

Kvalitet av ensilasje og ensilasjeprodukter fra restråstoff etter sløyning av torsk og laks

Thomas Guneriussen

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap, retning sjømat.

Desember 2018



Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Forkortelser	
Sammendrag.....	
1 Innledning.....	1
1.1 Restråstoff fra fiskeri og havbruk i Norge.....	1
2 Bakgrunn	4
2.1 Ensilering	4
2.2 Kvalitet og bruk av ensilasjeproduktene	8
2.2.1 Dannelse av frie fettsyrer.....	8
2.2.2 Effekter av frie fettsyrer	10
2.2.3 Effekter av kortkjedede organiske syrer i fôr	10
3 Materialer og metoder	11
3.1 Materialer	11
3.2 Metoder	12
3.2.1 Måling av pH.....	12
3.2.2 Frie fettsyrer	12
3.2.3 Ensilering av torske- og lakseslo	13
3.2.4 Utvinning av olje fra ensilasje.....	13
3.2.5 Tynnsjikt-kromatografi (TLC)	14
3.2.6 Fast-fase-ekstraksjon av lipidklasser (SPE)	14
3.2.7 Fettsyresammensetning	15
4 Resultater	16
4.1 Ensilering av torskeinnvoller I	16
4.2 Ensilasje av slo fra levendelagret torsk	21
4.3 Ensilering av slo fra oppdrettstorsk og oppdrettlaks.....	23
4.4 Ensilering av slo fra villfanget Vesterålstorsk.....	24
5 Diskusjon.....	27
6 Referanser.....	31

Forord

Denne masteroppgaven markerer avslutningen av et over 5 år langt studieløp ved Norges fiskerihøgskole. Tiden på universitetet har gått utrolig fort, og jeg vil takke alle venner som har gjort det til en tid jeg aldri vil glemme. Jeg vil også takke mine foreldre, og mine brødre for all støtte jeg har fått i løpet av studieårene.

Takk til Vesterålen Marine Olje (VMO) og spesielt Vigilija Svezikiene som hjalp meg på Myre med å skaffe og bearbeide råstoff.

En stor takk rettes til Guro Edvinsen og Lars Dalheim for hjelp på laboratoriet på NFH. Til slutt vil jeg takke min veileder Ragnar L. Olsen. Hans kunnskaper, tålmodighet og engasjement har vært uvurderlig under arbeidet med denne oppgaven.

Fred og kjærighet

Thomas Guneriussen

Tromsø, November 2018

Forkortelser

EPA	Eikosapentaensyre
DAG	Diacylglycerol
DHA	Dokosaheksaensyre
FA	Fettsyrer
FFA	Frie fettsyrer
GC	Gasskromatografi
KE	Kolesterylester
MAG	Monoacylglycerol
MUFA	Enumettetede fettsyrer
PUFA	Flerumettete fettsyrer
SPE	Fast-fase ekstraksjon
TAG	Triacylglycerol
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
TVN	Totalt flyktig nitrogen

Sammendrag

Nesten halvparten (314 000 tonn) av restråstoff i norsk fiskeri- og havbruksnæring ble i 2016 konserverert med ensilering. Dette er en enkel, veletablert og lønnsom teknologi. Fra ensilasjen kan det utvinnes proteinhydrolysat og olje som kan brukes i fôr til gris, kylling og oppdrettsfisk. Slik utnyttelse av restråstoff bidrar til matproduksjon og er et viktig eksempel på sirkulær bioøkonomi.

Forskning og industriell erfaring har vist at kvaliteten på olje utvunnet fra ensilasje kan variere i stor grad. Et av kvalitetskravene på marine oljer som brukes i fiskefôr er at innholdet av frie fettsyrer (FFA) i oljen ikke skal overskride 5 %. Om olje fra ensilasjen har et FFA-innhold på over 5 % må oljen raffineres, eller selges til sterkt redusert pris. Hovedmålet med denne oppgaven var å kartlegge mulige årsaker til dannelsen av et uønsket høyt nivå av frie fettsyrer i ensilasjeolje.

Resultatene i denne oppgaven viste at hovedårsaken til et høyt FFA-innhold i oljer fra ensilert torskeslo var for høy pH i ensilasjen. Det har blitt anbefalt å redusere pH til 4,0 ved produksjon av fiskeensilasje for å hindre bakteriell vekst, men dette er for høy pH. Når sloet ble tilsatt maursyre for å redusere pH til 2,9 viste det seg at oljen utvunnet fra ensilasjen hadde en akseptabel kvalitet (< 5 % FFA) selv etter 10 måneders lagring av ensilasjen. Olje utvunnet fra ensilasje produsert med pH 3,5 og 4,0 hadde et mye høyere innhold av FFA (14 og 26 %). En annen mulig årsak til høyt FFA-innhold viste seg å være mage-tarminnholdet. Dette ble undersøkt ved å lage ensilasjer ved pH 2,9 av mage-tarminnhold og av innvoller hvor mage-tarmsystemet var tømt for innhold. Resultatene viste at olje fra ensilasje av mage-tarminnholdet hadde et mye høyere FFA-innhold enn olje fra ensilasje av tømte innvoller. Frossen lodde som brukes ved fôring av villfanget torsk, ble ensilert ved lav pH og olje fra den hadde også høyt FFA-innhold.

