderogn

Fettsyre (g/100 g ekstrakt)	Rå rogn	±SD	Tørket rogn	±SD
C14:0	2,7	0,06	2,8	0,06
C16:0	12,5	0,31	12,5	0,15
C18:0	0,9	0,06	1,0	<0,01
C20:0	<0,1	---	<0,1	---
C22:0	<0,1	---	<0,1	---
C16:1 n-7	2,4	0,06	2,5	<0,01
C18:1	9,6	0,25	10,1	0,15
C20:1	1,7	<0,01	1,8	<0,01
C22:1	0,4	<0,01	0,5	0,06
C24:1 n-9	0,3	<0,01	0,3	0,06
C16:2 n-4	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C16:3 n-4	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C18:2 n-6	0,7	<0,01	0,7	<0,01
C18:3 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C20:2 n-6	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C20:3 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C20:4 n-6	0,3	<0,01	0,3	<0,01
C22:4 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C18:3 n-3	0,6	<0,01	0,6	0,06
C18:4 n-3	0,8	<0,01	0,8	<0,01
C20:3 n-3	<0,1	---	<0,1	---
C20:4 n-3	0,4	<0,01	0,5	<0,01
C20:5 n-3 (EPA)	8,3	0,10	8,2	0,06
C21:5 n-3	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C22:5 n-3	0,7	<0,01	0,7	<0,01
C22:6 n-3 (DHA)	20,3	0,12	19,9	0,15
Sum mettede	16,1	0,40	16,2	0,21
Sum monoene	14,4	0,30	15,1	0,17
PUFA n-6	1,1	<0,01	1,1	0,06
PUFA n-3	31,2	0,21	30,8	0,21
PUFA totalt	32,5	0,21	32,1	0,26
Sum EPA+DHA	28,6	0,21	28,0	0,15
Identifiserte	63,0	0,90	63,4	0,50
Uidentifiserte	4,0	0,06	3,9	0,12

6.6 Nivå organiske miljøgifter og tungmetaller

Nivå persistente organiske miljøgifter (POPs) er funnet å være svært lave i silderognprøver fra 2020 og 2021 (Tabell 22). POPs er fettløselige komponenter og ekstraksjon av lipider vil dermed føre til en konsentrering av disse komponentene relativt til fettnivået i rognen (Tabell 10) tilsvarende 5,6x økning i konsentrasjonen for frysetørket batch 0441. Dette stemmer godt overens med de nivåene som er observert i hhv. frysetørket rogn og etanolekstrakt basert på 11,3 % vann i etanolfasen (Tabell 22). EU-regulativet for maksimum nivå av POPs i næringsmidler er basert på såkalt «upper bound» nivå, dvs. at for alle kongenerer under kvanitifiseringsgrensen (LOQ) settes bidraget til lik LOQ. Spesielt for gruppene polychlorinated dibenzodioxin (PCDD) og polychlorinated dibenzofuran (PCDF) var flere av kongenerene under LOQ (Vedlegg 5-7) og dette har medført noe høyere nivå av toksiske ekvivalenter (TEQ) i prøven basert på «upper bound» sammenlignet med «lower bound» (dvs. nivå settes til null dersom <LOQ). De observerte nivåene i etanolekstrakt basert på batch #0441 viser nivå av POPs godt under gjeldende grenseverdier for marine oljer brukt i næringsmidler. Analyser av rogn fra 2021 viser

en god del lavere nivå av PCDD/F og DL-PCB og dette vil resultere i enda lavere nivå i ekstraktet. Til sammenligning er det i et tidligere FHF-prosjekt på modning av silderogn (Larsen, 2014) gjennomført analyser av silderogn fra både NVG- og Nordsjøsild. Også her er det funnet lave nivå godt innenfor gjeldene grenseverdier for fisk. Nivåene er oppgitt på prøvebasis og kan derfor ikke direkte sammenlignes med våre tall i tørket rogn. Basert på et estimert ts-nivå på 30 % er nivåene litt høyere enn det som er funnet i dette studiet, men alder og fangstområde kan trolig forklare forskjellen.

Tabell 22 Nivå persistente organiske miljøgifter (PCDD/F, DL-PCB og NDL-PCB) på vekt- og fettbasis i frysetørket rogn og lipidekstrakt

	Prøvebasis			Fettbasis			
Lower bound nivå	Fryse-tørket batch #0441	Fryse-tørket batch #1157	Etanol-ekstrakt batch #0441	Fryse-tørket batch #0441	Fryse-tørket batch #1157	Etanol-ekstrakt batch #0441	Max nivå marine oljer[1)]
PCDD-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,029	<LOQ	0,192	0,162	<LOQ	0,221	---
PCDF-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,111	0,047	0,504	0,619	0,258	0,579	---
PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,140	0,047	0,696	0,781	0,258	0,799	---
DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,155	0,074	0,710	0,864	0,410	0,816	---
PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,295	0,121	1,406	1,645	0,668	1,616	---
NDL-PCBs (µg/kg)	2,3	0,8	10,3	12,9	4,7	11,8	---
Upper bound nivå							
PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,195	0,123	0,869	1,086	0,678	0,998	1,75
DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,155	0,074	0,710	0,864	0,410	0,816	---
PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (ng/kg)	0,350	0,198	1,579	1,950	1,088	1,815	6,0[2)]
NDL-PCBs (µg/kg)	2,3	0,8	10,3	12,9	4,7	11,8	200

1) EU (2019). Commission regulation (EC) No. 1881/2006.
2) Norsk grenseverdi 4,0 (FOR-2015-07-03-870).
PCDD – Polychlorinated dibenzodioxin; PCDF - Polychlorinated dibenzofuran; DL-PCB - Dioxin-like polychlorinated biphenyl; NDL-PCB - Non-dioxin-like polychlorinated biphenyl (sum PCB6: PCB-28, 52, 101, 138, 153 and 180); TEQ – toksiske ekvivalenter.

Tilsvarende viser nivå av tungmetallene kadmium (Cd), bly (Pb) og kvikksølv (Hg) lave nivå sammenlignet med gjelde grenseverdier for kosttilskudd (Tabell 23). Det finnes ikke egne grenseverdier for arsen. Toksisitet for dette tungmetallet er i første rekke relatert til uorganisk arsen. I fisk og sjømat foreligger arsen primært i form av vannløselig arsenobetain (Frantzen et al., 2015) som har en betydelig lavere toksisitet (Næss et. al., 2020). Nivå av arsen i lipidekstakt fra rogn batch #0441 er omtrent det samme som på fettbasis i frysetørket rogn, dvs. at arsen co-ekstraheres kvantitativt sammen med lipider basert på de anvendte betingelser (11,3 % vann i etanolfasen). Kvikksølv foreligger også organisk bundet i form av metylkvikksølv (MeHgX). Nivå av kvikksølv på fettbasis i rogn batch #0441 er tett opp mot maksimum for kosttilskudd (0,1 mg/kg), men det er betydelig lavere nivå (<LOQ) i lipidekstraktet (Tabell 23). Det samme gjelder også for kadmium og bly, som antyder at disse tre tungmetallene forekommer i lite fettløselige former i rognen. Selen er et essensielt spormineral som inngår i aminosyren selenocystein og overskudd lagres i form av selenocystein eller selenomethionin. Selen kan virke detoksifiserende på metylkvikksølv gjennom dannelse av stabilt MeHg-selenocystein og reduksjon av MeHg til uorganisk form (Azad, 2019). Kvikksølv og selennivået i filet fra sild fanget i Norskehavet er funnet å være hhv. 0,04 og 0,61 mg/kg våtvekt (Azad, 2019). Ts-nivå er ikke oppgitt i denne publikasjonen, men basert på et omtrentlig nivå på 25 % tilsvarer dette 0,16 og 2,4 mg/kg tørrstoff. Dette er et betydelig høyere kvikksølvnivå sammenlignet med frysetørket rogn analysert i dette studiet (Tabell 23), mens selen-nivåene er sammenlignbare. På molbasis har dette økt ratio Se:Hg fra gjennomsnittlig 51,1 for filet fra sild fanget i Norskehavet (Azad et al., 2019) til 433 og 1426 i hhv.

silderogn batch #0441 og #1157. Selennivået i lipidekstakt er funnet å være betydelig lavere (21 %) sammenlignet med fettbasis i rognen og lav co-ekstraksjon av selen kan muligens også ha påvirket tilsvarende effekt på kvikksølv gjennom dannelse av stabilt MeHg-selenocystein.

Tabell 23 Nivå tungmetaller (mg/kg) på vekt- og fettbasis i frysetørket rogn og lipidekstrakt

	Prøvebasis			Fettbasis			
	Fryse-tørket batch# 0441	Fryse-tørket batch# 1157	Etanol-ekstrakt batch# 0441	Fryse-tørket batch# 0441	Fryse-tørket batch# 1157	Etanol-ekstrakt batch# 0441	Max nivå i kost-Tilskudd[1)]
As (mg/kg)	1,4	1,3	6,0	7,8	7,2	6,9	---
Cd (mg/kg)	0,022	0,007	<LOQ	0,123	0,039	<LOQ	1,0
Pb (mg/kg)	0,0028	<LOQ	<LOQ	0,016	<LOQ	<LOQ	3,0
Hg (mg/kg)	0,017	0,006	<LOQ	0,095	0,031	<LOQ	0,1
Se (mg/kg)	2,9	3,2	3,0	16,2	17,6	3,4	---

1) FOR-2015-07-03-870

7 Patentsøk

Ekstraksjon av lipider basert på forskjellig typer av organiske løsemidler (metanol, etanol, isopopanol, aceton, heksan, kloroform etc.) er kjent teknologi i laboratorieskala og beskrevet i en rekke publikasjoner. Industriell praksis innen ekstraksjon av polare lipider (fosfolipider) er mindre kjent og det er derfor av interesse å undersøke i hvilken grad fremgangsmåten studert i denne rapporten kommer i konflikt med patentert teknologi. Det gjennomførte patentsøk kan kun sees på som innledende. Bedrifter som eventuelt ønsker å ta i bruk den beskrevne teknologien anbefales å gjøre mer grundige søk i samarbeid med et patentkontor for å sikre at ikke andre patenterte fremgangsmåter og/eller produkter er oversett. Slike søk bør også inkludere søk i vitenskapelig primær- og sekundærlitteratur for å få frem kjent kunnskap og teknologi på området.

Patentsøket er gjennomført i databasen Espacenet (https://worldwide.espacenet.com/patent/) basert på følgende engelske søkeprofil: All textfields and names: phospholipid* and extract* and fish and roe and ethanol. Dette ga 461 treff hvorav 28 ble tatt ut for nærmere gjennomgang. Basert på søket er det funnet 8 patenter med spesiell relevans for den aktuelle problemstillingen. I Tabell 24 er det gitt en oversikt over informasjon relatert til søker, oppfinner, prioritet og legal status for disse. I tillegg er det lagt inn en hyperlink til Espacenet-databasen for dem som ønsker å se på ytterligere detaljer. I teksten under er det gitt en kort presentasjon i form av patent-nummer, tittel, sammendrag og hovedkrav. I noen tilfeller er også underkrav av spesiell interesse inkludert.

Hovedprinsippet for den fremgangsmåten som er anvendt i optimalisering av ekstraksjonsprosessen gitt i denne rapporten er nevnt i flere av disse patentene; dvs. tørking av rogn etterfulgt av ekstraksjon med polart løsemiddel (bestående av alkohol eller en kombinasjon av alkohol og vann), og fjerning av løsemiddel for å isolere de ekstraherte lipidene med høyt nivå av fosfolipider. Bruk av lavtemperatur tørketeknikk (<70 °C) og spesielt frysetørking er nevnt i patentkrav, men ikke bruk av spraytørking ved høy temperatur (>200 °C) som anvendt i dette studiet. Også direkte ekstraksjon av våt rogn er nevnt; f.eks. i CA2980043A1 (Tabell 24, #6). I JPH08325192A (Tabell 24, #1) er dette beskrevet generelt i hovedkravet og uavhengig av type råmateriale, men ekstraksjon av rogn fra tunfisk er nevnt spesifikt i eksempel. Tilsvarende er gitt for ekstraksjon av fiskemel i US2009028989A1 (Tabell 24, #2) og for fiskerogn i US2015018570A1 (Tabell 24, #3) og CN104479859 (Tabell 24, #5). Av andre ekstraksjonsteknikker for rogn er det her inkludert CN104327113A (Tabell 24, #4) på bruk av superkritisk CO_2 med etanol som «entrainer» (tilsettes for å øke polariteten på løsemiddelet). I CA2980043A1 (Tabell 24, #6) er ekstraksjon kombinert med membranfiltrering (MWCO 300 Dalton) for å fjerne deler av løsemiddelet, salt og miljøgifter. CN106987309A (Tabell 24, #7) er et eksempel der etanolekstraksjon for å ta ut fosfolipider er anvendt på krabbe, og WO2008060163A1 (Tabell 24, #8) på krill.

