

Ekstrakter av tangmel og krekling som naturlige antioksidanter

av

Anders Kvaløy Olsen

Fiskerikandidatoppgave
Studieretning marine næringsmidler
(60 stp)

Institutt for marin bioteknologi
Norges fiskerihøgskole
Universitetet i Tromsø
Mai 2007



Forord

Fiskerikandidat. Tenk det! Endelig er jeg fiskerikandidat! Min tilværelse som student i Tromsø avsluttes med denne oppgaven og jeg kan se tilbake på fem begivenhetsrike.

Forsøkene er utført ved Institutt for marin bioteknologi (IMAB) ved Norges fiskerihøgskole i tett samarbeid med Ingvill Aagesen Dreiem. Hun har med samme metoder undersøkt ekstrakter av blåbær og blåskjell.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Edel Elvevoll for inspirerende og særdeles god veiledning. Takk til Ingvill for at du har holdt ut med meg (Melk!).

Takk til Hanne Mære og Svein Kristian Stormo som har hjulpet meg med analysearbeidet. Takk til MariCom for å gjøre det økonomisk mulig med bedriftsbesøk til Kristiansund med FHF-stipend. Takk til Fortuna Oils for gjestfrihet og litervis med selolje. Takk til David Benjaminsen som var behjelpelig med tangmel. Takk til Børge, Tina og Ingvill for omhyggelig gjennomlesing.

Og til slutt en stor takk til alle som har vært med å gjøre studietiden ved Norges fiskerihøgskole til et eventyr!

Tromsø, juni 2007

Anders Kvaløy Olsen

Sammendrag

Det har i de siste 30-40 årene vært en bred søken etter alternative naturlige antioksidanter som kan erstatte syntetiske antioksidanter i næringsmidler. Enkelte syntetiske antioksidanter har vist seg å være skadelige i store mengder. Blant forbrukere er det en generell skepsis mot syntetiske stoffer i mat.

Samtidig anbefales det å øke inntaket av både mager og feit fisk og å få i seg mellom 190 til 650 mg langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer (LC n-3 PUFA) per uke. Marine oljer i flytende eller kapselform kan være et godt alternativ for folk som ikke får i seg nok fisk eller annen sjømat.

I oppgaven har antioksidative effekter av ekstrakter fra krekling og tangmel blitt studert. Disse ekstraktene ble testet for antioksidativ kapasitet gjennom lagringsforsøk med vandige systemer, emulsjonssystem og i fettsystem. Grad av oksidasjon ble målt som peroxid-innhold (PV) og innhold av anesidinkomplekserende forbindelser (AV)

Selolje er blitt analysert med hensyn til stabilitet og fettsyresammensetning. Innledende undersøkelser av optimal konsentrasjon av α - tokoferol i selolje ble foretatt.

Tangmelet viste seg å ha god effekt i et vandig system, mens virket prooksidantisk i fettsystem. Kreklige ekstraktet viste svak effekt i vandig system og ingen merkbar effekt i fettsystem. Innledende forsøk for optimal konsentrasjon av α - tokoferol i selolje ble beregnet til å være <200 ppm i et provosert system.

English summary

In the past 3-4 decades there has been a search for new alternative, natural antioxidants in replacement of synthetic ones.

In this master thesis methanol extracts made of crowberry and seaweed-flour have been investigated for antioxidant capacity in oil-, water- and emulsion systems. Degree of oxidation was measured as p-Anisedin-value (AV) and Peroxid-value (PV). The Seaweed-flour extract showed great effect in a water system, but was pro-oxidative in a oil system. Crowberry extract showed poor effect in a water system and no perceptible effects in a oil system.

Innholdsfortegnelse

1.0 Bakgrunn	9
2.0 Teori	11
2.1 Fettsyrer.....	11
2.2 Marine oljer.....	12
2.2.1 Selolje.....	12
2.2.2 Raffinering	13
2.2.3 Helsemessige fordeler med marine oljer.....	13
2.2.4 Anbefalt inntak av LC n-3 PUFA	14
2.3 Oksidasjon – ikke-enzymatisk forringelse av fettsyrer.....	15
2.4 Antioksidanter	18
2.4.1 Organiske syrer	19
2.4.2 Flavonoid - polyfenoler.....	19
2.4.3 Vitamin E – tokoferoler og tokotrienoler.....	20
2.4.4 Synergieffekter	21
2.5 Naturlige ekstrakter	22
2.5.1 Tang og tare.....	22
2.5.2 Krekling.....	23
2.6 Funksjonell mat.....	25
2.7 Emulsjoner	25
2.7.1 ”Det polare paradoks”	26
3.0 Material og metode.....	27
3.1 Materialer	27
3.2 Metoder	27
3.2.1 Tørrstoff	27
3.2.2 pH.....	27
3.2.3. Ekstraksjon	27
3.2.4 Innhold av polyfenoler	28
3.3 Karakterisering av selolje.....	29
3.3.1 Fettsyreanalyser.....	29
3.3.2 Vektøkning.....	29
3.4 Måling av antioksidative effekter.....	30
3.4.1 Antioksidative effekter i vannløsning.....	30
3.4.2 Antioksidative effekter i emulsjon	31
3.4.3 Antioksidative effekter i fettssystem.....	32
4.0 Resultat og diskusjon	35
4.1 Tilvirkning av ekstraktene.....	35
4.1.1 Tørrvekt.....	35
4.1.2 pH.....	36
4.1.3 Innhold av polyfenoler	36
4.2 Karakterisering av selolje.....	37
4.2.1 Vektøkningforsøket	37
4.2.2 Oksidasjonens innvirkning på fettsyresammensetning.....	38
4.3.1 Ekstrakter i vandig system	40
4.3.2 Ekstrakter i emulsjon.....	41
4.3.3 Ekstrakter i fettssystem.....	43

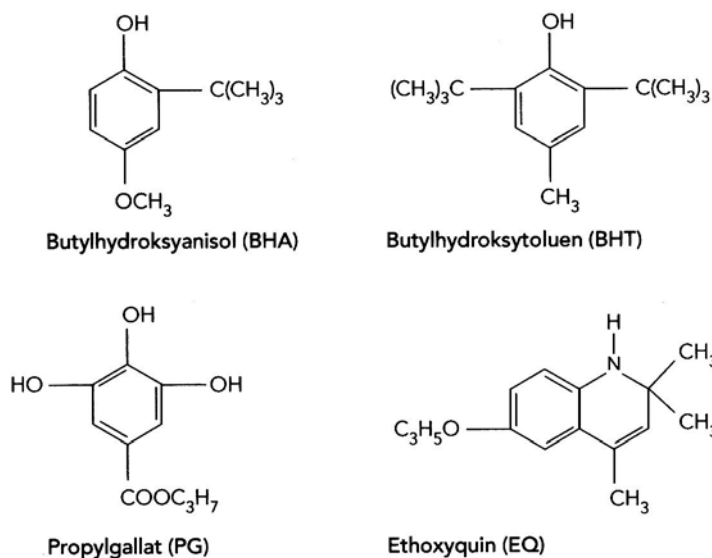
4.4 Evaluering av ekstraktene	45
4.5 Optimalt nivå av α -tocoferol i selolje.....	48
5.0 Konklusjon	51
6.0 Referanseliste	53

Forkortelser

BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
TBHQ	Tert-butylhydroquinone
EQ	Ethoxyquin
ADI	Akseptabelt daglig inntak
FRAP	Ferric-reducing ability of plasma
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
DPPH•	2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate
LDL	Low-density lipoprotein
LC n-3 PUFA	Langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer
VKM	Vitenskapskomiteen for Mattrygghet
EPA	Eicosapentaensyre
DHA	Docosaheksaensyre
DPA	Docosapentaensyre
CVD	Hjerte- og karesykdommer
AV	Innhold anisidinkomplekserende komponenter
PV	Peroksid-innhold
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO	World Health Organization
GAE	Gallic acid equivalents content
FID	Flammeioniserende detektor
DHR	Dihydrorhodamine- 1,2,3

1. Bakgrunn

Syntetiske antioksidanter tilsettes fettholdige matvarer for å motvirke oksidativ harskning. Felles for dem er at de ikke finnes naturlig, men framstilles syntetisk. De viktigste syntetiske antioksidantene som brukes i næringsmiddelindustrien er; BHA (butylated hydroxyanisole, E 320), BHT (butylated hydroxytoluene, E 321) og TBHQ (tert-butylhydroquinone). I tillegg har vi Ethoxyquin (EQ) som bare brukes i dyrefôr. Alle er fenoliske forbindelser med unntak av EQ som er et amin (figur 1).



Figur 1. Strukturell oppbygning for våre viktigste syntetiske antioksidanter.

I tillegg til å være effektive antioksidanter har disse stoffene vist seg å påvirke en rekke biologiske funksjoner negativt. BHA fører eksempelvis til redusert kroppsvekst og senke aktivitet til flere enzymer hos dyr som fôres med ekstremt store doser (500 - 600 mg/kg kroppsvekt)(Aune 2007). Av rotter som ble fôret med 2 % BHA i kosten fikk 30 % kreft i formagen (Ito *et al.* 1986). Akseptabelt daglig inntak (ADI) for BHA ligger på 0-0,5 mg/kg kroppsvekt (Aune 2007).

Ensidig bruk av naturlige antioksidanter, som for eksempel tokoferoler, kan også være problematisk. Vi vet at for høy tilsetning av antioksidanter virker prooksidantivt på lipider *in vitro* og det spekuleres i om et for høyt konsum på samme måte kan økt gi oksidasjon *in vivo*. I tillegg kan overdrevent inntak av α -tokoferol gi blødninger (Aune 2007).

En generell oppfatning og målsetning de siste tiårene har vært å minimere bruken av syntetiske tilsetningsstoffer i mat. Markedet for økologiske produkter som er frie for syntetiske

stoffer er voksende. Innen akvakultur ser man også et stort potensiale i å kunne tilby økologisk fisk – oppdrettet uten bruk av syntetiske antioksidanter i fôret. (Pers.med. Pettersen 2006)

Man antar at naturlige antioksidanter har antikarsinogen effekt gjennom å beskytte kroppen fra biologisk oksidasjon (Halliwell *et al.* 1995). Stoffer som virker som antioksidanter *in vivo* har også vist seg å være gode alternativer for å beskytte lipider i næringsmidler fra oksidasjon (Havsteen 2002).

Ved Universitetet i Oslo har Halvorsens *et. al* (2002) kartlagt det totale innholdet av antioksidanter i en rekke matplanter ved hjelp av *ferric-reducing ability of plasma* (FRAP-analyse). I analysen måles summen av alle antioksidanter over et referanseredokspotensial og uttrykkes som den totale konsentrasjonen av elektroner og hydrogenatomer som kan avgis i en redoksreaksjon. Krekling viste her en høy andel antioksidanter.

Tang og andre fotosyntetiserende organismer er utsatt for frie radikaler og reaktive oksygenforbindelser (ROS). Tangens resistens mot oksidative skader og dens stabilitet mot oksidasjon ved lagring indikerer at den har et svært effektivt beskyttende antioksidativt system. Jimenez og medarbeidere (2001) har kartlagt antioksidative effekter fra ekstrakter av prosessert og rå spiselige alger gjennom scavenging (radikalterminering) av DPPH• (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate), FRAP-analyse, *in vivo*-studier på low-density lipoprotein (LDL) og totalt innhold polyfenoler med Folin-Ciocalteu-metoden. Det ble vist korrelasjon mellom scavenging kapasitet og innhold av polyfenoler. Brunalger viste bedre effekt enn rødalger og spesielt brunalgene *Fucus* viste høyest antioksidativ kapasitet (Jimenez-Escrig *et al.* 2001).

Hensikten med dette arbeidet har vært å studere antioksidative effekter av ekstrakter fra krekling og tangmel. Krekling ble valgt på grunnlag av det høye totale innhold av antioksidanter. I tillegg er det et bær som det finnes mye av i Nord-Norge og som beskattes i beskjeden grad. Tangmel, som er en billig og lite utnyttet ressurs, vil i denne oppgaven bli undersøkt nærmere med hensyn til antioksidative effekter.

Selolje ble benyttet som marin komponent både som olje og som olje-i-vann-emulsjoner. I tillegg ble ekstraktene effekt testet ut i et vandig system.

2. Teori

2.1 Fettsyrer

Fettsyrer består av en karboksylgruppe (COOH), en uforgrenet hydrokarbonkjede med 4 til 36 C-atomer og en metylgruppe i den andre enden (CH₃).

Fettsyrenes metningsgrad, lengde og konfigurasjon er med på å gi fett sine spesifikke fysiske egenskaper. De bestemmer også om fett er av ernæringsmessig god eller dårlig karakter. Fettes smeltepunkt stiger med økende antall C-atomer i kjeden og synker med økende antall dobbeltbindinger. Dette er fordi mettede fettsyrer er rettete og kan dermed pakkes tettere sammen. Av dagens kostholdsanbefalinger basert på ernæringsmedisinsk forskning, rådes det til å redusere inntaket av korte-, mettede- og *trans*-fettsyrer. *Trans*-fettsyrer bør være mindre enn 1 % av inntatt energi (Johansson 2006). Man bør øke inntaket av flerumettede fettsyrer (PUFA) (VKM 2006).

Dobbeltbinding mellom C-atom 3 og 4 og C-atom 6 og 7 fra metylenden kan ikke syntetiseres av mennesker og dyr. Til det trengs enzymene Δ -12 desaturase og Δ -15 desaturase, noe bare planter og planteplankton har. α -linolensyre C18:3 n-3 og linolsyre C18:2 n-6 er fettsyrer med dobbeltbinding i disse posisjonene. De kalles essensielle fettsyrer og må inntas gjennom føde. Disse fettsyrene er utgangspunktet for videre syntetisering av langkjedede (LC) PUFA - Arakidonsyre (20:4n-6) fra 18:2n-6. I beskjedne skala kan også eicosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og docosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) syntetiseres fra 18:3n-3. Denne syntesen er ikke tilstrekkelig til å dekke kroppens behov, så det beste er å få EPA og DHA direkte inn via kosten.

2.2 Marine oljer

Marine oljer produseres av industrifisk, lever fra fisk og spekk fra marine pattedyr. Disse står i en særstilling på grunn av sin høye andel langkjedede flerumettede n-3 fettsyrer (LC n-3 PUFA). Andelen EPA og DHA er mellom ti til hundre ganger høyere enn for oljer av terrestrisk opprinnelse, og er klart den mest fullverdige kilden av disse fettsyrene.