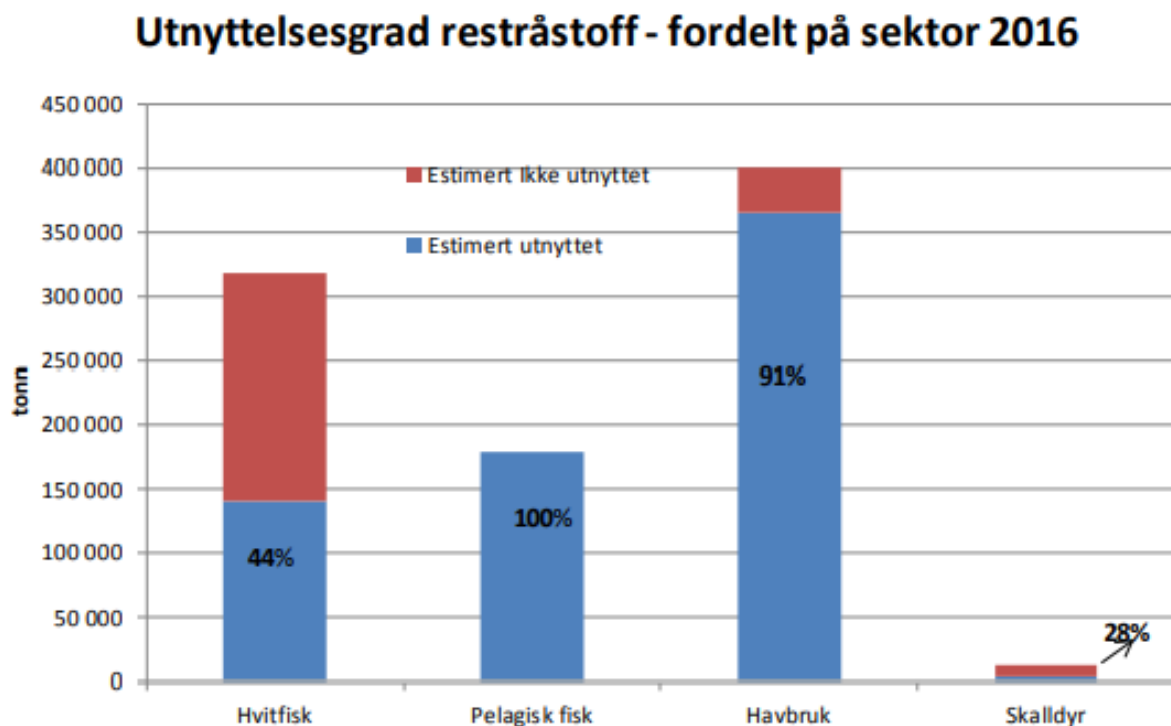
Ensilasjer med høyt innhold av FFA ble separert ved fast-fase ekstraksjon og fettsyresammensetning i triacylglyserol- og FFA-fraksjoner ble analysert. Analysen viste ingen forskjell i de to fraksjonene som tyder på at FFA hovedsakelig stammer fra triacylglyserol, ikke fra fosfolipider.

Det ble også sammenlignet FFA i olje utvunnet fra ensilasje av oppdrettslaks og oppdrettstorsk. Olje utvunnet fra ensilert oppdrettslaks hadde ett lavere innhold av FFA enn olje fra ensilert oppdrettstorsk. Dette kan tyde på artsspesifikke forskjeller.

1 Innledning

1.1 Restråstoff fra fiskeri og havbruk i Norge

Restråstoff er det som ikke er det primære hovedproduktet ved foredling av marint råstoff. Primære råstoffer er fisk og skalldyr som oppdrettes eller fanges på norske kvoter i norske farvann og/eller landes i Norge (Richardson et al., 2017). Restråstoffet blir gjerne fordelt på fire sektorer; hvitfisk, pelagisk, havbruk og skalldyr (figur 1). I 2016 var grunnlaget for restråstoff fra hvitfisk 319 000 tonn fra foredlingen av 746 400 tonn fisk. Av dette restråstoffet ble i overkant av 140 000 tonn (44 %) utnyttet. Fra foredlingen av pelagisk fisk til konsum, hovedsakelig sild, makrell, ble alt restråstoffet på til sammen 177 600 tonn utnyttet. I havbruksnæringen ble mer enn 90 % utnyttet mens en tilsvarende prosentandel i skalldyrnæringene var bare 28 % (figur 1).



Figur 1: Råstoffgrunnlag og tilgjengelig restråstoff fordelt på sektor. Av restråstoff fra skalldyr blir 28% anslått utnyttet, 2016 (fra Richardson et al., 2017).