1) JPH08325192A - Production of phospholipid containing docosahexaenoic acid

Sammendrag:

PURPOSE: To obtain a phospholipid useful as an active ingredient or an additive of a medicine or a food by drying a raw material containing docosahexaenoic acid at a low temperature and then extracting it with a solvent at a high concentration of docosahsaenoic acid and at a high efficiency. CONSTITUTION: This method for producing a liquid containing docosahexaenoic acid comprises drying a raw material containing docosahexaenoic acid at a low temperature of <=70 deg. C, especially at (-)60-70 deg. C, e.g. by methods of a lyophilization, a vacuum drying and at a low temperature/low humidity drying, then extracting it by an organic solvent (e.g. an alcoholic solvent such as methanol, isopropanol and octanol, a chlorine-based solvent such as chloroform and methylchloride, hexane and acetone) or a mixed solvent of the organic solvent with water at e.g. 0-70 deg.C.

Hovedkrav:

1. After low-temperature drying at a temperature range of raw materials 70 °C for containing docosahexaenoic acid, docosahexaenoic acid-containing phospholipids method for producing and extracting with a mixed solvent of an organic solvent or an organic solvent and water.
2. The low-temperature drying method of claim 1, wherein at a temperature range of -60~70 °C.
3. Low temperature drying, lyophilization, by vacuum drying and/or low temperature and low humidity drying method, process according to claim 1 or 2 water content of the raw material is made from processing until a 10 wt% or less.
4. Vacuum drying method, temperature 70 °C or less. The method of claim 3, which consists of processing the raw materials below 500 mmHg.
5. Low temperature and low humidity drying method, temperature 70 °C or less. The method of claim 3, which consists of processing the raw material in the humidity from 0 to 70 %.
6. The organic solvent is an alcohol solvent, hexane, acetone, method according to claim 1 or 2 wherein is selected from chlorinated solvents.
7. Alcoholic solvents are methanol, ethanol, are those selected from isopropanol and octanol, method of claim 6, wherein chlorinated solvent is chloroform or methyl chloride.
8. The method of claim 1 wherein the temperature of the extraction is 0 to 70 °C.

2) US2009028989A1 - Process for the Production of Phospholipids

Sammendrag:

The present invention provides a phospholipid composition obtainable by a process comprising contacting a fish meal with an organic solvent to produce a lipid-containing liquid, and subjecting said liquid to microfiltration optionally followed by solvent stripping.

Hovedkrav:

1. A phospholipid composition obtainable by a process comprising contacting a fish meal with an organic solvent to produce a lipid-containing liquid, and subjecting said liquid to microfiltration optionally followed by solvent stripping.
2. The phospholipid composition according to claim 1, wherein said microfiltration comprises a membrane separation process.

3) US2015018570A1 – Lipid composition with high DHA content

Sammendrag:

The invention provides lipid compositions comprising phospholipids having a high docosahexaenoic acid (DHA) content, which compositions are preferably extracted from natural sources. The lipid compositions are excellent sources of highly bioavailable DHA and they can be used in oral delivery vehicles, dietary supplements, functional foods, and the like.

Hovedkrav:

1. A process for efficiently providing a composition with high amounts of omega-3 phospholipids comprising: contacting immature fish roe with a polar solvent; extracting a lipid fraction from the immature fish roe, to provide a primarily polar lipid fraction comprising omega-3 phospholipids; and removing the solvent from the lipid fraction, to provide a solid polar lipid composition comprising omega-3 phospholipids, wherein at least about 40 % of the total fatty acids of the lipid fraction are omega-3 fatty acids, the fatty acids of the composition comprise docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and the ratio of DHA to EPA is at least about 1.3:1.

4) CN104327113A - Supercritical CO2 extraction method of phospholipid from roe

Sammendrag:

The invention relates to a method extracting phospholipid from a marine food processing by-product roe and particularly relates to a supercritical CO2 extraction method of the phospholipid from the roe. The method includes steps of pre-heating, oil removing, extraction with ethanol carrying, and drying to obtain the phospholipid. By means of the method, not only is a problem of waste of the residual marine by-product roe solved but also a preparation source of the phospholipid is enriched. The method is low in production cost, is short in period and is simple in process. In addition, the extracted phospholipid is rich in unsaturated fatty acid.

Hovedkrav:

1. Supercritical CO_2 a method for extracting fish lecithin, characterized in that the method comprises the following steps: (1) preheating: loading the homogenized, freeze-dried fish egg powder into an extraction kettle, preheating to 40-50 °C; 2）Deoiling: Adjusting pressure 25-35MPa, flow rate 20-30L/h, time 90-105 min, dephosphorization-derived raffinate after deoiling; 3）Extraction: Adding 4-8 % ethanol to the carrier tank, mixing with CO 2 and entering the extraction tank, the extraction pressure is 30-40 Mpa, the extraction temperature is 30-50 °C, the extraction time is 2-3 h, the flow rate is 15-20 L. /h, obtaining a phospholipid-rich extract; 4）The extract is concentrated and dried to obtain a phospholipid.

5) CN104479859 - A Preparation method of roe extract

Sammendrag:

The invention provides a preparation method of a roe extract. The preparation method comprises the following steps: directly performing static digestion on roes after freeze-drying, and then removing a solvent from the extracting solution to obtain the roe extract. According to the preparation method provided by the invention, dried roes do not need to be crushed or (and) puffed and granulated, so that a process is simple, dust pollution in a production process is prevented, and the quality of the roe extract can be improved.

Hovedkrav:

1. A method for preparing a fish egg extract, characterized in that the method comprises: In the first step, the frozen fish eggs are freeze-dried to a water content of 10 % or less at -10 °C to -50 °C and 10 Pa to 200 Pa; In the second step, the dried fish eggs obtained in the first step are placed in an extraction kettle, and static leaching is carried out by adding 3 to 15 times the weight of the dried fish eggs by 90 % to 100 % ethanol, and the leaching temperature is 10 °C to 50 °C. Dipping time 4-16 hours; In the third step, the extract is obtained by decompression distillation at 40 °C to 80 °C and -0.070 MPa to -0.095 MPa to obtain a fish egg extract.

6) CA2980043A1 – Methods for obtaining phospholipids and compositions thereof.

Sammendrag:

The invention provides methods for obtaining lipid compositions comprising phospholipids having a high docosahexaenoic acid (DHA) content, which compositions are preferably extracted from natural sources such as fish roe. The lipid compositions are excellent sources of highly bioavailable DHA and they can be used in oral delivery vehicles, dietary supplements, functional foods, and the like.

Hovedkrav:

1. A method for providing a composition with high amounts of omega-3 phospholipids comprising: contacting undried fish roe with a polar solvent and mixing the roe and solvent to form a first mixture; filtering the first mixture to remove solid particles larger than about 1 μm in size, to provide a solution of the polar solvent comprising extracted lipids; subjecting the solution to membrane filtration wherein the membrane has a MWCO of about 300 Daltons, to provide a retentate comprising greater than about 10 dry wt.% lipids; wherein at least about 40 % of the total fatty acid moieties of the retentate are omega-3 fatty acids, the fatty acid moieties of the retentate comprise docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and the DHA to EPA ratio at least about 2:1; and wherein the retentate comprises less than about 2 wt.% ash content, based on dry weight.
2. The method of claim 1 wherein the retentate is subjected to drying under reduced pressure to provide a solid.
3. The method of claim 1 wherein the fish roe is immature herring roe, immature salmon roe, immature mackerel roe, immature menhaden roe, or a combination thereof

7) CN106987309A - Method for extracting crab roe oil from swimming crab

Sammendrag:

The invention discloses a method for extracting crab roe oil from a swimming crab. The method comprises the following steps of (1) taking of a crab roe, selecting a fresh swimming crab, cleaning, removing a shell and absorbing the crab roe part; (2) drying, paving the crab roe flat and then drying to obtain dried crab roe; (3) ultrasonic treatment, crushing the dried crab roe and then adding 95% ethanol for ultrasonic treatment to obtain a crab roe-ethanol mixture; (4) ethanol extraction, further adding 95 % ethanol to the crab roe-ethanol mixture and stirring to obtain a stirred material; (5) filtering, carrying out secondary filtering on the stirred material by using filter paper to obtain filtrate; and (6) rotary evaporation, carrying out low-pressure rotary evaporation on the filtrate to remove the ethanol, thereby obtaining the crab roe oil of the swimming crab. The method is simple, fast and relatively high in controllability, the yield of the crab roe oil is relatively high and the extraction cost is relatively low.

Hovedkrav:

1. A crab butter extraction method, characterized in that it comprises the following steps:
   (1) Take crab: Choose fresh shuttle crab, wash, go back shell, draw crab part;
   (2) Drying: crab flattened after drying, dried crab yellow;
   (3) Sonicated: After the dried crab crushed by adding 95 % ethanol was sonicated to give crab - ethanol mixture;
   (4) Ethanol extraction: continue to add 95 % ethanol in the crab-ethanol mixture, and stir to obtain the stirring material;
   (5) Filtration: the filter material was stirred twice with the filter paper, the filtrate;
   (6) Rotary steaming: the filtrate was low-pressure rotary stripping alcohol that the shuttle crab butter.

8) WO2008060163A1 – Process for production of omega-3 rich marine phospholipids from krill

Sammendrag:

The present invention relates to a process for preparing a substantially total lipid fraction from fresh krill, a process for separating phospholipids from the other lipids, and a process for producing krill meal.

Hovedkrav:

1. A process for extracting a substantially total lipid fraction from fresh krill, comprising the steps of: a) reducing the water content of krill raw material; and b) isolating the lipid fraction.
2. A process of claim 1, wherein step a) comprises washing of the krill raw material with ethanol, methanol, propanol or iso-propanol in a weight ratio 1:0.5 to 1:5; and step b) comprises isolating the lipid fraction from the alcohol.

Tabell 24 Oversikt over patenter med relevans til den studerte ekstraksjonsteknologi

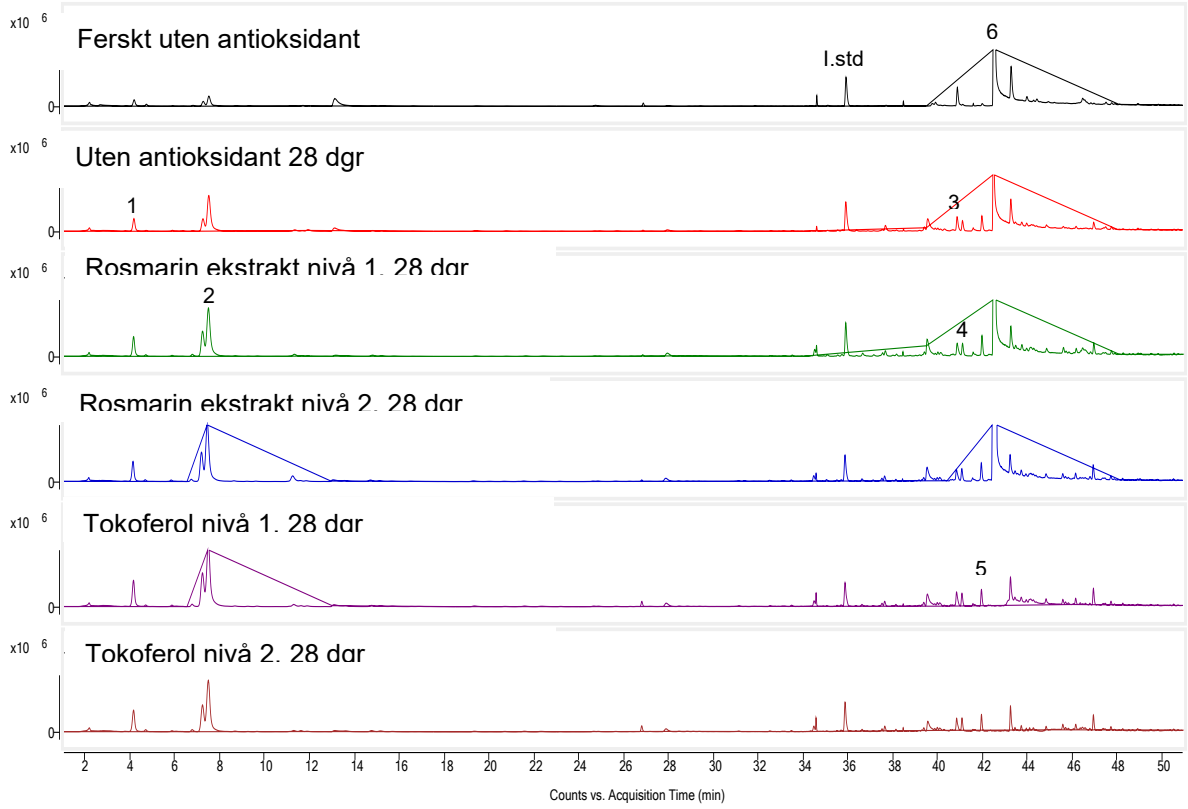
No	Title	Inventors	Applicants	Publication number	Earliest priority	Publication date	Kommentarer	Legal status
1	Production of phospholipid containing docosahexaenoic acid	ISHIHARA TAKAFUMI	BIZEN KASEI KK	JPH08325192A	1995-05-25	1996-12-10	Generell metodikk av tørt materiale basert på alkohol, klorert løsemiddel, vann.	Japansk patent – ingen status gitt
2	Process for the production of phospholipids	SCHNEIDER MICHAEL [NO] LOVAAS ERIK [NO]	PROBIO GROUP AS [NO]	US2009028989A1	2005-04-04	2009-01-29	Ekstraksjon av fiskemel – mikrofiltrering.	Application discontinued
3	Lipid composition with high DHA content	HALLARAKER HOGNE [NO] REMMEREIT JAN [NO] BERGER ALVIN [US] REMMEREIT JAN [NO]	HALLARAKER HOGNE [NO] REMMEREIT JAN [NO] BERGER ALVIN [US] ARCTIC NUTRITION AS [NO]	US2015018570A1 US9458409B2	2011-09-02	2015-01-15 2016-10-04	Etanol-ekstraksjon av frysetørket rogn med high-shear mixer, sekundær ekstraksjon og inndamping.	2016-09-14 US Patent grant; Non-entry into Europan phase
4	Supercritical CO2 extraction method of phospholipid from roe	LIANG PENG CHEN LIJIAO CHENG WENJIAN XU YANPING ZHANG HUITING LI DAN ZENG WENWU WU QINGYIN	UNIV FUJIAN AGRIC & FORESTRY	CN104327113A	2014-09-26	2015-02-04	Primær CO2 ekstraksjon for å fjerne TG etterfulgt av sekundær ekstraksjon med etanol som entrainer.	Kinesisk patent – ingen status gitt
5	Preparation method of roe extract	SUN ZHAOMIN CAI SHENGLI CAI AIYING HUANG SHASHA LI WENPING	WEIHAI BOOW FOODS CO LTD	CN104479859A	2014-11-27	2015-04-01	Statisk etanol-ekstraksjon av frysetørket rogn etterfulgt av vakuum destillasjon av ekstrakt.	2018-07-20 Patent application deemed withdrawn after publication
6	Methods for obtaining phospholipids and compositions thereof	SAEBO PER CHRISTIAN [NO] MANCINELLI DANIELE [NO]	ARCTIC NUTRITION AS [NO]	CA2980043A1	2015-03-19	2016-09-22	Etanol-ekstraksjon etterfulgt av nanofiltrering for å fjerne løsemiddel og lavmolekylære komponenter.	2021-02-17 European patent granted