2.2.1 Selolje

I tillegg til å inneholde en høy andel av EPA og DHA, inneholder fett fra sel også en betydelig andel docosapentaensyre (DPA, 22:5n-3). DPA har på samme måte som EPA og DHA vist å senke risikoen for hjerte- og karesykdommer (CVD) (Mann *et al.* 2006). Sammenlignet med tran ga selolje 30 % høyere opptak av EPA etter 10 måneders konsum av 15 ml olje per dag (Brox *et al.* 2001). Disse to faktorene taler for at selolje kan være en god kilde til langkjedede marine fettsyrer.

Norsk/Canadisk seloljeproduksjon.

Fortuna Oils i Kristiansund er verdens største og Norges eneste seloljeraffineri og står for tilnærmet all produksjon av selolje som etterspørres i Norge. Råoljen oppbevares nedfrost ved fabrikken, og er brunlig av farge når den ankommer.

Først blir oljen bleket med blant annet blekjord og aktivt kull. Pigmenter filtreres ut sammen med tungmetaller og miljøgifter. Deretter varmes oljen før den langsomt kjøles ned mot smeltepunktet for deler av oljen. Prosessen kalles vinterisering eller kaldfiltrering og innebærer at korte og mettede fettsyrer krystalliserer. De danner ”faste partikler” som lett lar seg filtrere ut.

Deoderiseringen fjerner uønsket lukt og smak og resterende miljøgifter. Oljen varmes da opp til 200 – 250 °C i en vakumbeholdere og gasser fjernes sammen med andre flyktige forbindelser. Den kan nå tilsettes vitaminer og antioksidanter og smak om det er ønskelig.

Under hele prosessen tas det ut kvalitetsprøver. Blant annet blir det utført visuell fargetest og nedfellingstest. Oljen skal ikke være misfarget eller danne faste fettkrystaller etter to timer inkubasjon ved et par grader celsius.

Det blir målt innhold av anisidinkomplekserende komponenter (AV), peroksid-innhold (PV) og fettsyresammensetning på det ferdige produktet ved eget laboratorium. Restverdier av miljøgifter og tungmetaller for hver batch analyseres ved eksterne laboratorium.

2.2.2 Raffinering.

Raffinering er en rensing av oljer hvor uønskede komponenter som pigmenter, frie fettsyrer og peroksider fjernes ved termisk dekomponering. Ved raffinering av marine oljer er det spesielt miljøgifter og tungmetaller man ønsker å fjerne. Dette gjøres for å få en trygg og god olje og for å gjøre den mer smaksnøytral. Under raffinering og industriell prosessering av for eksempel olivenolje vil en del beskyttende komponenter, som fenolene tyrosol og hydroxytyrosol, gå tapt. Kaldpresset olivenolje (ekstra virgin) er mer stabil enn en olje som er raffinert, på grunn av et høyere innhold av antioksidanter (Covas *et al.* 2006). Det samme gjelder for de marine oljene der raffinering prosessen helt eller delvis fjerner antioksidanter, pigmenter og vitaminer som finnes i oljen fra naturens side (Elvevoll og Østerud 2006). Et mål for industrien er å minimalisere dette tapet ved å behandle produktet mer skånsomt. De tapte antioksidantene må kompenseres med nye for å stabilisere produktet.

2.2.3 Helsemessige fordeler med marine oljer.

De positive effektene av å spise feit fisk er godt dokumentert og det oppdages stadig flere gode grunner til å sette fisk oftere på middagsbordet.

Undersøkelser av befolkningsdødelighet og kosthold har vist at inntak av LC n-3 PUFA gjennom konsum av sjømat fører til nedgang i dødelighet forårsaket av CVD, hjerteinfarkt, slag og dødelighet generelt. I tillegg gir et slikt økt konsum nedgang i psykiske lidelser og depresjon (Hibbeln *et al.* 2006). Disse konklusjonene støttes av kliniske undersøkelser. Disse viser også at økt inntak av LC n-3 PUFA fører til redusert risiko for å utvikle CVD (Psota *et al.* 2006). Kliniske undersøkelser viser også positiv effekt ovenfor forskjellige inflammatoriske sykdommer og mental helse (Ruxton *et al.* 2004).

De gunstige helsevirkningene av å spise fisk kan ikke bare tilskrives LC n-3 PUFA. Fisk og sjømat generelt inneholder også en rekke andre komponenter som fett- og vannløselige vitaminer, lettfordøyelige proteiner, spesielle aminosyrer (som taurin), antioksidanter, mineraler og sporestoff. Disse er også viktige i beskyttelsen mot CVD og bidrar til å forbedre virkningen av LC n-3 PUFA (Elvevoll og Østerud 2006).

Man har trodd at økt konsum av LC n-3 PUFA kunne ha en positiv virkning på noen former for kreft, men det har vist seg å ikke være tilfellet (MacLean *et al.* 2006). For fortidligfødte barn og barn med lav fødselsvekt har DHA-mangel vært assosiert med langsom utvikling av syn og sein kognitiv utvikling. Man tror at LC n-3 PUFA er en nødvendig del av kostholdet

for en optimal utvikling hos slike barn (Hoffman *et al.* 1993). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) anbefaler at morsmelkstillegg/-erstatning tilsettes n-3 PUFA (Olsen 2007).

2.2.4 Anbefalt inntak av LC n-3 PUFA

De største ernæringsinstitusjoner og -organisasjoner har ulike anbefalninger med hensyn til daglig inntak av LC n-3PUFA. Anbefalingene varierer mellom 190 til 650 mg/dag. Mennesker i risikogruppen for CVD anbefales å konsumere mellom 500 og 1000 mg/dag (Garg *et al.* 2006).

Vitenskapskomiteen for mattrygghet kom i 2006 ut med rapporten ”Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk kosthold”. Her gjøres det en samlet vurdering av ernæringsmessige og toksikologiske aspekter ved konsum av fisk og annen sjømat. Det konkluderes i rapporten at nordmenn generelt bør øke sitt konsum av både feit og mager fisk. Medianen for konsum av fisk blant voksne nordmenn ligger på 65 gram per dag, noe som tilsvarer cirka to måltider fisk i uka.

2.3 Oksidasjon – ikke-enzymatisk forringelse av fettsyrer.

Mye av det følgende er hentet fra Olsens kompendium ”Lipidkjemi – med vekt på fisk” (2007). Et fettholdig produkt mister etter en tid sine ønskelige sensoriske og ernæringsmessige egenskaper - det harskner. Dette fordi fett oksideres i kontakt med luft.

Oksidasjonsforløpet kan deles inn i tre faser: induksjonsfasen, kjedereaksjonen og terminering.

Induksjon

Under induksjonen mister fettsyren et hydrogenatom i en ustabil binding (ofte en dobbeltbinding). Et radikal ($X\bullet$) er et molekyl med uparrede elektroner og er svært reaktivt. Radikalet angriper fettsyren (RH), mottar et hydrogen og danner et fettsyreradikal ($R\bullet$). $X\bullet$ kan for eksempel være hydroksylradikal ($\bullet OH$) eller fettsyreperoksidradikal ($ROO\bullet$). Det reduserte radikalet blir da henholdsvis H_2O og fettsyreperoksid ($ROOH$).

Etter denne reaksjonen rearrangerer dobbeltbindingene seg slik at de blir konjungerte, det vil si at dobbeltbindinger erstatter enkeltbindinger. Oksidasjon ødelegger dermed de unike egenskapene som LC n-3 PUFA har. Jo flere dobbeltbindinger, jo raskere går oksidasjonen.

Kjedereaksjon

Det reaktive fettsyreradikalet ($R\bullet$) reagerer med oksygen og danner et fettsyreperoksidradikal ($ROO\bullet$). Dette radikalet reagerer med et nytt hydrogenatom og danner et fettsyreperoksid ($ROOH$) og et nytt fettsyreradikal ($R\bullet$). Implikasjonen er at en kjedereaksjon er startet.

Fettsyreperoksider er primære harskningsprodukter og er uten lukt og smak. Peroksider er ustabile og brytes lett ned til nye radikaler, for eksempel alkylradikaler ($RO\bullet$) og hydroksylradikal ($\bullet OH$), eventuelt også fettsyreradikal.

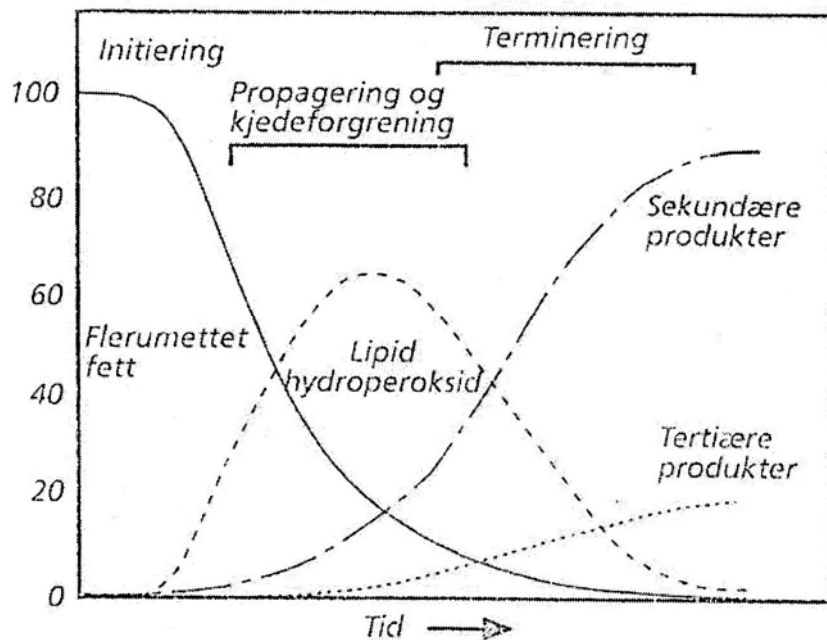
Aldehydradikaler kan brytes ned til mindre og flyktige forbindelser, de såkalte sekundære harskningsproduktene, som ketoner, aldehyder og alkoholer. Disse forbindelsene gir opphav til harsk lukt og smak. Nedbrytningsprodukter vil også kunne reagere med proteiner og vitaminer og endre på deres næringsmessige egenskaper. Disse er skadelig for mennesker i store mengder.

Terminering

Mengden reaktive fettsyreperoksider og oksidasjonsprodukter (radikaler) øker eksponentielt inntil de begynner å reagere med seg selv. De danner da polymere forbindelser som i oljer kan observeres som talglignende belegg. Vi får en nedgang i de primære harskningsproduktene i denne fasen.

Induksjonstidens varighet avhenger av en rekke faktorer som antall dobbeltbindinger i fett, tilgang på oksygen eller hydrogenakseptorer i form av frie metaller og energi (temperatur og UV-lys). Oksidasjon foregår hovedsakelig på produktets overflate der lipidene er mest utsatt for slike prooksidative faktorer.

Figur 2 illustrer oksidasjonsforløpet i et lukket system hvor O_2 er en begrensende faktor. Andelen PUFA synker fordi fettsyrer med dobbeltbindinger er mest utsatt for oksidasjon. De sekundære harskningsproduktene dannes av de primære og har en eksponentiell akkumulering først når peroksidnivået begynner å gå ned. Dette viser at man alltid måler både primære og sekundære harskningsprodukter for å kunne forstå hvor oksidert en olje er. En olje kan i praksis ha samme peroksidverdi (PV) i initieringsfasen som i termineringsfasen.



Figur 2. **Oksidasjonsforløp.** Figuren illustrerer oksidasjonsforløpet i et lukket system med utviklingen for PUFA, primære-, sekundære- og tertiære oksidasjonsprodukter gjennom initiering, propagering og terminering (Olsen 2007).

De primære harskningsproduktene kan i tillegg til PV måles som konjugerte dobbeltbindinger (konjugerte diener). Disse absorberer lys i UV-området ved 234 nm. De sekundære harskningsproduktene måles med thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS eller TBA test) eller innhold av anisidinkomplekserende komponenter (AV).

2.4 Antioksidanter

Hensikten med bruken av antioksidanter kan deles i to hovedkategorier. (1) å forlenge holdbarheten til et lipidholdig produkt og dermed opprettholde produktets ernæringsmessige kvalitet og (2) å begrense konsekvensene av oksidative skader som hele tiden skjer i kroppen vår (Halliwell *et al.* 1995).

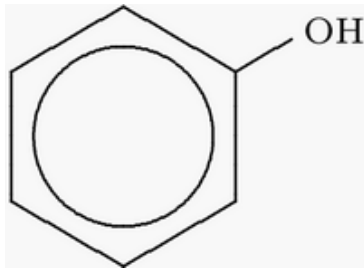
Ethvert molekyl som senker farten på oksidasjon av lipider kan defineres som en antioksidant. De kan virke på tre forskjellige måter:

1. Ved å fange opp og uskadeliggjør frie radikaler, fettsyreradikaler og fettsyreperoksidradikaler. Antioksidanten nøytraliserer et fritt radikal ved selv omdannes til et antioksidantradikal. Dette radikalet er mindre reaktivt enn det opprinnelige og kan igjen motta elektroner fra nye antioksidanter og bli ytterligere oksidert og mindre reaktivt (radical scaveching)
2. Ved å nøytralisere reaktive oksygenforbindelser (ROS). (quenching).
3. Ved å binde opp prooksidantiske transisjonsmetaller ved hjelp av en eller flere karboksylgrupper (kjelatere).

Punkt 2 og 3 beskriver begge molekyler som har preventiv en virkning. Antioksidantene holder tilbake eller nøytraliserer prooksidative faktorer. Punkt 1 beskriver en kjedebryter. Disse uskadeliggjør radikaler fra selve oksidasjonen.

I matindustrien brukes det lavmolekylære antioksidanter som enten er fettløselig eller vannløselige, naturlige eller syntetiske. Oksidasjonsprosessen hemmes av stoffer som oksiderer lettere enn lipidene.

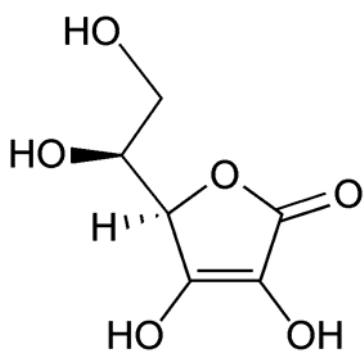
Fenoliske forbindelser er en viktig struktur for de fleste antioksidantene (figur 3). Fenolstrukturen stabiliserer antioksidantradikaler og binder opp ROS og transisjonsmetaller ved delokalisering av det uparrede elektronet gjennom resonansstrukturer.