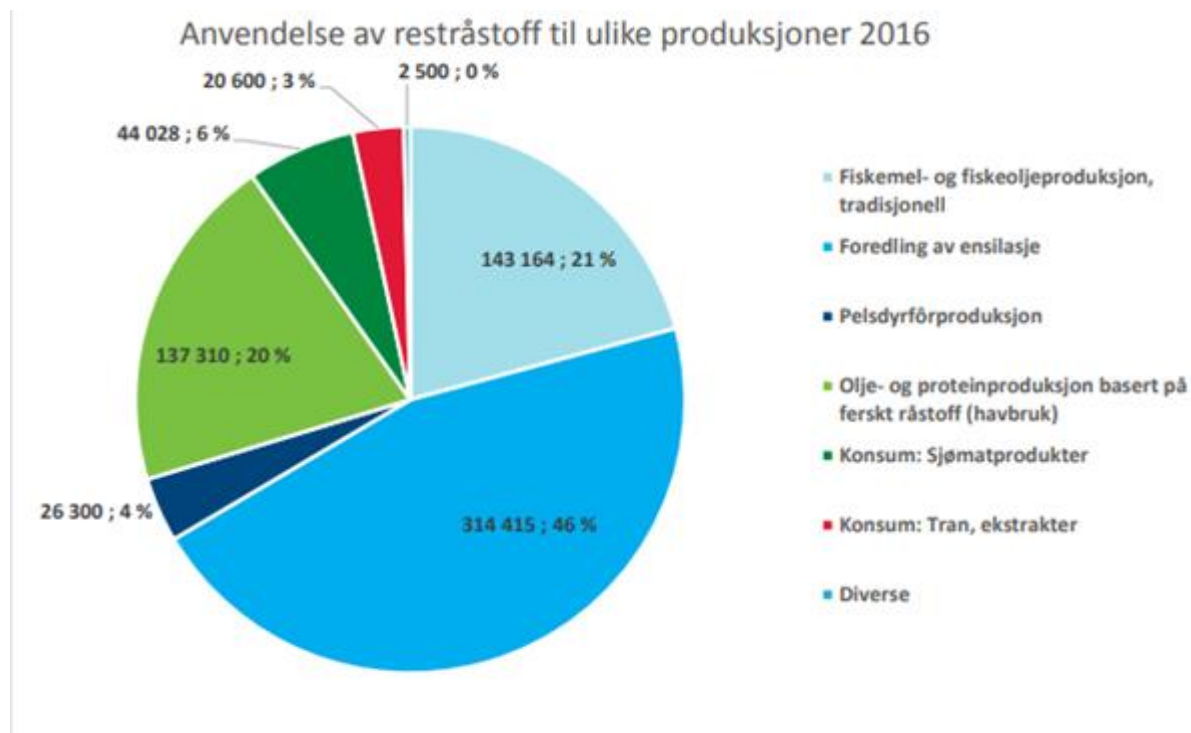
Årsaken til at mindre enn halvparten (44 %) av restråstoff fra hvitfisknæringen ble utnyttet kommer av plassmangel om bord i havfiskeflåten og manglende økonomiske insentiver for fiskeflåten til å lande restråstoffet. Havfiskeflåten foredler gjerne fisken om bord til hodekappet sløyd fisk (HG-fisk) eller fileter før de fryses inn. Restråstoffet males opp og spyles på havet, eventuelt blir det kastet direkte over bord. I dag kan nybygde trålere få installert utstyr

for utnyttelse av restråstoff om bord i båtene. Eksempel på dette er kompaktteknologi for produksjon av presskakemel, men om disse er i bruk er usikkert (Haarslev Industries, 2018). I eldre store fabrikktrålere med god plass er det montert utstyr for ensilering (Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond 2015). Ved fremtidig nybygging av fartøyer til havfiskeflåten bør det kanskje settes av plass om bord slik at restråstoff kan tas vare på. Men da må rederiene antageligvis gis insentiver til dette, for eksempel i form av økte kvoter. Fra havbruksnæringen utnyttes mer enn 90 % av restråstoffet. Noe går til mat (hoder, rygger, buklist), eller ved at det produseres fôringredienser til oppdrettsnæringen eller annen matproduksjon. Ferskt råstoff (rygger, buklist) benyttes i noen grad til produksjon av helsekostprodukter til mennesker eller kjæledyr. I all hovedsak er det bare blod fra slaktingen av laks som ikke utnyttes. Dette sendes i avløpsvannet fra produksjonen.

Årsaken til at en så liten andel av restråstoff fra skaldyrnæringene utnyttes kan være flere. Skall fra industriell foredling av reker benyttes til en viss grad til utvinning av kitin som deretter omdannes til kitosan (Olsen et al., 2014). En viktig årsak til at en stor del av dette restråstoffet ikke anvendes kan være at de daglige volumene er for små til å kunne forsvare en lønnsom utvinning av kitin eller tørking til et skaldyrsmel. Alternativt blir hele skaldyr solgt til konsumenter eller Horeca-segmentet (hotell, restaurant og catering). Volumene av restråstoff blir for små til å kunne utnyttes herfra.

Restråstoff (kategori 3) fra fiskeri- og havbruksnæringen har en rekke bruksområder. I 2016 gikk nesten halvparten (46 %) til produksjon av ensilasjeprodukter (figur 2). Av det resterende volumet gikk 21 % til tradisjonell fiskemel- og fiskeoljeproduksjon, mens 20 % ble brukt til produksjon av olje og proteinprodukter fra ferskt restråstoff fra havbruksnæringen. En mindre andel (6 %) ble benyttet til konsumprodukter som for eksempel kaviar og hermetikk fra torskerogn, tørkede torskehoder og buklist og hoder fra laks. Fire prosent av restråstoffet ble solgt som pelsdyrfôr mens 3 % gikk til framstilling av torskelevertran.

I 2007 innførte EU biproduktforordningen (NO.1774/2002), som også gjelder i Norge. Denne forordningen fordeler biprodukter i kategorier fra 1 til 3 ut fra hvor i verdikjeden biproduktene oppstår, sykdomssituasjon eller årsak til hvorfor produksjonsdyret har blitt slaktet/ avlivet (Mattilsynet, 2014).