No	Title	Inventors	Applicants	Publication number	Earliest priority	Publication date	Kommentarer	Legal status
7	Method for extracting crab roe oil from swimming crab	HU SHIWEI WANG JINHUI LI SHIJIE JIANG WEI LIU YU	UNIV ZHEJIANG OCEAN	CN106987309A	2017-04-24	2017-07-28	Krabberogn, tørking, etanolekstraksjon med ultrasonikering.	Kinesisk patent - ingen status gitt
8	PROCESS FOR PRODUCTION OF OMEGA-3 RICH MARINE PHOSPHOLIPIDS FROM KRILL	BREIVIK HARALD [NO]	PRONOVA BIOPHARMA NORGE AS [NO] BREIVIK HARALD [NO]	WO2008060163A1 WO2008060163A9	2008-05-22 2009-04-02	2008-05-22	Etanol-ekstraksjon av krill etterfulgt av isolering av fosfolipider.	2009-09-15 Entry into national phase

8 Oksidasjonsstabilitet

8.1.1 Valg av flyktige forbindelser for å følge oksidasjonsforløp

Eksempel på gasskromatogram av ferskt lipidekstrakt uten og tilsatt antioksidant på to nivå etter 28 dager lagring er gjengitt i Figur 17. Variasjon i analyseresultatetene for de to replikate analysene var gode og innenfor 15 %. De flyktige komponentene er dominert av oksidasjonsprodukter fra lipider (1-penten-3-on, 1-penten-3-ol, eddiksyre) og proteiner (2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal, benzaldehyd), som til sammen utgjør 20-70 % av den totale mengden flyktige komponenter. 1-penten-3-on og 1-penten-3-ol er typiske sekundære produkter dannet fra oksidasjon av n-3 flerumettede fettsyrer i lipidekstraktet. I tillegg ble det også funnet tr,tr 3,5-oktadien-2-on og tr,cis,3,5-oktadien-2-on, som også er typiske lipidoksidasjonsprodukter, men i noe lavere mengder enn de to førstnevnte. Lipidekstraktet inneholder en del protein (1,6 %; Oterhals og Thoresen, 2022) og dette gir i tillegg opphav til proteinoksidasjonsprodukter gjennom reaksjon mellom aminosyrer og hydrogenperoksider og/eller sekundære oksidasjonsprodukter (aldehyder). Enkelte av de nevnte lipid- og proteinoksidasjonsproduktene er angitt i Figur 17.



Figur 17 Gasskromatogram av lipidekstrakt med og uten antioksidant (rosmarinekstrakt og tokoferol). 1: 2-metyl-prpoanal, 2: 3-metyl-butanal, 3: tr,tr,3,5-Oktadien-2-on, 4: benzaldehyd, 5: tr,cis,3,5-Oktadien-2-on, 6: propylenglykol. Propylenglykol er et løsemiddel brukt i rosmarinekstraktet.

8.1.2 Screening forsøk uttesting av antioksidanter

Plotting av nivå for de respektive oksidasjonsprodukter viste en generell økning med lagringstid (Figur 18-23). Dette kommer klarest frem for fosfolipidekstrakt uten tilsatt antioksidant (PLU) der det er en tydelig eksponentiell økning over tid. Tilsetting av antioksidanter har hemmet oksidasjonen og i mange tilfeller gitt tydelig lavere nivå av de respektive oksidasjonsprodukter over tid.

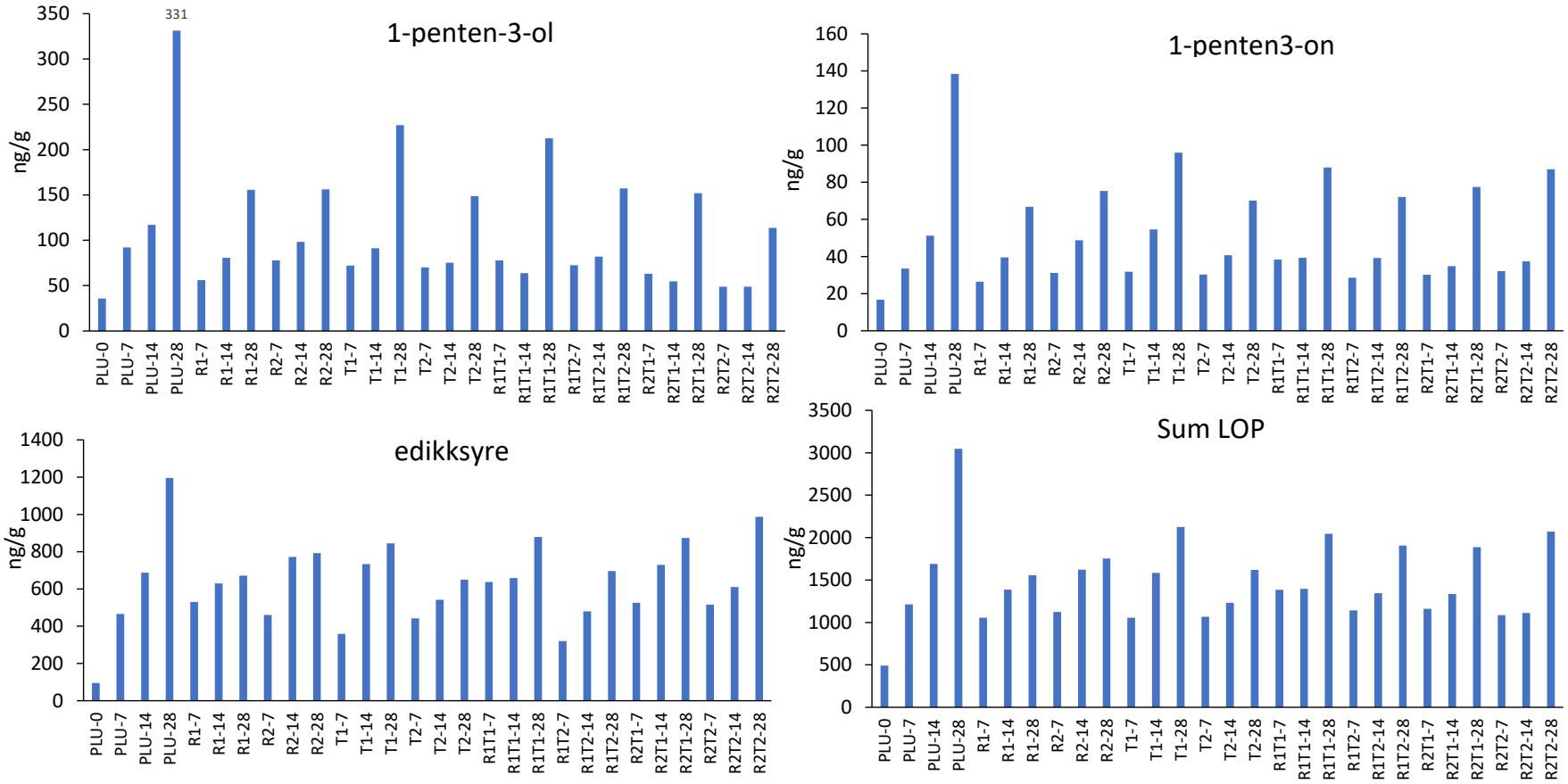
Basert på statiske analyser (ANOVA; Tabell 25) ble det etter 7 dager funnet signifikant effekt ($p < 0,05$) av å tilsette antioksidantene eller kombinasjon av disse på dannelse av følgende komponenter: 1-penten-3-ol (tokoferol), eddiksyre (rosmarin x tokoferol), tr,cis,3,5-oktadien-2-on (rosmarin). Rosmarinekstrakt hadde i tillegg nært signifikant effekt ($0,1>p>0,05$) for 1-penten-3-ol og eddiksyre. De blandede effektene reflekteres også av de observerte nivåene av flyktige oksidasjonsprodukter etter 7 dager (Figur 20). Det er ingen klart beste kombinasjon av antioksidant(er), men en indikasjon på at rosmarin er bedre enn tokoferol alene.

Etter 14 dager (Tabell 25) er det funnet signifikant effekt ($p<0,05$) av antioksidanter på følgende komponenter: 2-metyl-propanal (rosmarin), 3-metyl-butanal (rosmarin), 1-penten-3-on (rosmarin), eddiksyre (rosmarin og tokoferol), tr,tr 3,5-oktadien-2-on (rosmarin og rosmarin x tokoferol), tr,cis,3,5-oktadien-2-on (rosmarin x tokoferol). Nært signifikant effekt ($0,1>p>0,05$) er i tillegg funnet for interaksjonen tokoferol x rosmarin på 1-penten-3-on, og for tokoferol på tr,cis,3,5-oktadien-2-on. Også etter 14 dager har rosmarin ekstrakt signifikant effekt på flere komponenter enn tokoferol. Dette bildet bekrefter observasjoner etter 7 dager inklusiv at det i liten grad er funnet signifikant interaksjon mellom de to antioksidantene. Basert på de observerte nivåene av oksidasjonsprodukter (Figur 21) kommer det laveste nivået av rosmarin best ut, mens det høyeste har liten effekt relativt til prøve uten antioksidant.