Figur 3. Grunnstruktur for et enkelt fenolmolekyl

2.4.1 Organiske syrer

Av de organiske syrene er det benzosyre og askorbinsyre som anses som de to viktigste antioksidantene. Benzosyre finnes det mye av i blant annet tyttebær, mens sitrusfrukt er rik på askorbinsyre. I tillegg til antioksidative egenskaper virker askorbinsyre som fargestabilisator og pH-regulator. I kroppen fungerer askorbinsyre som C-vitamin. Askorbinsyrens kapasitet ligger i at den lett oksideres til semihydroaskorbinsyre og videre til dehydroaskorbinsyre (figur 4). Organiske syrer kan også binde opp metaller.

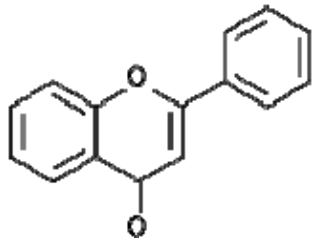


Figur 4. Askorbinsyre. Redusert form av C-vitamin.

2.4.2 Flavonoid - polyfenoler

Flavonoid er en stor klasse med sekundære metabolitter som finnes i alle fotosyntetiserende celler (figur 5). Spesielt er de tallrike i frukt, grønnsaker, te, vin, nøtter og rotfrukt. De er vannløselige og ofte fargerike. Polyfenoler fungerer som radikalfangere og binder metaller. I plantene fungerer de som pigmenter og beskyttelse mot UV-stråling, oksidative skader og mot insekter og mikrober. I mennesker har stoffene vist forebyggende egenskaper mot kreft og hjerte-karsykdommer og er god folkemedisin mot vanlige sykdommer på grunn av sin

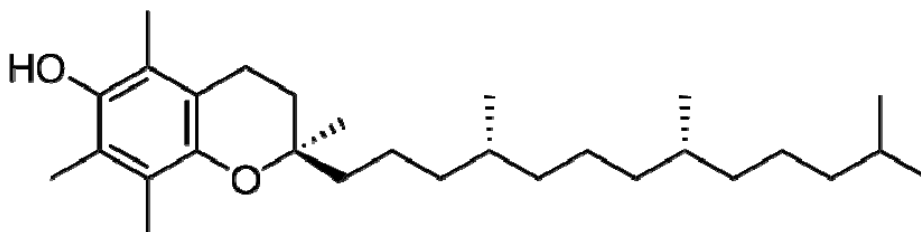
inhiberende effekt på enkelte enzymer (Havsteen 2002). Flavonoider er interessante for matindustrien da de viser antioksidative egenskaper både i naturlige produkter og modellsystemer (Skerget *et al.* 2005).



Figur 5: Grunnstruktur for flavonoid.

2.4.3 Vitamin E – tokoferoler og tokotrienoler

Tokoferoler er fenoliske vitaminer som virker som antioksidanter spesielt for fettsyrer i cellemembraner. Den lange hydrofobe sidekjede tiltrekkes lett av fettsyrekjeder og gjør vitaminet fettløselig (figur 6). Tokoferoler er varmeabile og passer dermed bra i matvarer som må oppvarmes under prosessering. Vitaminets oksidative kapasitet er lokalisert i molekylets ringstruktur der det blant annet fungerer som quncher. Det finnes åtte ulike isotoper av tokoferol og særlig er de tallrike i vegetabiliske oljer. α – tokoferolet er den mest aktive og har E-nr. 307. Tokoferoler kan også framstilles syntetisk. Disse er merket med d, l-tokoferol eller d, l-tokoferyl acetat og består av en blanding med 50 % d- og 50 % l- α – tokoferol (Higdon 2004). For høy konsentrasjon av tokoferoler i matvarer kan gi prooksidativ virkning.



Figur 6. Kjemisk formel for α – tokoferol (Higdon 2004)

Soyaolje inneholder en blanding av d- α - tokoferol (4-10 %), d- β - tokoferol (1-3 %), d- γ - tokoferol (60-66 %) og d- δ - tokoferol (24-29 %) – totalt mellom 1300 og 1600 ppm tokoferol. Under industriell prosessering forsvinner noe av disse beskyttende komponentene og det må derfor tilsettes nye for å stabilisere oljen (Evans *et al.* 2002). JECFA har en ADI for tokoferol på 0,15-2 mg/kg kroppsvekt. (Aune 2007)

2.4.4 Synergieffekter

Vitamin E og vitamin C ansees for å være de viktigste antioksidantene i levende vev. Ved å bruke begge antioksidantene sammen kan man oppnå en effekt som er større enn ved å bruke dem hver for seg. Vitamin C regenererer oksidert vitamin E og skaper dermed en synergistisk virkning. Dette skjer ved at vitamin C donerer et hydrogenatom til et tokoferolradikalet og blir i stede selv et vitamin C-radikal. Vitamin C-radikalet kan tilbakedannes til vitamin C ved at to glutathion molekyler (GSH) oksideres til GSSG (oksidert glutation). I levende organismer skjer dette ved hjelp av enzymet glutathionreduktase.

Barstad og medarbeidere (2006) har utviklet en metode for undersøkelse av antioksidanter inkorporert i en kunstig lipidmembran. Metoden gir et bilde av hvordan antioksidantene fungerer i en cellemembran. I deres forsøk bidro tokoferol og askorbat til en induksjonsperiode på henholdsvis 5 og 7 minutter hver for seg, mens hele 31 minutter når de virker sammen.

2.5 Naturlige ekstrakter

Et ekstrakt er et konsentrat der den virksomme substansen er ekstrahert og konsentrert ut fra en dyre- eller plantedel. Oftest tenker vi her på vann eller løsemiddelet.

Bruken av naturlige ekstrakter med antioksidative effekter som tilsetningsstoff i mat er fremdeles i en tidlig fase og trenger mye forskning og utvikling. Særlig har ekstrakter fra forskjellige urter og sitrusfrukter blitt testet. Zia-ur og medarbeidere (2006) har i artikkelen ”Citrus peel extract – A natural source of antioxidant” beskrevet en metode for ekstraksjon av sitronskall. Skallene ble vasket og tørket i en varmluftsovn ved 80°C. Sitronskallekstraktet ble testet i lagringsforsøk med raffinert maisolje ved 25 og 45 ° C over 6 måneder og viste en god beskyttende virkning ovenfor oksidasjon (Zia ur 2006). Andre naturlige ekstrakter, tilvirket på lignende måter, er også vist å ha gode antioksidative effekter. For eksempel har ekstrakter av grapefruktfrø, grønn te og karotenoidet astaxantin gir god beskyttende effekt på ansjosolje i et lagringsforsøk på 10 dager ved 30 °C (Park *et al.* 2006). I lagringsforsøk med fiskeolje viste ekstrakter av rosmarin stabiliserende effekt. (Pettersen 2006). Ekstrakter fra rosmarinblad og ekstra virgin olivenolje har begge beskyttende egenskaper i forskjellige matsystemer med fiskeolje fra hestemakrell (Medina *et al.* 2003). Fiber fra røde drueskall viste seg å utsette oksidasjon av opphakket hestemakrell under fryselagring ved 20 °C i de tre første månedene (Sanchez-Alonso *et al.* 2007).

2.5.1 Tang og tare

Tang og tare er marine bentiske brunalger (*Phaeophyta*). Vi deler bentiske alger i rød- brun- og grønnalger, avhengig av dybde de lever på og dermed hvilke lysbølger som er tilgjengelig for fotosyntesen. Alger har en annen type klorofyll enn høyerestående planter. Primitive planter som brunalgene har klorofyll a og c, mens høyerestående planter har klorofyll b. Klorofyll sammen med andre pigmenter, kan virke som en effektive antioksidant. Alger inneholder en rekke essensielle aminosyrer. De har ett svært høyt innhold av mineraler og sporestoffet som natrium, kalsium, magnesium, jern, krom og jod. Ofte mellom 8 og 40 ganger mer enn terrestriske planter. (Se appendiks)

Kommersielt høstes det i hovedsak to typer tang i Norge. Det høstes cirka 30 00 tonn grisatang (*Ascophyllum nodosum*) året, og mer enn 160 000 tonn Stortare (*Laminaria hyperborea*) i året (Havets ressurser 2004). Av dette framstilles tangmel, alginatprodukter og ekstrakter brukt til plantegjødsel. Tang og tare inneholder også alginat, agar og karragen som

blir brukt som tykningsmidler. På tangmelfabrikker vaskes og tørkes det høstede tangen før det kværnes opp til ønsket finhetsgrad. Tanget skjæres med ett intervall på 5 år ved hver lokalitet for å sikre en bærekraftig ettervekst (Pers.med. Benjaminsen 2006).

Det er gjort få vitenskapelige undersøkelser av tangekstrakt til direkte bruk som antioksidant i marine oljer. Men en undersøkelse av potensiell antioksidativ kapasitet i tang med FRAP-analyse viste gode resultater og man konkluderte med at svovelholdige polysakkarider fra tang potensielt kan brukes som naturlige antioksidanter av matvareindustrien (Ruperez *et al.* 2002).

Athukorala og medarbeidere (2003) testet 28 marine alger for antioksidative effekter gjennom blant annet totalt innhold av fenoliske forbindelser og fant sterkest effekt fra et ekstrakt av algen *Symphocladia laticula*. Et kloroform-ekstrakt av *Grateloupia filencia* (rød alge) tilsatt 0,05 % viste en klar antioksidativ effekt ovenfor lionolensyre og fiskeolje sammenlignet med BHT, BHA og α -tokoferol under lagring ved 65 °C (Athukorala *et al.* 2003). Et vannekstrakt av algeproduktet ”Haba nori” - *Petolonia binghamiae* viste å ha gode antioksidative effekter i vandige system (Kuda *et al.* 2006).

2.5.2 Krekling

I Norge har vi to arter av denne dvergbusken, henholdsvis *Empetrum nigrum* i lavlandet og *Empetrum hermaphroditum* på fjellet. I denne oppgaven skilles det ikke mellom de to artene og de benevnes kun som krekling - *Empetrum sp.* Planten har nålformede vintergrønne blader, er svært hardfør og kan vokse i karrige og næringsfattige områder. Det eneste den krever er rikelig med lys. I folkemedisin har krekling vært brukt som vanndrivende middel. I arktiske strøk har den i lang tid vært brukt av inuitter og samer som smakstilsetning og legeplante mot blant annet skjørbuk. Samene tilsatte krekling i reinsdyrsmelk som skulle lagres over vinteren, oppbevart i reinmager (www.studnot.hit.no).



Bilde 1. Kjekling empetrum sp.

Kjekling har vist et høyt totalt innhold av antioksidanter: 9.17 mmol /100 g i FRAP-analyse. Her måles summen av alle antioksidanter over et referanseredokspotensiale og uttrykkes som det totale konsentrasjonen av elektroner og hydrogenatomer som kan avgis i en redoksreaksjon. (Halvorsen *et al.* 2002).

Kjekling inneholder mye flavonoider, blant annet quersetin. Andelen quersetin ble målt til 56 mg / kg kjekling (Hakkinen *et al.* 1999) Undersøkelser av total mengde polyfenoler ved Folin-Ciocalteu metoden viste at kjeklig har en gallic acid equivalents content (GAE) på 50.8 mg / g. Dette er svært høyt i forhold til andre bær og tyder på stor antioksidativ kapasitet (Kahkonen *et al.* 1999). Andre deler av planten har også vist antioksidativ kapasitet, for eksempel ekstrakter fra skuddene (Krasnov *et al.* 2000).

2.6 Funksjonell mat

Funksjonell mat kan defineres som mat som gir positive helseeffekter ut over det å dekke behovet for næringsstoffer. Disse matvarene kan være tilsatt ekstra nyttestoffer eller fratatt uheldige stoffer. Produktet skal fungere som et vanlig næringsmiddel og skal ved et normalt, regelmessig inntak kunne inngå i en allerede ernæringsmessig anbefalt kost. Kosttilskudd og piller faller dermed utenom denne definisjonen.

Mange matprodusenter spiller i en økende grad på våre ønsker om å spise riktig og få en bedre helse. Vekstraten for funksjonell mat i EU ligger på mellom 15 og 20 prosent mot 1-2 prosent for vanlige matvarer (www.forbrukerportalen.no, 2001). Riktig mat kan forebygge sykdommer og lindre plager. Mat er ikke lenger bare ernæring, den selges nå også med lovnader om velvære, vitalitet og på sikt bedre helse.

Matvarer kan anrikes med LC n-3 PUFA ved å blande inn fiskemuskel fra feit fisk eller marine oljer direkte inn i produkter som margarin, majones og sauser. Utfordringen med slike produkter ligger i å forhindre for rask harskning og vond bismak. Ved å erstatte noe av svinefettet med fiskeolje klarte man å forbedre næringsverdien av kjøttpølser betraktelig. Denne erstatningen ga totalt 1,1 g EPA og DHA per 100g produkt, noe som senket n-6/n-3 forholdet fra 13,86 til 2,97. Verken sensoriske egenskaper eller grad av oksidasjon ble påvirket av fiskeoljen (Valencia *et al.* 2006). Et eggprodukt tilsatt fiskeolje gav forbedring i blodverdier ved konsum i 21 dager. Daglig rasjon bestod av 1,3 gram EPA/DHA. (Rose *et al.* 2006). Egg som er anrikt med omega-3 selges allerede og det er også mulig å føre fjærkre og svin med fiskemel for å få en sunnere fettsammensetning i kjøttet fra disse. Når dette er sagt har kjøtt fra griser som er føret med en PUFA-rik diett vist seg å være mer utsatt for oksidasjon under langtidslagring og avgir en uønsket fiskelukt/smak. Dette begrenser muligheten for slike produkter (Bryhni *et al.* 2002).

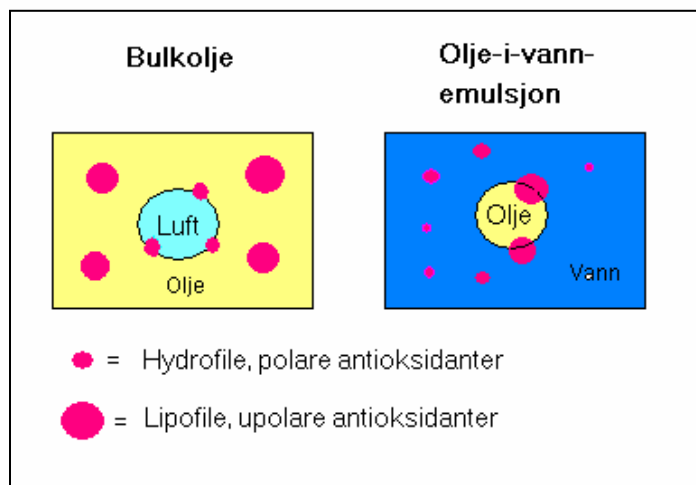
2.7 Emulsjoner

En emulsjon er en dispersjon av to ikke-blandbare væsker. Dråper av den ene væsken er altså finfordelt i den andre. Denne tilstanden gir høyt overflate/volum-forhold og økt grenseflatespenning. Etter en tid vil de to fasene skille seg igjen. Emulgatorer brukes for å gjøre fordelingen mer stabil. Deres bipolare struktur formidler kontakt mellom de to fasene og reduserer dermed grenseflatespenningen, noe som gjør emulsjonen mer kinetisk stabil. Majones er et eksempel på en olje-i-vann-emulsjon hvor blant annet proteiner fra egg fungerer

som emulgator. Alginatprodukter fra tang og tare kan også brukes som emulgatorer og fortykningsmidler.