Figur 2: Anvendelse av restråstoff fra fiskeri- og havbruksnæringen (fra Richardsen et al., 2017).

Forordningen legger altså retningslinjer for hvilken kategori restråstoff skal under, og hvordan det videre skal behandles og hva det kan brukes til. Restråstoff som faller under kategori 1 er av lavest kvalitet fordi det omfatter råstoff hvor det er fare for at produktet kan overføre sykdommer til mennesker eller andre dyr. Restråstoff som går under kategori 1 skal holdes langt unna næringskjeden og derfor går alt restråstoff i denne kategorien til destruksjon (brennes). I praksis har man ikke kategori 1 restråstoff i fiskeri- og havbruksnæringen. Kategori 2 omfatter stort sett fisk med klinisk tegn til sykdom, som er behandlet med medikamenter eller død fisk fra akvakultur. Restråstoff (hel fisk) i kategori 2 brukes til tekniske formål, bioenergi, gjødsel og jordforbedring. Dette restråstoffet kan også brukes i fôr til ikke-matproduserende dyr som pelsdyr. For at restråstoff fra fisk skal kunne brukes til fôr eller konsumprodukter må dette komme fra fisk som er slaktet for humant konsum. Dette er kategori 3 biprodukter. Restråstoff i kategori 3 blir enten brukt til mat, av fôrindustrien eller til produksjon av helsekostprodukter.

Produksjon av ensilasje er en billig og enkel teknologi som er velegnet for konservering av marint restråstoff i liten eller stor skala (Raa & Gildberg, 1982). I praksis blir restråstoffet kvernet opp og tilsatt maursyre slik at pH blir mindre enn 4,0. I tillegg blir gjerne en antioksidant, til nå ethoxyquin, også tilsatt. Denne lave pH vil hindre eller i stor grad hemme

vekst av mikroorganismer. Restråstoffet vil imidlertid bli brutt ned av endogene enzymer, hovedsakelig pepsin fra magesekker tilstede i restråstoffet. Dersom det er lite eller ingen magesekker tilstede vil den endogene hydrolysen ta lengre tid og være forårsaket av lysosomale enzymer slik som katepsin D og L. Etter noen uker, avhengig av temperatur, vil fett (oljen) skilles fra en væskefase som inneholder nedbrutte proteiner og andre vannløselige stoffer. Avhengig av hvor mye bein det er i restråstoffet vil det også dannes et større eller mindre bunnfall.

Industriell erfaring har vist at kvaliteten på oljen utvunnet etter ensilering av restråstoffet ved slakting av oppdrettslaks kan variere mye (R. L. Olsen, pers. med.). Det har også blitt rapportert at innholdet av frie fettsyrer (FFA) i olje fra ensilasje av torskeinnvoller kan være så høyt som 20 % (Gildberg & Raa, 1977). Dette begrenser bruken av en slik olje blant annet fordi laksefôrindustrien setter en maksimal grense på 5 % FFA i olje som skal tilsettes fôr (Hertrampf og Piedad-Pascual, 2000).

Det overordnede mål med denne oppgaven var å kartlegge mulige årsaker til dannelsen av et uønsket høyt nivå av frie fettsyrer i ensilasjeolje.