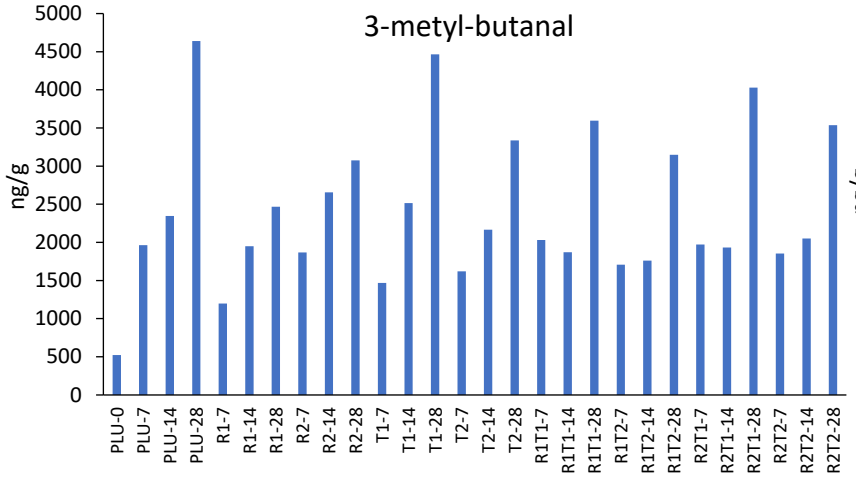
Etter 28 dager (Tabell 25) ble det funnet signifikant effekt ($p<0,05$) av tilsetting antioksidanter på følgende komponenter: 2-metyl-propanal (rosmarin og tokoferol), 3-metyl-butanal (rosmarin), 1-penten-3-on (rosmarin og rosmarin x tokoferol), 1-penten-3-ol (rosmarin, tokoferol og rosmarin x tokoferol), eddiksyre (rosmarin x tokoferol), tr,tr 3,5-oktadien-2-on (rosmarin og rosmarin x tokoferol), benzaldehyd (rosmarin x tokoferol), og tr,cis,3,5-oktadien-2-on (rosmarin, tokoferol og rosmarin x tokoferol). Nært signifikant effekt ($0,1>p>0,05$) er i tillegg funnet for tokoferol på 1-penten-3-on og for rosmarin på benzaldehyd. De observerte nivåene av oksidasjonsprodukter (Figur 22) viser klare effekter av alle kombinasjoner relativt til prøve uten tilsatt antioksidant. Lavt nivå av rosmarin viser generelt best antioksidativ effekt. Høyt nivå av rosmarin har ikke gitt noen additiv effekt eller i mange tilfeller en svakt dårligere stabilitet. Tokoferol viser tilsvarende eller litt dårligere effekt enn laveste nivå rosmarin. Kombinasjoner av de to antioksidantene har ikke gitt noen klar additiv effekt.

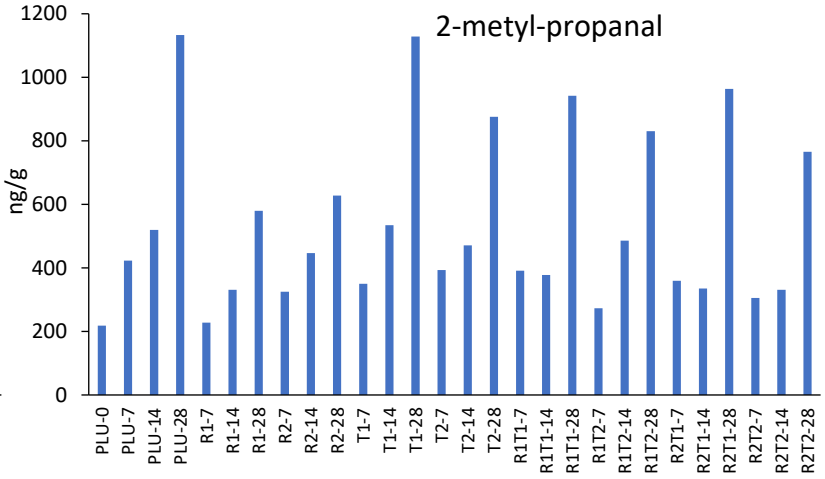
Det er i lagringsstudiet ikke funnet noen effekt ($p<0,1$) på dannelse av 2-metyl-butanal. Dette indikerer at denne forbindelsen i mindre grad egner seg til å måle effekt av å tilsette antioksidant(er) i denne type lipidekstrakt. Signifikante effekter på dannelse av benzaldehyd ble kun observert etter 28 dagers lagring. Benzaldehyd er et proteinoksidasjonsprodukt, men også her indikerer resultatene at denne komponenten i liten grad egner seg til å differensiere mellom de testede antioksidantene.

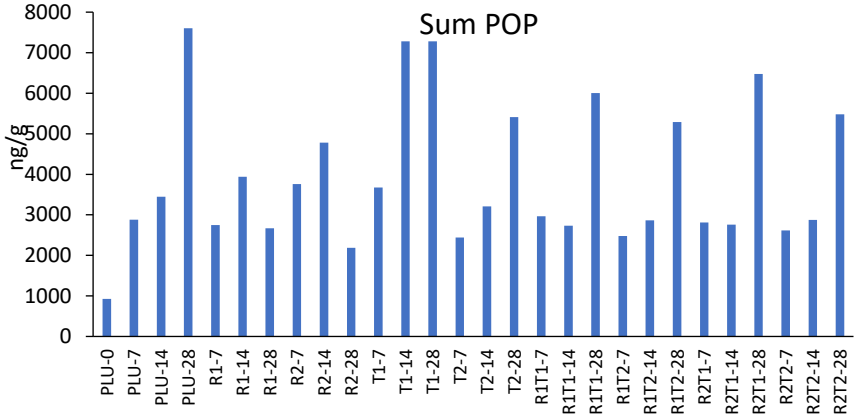
Figur 18 Oversikt semikvantitative nivå (ng/g) av flyktige lipid oksidasjonsprodukter (LOP) etter 0, 1, 2 og 4 ukers lagringstid. Koding av prøver angir antioksidantkombinasjon (Tabell 2) og lagringstid i dager (#).



*Figur 19 Oversikt semikvantitative nivå (ng/g) av flyktige protein oksidasjonsprodukter (POP) etter 0, 1, 2 og 4 ukers lagringstid. Koding av prøver angir antioksidantkombinasjon (*Tabell 2 *og lagringstid i dager (#)*

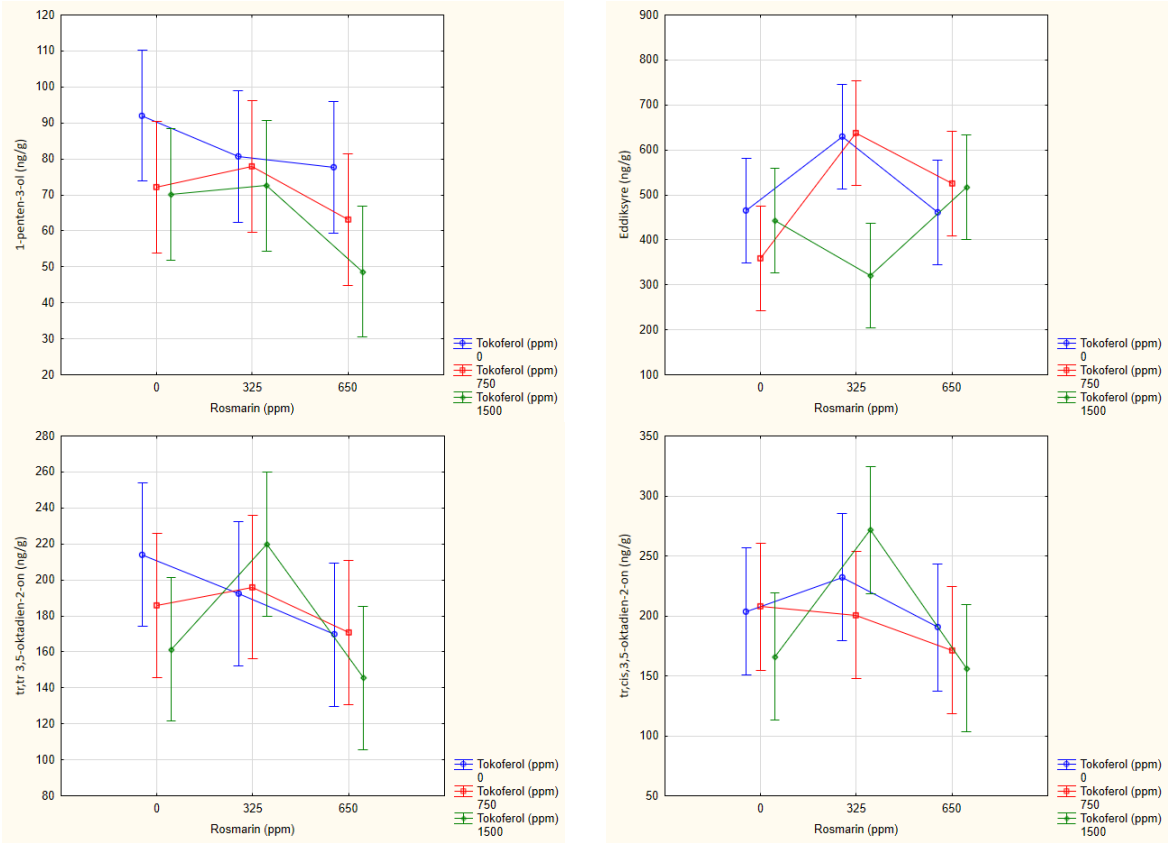




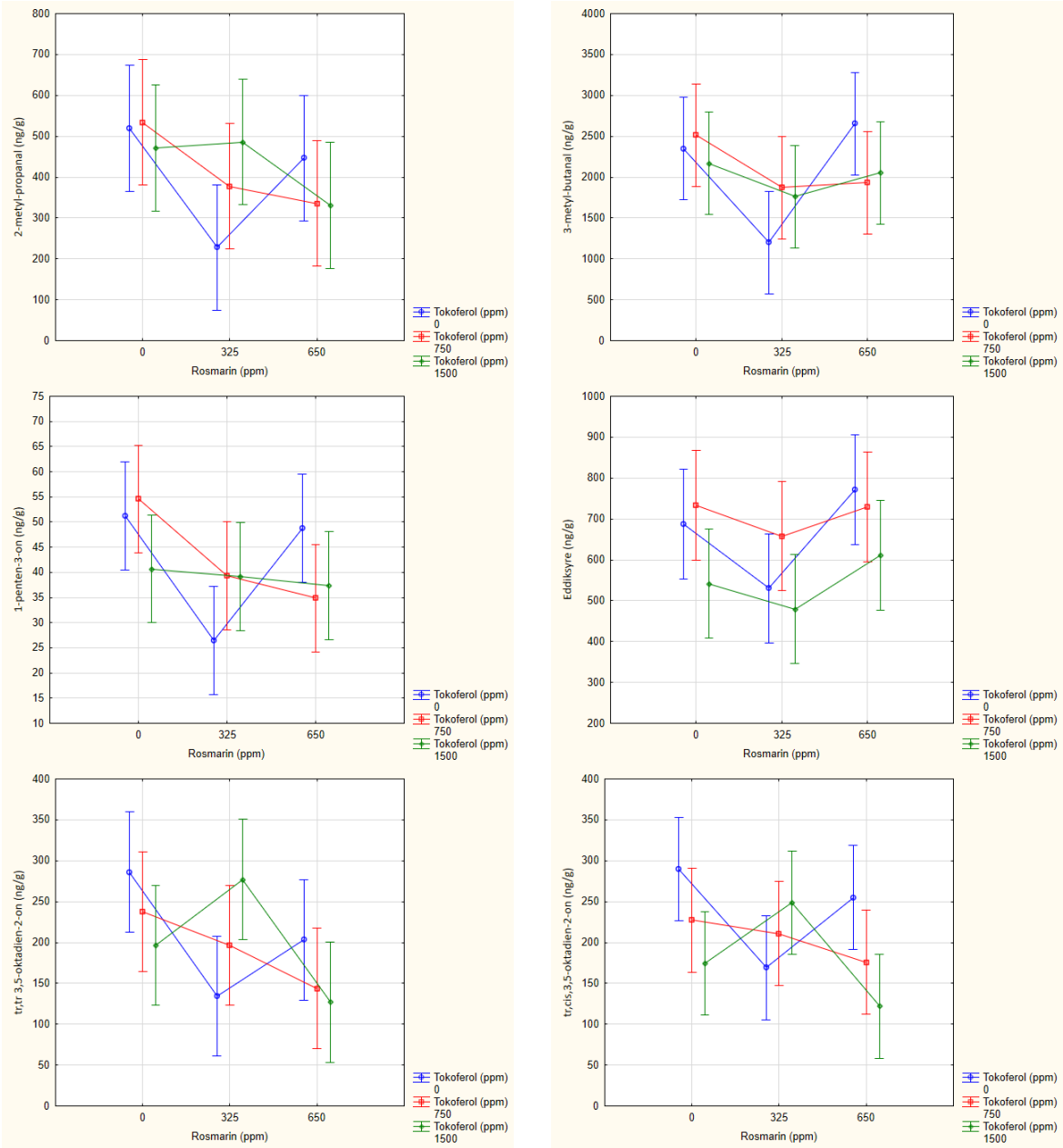


Tabell 25 Analyse effekter av tilsetting av antioksidantene rosmarin og tokoferol og interaksjon mellom disse på semikvantitative nivå av flyktige komponenter i prøver av lipidekstrakt fra silderogn etter 7, 14 og 28 dagers lagring. Røde tall angir signifikante p-verdier (p <0,05), sorte ikke-signifikante p-verdier (0,05 < p < 0,1) og n.s. ikke-signifikante p-verdier (p > 0,1).