2.7.1 "Det polare paradoks"

Vi deler antioksidantene inn i vannløselige (hydrofile) og fettløselige (lipofile), henholdsvis polare og upolare antioksidanter. Grovt sett kan det virke som om polare antioksidanter har best virkning i rene oljer. Dette fordi oksidasjon for det meste innledes på oljens overflate hvor de polare antioksidantene vil være. Upolare antioksidanter har en bedre virkning i emulsjoner. I slike matsystemer med høyt overflate/volum-forhold, søker de lipofile antioksidantene mot oljedråpene, mens de hydrofile antioksidantene vil være utilgjengelig løst i vannfasen (figur7). Det er altså ikke likegyldig hvilke antioksidanter man bør tilsette om man vil stabilisere en bulk olje eller en emulsjon (Frankel 1996).



Figur 7. Overflatefenomenets innvirkning på antioksidanters kapasitet i bulkolje og olje-i-vann-emulsjoner. Fritt fra Frankel (1996).

I virkeligheten er denne framstillingen litt for enkel siden antioksidanter forekommer i forskjellige grader av polaritet og løselighet. I et forsøk av Škerget og medarbeidere (2005) ble metanolekstrakter av forskjellige plantematerialer testet for antioksidative egenskaper på solsikkeolje ved 95 °C. Her observeres det motsatte og de fleste flavonoidene viste en prooksidativ aktivitet i bulk olje, mens de forhindret oksidasjon i en emulsjon. Vurderingen av en antioksidant må derfor sees i sammenheng med hvilke forutsetninger den får virke under og hvilke analytiske metoder som benyttes. Antioksidantenes effekt påvirkes av de forhold som maten den tilsettes gir. Det er derfor viktig å vite den kjemiske sammensetning av produktet antioksidantene tilsettes.

3. Material og metode

3.1 Materialer

- **Krekling** ble innsamlet i Dåfjorden, Ringvassøya i Troms i august 2006.
- **Tangmel** fra Algea AS, Brønnøysund.
- **Matoljer og tranprodukter** til metodeopplæring og sammenligning ble kjøpt på Kræmer, Tromsø.
- **Selolje**, ren fersk raffinert og fersk raffinert tilsatt E-vitamin fikk vi fra Fortuna Oils AS, Kristiansund. Oljen ble posisjonert i flasker og fryst ned.
- **(±)- α -Tokoferol approx. 95% HPLC** fra Sigma Aldrich inc., St.Louis, USA.
- **Fettløselig emulgator**, bestående av polare (phospho-, lyso.phospho og glyko-) lipider. Basert på soya lecitin.
- **Vannløselig stabilisator**, bestående av carrageenan standardisert med sukker, xanthangum og guar gum.

3.2 Metoder

3.2.1 Tørrstoff

Det ble veid opp tre aluminiumsbeger med cirka 5 gram krekling. Skålene ble satt i varmeskap (Termaks, Heigar) på 95°C og veid til konstant vekt var oppnådd.

3.2.2 pH

pH ble målt med et pH-meter (InoLab pH level 1, WTW) før og etter koking.

3.2.3. Ekstraksjon

Metoden for ekstraksjon er beskrevet i artikkelen "Citrus peel extract - A natural source of antioxidant" (Zia ur 2006) og ble utført med noen modifikasjoner. Blant annet ble bærene fryse/vakumtørket istedenfor tørket i varmeskap. Tørrstoffet fra bærene ble ikke malt opp med kværn, men knust i mortel. Videre ble ekstraktet filtrert gjennom kaffefilter og ikke en filterduk.

Krekling (450 gram) ble knust med stavmikser. Bærmassen ble fordelt i rundkolber og fryst inn med flytende nitrogen for å fordele massen i hele kolben. Prøvene ble frysetørket

(lyofilisert) med en vakum/frysetørker (Heto FD3, Medinor Produkter) i to døgn tildekket med aluminiumsfolie for beskyttelse mot lyspåvirkning.

Den tørkede bærmassen ble malt opp til pulver med en mortel. Pulveret ble løst opp i metanol (10% w/v), flushet med nitrogen i erlenmeyerkolbe og forseglet med parafilm. Prøvematerialet ble tildekket med aluminiumsfolie for beskyttelse mot UV-lys og satt til inkubasjon på platerotator (Laboratory rotator – model G2, New Brunwich Scientific).

Etter ett døgn ble blandingen filtrert med kaffefilter. Restkonsentrasjonen ble re-ekstrahert med halvparten så mye methanol i ytterligere ett døgn. Løsningen ble evaporert



Bilde 2. Frysetørring (lyofilisering) av krekling med fryse/vakum-pumpe (Heto FD3, Medinor Produkter)

ved 35 °C, og et trykk på cirka 200mbar ved bruk av rotavator (Heidolph Laborota 4000, Büchi Vacuum Controller B-721). Kolbene ble deretter frysetørket for å fjerne metanolrester. Dette resulterte i et tørrprodukt som ble knust til pulver i mortel – kreklingekstrakt A.

Kreklingekstrakt B ble tilvirket på samme måte, men ble kokt ved 100 °C i ti minutter før bærmassen ble fryst inn i rundkolber.

Tangmelekstraktet ble tilvirket ved at 20 g tangmel ble løst i 100 ml metanol. Blandingen ble ristet, filtrert og evaporert på samme måte som kreklingen.

3.2.4 Innhold av polyfenoler

Denne delen av forsøket ble utført og er beskrevet av Ida-Johanne Jensen ved Instituto del Frio, Ciudad universitaria i Madrid. (Metodebeskrivelse i appendiks)

Innholdet av polyfenoler ble kvantifisert ved bruk av Folin-Ciocalteus metode (Singleton *et al.* 1999).

3.3 Karakterisering av selolje

Seloljen ble karakterisert med hensyn til fettsyresammensetning og grad av oksidasjon i form av vektøkning.

3.3.1 Fettsyreanalyser

Fettsyresammensetningen i lipider kan karakteriseres som metylestere med gasskromatografi (GS) sammen med en flammeioniserende detektor (FID). Lipidet metyleres før analyse med syre og trykkoking som derivatiserer fettsyrene til metylestere. Prøvematerialet ble metylert ved metode av Stoffell, Chu & Ahrens (1959)

Prøver ble injisert splittless med en 7683 autosampler (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) en Agilent 6890N gasskromatograf utstyrt med en 50m kappilærkolonne (0,25 mm indre diameter med en kjent kjemisk bundet CP-select CB for FAME stasjonærfase, 0,25µm filmtykkelse (Varian, Palo Alto, USA). Injeksjonstemperatur på 250 °C. Kolonnetemperaturen ble holdt ved 50 °C i 2 min. og videre økt med 10 °C min⁻¹ til 150°C etterfulgt av 2 °C min⁻¹ til 205 °C. Derneft ble kolonnetemperaturen justert til 255 °C (15 °C min⁻¹), der den ble holdt stabil i 10 minutter for å vaske kolonnen. Fettsyrene ble detektert i en FID detektor og data ble bearbeidet av Chemstation software (Agilent). Identifisering av fettsyrer er basert på sammenligning av retensjonstiden til kjente eksterne standarder og arealet av hver fettsyre ble lest av de ulike kromatogrammene.

3.3.2 Vektøkning

Til dette forsøket trenger man kun et varmeskap (Termaks, Heigar), petriskåler og en vekt med en nøyaktighet på 0,1 mg. Forsøket viser fettets oksidasjon ved fettsyreradikalets binding til oksygen fra luften som gjør at vekten øker. Selolje fra Fortuna Oils, Møllers tran og Gaea Ekstra Virgin Olivenolje ble tilsatt (5 gram, tre paralleller) i petriskåler og satt til inkubering i varmeskap ved 32° C. Veiing av petriskålene ble foretatt daglig i 27 dager.

3.4 Måling av antioksidative effekter

Ekstraktene ble testet ut for antioksidative effekter i et vandig system, et oljesystem og i emulsjon.

3.4.1 Antioksidative effekter i vannløsning

Relativ absorbasjon ble målt ved 492 nm som et uttrykk for oksidasjon. Ekstraktets evne til å forhindre oksidasjon av DHR (dihydrorhodamine- 1,2,3) - substrat som farges gulrødt ved oksidering (Dunlap et al. 2003).

Reagenser:

1. DHR, dihydrorhodamine- 1,2,3 Sigma, D1054 (2 mg kapsel)
2. APPH 2,2 diazobis(2-amidinopropane) dihydrochloride; Waco Chemicals 017- 11062
3. Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, Aldrich 238813

Tillaging av løsningene.

1. Lagde stock-løsninger av ekstraktene (10 mg/ml methanol) og følgende fortynninger i effendorph-rør: 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml og 50 µg/ml.
2. DHR (500µM) – kapselen ble fortynnet i 2.0 ml MeOH, 125 µl 10 med mer EDTA (pH 8) og 7,875 ml Tris HCl (100 µM, pH 7.4.)
3. APPH (50µM) (oksidant) 67,8 mg (250 µmol) i 5,0 ml H₂O eventuelt isopropanol:H₂O (4:1) om lipidinnholdet i prøven er stort.
4. Trolox (antioksidant, positiv kontroll). Følgende fortynning: 50 µg/ml (80 µM), 25 µg/ml, 10 µg/ml og 5 µg/ml.

Oppsett assay (96 brønners plate)

DHR	30 µl
APPH	60 µl
Prøve/kontroll løst i MeHO)	60 µl
Nullprøve MeHO	60 µl

Kinetisk data ble lest ved 492 nm, hvert 2. min i 60 min.

3.4.2 Antioksidative effekter i emulsjon

Emulsjoner ble laget med følgende mengdeforhold:

- 37,5 ml selolje
- 212,5 ml H₂O
- 0,75 g fettløselig emulgator
- 1,25 g vannløselig stabilisator
- 0,25 g ekstrakt

Selolje og fettløselig emulgator ble blandet i ett minutt med en thermomix (Thermomix, Vorwerk). Deretter ble H₂O, vannløselig stabilisator og ekstrakt blandet i fem minutter på 70 °C på nivå 3 og til slutt ett minutt 70 °C på full styrke. Emulsjonene ble lagret ved 4 °C i to måneder i mørke flasker i kjøleskap.

Oljen i emulsjonene ble ekstrahert ut med Bligh & Dyer's metode (1959) og bestemmelse av peroksid-innhold i små mengder olje etter metode av Ueda et al. (1986); Ferrothiocyanatmetoden.

Reagenser (Bligh & Dyer):

1. Metanol (CH₃OH)
2. Kloroform (CHCl₃)
3. 0,88% Kaliumklorid (KCl)
4. Heptan (C₇H₁₆)
5. 2 % Svovelsyre (H₂SO₄)
6. 5 % Natriumklorid (NaCl)
7. Internstandard (C17:0)

Veide opp 7 gram emulsjon i teflonrør og tilsatte 200 µl internstandard 10mg/ml.

Peroksider i emulsjon

Hydroperoxiderne i fettene oksiderer Fe (II) til Fe (III). Fe (III) reagerer videre med ammoniumthiocyanat ved oppbygging av et rødt kompleks som har sitt abs-max ved 500 nm.

Bestemmelse av PV beregnes ut fra en standardkurve som angir absorbans av løsning med kjent Fe(III)-konsentrasjon. Vi brukte jernstandard (Titrisol prod nr.1.09972, Merck) med

3,5% HCl til en konsentrasjon på 100 µg/ml. Til analysen brukte vi 40 mg Fe(II) klorid tetrahydrat blandet i 100 ml 3,7 % HCl.

Hvert prøverør ble tilsatt 10 ml 95% etanol, 200 µl iso-hexan og mengdene 200, 150, 100 og 50 av Fe(III) + blank. Prøvene ble blandet i 15 sekunder vent 2 minutt og mikset i 45 sekunder igjen. Absorbansmåling ved 500nm som gav standardkurve x (appendiks).

Standardkurven har en stigningskoeffisient på 50,383x. Med en R² verdi på 0,9996.

Veide opp to dråper fett (i overkant av 10 mg) og løste det i 1 ml iso-hexan. Tilsatte 10 ml 95% etanol, 200 µl prøveløsning, 200 µl 30% ammoniumthiocyanatløsning, 200 µl Fe (II) løsning. Prøvene ble ristet og avlest på samme måte og PV ble funnet.

3.4.3 Antioksidative effekter i fettsystem.

Det ble utført provoserte lagringsforsøk med selolje. Forsøkene ble foretatt med utgangspunkt i Pettersens (2006b) modell for testing av naturlige antioksidanter beskrevet i "Natural antioxidant assessment: Stabilizing effect on marine lipids". Under slike forsøk øker man de fysiske påvirkninger på oljen for å framskynde harskningsprosessen. 30 g olje i hver kolbe ble satt til inkubering i en ristemaskin (Innova 4300 Incubator Shaker, New Brunwich Scientific) ved 45° C. Prøver ble tatt etter x antall timer og undersøkt med hensyn til innhold av peroksid og anisidinkomplekserende forbindelser.

Fettsyreperoksid oksideres til fettsyrealkohol med iodid som da reduseres til molekylært iod:



Dannet iod (I₂) titreres med en standard natriumthiosulfatløsning for å bestemme hvor mye oksidasjonsmiddel (I[·]) som har vært forbrukt:



Stivelse blir gjerne brukt som indikator fordi iod (I₂) som dannes binder seg til stivelse og gir den mørk blå farge. Når I₂ har blitt oksidert til iodid (I⁻) av thiosulfat, vil blåfargen forsvinne (observeres visuelt) Og endepunktet for titrering er nådd. Ut fra forbrukt natriumthiosulfat (0,1 eller 0,01 M) kan mengden fettsyreperoksid bestemmes. (Olsen 2007)

Reagenser

1. 2:3 miks av kloroform og eddiksyre.
2. 0,01 M sodium thiosulfate
3. Potassium iodid
4. Stivelse

1 g fett ble løst i 30 ml kloroform:eddiksyre i en erlemeyerflaske. 500 ml mett potassium iodid fikk reagere i 1 minutt før reaksjonen ble stoppet med 30 ml H₂O. 5 ml stivelsesløsning ble tilsatt noe som gav prøven en blåfarge. Prøven ble titrert med autotitrator (715 Dosmal autotitrator, Metrohm) med 0.01M sodium thiosulfate til fargeomslag. PV bestemmes med følgende formel:

$$I_p = 10(n_1 - n_2)/m$$

n_1 = titratorvolum

n_2 = Blindprøve

m = oljemengde i gram.