2 Bakgrunn

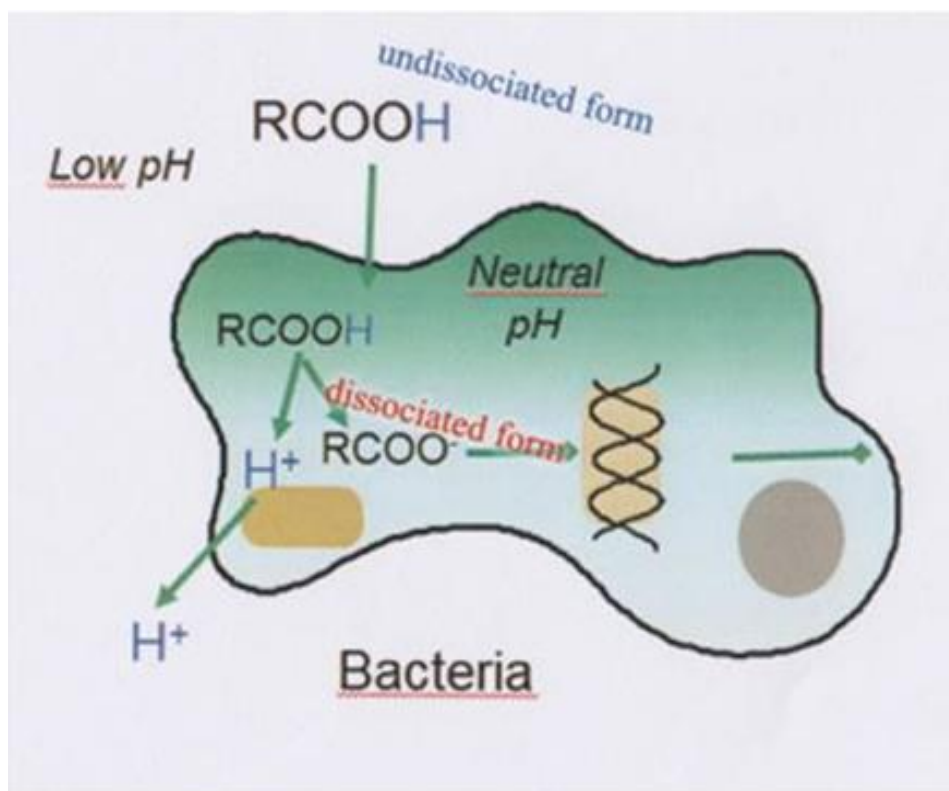
2.1 Ensilering

Ensilering er en metode som tradisjonelt ble brukt til å konservere grønnfôr til husdyr. Teknologien ble utviklet av den finske kjemikeren Artturi Ilmari Virtanen på 1930-tallet. I 1945 fikk han medelt Nobelprisen i kjemi for sine undersøkelser og oppfinnelser i agrikulturell- og næringskjemi. Metoden for ensilering ble patentert i 1932. Virtanen fant ut at hvis nylagret korn ble tilsatt en uorganisk syre under anaerobe forhold ville forråtnelsen stoppe og samtidig ville kornet beholde den næringsmessige verdien. Senere ble det foreslått å bruke maursyre ved ensilering av fiskeslo (Petersen, 1953).

I dag har de organiske syrene stort sett erstattet de uorganiske i ensilasjeproduksjon. De uorganiske syrene er stort sett billigere, men de organiske syrene har en rekke fordeler som veier opp for det. Blant annet representerer de uorganiske syrene en større fare for de som arbeider med dem enn organiske syrer. Dette er fordi de uorganiske syrene er sterke syrer, mens de organiske er svake syrer. Styrken til en syre bestemmes ut fra en pK-verdi. pK er et mål for hvor mye et stoff er spaltet og brukes særlig for syre- og baselikevekter i vann. K_a er et mål for en syres styrke. Svake syrer har en lav K_a -verdi. Når pH i en syreløsning er lik pK_a-verdien er

50 % av syremolekylene i løsningen dissosiert. Uorganiske syrer er fullstendig dissosiert. Dissosiasjon av syremolekyler betyr at de har spaltet av ett eller flere hydrogenion (H^+). En udissoiert syre i et surt miljø vil kunne diffundere gjennom cellemembranen og når den kommer inn i cytoplasma hvor pH er nøytral vil den dissosiere (figur 3).

Proton vil redusere den intracellulære pH og bakterien må pumpe det ut gjennom en energikrevende prosess (ATPase) for å opprettholde nøytral pH. Dette vil hindre vekst av bakterien. I tillegg vil anionet som dannes intracellulært kunne skade DNA, RNA og cellemembranen og derved bidra til bakteriedrepende effekt (Ricke, 2003; Olsen & Toppe, 2017).



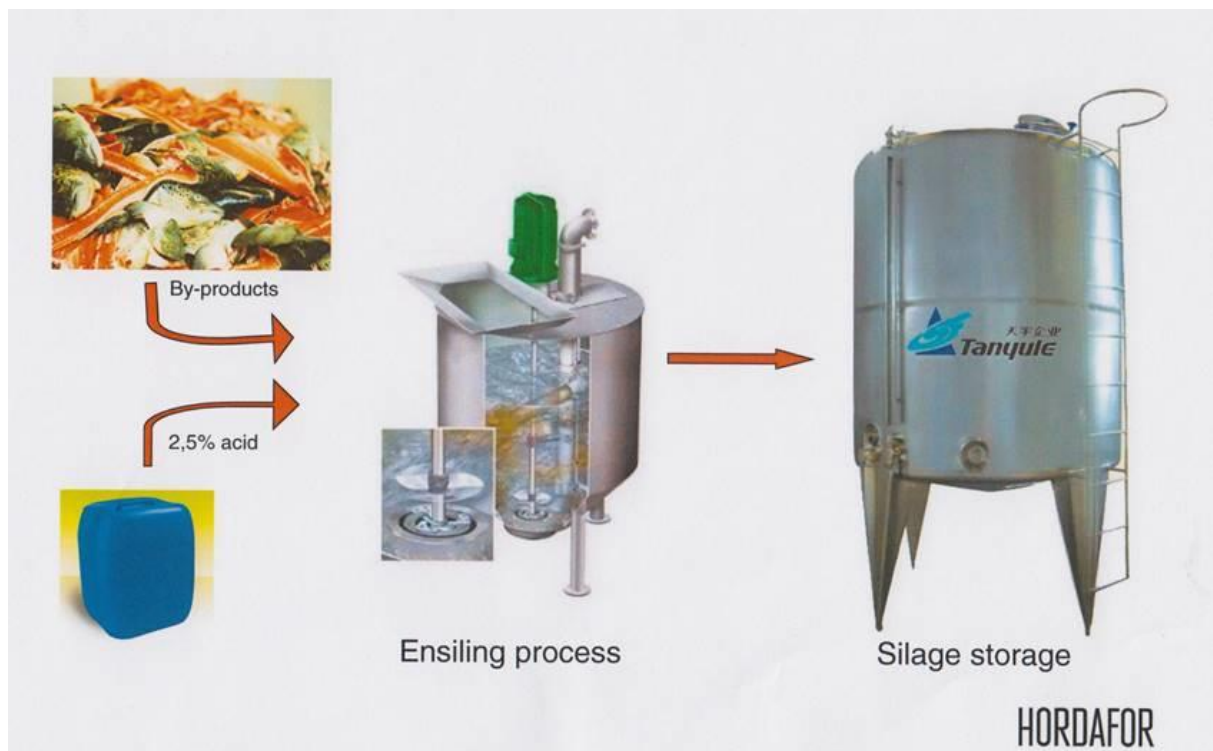
(Wilke, Dr. Eckel GmbH, Tyskland)