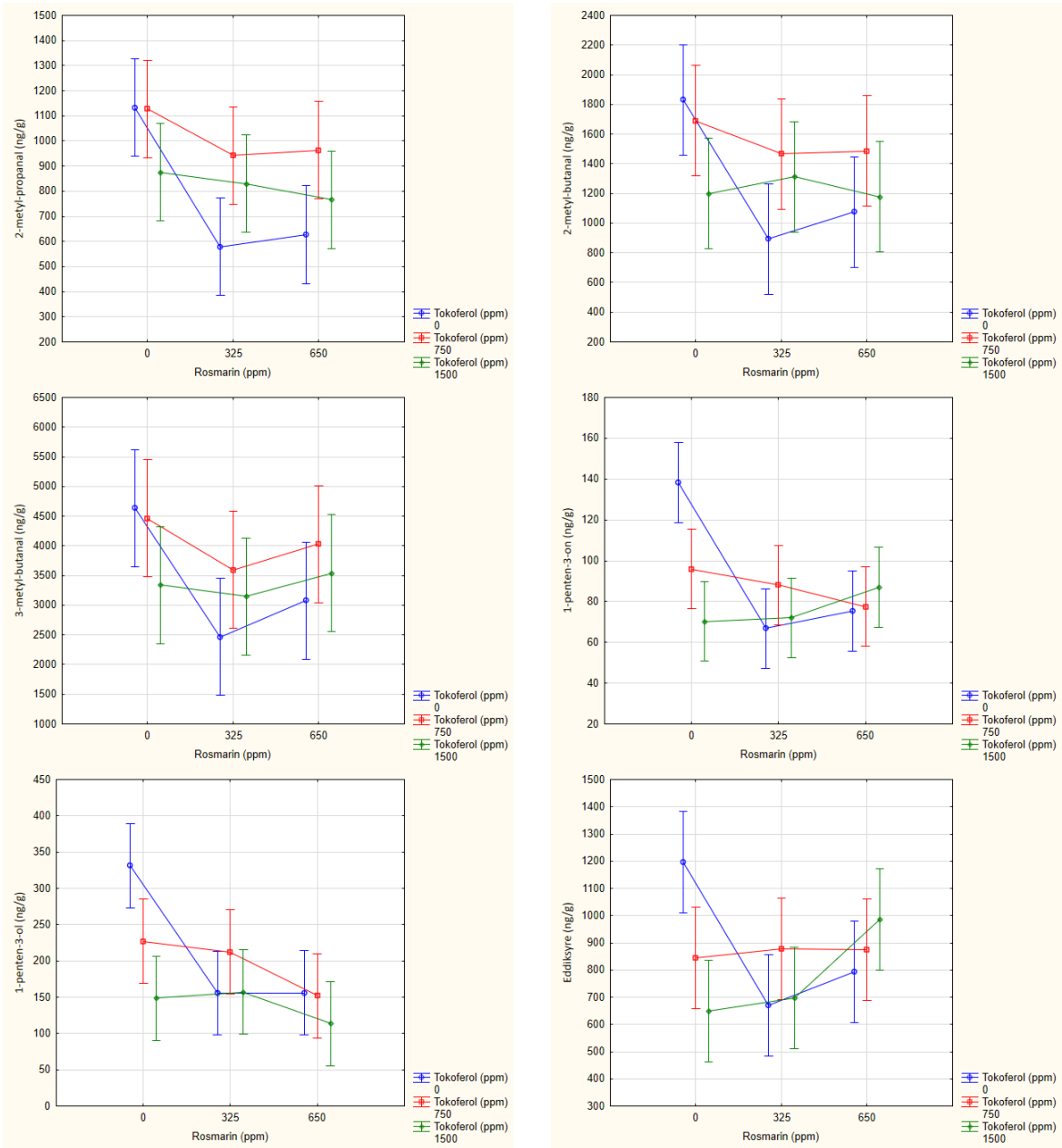
Lagringstid (dager)	2-metyl-propanal	2-metyl-butanal	3-metyl-butanal	1-penten-3-on	1-penten-3-ol	Eddiksyre	tr,tr 3,5-oktadien-2-on	Benz-aldehyd	tr,cis,3,5-oktadien-2-on
7 dager									
Rosmarin	n.s	n.s	n.s	n.s	0,090	0,076	0,055	n.s	0,028
Tokoferol	n.s	n.s	n.s	n.s	0,043	n.s	n.s	n.s	n.s
Rosmarin x Tokoferol	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0,016	n.s	n.s	n.s
14 dager									
Rosmarin	0,049	n.s	0,022	0,018	n.s	0,038	0,038	n.s	n.s
Tokoferol	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0,022	n.s	n.s	0,098
Rosmarin x Tokoferol	n.s	n.s	n.s	0,062	n.s	n.s	0,038	n.s	0,030
28 dager									
Rosmarin	0,007	n.s	0,042	0,011	0,004	n.s	0,011	0,069	0,002
Tokoferol	0,021	n.s	n.s	0,100	0,015	n.s	n.s	n.s	0,020
Rosmarin x Tokoferol	n.s	n.s	n.s	0,006	0,036	0,009	0,002	0,004	0,000



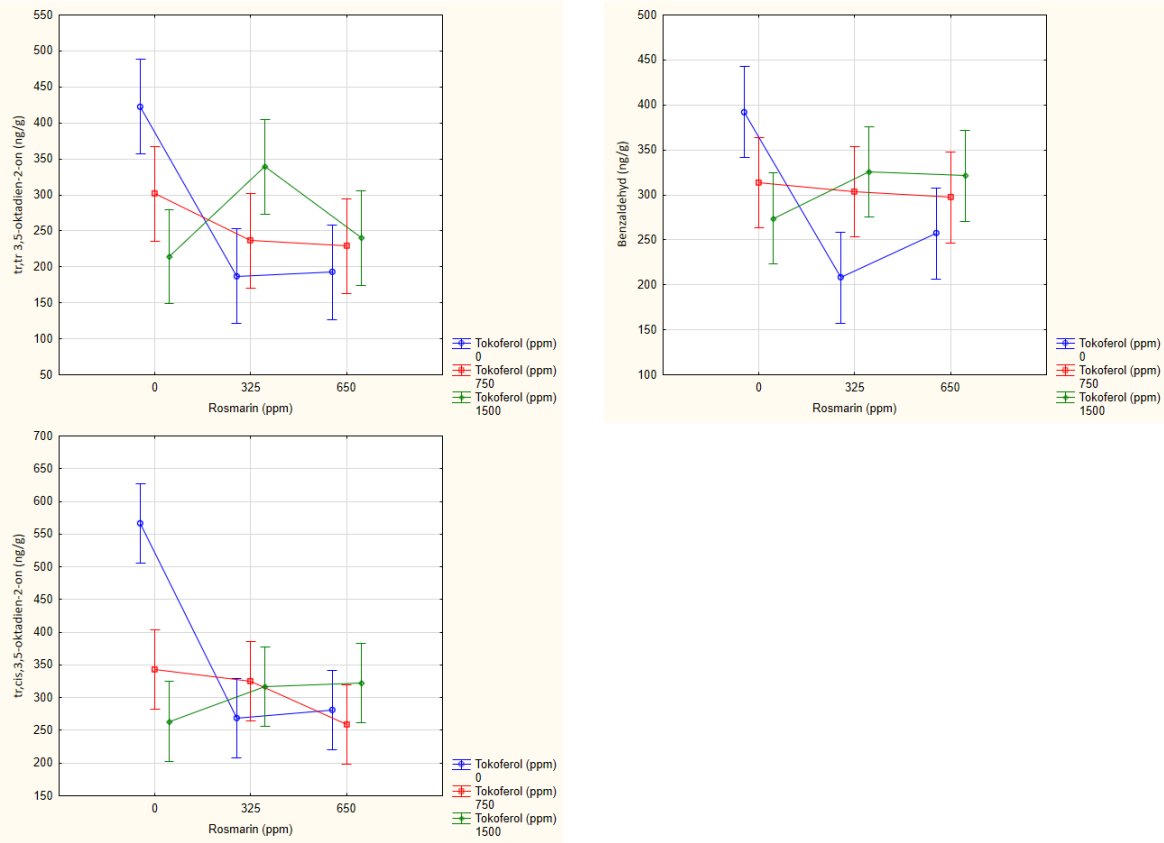
Figur 20 Nivå oksidasjonsprodukter etter 7 dager lagring med signifikant effekt (p<0,1) av antioksidant tilsetting



Figur 21 Nivå oksidasjonsprodukter etter 14 dager lagring med signifikant effekt (p<0,1) av antioksidant tilsetting



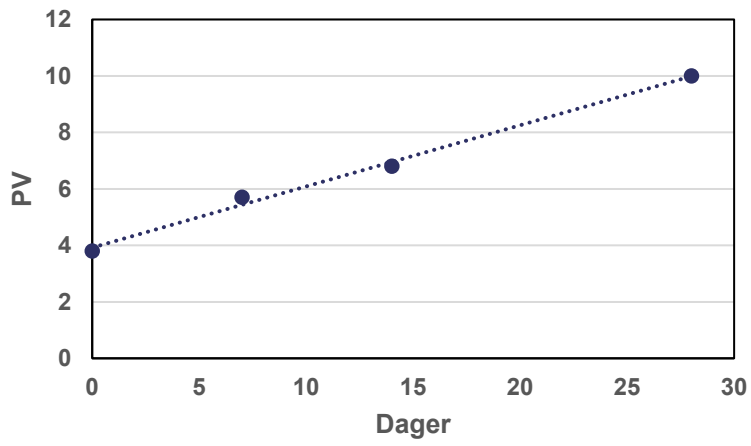
Figur 22 Nivå oksidasjonsprodukter etter 28 dager lagring med signifikant effekt (p<0,1) av antioksidant tilsetting



Figur 22 (fortsettelse). Nivå oksidasjonsprodukter etter 28 dager lagring med signifikant effekt (p<0,1) av antioksidant tilsetting.

8.1.3 Peroksidtall

Peroksidtall i lipidekstrakt ble innledningsvis analysert i kun ekstrakt uten tilsatt antioksidant (kontrollprøver) for å evaluere om metoden ga en respons som kunne skille mellom prøvene. Nivåene var svært lave og viste en lineær sammenheng med lagringstid (R^2 = 0,9974; Figur 23). I en vanlig oljeprøve (triglyserider) vil det normalt være en eksponentiell utvikling og lipidekstraktet avviker klart i fra et slikt forløp. Generelt viser lipidekstrakt uten tilsatt antioksidant lave nivå av peroksider og dette bekrefter at disse raskt omdannes til sekundære oksidasjonsprodukter og/eller reagerer med aminosyrer i prøven. Selv etter 4 ukers lagring er ikke peroksidtallet høyere enn 10 og analysemetoden ansees derfor som mindre egnet til å påvise effekter av å tilsette antioksidanter i denne type prøvemateriell.



Figur 23 Utvikling i nivå peroksidtall (PV) i lipidekstrakt uten tilsatt antioksidant.

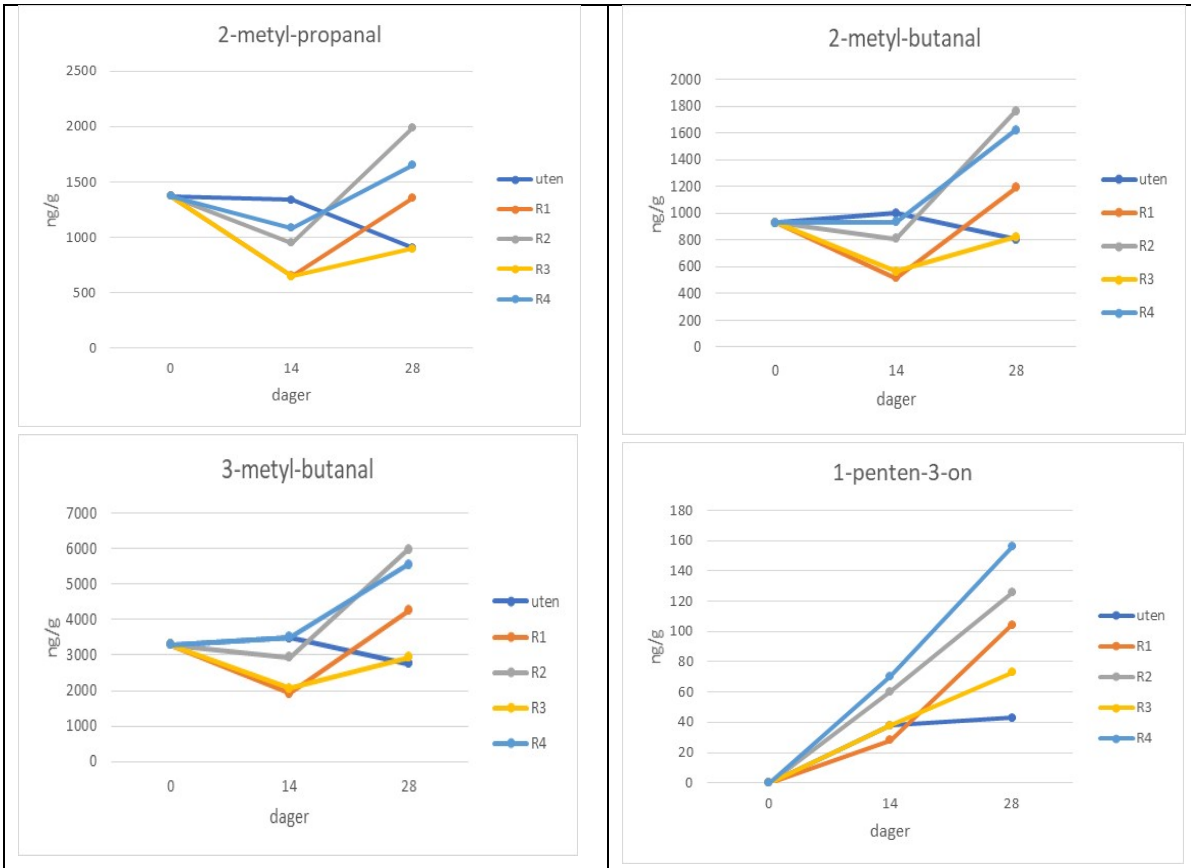
8.1.4 Optimalisering av nivå rosmarinekstrakt