Anisidin-verdi (AV).

Peroksidene som er labile forbindelser blir fort omgjort til sekundære produkter. AV måler tilstedeværelse av anisidinkomplekserende komponenter. Høymolekylære karbonylforbindelser og p-anisidin i iseddik reagerer og danner et gult kompleks som måles optisk ved bølgelengde 350 nm.

Reagenser

1. Isooktan (2,2,4 tri metyl pentan ca 0 i OD v/350 nm)
2. 0,25 % p-anisidine i eddiksyre

Prøvene ble løst i Isooktan 0,1g/10 ml. Egenabsorbans av prøvene ble målt med spektrofotometer (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi Instruments Inc.) UV –meter v/350 nm. 500 ml 0,25 % p-anisidin fikk reagere i 10 min for så å på nytt måle absorbans. AV kunne beregnes ved følgende formel:

$$AV = 10 * (1,2 A_s - A_b)/m$$

As = Absorbering etter reaksjonen med p-anisidin/eddiksyre

Ab = Egenabsorbans

M = oljemengde i gram

Oksipress

Oksipress er en maskin (Mikrolab, Aarhus) for oksidografi - et manipulert lagringsforsøk. Den måler forbruk av oksygen under oksidasjon i form av reduksjon av trykk. En beholder med olje varmes opp til ønsket temperatur og fylles med x antall bar O₂. Forbruket av O₂ over tid reduserer trykket i beholderen og framstilles grafisk.

4. Resultat og diskusjon

4.1 Tilvirkning av ekstraktene

4.1.1 Tørrvekt

Tørrvekt av krekling ble målt for å beregne mengde bær som trengtes for å tilvirke tilstrekkelige mengder ekstrakt. Prosent tørrvekt av krekling ble beregnet til $9,96 \pm 0,6$.

Tabell 1. Utbytte for frysetørrking og ekstraksjon av tangmel og krekling

	Type	Våtvekt	Tørrvekt	Ekstraktutbytte		Utbytte totalt
		gram	gram	gram	% tørrvekt	%
Metanol	Krekling ikke-varmebehandlet	226,88	24,5	10,73	43,80	4,73
	Krekling vb 100 grader C	227,85	25,2	9,19	36,40	4,03
	Alginat A-60	Uvisst	20	0,94	4,71	Uvisst
	Alginat SG	Uvisst	20	0,83	4,16	Uvisst
Heptan	Krekling ikke-varmebehandlet	226,88	5	0,05	1,08	0,02
	Krekling vb 100 grader C	227,85	5	0,04	0,78	0,02

Av 226,88 g bær satt man igjen med 10,73 g høykonsentrert metanolekstrakt av ikke-varmebehandlet krekling og 9,19 g varmebehandlet krekling. Dette utgjorde henholdsvis 4,73 % og 4,03 % av våtvekta. Ekstraktet var mørkt lilla og blander seg fint i vann. Ekstraktet blander seg dårlig i olje, men danner dråper i oljen etter en stund.

Tangmelet ble ekstrahert på samme måte som med frysetørkede bær. Utbyttet ble på mellom 4-5 prosent for de ulike alginatproduktene. Tangekstraktet lot seg i større grad enn kreklingen løse i olje.

Vi prøvde også heptan som ekstraksjonsmiddel. Dette for å se om vi kunne få ut flere fettløselige komponenter av prøvene. 20g Alginat – 120 ble løst i 10 ml heptan og 5 gram K100 og K25 i 5 ml heptan. Tangekstraktet fikk en fin og klar grønnfarge, men vi klarte ikke å få stoffet i pulverform.

Av kreklingen klarte vi å ekstrahere 0,054 og 0,039 gram med heptan. Altså rundt 1 % av pulveret og minimale 0,024 og 0,017 % av total bærvekt. Ekstraktet var fargeløst. Det fantes altså ingen fettløselige fargekomponenter i krekling som lot seg løse i heptan, og det som lot seg løse var det såpass lite av at vi vurderte det som uinteressant å gå videre med i oppgaven.

4.1.2 pH.

pH ble målt til 3,73 før koking og 3,53 etter koking. Kreklingen er altså forholdsvis sur og inneholder organiske syrer. Vi vet at organiske syrer som askorbinsyre har antioksidative effekter på lipider (Aune 2006). I undersøkelser av organiske syrer i krekling ble følgende målinger gjort: Innholdet av sitronsyre 2.27 g l⁻¹, eplesyre, 4.30 g l⁻¹, og benzosyre 0,06 g l⁻¹. Her ble pH målt til 3.52. Nivået av benzosyre er den laveste av de undersøkte bærene (Viljakainen *et al.* 2002).

4.1.3 Innhold av polyfenoler

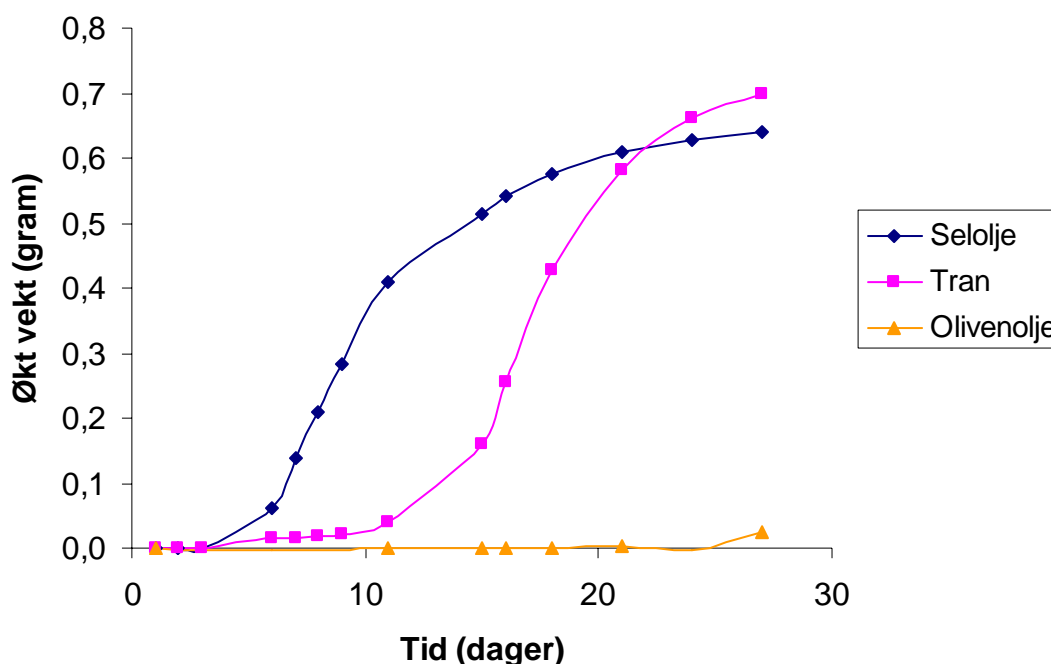
Innholdet av polyfenoler i tangmelet Alginat Special Ground ble målt til å ligge på 6,16 g /100 g ± 0,35 g. I krekling ble det målt til 6,58 g /100g ± 0,42 g. Kahkonen har gjort samme målinger og fått verdien 5,08 g /100g (Kahkonen *et al.* 1999).

I Jimenez`s forsøk ble korrelasjonen mellom total mengde og polyfenoler og antioksidativ kapasitet målt til å være $r = 0.73$. Dette viser at selv om tang inneholder andre antioksidanter som askorbinsyre og karotenoider er det polyfenolene som bidrar mest i denne modellen (Jimenez-Escrig *et al.* 2001).

4.2 Karakterisering av selolje

4.2.1 Vektøkningforsøket

Figur 8 viser at seloljen er den minst stabile av oljene og har en initieringsperiode på 5-6 dager sammenlignet med Møllers tran på cirka 12 dager. Etter 21 dager flater kurven ut og vi observerer i petriskålen at oljen var polymerisert. Olivenoljen holder seg stabil gjennom hele forsøket med unntak av siste måling der vekten øker med 0,12 % i forhold til utgangspunktet.



Figur 8. Δ vekt av oljer som uttrykk for oksidasjon. Møller's tran, Gaea extra virgin olivenolje og Fortuna Oils selolje (5 gram) inkubert i varmeskap ved 30 grader i 27 døgn.

Av fettsyresammensetningen (tabell 2) ser vi at andelen PUFA i seloljen er på 18,8 % med en fordeling på; 20:05 (EPA): 6,7 %, 22:05 (DPA):4,0% og 22:06 (DHA): 8,1%.

Møllers tran har 21,0 % PUFA med en fordeling på; EPA: 8,3 % DPA: 1,1 % og DHA:11,6 %.

Olivenolje inneholder ingen PUFA. Andelen PUFA har innvirkning på oljens stabilitet. Jo flere dobbeltbindinger desto flere angrepspunkter. Derved kan kjedereaksjonen starte raskere og vi får en kortere induksjonseperiode (Olsen 2007).

Tabell 2. Fettsyresammensetning for Møller`s tran, Gaea extra virgin Olivenolje og Fortuna Oils selolje angitt i arealprosent. Analyse er gjort med gasskromatografi (GC-FID). Kun fettsyrer <1% tatt med.

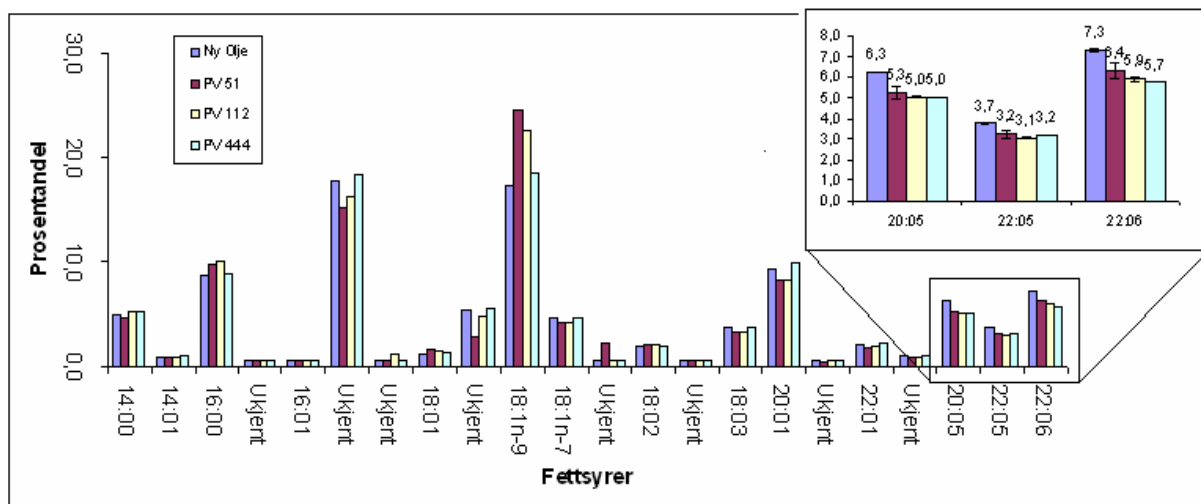
Fettsyrer	Tran	Olivenolje	Selolje
14:0	3,9	0,0	5,3
14:1	0,0	0,0	1,0
16:0	11,8	12,2	9,3
16:1	7,2	1,1	17,9
18:0	2,5	3,0	1,4
Ukjent	2,6	0,0	5,5
18:1, n-9	20,4	75,1	17,9
18:1, n-7	4,3	2,1	4,6
18:2	2,1	6,5	2,0
18:3	1,2	0,0	0,0
Ukjent	0,0	0,0	2,0
Ukjent	4,6	0,0	2,0
20:1	11,0	0,0	9,4
22:1	7,3	0,0	2,1
20:5	8,3	0,0	6,8
22:5	1,1	0,0	4,0
22:6	11,6	0,0	8,2

Møllers tran er tilsatt : *dl- α -tocoferylacetat* og *naturlige tokoferoler*. Seloljen er ikke tilsatt noen antioksidanter. Dette forklarer at tranen er mer stabil enn seloljen selv om Møllers tran inneholder en høyere andel PUFA.

Etter 27 døgn har seloljen hatt en prosentvis vektøkning på $2,97 \% \pm 0,006 \%$. Både seloljen og tranens kurve viser oss på en fin måte den eksponentielle utviklingen i oksidasjonsprosessen og vi får en pekepinne på at seloljen er av en relativt ustabil karakter.

4.2.2 Oksidasjonens innvirkning på fettsyresammensetning

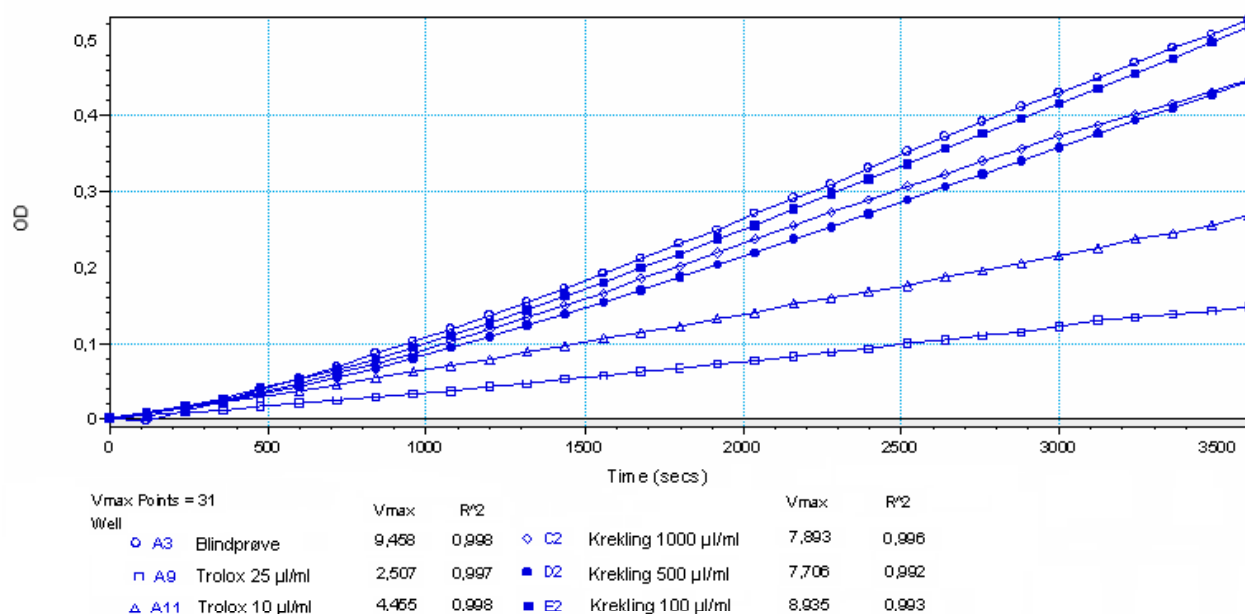
Fettsyresammensetningen for selolje med ulik grad av oksidasjon ble studert. Oksidasjonens innvirkning på fettsyresammensetningen ser man på andelen av LC n-3 PUFA. Disse viser en klar nedgang i prosentandel og er altså mest utsatt for oksidasjonen. Dette er å forvente når vi vet at oksidasjonen oftest starter ved ustabile dobbeltbindinger. Reduksjonen av prosentandel PUFA er størst i starten mellom fersk selolje og olje med en PV på 51. Sammenligner vi med Olsens figur for oksidasjonsforløpet (figur 2) ser vi at reduksjonen ikke er like markant i vårt provoserte forsøk som i denne illustrasjonen.