Figur 3: Viser hvordan organiske syrer kan trenge gjennom cellemembranen til bakterier og dissosieres på innsiden av bakterien på grunn av nøytral pH (Wilke, 2015)

Hvis en bruker organiske syrer kan en ha en ensilasje med pH 3,5 – 4,0 ved bruk av maursyre og 4,5 ved bruk av propionsyre (Raa et al., 1983). Siden ensilasjen har en så høy pH kan den tilsettes direkte i dyrefôr uten at den må nøytraliseres. Ved bruk av uorganiske syrer og lav pH må ensilasjen nøytraliseres med f. eks kalk før den kan tilsettes dyrefôr. Organiske syrer har konserverende effekter i tillegg til senket pH.

Ensilasje kan også produseres ved å tilsette melkesyrebakterier som *Lactobacillus plantarum*, som startkultur. Bakterier som tolererer lav pH vil omgjøre karbohydrater til melkesyre og da fortsette å holde en lav pH. Det finnes dog lite melkesyrebakterier i fisk, og heller ikke lett fermenterbart substrat (karbohydrater). Hvis ikke karbohydrater fra for eksempel melasse eller biprodukter fra fruktforedling blir tilsatt vil ikke melkesyrebakteriene vokse (Bower og Hietala, 2008; Dong et al., 1993; Fagbenro og Jauncey, 1995). Melkesyren som produseres under fermenteringen vil redusere pH i ensilasjen slik at vekst av bedervelsesbakterier hemmes (Faid, Zouiten, Elmarrakchi og Achkari-Begdouri, 1997). Nivåer av frie fettsyrer i olje fra fermentert ensilasje er rapportert til å være mye høyere enn i olje fra syreensilasje (Vidotti, Pachero og Goncalves, 2011)

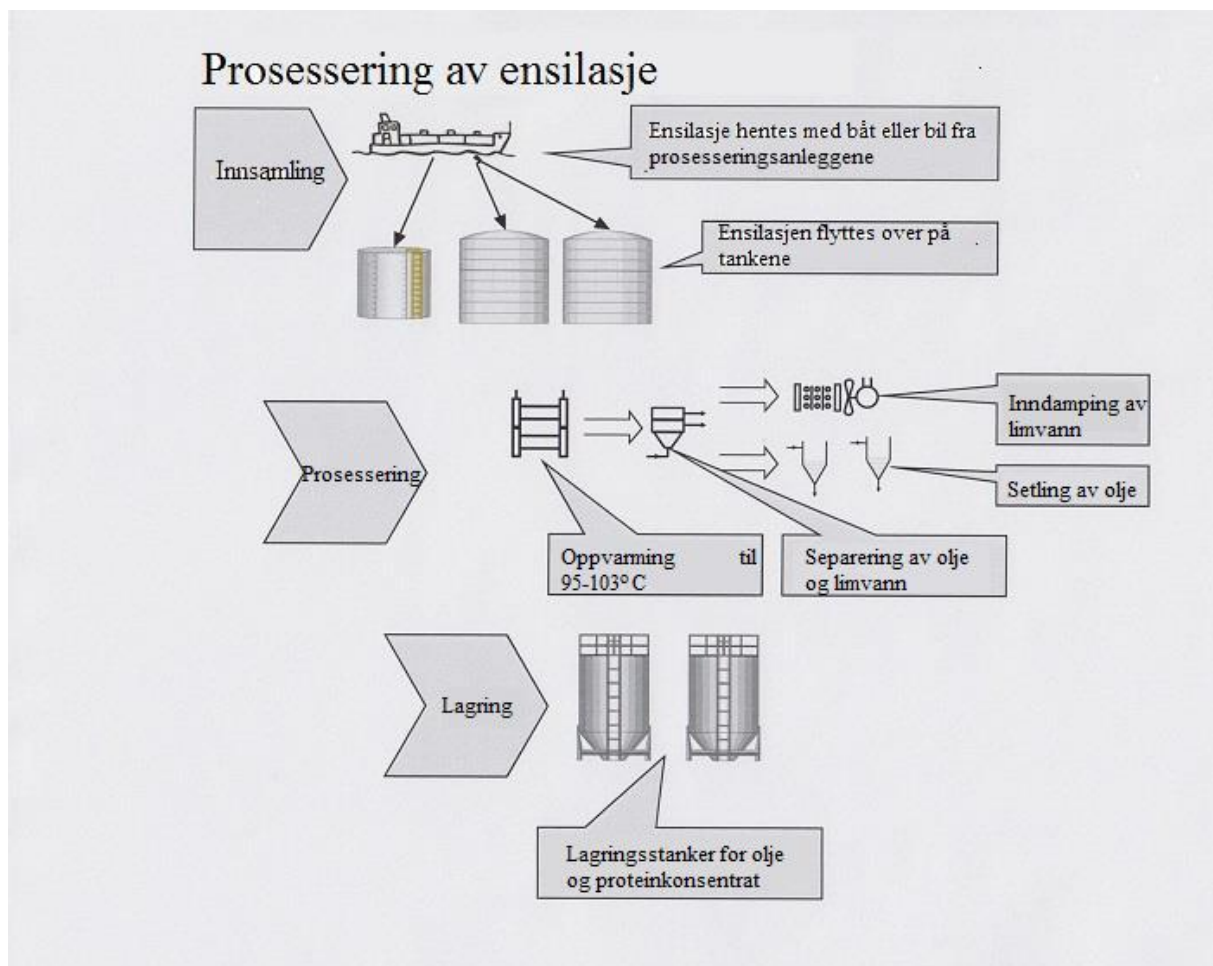
Fermenterbare og billige karbohydrater som melasse fra produksjon av sukker fra sukkerroer, er lite tilgjengelig ved fiskeforedlingsbedrifter i Norge.