Basert på hovedfunn i det innledende screeningforsøket ble det besluttet å gjennomføre et optimaliseringsforsøk basert på økende dosering av kun rosmarinekstrakt; hhv. 0 – 310 – 625 – 935 – 1250 ppm. Utvikling av flyktige komponenter etter 14 og 28 dager v/40 °C viste et komplekst og noe usystematisk mønster med forskjellig rangering etter 14 og 28 dagers lagring (Figur 24). Prøve uten tilsetting av antioksidant viser en flat eller svakt økende (1-penten-3-ol) trend for de sekundære oksidasjonsproduktene, men flater deretter ut eller blir redusert etter 28 dager. Normalt skulle det forventes at denne prøven viser en eksponentiell økning av flyktige oksidasjonsforbindelser over tid (jfr. screeningforsøket), men er ikke funnet i dette forsøket. Mulige forklaringer på dette kan være at oksidasjonsproduktene delvis fordamper fra prøven grunnet stor overflate, at de reagerer med protein i prøven og gir opphav til proteinoksidasjonsprodukter, eller en kombinasjon av disse mekanismene. Oksidasjonsproduktene tr,tr 3,5-oktadien-2-on, benzaldehyd og tr,cis,3,5-oktadien-2-on viser alle en økning i prøve uten antioksidant etter 14 dager, men deretter en utflating eller reduksjon. Etter 28 dager kommer derfor prøve uten tilsatt antioksidant like godt ut som prøve R3 (935 ppm rosmarinekstrakt). R1 viser en generell økning av flyktige forbindelser fra 14 til 28 dager og kommer dårligere ut. Dannelse av 2-metyl-butanal viste ingen signifikante forskjeller i screeningforsøket. I optimaliseringsforsøket viser denne komponenten samme bilde som hovedtrend angitt over.

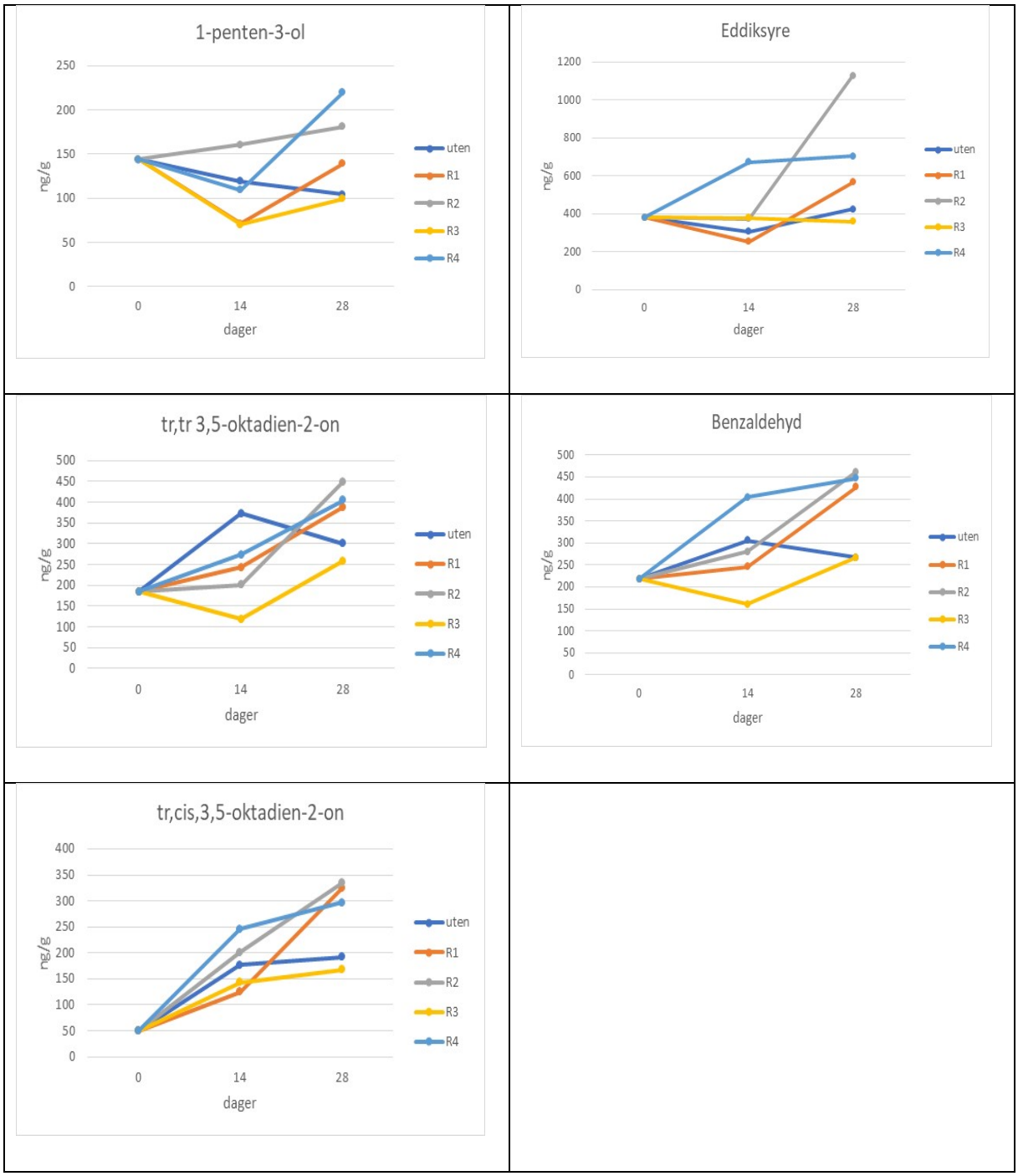
Basert på en-veis ANOVA etter 14 og 28 dager er det kun funnet signifikante forskjeller for noen av de flyktige forbindelsene etter 14 dagers lagring (Tabell 26). Signifikante forskjeller mellom enkeltprøver er testet basert på Tukey post hoc test. Det er funnet signifikant forskjell mellom R1 (lav) og R4 (høy) for 1-penten-3-on og eddiksyre, mellom R3 (lav) og prøve uten antioksidant (høy) for tr,tr 3,5-oktadien-2-on, og mellom R3 (lav) og R4 (høy) for benzaldehyd (Figur 24). Få signifikante forskjeller mellom prøvene og endret rangering etter 14 og 28 dager lagring ved 40 °C gjør det vanskelig å trekke noen sikker konklusjon fra forsøket. Basert på trendbildet kan det generelt konkluderes med at prøve uten antioksidant er like stabil som prøver tilsatt rosmarinekstrakt. Av de prøver som er tilsatt rosmarinekstrakt kommer R3 best ut, men det kan ikke konkluderes med at tilsetting av antioksidant har gitt en økt stabilitet på lipidekstraktet. Dette stemmer kun delvis overens med det innledende screeningforsøket der prøve uten antioksidant kom klart dårligst ut etter 28 dager. En forskjell mellom screening- og optimaliseringsforsøket er at de anvendte lipidekstrakt ble fremstilt basert på hhv. 100% og vannholdig etanol (11,3% vann). Dette har gitt et høyere proteinnivå i sistnevnte ekstrakt (1,4 vs. 3,5%; Oterhals og Thoresen, 2022) og betydning av dette for oksidasjonsforløp og stabilitet er en ukjent faktor som bør undersøkes nærmere gjennom nye forsøk. Dette har imidlertid vært utenfor de økonomiske rammer som er gitt for dette prosjektet.

Tabell 26 Signifikante forskjeller mellom nivå flyktige komponenter etter 14 og 28 dager lagiring v/40 °C. Røde tall angir signifikante p-verdier (p <0,05), sorte ikke-signifikante p-verdier (0,05 < p < 0,1) og n.s. ikke-signifikante p-verdier (p > 0,1).

	14 dager	28 dager
2-metyl-propanal	n.s.	n.s.
2-metyl-butanal	n.s.	n.s.
3-metyl-butanal	n.s.	n.s.
1-penten-3-on	0,041	n.s.
1-penten-3-ol	0,056	n.s.
Eddiksyre	0,018	n.s.
tr,tr 3,5-oktadien-2-on	0,026	n.s.
Benzaldehyd	0,019	n.s.
tr,cis,3,5-oktadien-2-on	n.s.	n.s.
Sum flyktige	n.s.	n.s.



Figur 24 Nivå oksidasjonsprodukter etter 0, 14 og 28 dager lagring v/40 °C. Nivå tilsatt rosmarinekstrakt: Uten (0 ppm), R1 (310 ppm), R2 (625 ppm), R3 (935 ppm), R4 1250 ppm.



Figur 24 (fortsettelse). Nivå oksidasjonsprodukter etter 0, 14 og 28 dager lagring v/40 °C. Nivå tilsatt rosmarinekstrakt: Uten (0 ppm), R1 (310 ppm), R2 (625 ppm), R3 (935 ppm), R4 1250 ppm.

9 Konklusjoner

9.1 Resultatmål

9.1.1 Fosfolipidnivå i avskjær fra makrell og sild, silderogn, grakse, limvann og råolje

Opparbeidelse av restråstoff fra makrell i industriell skala ga et høyt oljeutbytte på 17 kg per 100 kg råstoff. Masse og komponentbalanser viser en fettfordeling på 15 % i presskake/grakse, 3 % i konsentrat og 81 % i olje. Nivå polare lipider (fosfolipider) på fettbasis i råstoffet er svært lavt (1,5 %), men øker noe i mellomproduktene presskake (3,4 %), grakse (9,1 %) og konsentrat (2,2 %). Nivå i fraseparert olje var 0,8 %. Nivå av n-3 flerumettede fettsyrer (n-3 PUFA) var 19 % i råstoffet og 18,3 % i oljen. Lavere nivå n-3 PUFA i mellomproduktene presskake, grakse og konsentrat kan trolig primært tilskrives utfordringer med oksidasjon i disse prøvene. Makrell gyter vår-forsommer og fangstsesongen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gytesesong slik tilfelle er for sild. Kombinert med høyt fettnivå (triglyserider) gir dette et meget lavt nivå av fosfolipider i ekstrahert fett fra restråstoff og mellomprodukter. Samlet vurdert er restråstoff fra makrell lite egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av marine fosfolipider.

Opparbeidelse av restråstoff sild basert på fiskemel- og hydrolyseprosess i labskala viser en betydelig økning av nivå polare lipider i fettfase fra presskake/grakse sammenlignet med utgangsnivå i råstoffet. Effekten er høyest for en hydrolyseprosess der det er oppnådd en 3-4 dobling av nivå polare lipider i graksen til 22,1 % for NVG-sild og 17,7 % for Nordsjøsild. En fiskemelprosess ga en presskake/grakse med hhv. 8 og 5 % lavere nivå. Råstoffet i disse forsøkene inneholdt kun mindre mengder med rogn og melke. Ved å ta utgangspunkt i buklist-rogn-melke-fraksjonen kunne nivå polare lipider økes fra 19,6 til 47 % i presskake/grakse basert på en fiskemelprosess. I sistnevnte forsøk oppsto det problemer med fettseparasjonen grunnet emulsjonsdannelse og noe tap av polare lipider.

Forsøkene bekrefter at de polare lipidene primært følger den ikke-vannløselige (partikulære) proteinfraksjonen i fiskemel- og hydrolyseprosessen. Ved å varmebehandle og mekanisk separere råstoffet kan en stor andel av vann og nøytrale lipider (triglyserider) fjernes før ekstraksjon av de polare lipidene ved bruk av etanolekstraksjon. Dette vil muliggjøre bruk av restråstoff med relativt lave nivå polare lipider inn i en ekstraksjonsprosess.

9.1.2 Prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider

Optimal vann% i etanolfase ved ekstraksjon av fosfolipider fra spraytørket silderogn er funnet å være i området 11,3 %. Temperatur i området 20-60 °C ble ikke funnet å ha signifikant effekt på utbytte. Etanol-vann som løsemiddel gir økende co-ekstraksjon av salt og protein med økende vannprosent.