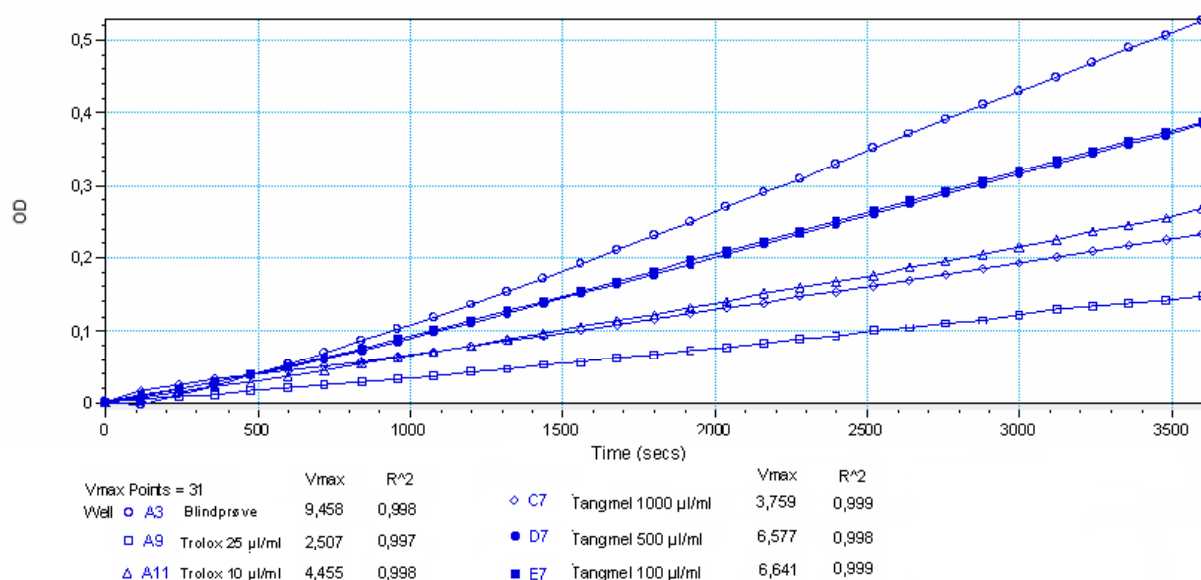
Figur 9. Fettsyresammensetning (areal%) for selolje med fire ulike stadier av oksidasjon målt ved peroksid-verdier (>5, 51, 112 og 444). Oljen metylert ved metode av Stoffell, Chu & Ahrens (1959) og FFA-analyse er gjort med gasskromatografi (GC-FID). Standardavvik kun angitt for LC n-3 PUFA.

4.3 Måling av antioksidative effekter

4.3.1 Ekstrakter i vandig system



Figur 10. Måling av antioksidative effekter i vandig system (antioxidant screening (Dunlap et al. 2003) av metanolekstrakt av krekling. Kreklingeekstraktets inhiberende virkning på oksidasjon av dihydrorhodamine- 1,2,3 (DHR) målt som absorbans med bølgelengde 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter.



Figur 11. Måling av antioksidative effekter i vandig system (antioxidant screening, (Dunlap et al. 2003) av metanolekstrakt av tangmel. Tangmelekstraktets inhiberende virkning på oksidasjon av DHR målt som absorbans med bølgelengde 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter.

Figur 10 viser at OD for kreklingekstrakt 1000 og 500 µl/ml får en noe slakere kurve enn blindprøven. Kreklingekstraktet har altså en viss inhiberende virkning på oksidasjon av DHR i konsentrasjonene 1000 og 500 µl/ml.

OD for tangmelekstrakt 1000 µl/ml havner under kurven for Trolox 10 µl/ml. Tangmelekstraktet (Figur 11.) viser dermed en klart inhiberende effekt og en effektiv antioksidant i dette systemet.

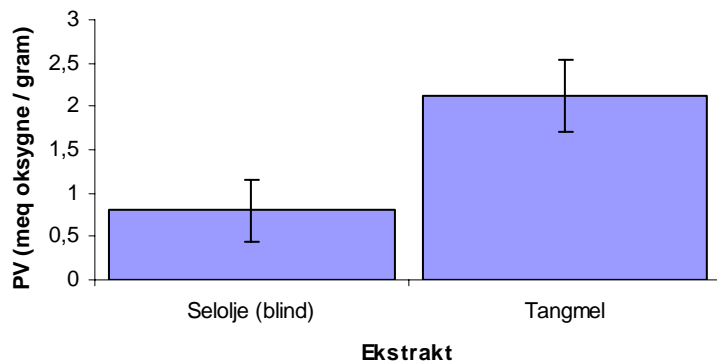
4.3.2 Ekstrakter i emulsjon

Emulsjonene uten tilsatt ekstrakt (blindprøve) fikk en hvit kremaktig farge. Emulsjonen som var tilsatt kreklingekstrakt ble farget lilla, mens emulsjonen som var tilsatt tangmelekstrakt i liten grad ble farget.

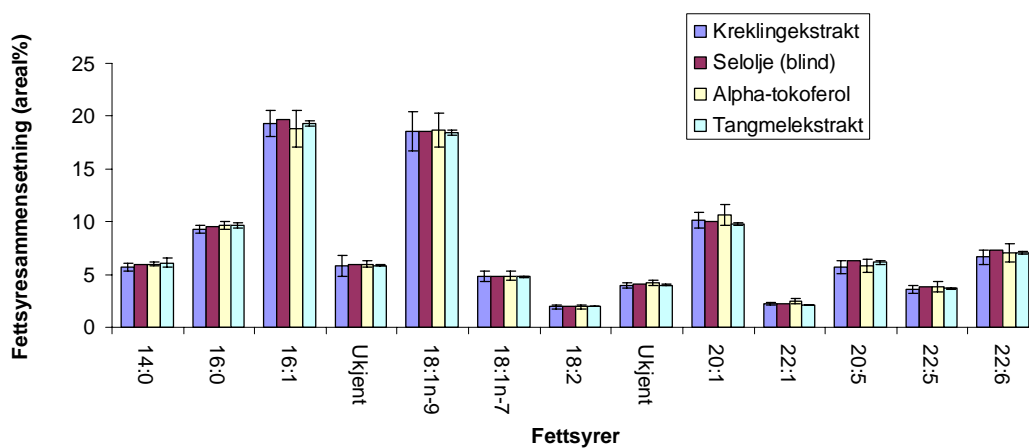
PV målinger av emulsjonen tilsatt krekling ble ved en feiltakelse ikke foretatt.

Emulsjonen med tangmelekstrakt har en høyere PV enn blindprøven (figur 12). Den har altså en prooksidativ virkning på emulsjonen. Ser vi på fettsyresammensetningen (figur 13) er det ingen merkbare forskjeller mellom emulsjonene. Denne analysen er altså for lite sensitiv ovenfor olje-i-vann-emulsjoner med lav PV.

Vi hadde håpet å se en bedre effekt av tangmelekstraktet i emulsjonen. Tangmelekstraktet var i mye større grad fettløselig og inneholdt tydeligvis en betydelig andel lipofile komponenter. Vår olje-i-vann emulsjon hadde relativ høy fettandel, 15 % olje og 84 % vann. Med tanke på at tangmel løste seg best i fett, hadde vi regnet med at tangekstraktet var det som gav best beskyttelse i en emulsjon. Fettløselige upolare antioksidanter har som nevnt under ”det polare paradoks” en generelt bedre virkning i emulsjonssystemer med et høyt overflateforhold (Frankel 1996). Dette klarte vi ikke å påvise i vårt forsøk.



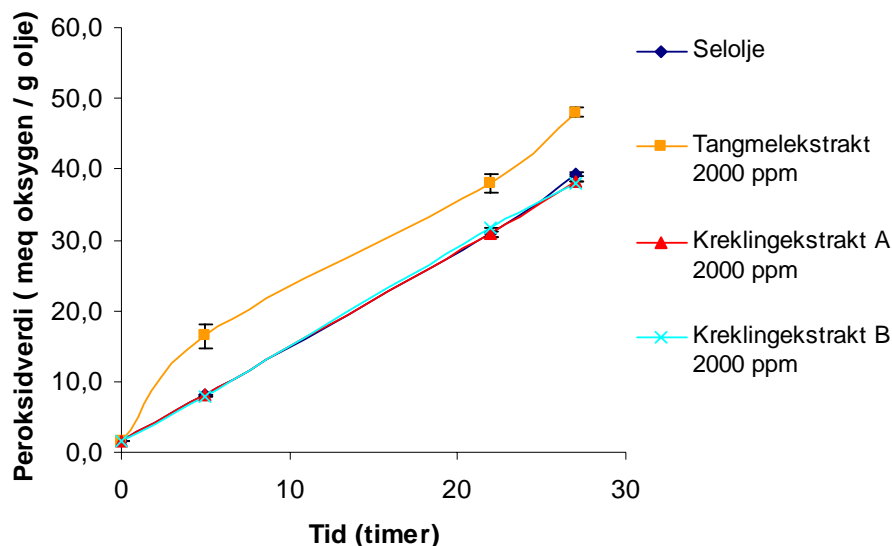
Figur 12. Peroxidverdi i olje angitt som meq O_2 /g fra olje-i-vann-emulsjoner av selolje tilsatt tangmelmelekstrakt, lagret i kjøleskap ved 4 °C i to måneder. Olje ekstrahert med Bligh & Dyers metode (1959) og PV etter Udea et al (1986).



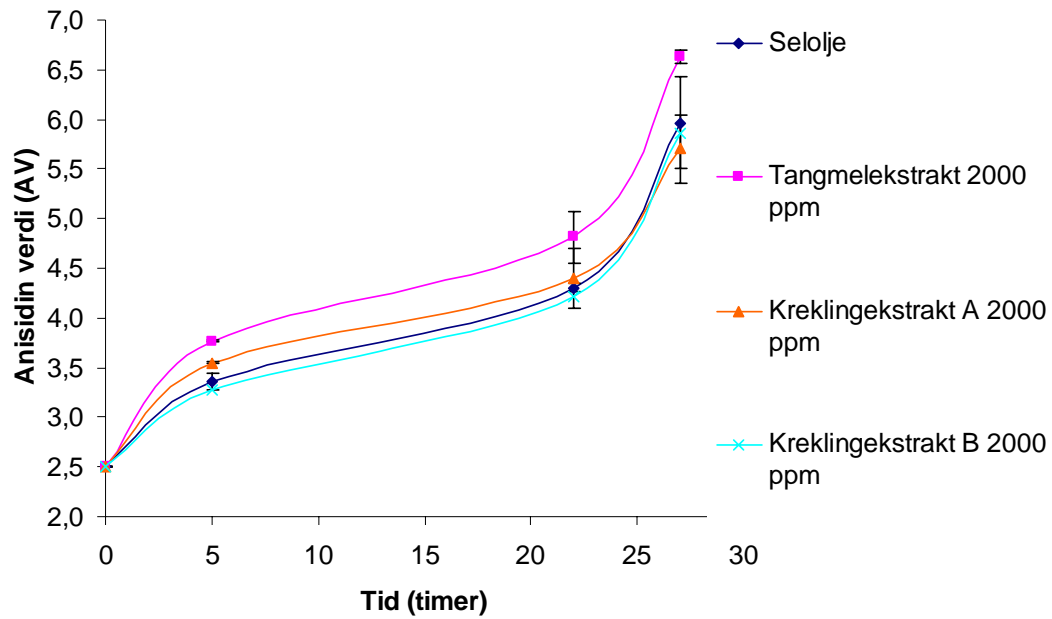
Figur 13. Fettsyresammensetning i areal% for olje-i-vann-emulsjoner av selolje tilsatt tokoferol, krekling-, og tangmelekstrakt, lagret i kjøleskap ved 4 °C i to måneder. Olje ekstrahert med Bligh & Dyers metode (1959) og metylert ved metode av Stoffell, Chu & Ahrens (1959) og FFA-analyse er gjort med gasskromatografi (GC-FID). Standardavvik for blindprøve ikke med.

4.3.3 Ekstrakter i fettsystem

Ved PV målingene brukte vi 1 gram fett istedenfor 5 gram som metoden egentlig er beregnet for. Dette fordi vi til tider hadde lite olje. PV fra 1 gram gav en litt høyere PV enn med 5 gram. Av figur 14 ser vi at det var ingen signifikante forskjeller for PV mellom kreklings ekstrakt A og B og blindprøven. Disse tre hadde et sammenfallende oksidasjonsforløp med hensyn til PV. Det var altså ingen antioksidative effekter å spore fra kreklings ekstrakt A og B i et fettsystem. PV for tangmelekstraktet fikk høyere verdier enn blindprøven. Tangmelekstraktet viste dermed på samme måte som i emulsjonen å være prooksidantisk ovenfor oljen. AV-målingene viste samme tendens som PV-målingene (figur 15).



Figur 14. **Primær initiering.** Peroxidverdi (PV) av selolje tilsatt kreklings ekstrakt A (ikke varmebehandlet) 2000 ppm og kreklings ekstrakt B (varmebehandlet med koking i ti minutter) 2000 ppm. Prøvene inkubert med full tilgang på oksygen ved 45 °C med uttak etter 0,5, 22 og 27 timer.



Figur 15. *Sekundære harskningsprodukter*. AV av selolje tilsatt, kreklingeekstrakt A (ikke varmembehandlet) 2000 ppm og kreklingeekstrakt B (varmebehandlet med koking i ti minutter) 2000 ppm inkubert med full tilgang på oksygen ved 45 °C med uttak etter 0, 5, 22 og 27 timer målt som absorbans med bølgelengde 350 nm.