Figur 4: Viser i enkle steg hvordan fiskeensilasje produseres. (fra Seliussen, 2016).

I Norge brukes det Ensilox (maursyre tilsatt antioksidanten ethoxyquin) ved ensilering av fiskeslo. Ensilasjeproduksjonen er en relativt enkel prosess. Råstoffet blir først oppmalt før syre tilsettes og det blandes sammen. Det er viktig at råstoffet er godt oppmalt og blandet sammen slik at hele blandingen får en jevn pH (figur 4). Hvis råstoffet er dårlig oppmalt eller ensilasjen er lite homogen vil det være ujevn pH i ensilasjen, og en risikerer lokal forråtnelse i delene av ensilasjen med høy pH.

Ensilasje produseres ved foredlingsanlegg for fisk. Kategori 2 og kategori 3 ensileres separat. Her kan ensilasjonen lagres opp til 6 måneder før den blir samlet inn med båter eller tankbiler. Ensilasjonen transporteres til prosesseringsanlegg hvor den blir varmet opp til minst 95 °C for å deaktivere enzymene i ensilasjonen og som et hygienetrinn (figur 6). Deretter separeres olje, limvann (proteinvann) og grakse (grakse består av emulsjoner mellom fett og proteiner, aske og mineraler) i en dekanter eller trikanter. Oljefasen puttes i en tank hvor den står rolig og «setles». Eventuelt vanninnhold blir deretter tappet ut på bunnen av tanken. Fiskeoljen som er igjen i tanken er da det ferdige produktet. Limvannet settes til inndamping slik at mesteparten av vannet dampes bort og tørrstoffinnholdet er over 40 %. Etter konsentreringen av limvannet ender man opp med ett proteinhydrolysat og hvis det oppstår grakse i produksjonen blir den gjerne tilsatt sammen med proteinhydrolysatet.

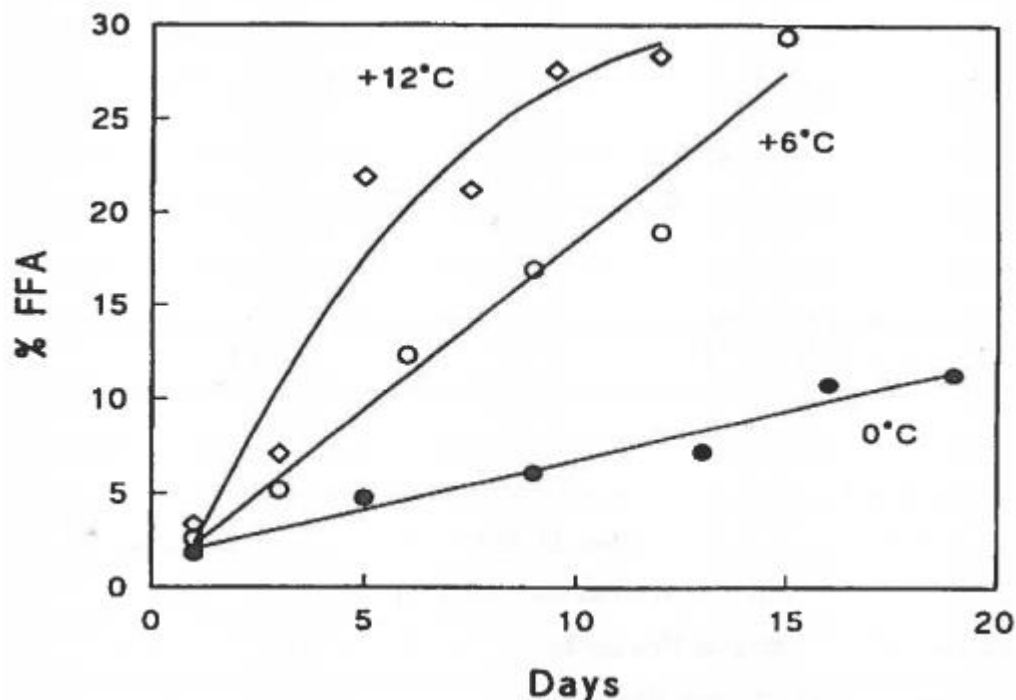


Figur 5: Prosessering av ensilasje i Norge. Ensilasje samles inn langs kysten med båt eller bil og transporteres til prosesseringsanlegg hvor ensilasjeolje, proteinhydrolysat og eventuelt grakse separeres. (Hordafors AS).