Patentsøk har dokumentert at det generelle prinsipp for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn (dvs. bruk av et polart løsemiddel som etanol-vann) og ekstraksjon av våt eller tørket rogn er beskrevet i patentlitteraturen. Bruk av lavtemperatur tørketeknikk (<70 °C) og spesielt frysetørking er nevnt i patentkrav, men ikke bruk av spraytørking ved høy temperatur (>200 °C) som anvendt i dette studiet.

9.1.3 Utbytte for produksjon av fosfolipider

Høyeste oppnådde utbytte lipidekstrakt ved bruk av ett ekstraksjonstrinn er 200 g/kg tørket rogn. Sammenlignet med kloroform-metanol ekstraksjon var det mulig å ekstrahere 84 % av fosfolipidene. Tilnærmet kvantitativ ekstraksjon kan oppnås gjennom vasking av filterkaken, men dette vil også øke driftskostnadene. Vann% i etanolfasen ved optimum utbytte for de individuelle fosfolipidene varierte mellom 9,7 % (PC) og 19,6 % (LPE). Den anvendte fremgangsmåte gir et lipidekstrakt med >65 % fosfolipider, 31 % n-3 PUFA, og et lavt oksidasjonsnivå (peroksidtall 4 m.ekv./kg).

Direkte ekstraksjon av våt rogn ga 25 % lavere utbytte av ekstrakt og fosfolipider sammenlignet med spraytørket rogn basert på samme betingelser. Fordeling av lipidklasser i de to ekstraktene viste ingen signifikante forskjeller, men det er funnet et litt lavere nivå (0,6 %) av EPA+DHA i ekstrakt basert på spraytørket rogn.

9.1.4 Stabilisering av fosfolipider i ren form

Basert på et faktorielt forsøk med antioksidantene naturlige tokoferoler og rosmarinekstrakt, er det funnet best effekt av rosmarinekstrakt. Tilsetting av tokoferoler alene eller i kombinasjon med rosmarinekstrakt ga henholdsvis dårligere eller ingen tilleggseffekt. Kontrollprøve uten tilsatt antioksidant kom dårligst ut, men viste en uvanlig lav og lineær utvikling av peroksider med nivå etter 4 uker på kun 10 m.ekv./kg.

Forsøk på å finne et optimum for dosering av rosmarinekstrakt ga ikke klare svar på effekt av å tilsette denne antioksidanten. Ingen av prøvene tilsatt rosmarinekstrakt kom bedre ut enn kontrollprøven etter 28 dagers lagring ved 40 °C. Prøve tilsatt 935 ppm rosmarinekstrakt (R3) kom like godt ut som kontroll, men gir ingen tilleggseffekt på stabilitet.

Sammenlignes kontrollprøver uten antioksidant fra screening- og optimaliseringsforsøket viser sistnevnte bedre stabilitet. Årsak til dette er ikke kjent, men en viktig faktor kan være de anvendte ekstraksjonsbetingelser ved fremstilling av de to lipidekstraktene, hhv. basert på 100 % etanol og etanol med 11,3 % vann. Dette har gitt høyere nivå co-ekstrahert protein i sistnevnte prøve (hhv. 1,4 og 3,5 %) og kan være en faktor med betydning for oksidasjonsstabilitet.

9.1.5 Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje

Viskositet i lipidekstraktet kan reduseres gjennom tilsetting av f.eks. makrellolje. Ved tilsetting av olje til etanolfasen før fjerning av siste rest ble det oppnådd et homogent produkt med 65 % lipidekstrakt. Ved mekanisk innblanding av olje ble det oppnådd et homogent produkt ved 50 % innblanding. 65 % ga faseskilling av produktet ved henstand.

9.1.6 Farge og oksidasjonstall i ekstraherte fosfolipider, samt nivå av aktuelle uønskede stoffer

Lipidekstrakter basert på 0-40 % vann i etanolfasen ga produkter med en lys gul farge. Etter frysetørking av ekstraktene ble det oppnådd produkter som varierte fra en granulert form til fint pulver ved økende vann%. Det er ikke funnet noen systematisk effekt av vann% på farge.

Lipidekstrakt basert på optimale betingelser hadde et lavt peroksidtall på kun 4 m.ekv./kg. Dette bekrefter at den anvendte fremgangsmåte resulterte i lav oksidasjonsgrad.

Nivå av miljøgifter i silderogn er generelt funnet å være lave og godt under gjeldende grenseverdier. Persistente organiske miljøgifter (POPs) ekstraheres kvantitativt og det er funnet tilnærmet samme nivå i ekstrakt som på lipidbasis i rognen. For tungmetallene kadmium, bly og kvikksølv er det funnet lavere nivå i lipidekstrakt enn på lipidbasis i rognen. Arsen er funnet å bli tilnærmet kvantitativt ekstrahert, mens selennivået er betydelig lavere i ekstrakt sammenlignet med nivå på lipidbasis i rognen.

10 Hovedfunn

1. Grakse fra prosessering av makrellavskjær inneholder lave nivå fosfolipider og er mindre egnet for produksjon av fosfolipider sammenlignet med restråstoff fra sild og spesielt umoden silderogn.

2. Optimalt nivå vann i etanolfasen under ekstraksjon av spraytørket umoden silderogn er funnet å være 11,3 %. Temperatur i området 20-60 °C har ingen innflytelse på utbytte av fosfolipider. Den anvendte fremgangsmåte gir et lipidekstrakt med >65 % fosfolipider, 31 % n-3 PUFA, og et lavt oksidasjonsnivå (peroksidtall 4 m.ekv./kg).

3. Ekstraksjon av umoden silderogn ved optimale betingelser gir et utbytte fosfolipider på 83,6 %. Dette kan økes ytterligere ved bruk av høyere andel løsemiddel eller vasking av filterkaken. Direkte etanolekstraksjon av våt rogn ved de samme betingelser gir 25 % lavere utbytte av fosfolipider.

4. Etanolekstraksjon gir økende co-ekstraksjon av salt og protein med økende nivå vann i etanolfasen. Dette påvirker i liten grad farge, men i noen grad produktets fysiske egenskaper (granulat til pulverform). Ved tilsetting av 35 % raffinert makrellolje før fjerning av etanol i ekstraktet kan det lages et homogent flytende produkt med akseptabel viskositet for videre håndtering.

5. Lipidekstrakt basert på silderogn inneholder lave nivå organiske miljøgifter (POPs) og tungmetaller godt under gjeldende grenseverdier.

11 Leveranser

11.1 Rapporter, foredrag, faktaark

Oterhals, Å. (2019). Ekstraksjon av fosfolipider. Foredrag seminar Pelagisk Løft – økt bearbeiding av makrell, 7. januar 2020. Radisson Blue Royal Hotel, Bergen.

Oterhals, Å, Thoresen, L. (2021). Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat. Nofima Rapport 11/2021.

Oterhals, Å, Thoresen, L. (2022). Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider i silderogn. Nofima rapport 10/2022.

Oterhals, Å, Thoresen, L., Haugen, J.-E. (2022). Oksidasjonsstabilitet av fosfolipider ekstrahert fra silderogn. Nofima rapport 14/2022.

Oterhals, Å., Thoresen, L. (2022). Optimization of a herring roe lipid extraction process. Foredrag 31st Nordic Lipidforum Symposium, Ålesund 12-15 Juni 2022.

Oterhals, Å., Thoresen, L., Haugen, J.-E. (2022). Utnyttelse av restråstoff fra makrell og sild, ekstraksjon av fosfolipider – Faglig sluttrapport. Nofima rapport 18/2022.

Faktaark (2022) - Utnyttelse av restråstoff fra makrell og sild, ekstraksjon av fosfolipider.

PPT-presentasjon til bruk for næringen og andre interessenter (2022).

Administrativ sluttrapport (2022).

11.2 Industrirettede leveranser

1) Nivå og variasjon i fosfolipidnivå i restråstoff, silderogn, grakse, limvann og råolje.
    - Detaljer gitt under §6.1 og i Nofima rapport 11/2021 (Oterhals og Thoresen, 2021).
2) Fordeling av fosfolipider i grakse, limvann/hydrolysat og råolje basert på konvensjonell og hydrolysebasert nedstrømsprosess.
    - Detaljer gitt under §6.1 og i Nofima rapport 11/2021 (Oterhals og Thoresen, 2021).
3) Prosessoppskrift for kostnadseffektiv ekstraksjon av fosfolipider
    - Detaljer gitt under §6.2 og i Nofima rapport 10/2022 (Oterhals og Thoresen, 2022).
4) Utbytte av fosfolipider og innhold av andre lipidklasser.
    - Detaljer gitt under §6.2 og i Nofima rapport 10/2022 (Oterhals og Thoresen, 2022).
5) Nivå og variasjon i farge, oksidasjonstall og uønskede stoffer i fosfolipider.
    - Detaljer gitt under §6.3 og 6.6 og Nofima rapport 10/2022 (Oterhals og Thoresen, 2022).
6) Prosessoppskrift for reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje.
    - Detaljer gitt under §6.4 og i Nofima rapport 10/2022 (Oterhals og Thoresen, 2022).
7) Prosessoppskrift for stabilisering av fosfolipider.
    - Detaljer gitt under §8 og i Nofima rapport 14/2022 (Oterhals et al., 2022).
8) Gjennomgang av patentlitteratur for å evaluere mulige IPR-konflikter.
    - Detaljer gitt under §7 og i Nofima rapport 10/22 (Oterhals og Thoresen, 2022).

12 Referanser

AOCS Official Method Cd 8b – 90. Peroxide value. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 5th ed.; Firestone, D., Ed.; AOCS Press: Champaign, IL*, 1998.

AOCS Official Method Ce 1b-89. Fatty acid composition by GLC. Marine oils.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917.

EU (2019). Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. Consolidated version 28.11.2019. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20191128&from=EN.

FOR-2015-07-03-870: Forskrift om visse forurensende stoffer i næringsmidler, § 3 Gjennomføring av forordning (EF) nr. 1881/2006. https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-07-03-870.

Frantzen, S., Måge, A., Arnholt Iversen, S., Julshamn, K. (2011). Seasonal variation in the levels of organohalogen compounds in herring (Clupea harengus) from the Norwegian Sea. Chemosphere 85:179–187.

Frantzen, S., Maage, A., Duinker, A., Julshamn, K., Iversen, S.A., (2015). A baseline study of metals in herring (Clupea harengus) from the Norwegian Sea, with focus on mercury, cadmium, arsenic and lead. Chemosphere 127:164–170.

Haouet, M.N., Altissimi, M.S., Framboas, M., Galarini, R. (2006). Validation of the Volhard method for chloride determination in food. Accred Qual Assur 11: 23–28.

Haugen, J.E. (2018). Komponenter i råolje fra makrell restråstoff som bidrar til lukt og smak, Nofima rapport 40/2018.

Haugen J.E., Thoresen, L., Meisland, A. og Å. Oterhals (2019). Bleking og vinterisering av råolje fra makrell restråstoff, Nofima rapport 37/2019.

ISO 6496. Animal feeding stuffs - Determination of moisture and volatile matter content. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.

ISO 5983-2:2009. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 2: Block digestion and steam distillation method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization (ISO); 2009.

ISO 5984:2002. Animal feeding stuffs – Determination of crude ash. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization (ISO); 2002.

Kjerstad, M., Barnung, T., Mildenberger, J., Carvajal, A., Fugledal Remme, J., (2019). Sluttrapport: Kartlegging av oksidasjonsstatus i råolje produsert fra makrellavskjær. Rapport nr. MA 19-08; FHF-prosjekt 901317.

Knutsen, H.K., Alexander, J. et al. (2018). Assessment of a decontamination process for dioxins and PCBs from fish meal by replacement of fish oil. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal 16(2):5174.

Larssen, W.E., Fylling, T.S., Kvangarsnes, K., & Barnung, T. (2014). Råstoffanalyse av rogn fra norsk vårgytende sild og nordsjøsild (MA 14-20). Møreforsking.

Liu, H.J., Chang, B.Y., Yan, H.W., Yu, F.H., Liu, X.X. (1995), Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimedyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, Journal of AOAC International, Vol. 78, No. 3, pp. 736-744.

Moriya, H., Kuniminato, T., Hosokawa, M., Fukunaga, K., Nishiyama, T., Miyashita, K., (2007). Oxidative stability of salmon and herring roe lipids and their dietary effect on plasma cholesterol levels of rats. Fisheries Science 73:668-674.

Nilsen, B., Wiech, M., Sanden, M. (2020). Miljøgifter i fisk og fiskevarer 2019. Organiske miljøgifter, tungmetaller, 3-MCPD og glysidylestere i marine oljer til humant konsum. Rapport fra Havforskningen Nr.: 2020-25. Havforskningsinstituttet, pp. 19.