4.4 Evaluering av ekstraktene

Kreklingeekstraktet gir ingen antioksidative effekter i oljesystem. I vandig system viste den en viss inhiberende effekt på oksidasjon av DHR. Antall polyfenoler blir målt til å være 6,58 g /100g \pm 0,42 g. Vi vet altså at det finnes komponenter med antioksidative virkninger i krekling, men de hadde ingen effekt i oljesystem.

En forklaring på dette kan være den dårlige løseligheten vi opplevde med ekstraktet. Under oppveiling observerte vi at det hadde lett for å klumpe seg sammen. Ekstraktet forble klumpete i oljen og ble i liten grad fordelt inn i den. Kreklingeekstraktet la seg etter et døgn på bunnen av kolben og dannet en seig masse. Dette kan ha ført til at det ble for lite kontakt mellom ekstraktet og oljen og den antioksidative effekten uteble.

En annen faktor kan være at de fleste antioksidantene i krekling ligger i skallet (Hakkinen *et al.* 1999) og at det av den grunn ikke kom med i ekstraksjonen. I Zia-ur's metode ble preparatene kvernet i en kvern (Tecator – Cemotec 1090 samples mill, Hogan, Sweden). En slik kvern hadde vi ikke, så vi benyttet en mortel for å homogenisere den frysetørkede bærmassen. Skallene var tynne og solide og vi klarte ikke å knuse dem ordentlig. De ble liggende igjen i filterpapiret ved ekstraksjonen. Ekstrakt B som var varmebehandlet hadde også skallene intakt. Hvis hovedmengden av fenolene ligger i skallet er det tenkelig at mange av disse komponentene ikke kom med i ekstraksjonen. Under målingene av totalt innhold polyfenoler ble de frysetørkede bærene ekstrahert med metanol og HCl (1:1), mens ved vår ekstraksjon ble det kun ekstrahert med metanol. HCl vil etter all sannsynlighet har frigjort en del av polyfenolene som lå i skallet. Dermed er ikke målingene av totalt innhold polyfenoler helt gjeldende for våre ekstrakter og det reelle innholdet av polyfenoler kan ha vært mye lavere.

Man ser en stor variasjon av flavonoidinnholdet i krekling. I undersøkelser av innholdet av flavonoidene myricetin quersetin og kaempherol i vin fra krekling varierte innholdet av disse (summert) fra 23,3 til 6.0 mg /l (Vuorinen *et al.* 2000). Variasjonen kan tilskrives variasjoner i årstid og geografiske og fysiologiske betingelser for kreklingen i de forskjellige vinene. Vår krekling ble plukket i september måned og det var et stort innslag av brune, ”råtnede” bær som ble renskes ut. Om disse variasjonene gikk negativt ut over våre ekstrakter er uvisst.

Tid er en annen faktor som kan ha hatt innvirkning på resultatet. Det tok ca. fem måneder fra da ekstraktene ble tilvirket til de ble testet ut med pålitelige resultater. Dette kan være en forklaring, men den støttes heller ikke av mengden polyfenoler som ble målt.

Vi hadde håpet å finne forskjellig effekt mellom den varmebehandlede og den ikke-varmebehandlede kreklingen. Det har vist seg at koking av blant annet tomater øker bio-tilgjengeligheten av enkelte antioksidanter. I forsøk der personer fikk servert enten kokte eller ukokte cherry tomater kunne man måle signifikant høyere konsentrasjoner av naringenin (flavanoid) og cloorogenic acide (ester). Begge komponenter som er vel kjent for å ha potensielle helsemessige egenskaper (Bugianesi *et al.* 2004). Det samme gjelder for karotenoidet lycopene, som også har antioksidative egenskaper. Lycopene viser større biologisk tilgjengelighet i tomatpurre enn i ferske tomater (Gartner *et al.* 1997). Om dette også gjelder for krekling er uvisst. Vi klarte ikke å påvise en slik forskjell.

Tangekstraktet gir en signifikant høyere verdi av både AV og PV i forhold til blindprøven i fettsystem og i emulsjoner. Det har altså en prooksidativ virkning ovenfor seloljen.

Ser vi derimot på figur 11 har tangmelet en meget god effekt. Her er det ekstraktets evne til å forhindre oksidasjon av DHR som testes. Dette tyder på at ekstraktet inneholder antioksidative komponenter, men at disse ikke virker i oljesystem, eller at virkningen overskygges av en prooksidativ faktor som tangmelet også innehar.

I de forsøkene der antioksidative effekter i tang og tare er testet er det benyttet ekstrakter fra fersk tang og ikke fra tangmel. En forklaring på at ekstraktet ikke virker kan derfor være at tangmelet er utsatt for høy temperatur under prosesseringen når fuktigheten dampes ut. Dette kan føre til at antioksidantene er ødelagt når melet er ferdig. Denne forklaringen blir lite pålitelig siden det ble påvist en bra effekt i det vandige systemet. Andre finner motstridende resultater; I Kudas undersøkelser av antioksidative egenskaper i spiselig tang økte radikal-scavenging-aktiviteten etter varmebehandling ved 121 °C i en time (Kuda *et al.* 2006). Mens i Jimenez's forsøk viste kommersielle tang-produkter lavere antioksidantkapasitet enn fersk tang (Jimenez-Escrig *et al.* 2001).

Tangmel inneholder også sporstoffer som vi vet har en negativ effekt på lipider. Vi vet at tilstedeværelsen og aktiviteten av transisjonsmetaller er avgjørende for lipidens stabilitet. Spesielt jern og kopper er høyt aktive prooksidanter fordi de kan skifte mellom to valenser (Fe^{2+} - Fe^{3+} og Cu^{+} - Cu^{2+}). Selv sporemengder (0,1 – 1 ppm) av disse metallene kan stimulere oksidasjon (Olsen 2007) Dette påpeker viktigheten med å hindre metallkontaminering under produksjon av lipidholdige produkter.

Tangmelet inneholder som vi ser i tabell 3, både jern (150 – 1200 ppm) og kopper (1-10 ppm). Man kan anta at noe av dette metallet kom med under ekstraksjonen men det ble ikke foretatt noen form for måling av tilstedeværelse av metaller i ekstraktet.

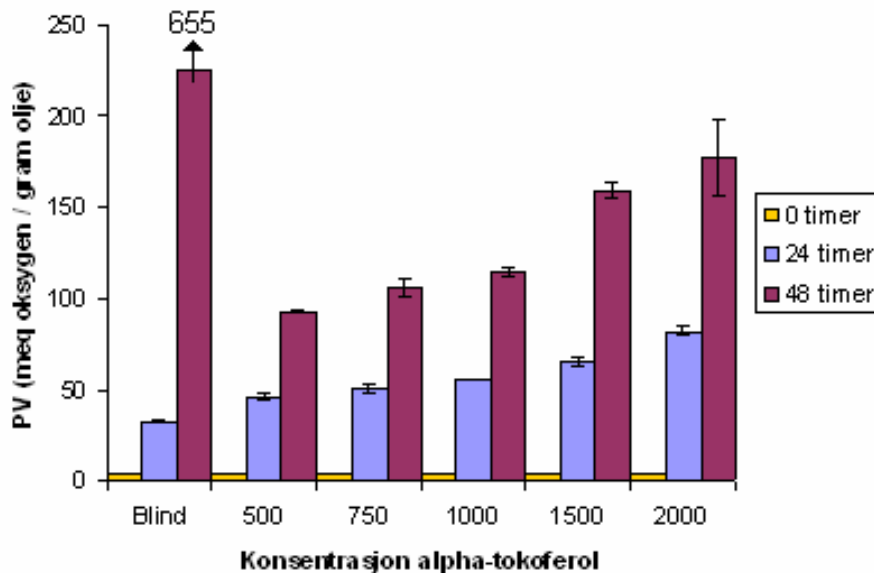
Tabell 3. Andelen transisjonsmetaller i tangmel (tangmelets produktspesifikasjon, se appendiks)

Transisjonsmetall i tangmel		Mengde (ppm)
Jern	Fe	150 - 1000
Zink	Zn	40 – 200
Magnesium	Mn	10 - 50
Kopper	Cu	1 - 10
Molybdeb	Mo	1 – 5

Ved bruk av ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for stabilisering av fiskeoljer i olje-i-vannemulsjoner som inneholder jern viser EDTA kun en beskyttende evne der molar-konsentrasjonen er høyere enn jernet i emulsjonen. (Frankel *et al.* 2002) Dette kan virke banalt logisk, men det staker ut kursen man må ha om man skal kunne bruke tangmelekstrakter som stabilisator for lipider. Man må altså framstille ekstraktet på en slik måte at jernet ikke kommer med eller finne en måte å fjerne jernet fra ekstraktet.

4.5 Optimalt nivå av α - tokoferol i selolje

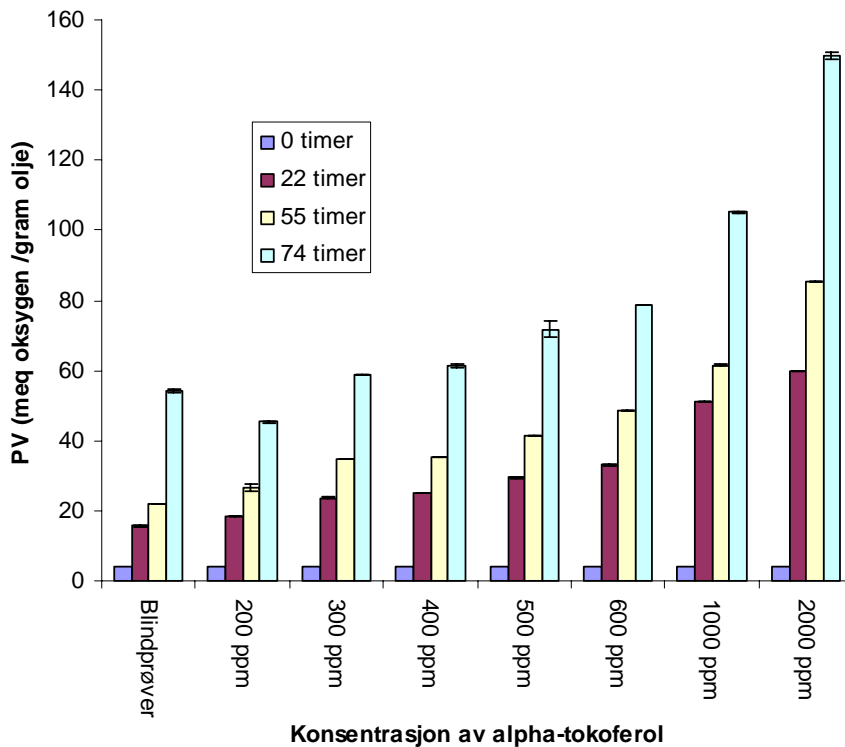
Det ble foretatt to lagringsforsøk med ulike konsentrasjoner av α - tokoferol. Første forsøk ble kjørt med 60 °C i to døgn. Etter 48 timer var det oljen med 500 ppm som hadde lavest PV (figur 16). Det ble ikke foretatt målinger av AV da dette kun var innledende forsøk.



Figur 16. Perksidverdi (PV) av selolje tilsatt, 500, 750, 1000, 1500 og 2000 ppm α - tokoferol. Prøvene inkubert med full tilgang på oksygen ved 60 °C med uttak etter 0, 24 og 48 timer.

PV målinger (figur 17) viser at etter 22 og 55 timer med 45 °C virker alle konsentrasjonene av tokoferol prooksidantisk på seloljen. Etter 74 timer får blindprøven en høyere PV enn 200 ppm tokoferol. Ved 45 °C kan det virke som at en lav konsentrasjon gir det den beste beskyttelsen av oljen. En konsentrasjon under 200 ppm gir den beste beskyttelse av selolje ved 45 °C.

Om vi hadde hatt mer tid til rådighet ville vi kjørt forsøket på nytt med inkubasjon på 60 °C og med noen konsentrasjoner på < 200 ppm α - tokoferol



Figur 17. Perksidverdi (PV) av selolje tilsatt 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 2000 ppm α -tokoferol. Prøvene inkubert med full tilgang på oksygen ved 45 °C med uttak etter 0, 22, 55 og 74 timer.

Ved konsentrasjonsforsøk gjort på soyaolje viser α -tokoferol å ha følgende optimale konsentrasjoner ~ 50 - 250 ppm ved 40 °C, 50 – 100 ppm ved 50 °C og 100 ppm ved 60 °C ($P < 0,05$) (Evans *et al.* 2002)

Når dette er sagt er det ikke holdbart å anbefale denne konsentrasjon av tokoferol for et produkt som er beregnet for kjølig lagring.

Det er viktig å ettersjekke resultater fra et provoser forsøk med naturlige lagringsforsøk. Forholdene som setter i gang oksidasjon under et provosert forsøk kan ha en stor innvirkning på hvordan antioksidanten virker. (Evans *et al.* 2002). Seloljen som Fortuna Oils produserer tilsettes langt høyere konsentrasjoner enn hva som her påvises - mellom 1000 og 2000 ppm. En antioksidant har en spesifikk effekt ved en temperatur og kan virke helt forskjellig ved en annen. Derfor ble samme oppsettet satt til langtidslagring i kjøleskap, fluschet med nitrogen i fargede flasker. Dette forsøket ble satt i gang såpass seint at det ikke blir presentert resultater i denne oppgaven.

5. Konklusjon

I denne oppgaven har vi forsøkt å finne antioksidative effekter av ekstrakter fra krekling og tangmel. Målet med arbeidet har vært å finne alternativer til syntetiske antioksidanter og tokoferoler som benyttes i næringsmiddelindustrien. Ekstraktene har blitt testet for antioksidativ kapasitet gjennom lagringsforsøk i vandige systemer, fettsystem og i emulsjoner. Grad av oksidasjon ble målt som peroxid-verdi (PV) og innhold av anisidinkomplekserende forbindelser (AV)

Ekstraksjon av frysetørket krekling og tangmel ble utført etter metoder beskrevet av Zai-ur (2006) Forsøk for testing av antioksidative effekter i fettsystem ble utført etter metode beskrevet av Pettersen (2006). Forsøk for testing av antioksidative effekter i vannsystem ble utført etter metode beskrevet av Dunlap (2003).

Selolje ble analysert med hensyn til stabilitet og fettsyresammensetning. Ekstraksjon av fett ble utført med Bligh & Dyer (1959). Fett for fettsyreanalyse ble metylert ved metode av Stoffell, Chu & Ahrens (1959), og analysert med gasskromatograf.

Initielle undersøkelser av optimal konsentrasjon av α -tokoferol i selolje ble foretatt.