Næss, S., Aakre, I., Lundebye, A.K., Ørnsrud, R., Kjellevold, M., Wik Markhus, M., Dahl, L. (2020). Mercury, lead, arsenic, and cadmium in Norwegian seafood products and consumer exposure. Food Additives & Contaminants: Part B. 13:99–106.

Opstvedt, J. and Hansen, P. (1977). Fish-protein in nutrition of young calf.1. Low fat, hexane-extracted herring meal (Norsamin) in milk replacers for veal calves. Acta Agriculturae Scandinavica 27(3):197-215.

Oterhals, Å., Nygård, E., 2008. Reduction of Persistent Organic Pollutants in Fishmeal: A Feasibility Study. J. Agric. Food Chem. 56:2012–2020.

Oterhals, Å., Kvamme, B., Berntssen, M.H.B., 2010. Modelling 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. og Haugen, J.-E., 2022. Oksidasjonsstabilitet av fosfolipider ekstrahert fra silderogn. Nofima rapport 14/2022.

Oterhals, Å. og Thoresen, L., 2021. Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat. Nofima rapport 11/2021.

Oterhals, Å. og Thoresen, L. 2022. Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn. Nofima rapport 10/2022.

Young, F. V. K., 1986. The chemical & physical properties of crude fish oils for refiners & hydrogenators. IAFMM Fish Oil Bulletin No. 18, IFOMA, London, UK.

Zailer, E., Monakhova, Y.B., Diehl, B.W.K., 2018. ^{31}P NMR Method for Phospholipid Analysis in Krill Oil: Proficiency Testing—A Step toward Becoming an Official Method. J Am Oil Chem Soc 95:1467–1474.

13 Vedlegg

Danisco GUARDIAN™ Rosemary Extract 201	Vedlegg 1-2
Danisco GUARDIANTM TOCO 50	Vedlegg 3-4
POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441	Vedlegg 5
POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #1157	Vedlegg 6
POPs og tungmetaller i etanolekstakt rogn batch #0441	Vedlegg 7

CULTURES DIVISION
www.danisco.com

Page 1 / 3

Valid from: August 29, 2017

DANISCO
First you add knowledge...

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*	4.1 - 4.8 %
Form at 25°C	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.

DANISCO
First you add knowledge...

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.

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.

CULTURES DIVISION
www.danisco.com

Page 1 / 3

Valid from: December 15, 2016

DANISCO
First you add knowledge...

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), stiring 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

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.

DANISCO
First you add knowledge...

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.

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.

Nofima

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441. Vedlegg 5

Customer ID: Silderogn-batch 0441 (frysetørket)
SINTEF ID: 2022-164

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,140	0,0126	9,0	0,195	0,0135	6,9
WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,155	0,0219	14,1	0,155	0,0219	14,1
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,295	0,0252	7,9	0,350	0,0257	7,4
Sum NDL-PCB (ng/g)	2,32	0,265	11,4	2,32	0,265	11,4

Analyte	LOQ (pg/g)	Individual results: Conc. (pg/g)	±	± U (pg/g)	Individual results, TEQ: TEF-value	Conc. (TEQ pg/g)	±	± U (TEQ pg/g)
2378-TCDD	0,0195	<LOQ	±	n/a	1	<LOQ	±	n/a
12378-PeCDD	0,0195	0,029	±	0,005	1	0,029	±	0,0050
123478-HxCDD	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDD	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDD	0,0399	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDD	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDD	0,123	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Dioxins (pg/g)		0,0290	±	0,0050	*Sum Dioxins -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,0290	±	0,0050
2378-TCDF	0,0102	0,475	±	0,063	0,1	0,048	±	0,0063
12378-PeCDF	0,0246	0,061	±	0,007	0,03	0,002	±	0,0002
23478-PeCDF	0,0246	0,206	±	0,032	0,3	0,062	±	0,0096
123478-HxCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
234678-HxCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
1234789-HpCDF	0,0493	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDF	0,123	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Furans (pg/g)		0,742	±	0,0713	*Sum Furans -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,111	±	0,0115
Sum PCDD/F (pg/g)		0,771	±	0,0714	**WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**0,140**	**±**	**0,0126**
PCB-77	0,0255	2,94	±	0,576	0,0001	0,0003	±	0,0001
PCB-81	0,0255	0,058	±	0,013	0,0003	0,0000	±	0,0000
PCB-126	0,0501	1,22	±	0,215	0,1	0,1220	±	0,0215
PCB-169	0,0255	0,540	±	0,118	0,03	0,0162	±	0,0035
PCB-105	0,408	128	±	23,4	0,00003	0,0038	±	0,0007
PCB-114	0,204	15,20	±	4,96	0,00003	0,0005	±	0,0001
PCB-118	0,204	306	±	75,6	0,00003	0,0092	±	0,0023
PCB-123	0,204	<LOQ	±	n/a	0,00003	<LOQ	±	n/a
PCB-156	0,204	20,40	±	3,33	0,00003	0,0006	±	0,0001
PCB-157	0,204	7,32	±	1,59	0,00003	0,0002	±	0,0000
PCB-167	0,204	71,80	±	17,4	0,00003	0,0022	±	0,0005
PCB-189	0,204	1,31	±	0,237	0,00003	0,0000	±	0,0000
Sum DL-PCB (pg/g)		555	±	81,3	*WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,155	±	0,022
Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g)		556	±	81,3	**)-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**0,295**	**±**	**0,025**
PCB-28	0,204	232	±	86,3				
PCB-52	0,204	458	±	80,6				
PCB-101	0,408	510	±	113				
PCB-138	0,408	448	±	165				
PCB-153	0,408	557	±	124				
PCB-180	1,00	112	±	24,9				
Sum NDL-PCB (pg/g)		2317	±	265				

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	1,4	27
Cd	0,00035	0,022	31
Pb	0,0025	0,0028	29
Hg	0,0040	0,017	27
Se	-	2,9	-

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #1157

Vedlegg 6

Customer ID: Silderogn-batch 1157 (frysetørket)
SINTEF ID: 2022-165

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,0468	0,0047	10,1	0,123	0,0077	6,3
WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,0744	0,0114	15,3	0,0744	0,0114	15,3
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,121	0,0123	10,1	0,198	0,0137	7,0
Sum NDL-PCB (ng/g)	0,850	0,095	11,2	0,850	0,095	11,2

Analyte	LOQ (pg/g)	Individual results: Conc. (pg/g)	± U (pg/g)		Individual results, TEQ: TEF-value	Conc. (TEQ pg/g)	± U (TEQ pg/g)	
2378-TCDD	0,0199	<LOQ	±	n/a	1	<LOQ	±	n/a
12378-PeCDD	0,0199	<LOQ	±	n/a	1	<LOQ	±	n/a
123478-HxCDD	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDD	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDD	0,0407	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDD	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDD	0,125	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Dioxins (pg/g)		<LOQ	±	n/a	*Sum Dioxins -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	<LOQ	±	n/a
2378-TCDF	0,0104	0,267	±	0,036	0,1	0,027	±	0,004
12378-PeCDF	0,0251	<LOQ	±	n/a	0,03	<LOQ	±	n/a
23478-PeCDF	0,0502	0,067	±	0,010	0,3	0,020	±	0,003
123478-HxCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
234678-HxCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
1234789-HpCDF	0,0502	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDF	0,125	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Furans (pg/g)		0,334	±	0,037	*Sum Furans -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,0468	±	0,0047
Sum PCDD/F (pg/g)		0,334	±	0,037	**WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**0,0468**	**±**	**0,0047**
PCB-77	0,0260	2,49	±	0,489	0,0001	0,0002	±	0,000
PCB-81	0,0260	0,045	±	0,010	0,0003	0,0000	±	0,000
PCB-126	0,0511	0,64	±	0,113	0,1	0,0641	±	0,011
PCB-169	0,0260	0,137	±	0,030	0,03	0,0041	±	0,001
PCB-105	0,415	47	±	8,67	0,00003	0,0014	±	0,000
PCB-114	0,208	5,13	±	1,67	0,00003	0,0002	±	0,000
PCB-118	0,208	108	±	26,7	0,00003	0,0032	±	0,001
PCB-123	0,208	<LOQ	±	n/a	0,00003	<LOQ	±	n/a
PCB-156	0,208	6,82	±	1,11	0,00003	0,0002	±	0,000
PCB-157	0,208	2,56	±	0,56	0,00003	0,0001	±	0,000
PCB-167	0,208	27,60	±	6,71	0,00003	0,0008	±	0,000
PCB-189	0,208	0,37	±	0,068	0,00003	0,0000	±	0,000
Sum DL-PCB (pg/g)		201	±	28,9	*WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,0744	±	0,011
Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g)		202	±	28,9	**)-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**0,121**	**±**	**0,012**
PCB-28	0,208	114	±	42,4				
PCB-52	0,208	196	±	34,5				
PCB-101	0,415	183	±	40,6				
PCB-138	0,415	142	±	52,3				
PCB-153	0,415	182	±	40,6				
PCB-180	1,02	33	±	7,28				
Sum NDL-PCB (pg/g)		850	±	95				

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	1,3	27
Cd	0,00035	0,007	31
Pb	0,0025	<LOQ	29
Hg	0,0040	0,0057	27
Se	-	3,2	-

POPs og tungmetaller i etanolekstrakt rogn batch #0441

Vedlegg 7

Customer ID: Etanolekstrakt av silderogn-LATH-2-82
SINTEF ID: 2022-166

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,696	0,0619	8,9	0,869	0,0638	7,3
WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	0,710	0,100	14,1	0,710	0,100	14,1
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)	1,41	0,118	8,4	1,58	0,119	7,5
Sum NDL-PCB (ng/g)	10,3	1,26	12,3	10,3	1,26	12,3

Analyte	LOQ (pg/g)	Individual results Conc. (pg/g)	±	± U (pg/g)	Individual results, TEQ TEF-value	Conc. (TEQ pg/g)	±	± U (TEQ pg/g)
2378-TCDD	0,0619	<LOQ	±	n/a	1	<LOQ	±	n/a
12378-PeCDD	0,0619	0,192	±	0,033	1	0,192	±	0,033
123478-HxCDD	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDD	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDD	0,127	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDD	0,156	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDD	0,390	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Dioxins (pg/g)		0,1920	±	0,0332	*Sum Dioxins -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,192	±	0,0332
2378-TCDF	0,0323	2,140	±	0,285	0,1	0,214	±	0,028
12378-PeCDF	0,0781	0,300	±	0,037	0,03	0,009	±	0,001
23478-PeCDF	0,0781	0,935	±	0,146	0,3	0,281	±	0,044
123478-HxCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123678-HxCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
123789-HxCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
234678-HxCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,1	<LOQ	±	n/a
1234678-HpCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
1234789-HpCDF	0,156	<LOQ	±	n/a	0,01	<LOQ	±	n/a
OCDF	0,390	<LOQ	±	n/a	0,0003	<LOQ	±	n/a
Sum Furans (pg/g)		3,375	±	0,322	*Sum Furans -TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,504	±	0,0522
Sum PCDD/F (pg/g)		3,567	±	0,324	**WHO-PCDD/F-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**0,696**	**±**	**0,0619**
PCB-77	0,0808	13,7	±	2,69	0,0001	0,0014	±	0,000
PCB-81	0,0808	0,249	±	0,056	0,0003	0,0001	±	0,000
PCB-126	0,159	5,58	±	0,982	0,1	0,5580	±	0,098
PCB-169	0,0808	2,49	±	0,543	0,03	0,0747	±	0,016
PCB-105	1,29	606	±	111	0,00003	0,0182	±	0,003
PCB-114	0,646	53,8	±	17,5	0,00003	0,0016	±	0,001
PCB-118	0,646	1387	±	343	0,00003	0,0416	±	0,010
PCB-123	0,646	<LOQ	±	n/a	0,00003	<LOQ	±	n/a
PCB-156	0,646	93,2	±	15,2	0,00003	0,0028	±	0,000
PCB-157	0,646	31,9	±	6,92	0,00003	0,0010	±	0,000
PCB-167	0,646	358	±	87,0	0,00003	0,0107	±	0,003
PCB-189	0,646	6,27	±	1,13	0,00003	0,0002	±	0,000
Sum DL-PCB (pg/g)		2558	±	371,3	*WHO-DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)*	0,710	±	0,100
Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g)		2562	±	371,3	**)-PCDD/F+DL-PCB-TEQ$_{2005}$ (pg/g)**	**1,41**	**±**	**0,118**
PCB-28	0,646	887	±	330				
PCB-52	0,646	1962	±	345				
PCB-101	1,29	2420	±	537				
PCB-138	1,29	2543	±	936				
PCB-153	1,29	1920	±	428				
PCB-180	3,18	524	±	116				
Sum NDL-PCB (pg/g)		10256	±	1261				

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	6,0	27
Cd	0,00034	<LOQ	31
Pb	0,0025	<LOQ	29
Hg	0,0039	<LOQ	27
Se	-	3,0	-