Tangmelet viste seg å ha god effekt i et vandig system, mens virket prooksidantisk i fettsystem. Kreklige ekstraktet viste svak effekt i vandig system og ingen merkbar effekt i fettsystem. Innledende forsøk for optimal konsentrasjon av α -tokoferol i selolje ble beregnet til å være <200 ppm i et provosert system.

Det å kunne tilby et helsekostprodukt som inneholder sunne marine LC n-3 PUFA sammen med naturlige antioksidanter vil være en spennende satsning.

Siden løseligheten er såpass dårlig og den beskyttende effekten således uteble må man kanskje tenke bort fra det å løse de opp i hverandre. Vi vet at effekten av LC n-3 PUFA forsterkes med et kosthold rikt på naturlige antioksidanter. Hvis vi tenker oss trankapselmarkedet, kunne man kanskje inkorporere et ekstrakt i soft-gel-kapselen og dermed selge omega-3 med naturlige antioksidanter.

Ved et eventuelt videre arbeid ville det vært interessant å se om en kunne finne en måte å få ekstraktet i en bedre pulverform før det ble blandet med oljen. Videre kunne det vært spennende å prøve og blande ekstraktene kraftigere inn slik at de forble i oljen og ikke samlet seg på bunnen. Det hadde også vært interessant og målt innhold av transisjonsmetaller i

tangmelekstraktet. Hvis det inneholdt transisjonsmetaller ville det vært naturlig å prøve ut andre ekstraksjonsmetoder på tangmelet og/eller prøve å fjerne transisjonsmetallene.

Når det gjelder forsøkene med å finne et optimalt nivå av α -tokoferol i selolje ville et naturlig steg videre vært å prøve ut andre tokoferoler for å se om de gav bedre beskyttelse. Videre vil det være interessant å se nærmere på forsøket som ble satt i gang under normale lagringsbetingelser.

Referanseliste

- Forbrukerrådets nettside www.forbrukerportalen.no/Artikler/fr/2001/1022327826.54# (sett 05.06.2007)
- Høgskolen i Telemark nettside: www-studnot.hit.no/u971016/kreclin/kreclinf.htm (sett 05.06.2007)
- Benjaminsen, D. Bedriftsbesøk ved Algea AS i Brønnøysund 10.04.2006.
- Ramberg, Ø. Bedriftsbesøk ved GC Rieber Fortuna Oils i Kristiansund 22.02.2007
- Pettersen, J. Prefessor ved fiskeriforskning I Bergen 2006
- Pettersen, J. (2006a) Green Antioxidants match synthetics. Intervju i *Fish Farming International* June 2006.
- Pettersen, J. (2006b) Natural antioxidant assessment: Stabilizing effect on marine lipids.
- Johansson L, et al (2006) Transfettsyrer I norsk kosthold. Medisin og vitenskap –Tidsskrift for Den norske lægeforening. Nr 6, 2006; 126: 760-763.
- Elvevoll E.O., James D.G (2000) Potential benefits of fish for maternal, foetal and neonatal nutrition. *Food Nutrition and Agriculture* **27** 28-37.
- Olsen, RL. (1997) Lipidkjemi – med vekt på fisk. Kompendium for fiskerifagstudenter 2.utgave høst 1997.
- Vitenskapskomiteen for Mattrygghet (2006) ”Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk” http://coreweb.nhosp.no/fhl.no/html/files/vitenskapskomiteen_1.pdf (sett 05.06.2007)
- Campbell M K. Farrell S O. Biochemistry - fjerde utgave. Thomson Brooks/Cole ISBN 0030348498.
- Havforskningsinstituttet. Havets ressurser 2004: 143-146
- Barstad, H. et al.(2006) ”Antioxidant synergy effect between α -tocoferol and ascorbate on the autoxidation of liposomes.” Seafood research from fish to dish: 87-94 Proc.WEFTA.
- Higdon J Ph.D, (2004) Oregon state University Micronutrient Information Center <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminE/> (sett 05.06.2007)
- Athukorala, Y., K. W. Lee, F. Shahidi, M. S. Heu, H. T. Kim, J. S. Lee, *et al.* (2003). Antioxidant efficacy of extracts of an edible red alga (*Grateloupia filicina*) in linoleic acid and fish oil. *Journal of Food Lipids* **10**(4): 313-327.

- Brox, J., K. Olaussen, B. Osterud, E. O. Elvevoll, E. Bjornstad, T. Brenn, *et al.* (2001). A long-term seal- and cod-liver-oil supplementation in hypercholesterolemic subjects. Lipids **36**(1): 7-13.
- Bryhni, E. A., N. P. Kjos, R. Ofstad and M. Hunt (2002). Polyunsaturated fat and fish oil in diets for growing-finishing pigs: effects on fatty acid composition and meat, fat, and sausage quality. Meat Science **62**(1): 1-8.
- Bugianesi, R., M. Salucci, C. Leonardi, R. Ferracane, G. Catasta, E. Azzini, *et al.* (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. European Journal of Nutrition **43**(6): 360-366.
- Covas, M. I., K. Nyyssonen, H. E. Poulsen, J. Kaikkonen, H. J. F. Zunft, H. Kiesewetter, *et al.* (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors - A randomized trial. Annals of Internal Medicine **145**(5): 333-341.
- Dunlap, W., L. Llewellyn, J. Doyle and Y. Yamamoto (2003). A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. Marine Biotechnology **5**(3): 294-301.
- Evans, J. C., D. R. Kodali and P. B. Addis (2002). Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. Journal of the American Oil Chemists Society **79**(1): 47-51.
- Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. Food Chemistry **57**(1): 51-55.
- Frankel, E. N., T. Satue-Gracia, A. S. Meyer and J. B. German (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(7): 2094-2099.
- Garg, M. L., L. G. Wood, H. Singh and P. J. Moughan (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. Journal of Food Science **71**(5): R66-R71.
- Gartner, C., W. Stahl and H. Sies (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. American Journal of Clinical Nutrition **66**(1): 116-122.
- Hakkinen, S. H., S. O. Karenlampi, I. M. Heinonen, H. M. Mykkanen and A. R. Torronen (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(6): 2274-2279.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Loliger and O. I. Aruoma (1995). The Characterization of Antioxidants. Food and Chemical Toxicology **33**(7): 601-617.
- Halvorsen, B. L., K. Holte, M. C. W. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S. F. Remberg, *et al.* (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. Journal of Nutrition **132**(3): 461-471.

- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics **96**(2-3): 67-202.
- Hibbeln, J. R., L. R. G. Nieminen, T. L. Blasbalg, J. A. Riggs and W. E. M. Lands (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. American Journal of Clinical Nutrition **83**(6): 1483S-1493S.
- Hoffman, D. R., E. E. Birch, D. G. Birch and R. D. Uauy (1993). Effects of Supplementation with Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty-Acids on Retinal and Cortical Development in Premature-Infants. American Journal of Clinical Nutrition **57**(5): S807-S812.
- Ito, N., M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai and M. Tatematsu (1986). Studies on Antioxidants - Their Carcinogenic and Modifying Effects on Chemical Carcinogenesis. Food and Chemical Toxicology **24**(10-11): 1071-1082.
- Jimenez-Escrig, A., I. Jimenez-Jimenez, R. Pulido and F. Saura-Calixto (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. Journal of the Science of Food and Agriculture **81**(5): 530-534.
- Kahkonen, M. P., A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, *et al.* (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 3954-3962.
- Krasnov, E. A., E. V. Ermilova, T. V. Kadyrova, V. A. Raldugin, I. Y. Bagryanskaya, Y. V. Gatilov, *et al.* (2000). Phenolic components of Empetrum nigrum extract and the crystal structure of one of them. Chemistry of Natural Compounds **36**(5): 493-496.
- Kuda, T., T. Hishi and S. Maekawa (2006). Antioxidant properties of dried product of 'habanori', an edible brown alga, Petalonia binghamiae (J. Agaradh) Vinogradova. Food Chemistry **98**(3): 545-550.
- MacLean, C. H., S. J. Newberry, W. A. Mojica, P. Khanna, A. M. Issa, M. J. Suttorp, *et al.* (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk - A systematic review. Jama-Journal of the American Medical Association **295**(4): 403-415.
- Medina, I., M. J. Gonzalez, M. Pazos, D. Della Medaglia, R. Sacchi and J. M. Gallardo (2003). Activity of plant extracts for preserving functional food containing n-3-PUFA. European Food Research and Technology **217**(4): 301-307.
- Park, D. C., H. S. Jr, H. Lee, J. J. Kim, Y. M. Jung, Y. S. Gyoung, *et al.* (2006). Natural antioxidants to improve stability of refined anchovy oil against oxidation. Food Science and Biotechnology **15**(2): 202-206.
- Psota, T. L., S. K. Gebauer and P. Kris-Etherton (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. American Journal of Cardiology **98**(4A): 3I-18I.
- Rose, E. L. and B. J. Holub (2006). Effects of a liquid egg product containing fish oil on selected cardiovascular disease risk factors: A randomized crossover trial. Food Research International **39**(8): 910-916.

- Ruperez, P., O. Ahrazem and J. A. Leal (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(4): 840-845.
- Ruxton, C. H. S., S. C. Reed, M. J. A. Simpson and K. J. Millington (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. Journal of Human Nutrition and Dietetics **17**(5): 449-459.
- Sanchez-Alonso, I., A. Jimenez-Escrig, F. Saura-Calixto and A. J. Borderias (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. Food Chemistry **101**(1): 372-378.
- Skerget, M., P. Kotnik, M. Hadolin, H. R. Hras, M. Simoncic and Z. Knez (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry **89**(2): 191-198.
- Valencia, I., D. Ansorena and I. Astiasaran (2006). Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with n-3 PUFAs. Meat Science **72**(4): 727-733.
- Viljakainen, S., A. Visti and S. Laakso (2002). Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from Nordic berries. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science **52**(2-3): 101-109.
- Vuorinen, H., K. Maatta and R. Torronen (2000). Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in Finnish berry wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(7): 2675-2680.
- Zia ur, R. (2006). Citrus peel extract - A natural source of antioxidant. Food Chemistry **99**(3): 450-454.

Appendiks.



FORTUNA
oils

Fortuna Oils AS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Batch no: **F033/06**
 Customer: **Fortuna**
 Product: **Seal oil**
 Spec.no: **Fully refined and deodorised.**
 Date of production: **27.11.2006**
 Date of analysis: **27.11.2006**
 Comment: **Final analysis**

Sell by date is 2 years from date of productions.
 Shelf life is guaranteed if the product is stored in unopened original closed containers, protected from heat and light.

Analysis:

Description	Unit	Specification		Results	Methods
		Min	Max		
C20:5 n3 (EPA)	Area%			6,7	AMO001
	mg/g			61	AMO001
C22:6 n3 (DHA)	Area%			8,4	AMO001
	mg/g			77	AMO001
C22:5n3(DPA)	Area%			4,6	AMO001
	mg/g			42,1	AMO001
Total omega-3	Area%			21	AMO001
EPA,DHA,DPA	mg/g			180	AMO001
Total omega-6	Area%			2,3	AMO001
Saturated fatty acid:	Area%			13,5	AMO001
Monounsaturated fatty acids:	Area%			54,9	AMO001
Poly-unsaturated fatty acids:	Area%			23,9	AMO001
Acid Value	mg KOH/g			0,5	AMO003
Peroxide Value	mEq/kg			2,2	AMO006
Anisidine value				1,0	AMO007
Totox				5,5	
Cold test	3h/0°C			Passed	AMO005
Colour	Gardner		5	3	AMO004
Iodine value	gI/100g	120	180	148	AMO011
Specific gravity		0,918	0,927	0,925	AMO015
Vitamin A	IU/g			Trace	AMO012
Vitamin D	IU/g			Trace	AMO013
D-alpha.tocopherol (Vit. E)	ppm	1000	2000	1100	AMO 020
Environmental analysis					
Dioxin and furanes	ng/kg WHOTEQ		2.0	<2,0	AMO017
dl-PCB	ng/kg WHOTEQ		3.0	<3,0	AMO017
Marker-PCBs(7 congeners)	mg/kg		0,09	<0,09	AMO017
Cadmium(Cd)	mg/kg		0,1	<0,1	AMO016
Arsenic(Ac)	mg/kg		0,1	<0,1	AMO016
Lead (Pb)	mg/kg		0,1	<0,1	AMO016
Mercury (Hg)	mg/kg		0,1	<0,1	AMO016

Quality evaluation: This batch is approved according to specification.

Analysed by

Quality Manager



ALGIT SPECIAL G

Product code: 1900025

TYPICAL ANALYSIS

General description:

Seaweed meal

General application:

Multi-purpose, even human consumption

Raw material:

Ascophyllum nodosum

Appearance:

Olive coloured, fine powder

Smell/taste:

Typical for dried and ground seaweed

Particle size:

Min. 85% through a 420 µm sieve

Average composition:

Moisture	12 - 15 %	Carbohydrates (incl. Fibre)	45 - 60 %
Crude protein	5 - 8 %	Alginic acid	20 - 26 %
Crude fat	2 - 4 %	Mannitol	5 - 8 %
Crude fibre, less than	8 %	Laminaran	2 - 6 %
Ash	17 - 27 %	Fucoidin	8 - 10 %
Sand, less than	0.5 %		

Essential major elements:
(macro-nutrients)

Essential trace elements:
(micro-nutrients)

Nitrogen	N	0.8 - 1.3 %	Iodine	I	500 - 1200 ppm
Phosphorus	P	0.05 - 0.15 %	Copper	Cu	1 - 10 ppm
Potassium	K	1 - 3 %	Iron	Fe	150 - 1000 ppm
Calcium	Ca	1 - 3 %	Manganese	Mn	10 - 50 ppm
Sulphur	S	2 - 5 %	Zinc	Zn	40 - 200 ppm
Magnesium	Mg	0.5 - 0.9 %	Boron	B	20 - 100 ppm
Chlorine	Cl	2 - 5 %	Molybdenum	Mo	1 - 5 ppm
Sodium	Na	2 - 4 %	Arsenic	As	20 - 45 ppm

Vitamins are present in the following approximate quantities:

Carotene	20 - 60 ppm	Tocopherols	50 - 200 ppm
Ascorbic acid	200 - 1000 ppm	Niacin	10 - 30 ppm
Riboflavin	5 - 10 ppm	B ₁₂ approx.	0.004 ppm
Thiamin	1 - 5 ppm	Folic acid	0.2 ppm
Biotin	0.1 - 0.4 ppm	Folinic acid	0.2 ppm

9/02

PRODUCT OF NORWAY

Algea AS

Lysaker Torg 8, N-1325 Lysaker, Norway
Phone: +47 67 10 28 00 - Fax: +47 67 10 28 01
algea@hydro.com

Standardkurve for Ferrothiocyanatmetoden