2.2 Kvalitet og bruk av ensilasjeproduktene

2.2.1 Dannelse av frie fettsyrer

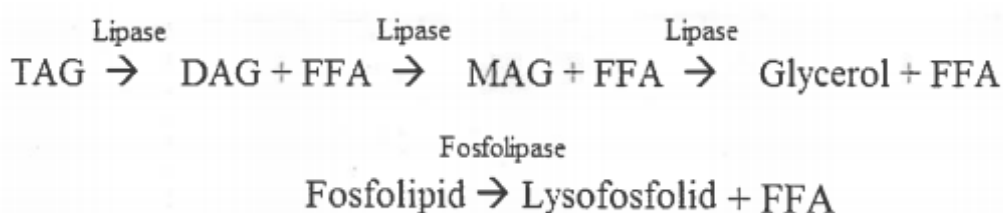
Frie fettsyrer (FFA) er fettsyrer som ikke er esterifisert til en alkohol. I levende dyr finnes det lite FFA, de oppstår etter at døden inntreffer. Andel FFA er blant de viktigste kvalitetskriteriene for fiskeolje. Olje utvunnet fra fersk pelagisk fisk har en veldig lav andel FFA, men denne vil øke jo lengre tid fisken lagres før produksjon til mel og olje (Huss, 1995). Det er flere årsaker til denne økningen. Blant annet fiskens egne fordøyelsesenzymer, en annen årsak er eksogene lipidspaltende enzymer. Disse eksogene enzymer kan komme fra byttedyr som zooplankton, i fiskens eget fordøyelsessystem, og/ eller fra mikroorganismer som vokser under lagringen. Siden dannelsen av FFA er en enzymkatalysert prosess vil hastigheten være temperaturavhengig (figur 6). Måling av frie fettsyrer er en enkel titeringsanalyse og har i mange år, sammen med måling av totalt flyktig nitrogen (TVN) blitt brukt som en kvalitetsindikator på råstoff levert til fiskemel- og fiskeoljeindustrien. Dette for å forsikre seg mot at råstoff ikke er i en tilstand av begynnende forråtnelse.



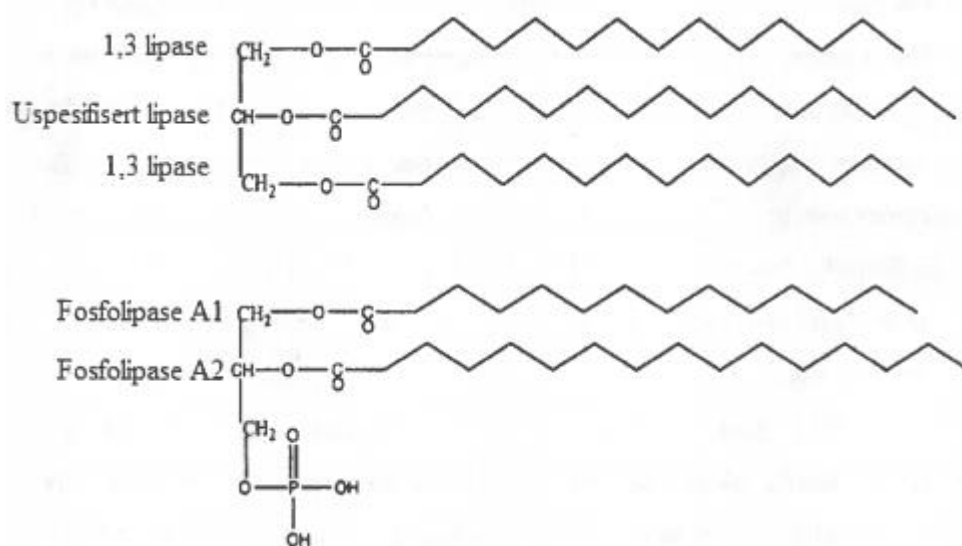
Figur 6: Utvikling av frie fettsyrer i sild lagret ved 12 °C, 6 °C og 0 °C (Huss, 1995)

Tidligere har det blitt brukt kjemiske stoffer for å drepe eller hindre vekst av bakterier. De fleste av disse har hatt skadelige effekter og er derfor ikke lenger i bruk.

Konserveringsvæsken V65 ble tatt i bruk i fiskemel- og oljeindustrien i 1965. V65 inneholdt natriumnitritt og formalin (Håndbok for sildemelindustrien 1993). Disse stoffene kan enten danne kreftfremkallende stoffer (nitrosaminer) eller er kreftfremkallende i seg selv (Aune, 2007; Sun, 1981). Etter de kreftfremkallende egenskaper ble påvist ble det forbudt å bruke V65. Tilstrekkelig tilsetning av syre for å oppnå lav nok pH er nok for å hindre vekst av bakterier i ensilasjen. Dannelse av FFA skjer ved enzymatisk hydrolyse av enkeltbindinger i triacylglycerol (TAG) og i fosfolipider. I hydrolysen av triacylglycerol vil lipase katalysere nedbrytningen av triacylglycerolet til frie fettsyrer og glycerol. Fosfolipaser er en type enzymer som bryter ned fosfolipider til frie fettsyrer (figur 7 og 8).



Figur 7: TAG og fosfolipider spaltes av lipase og fosfolipase til FFA og andre forbindelser; DAG, MAG, glycerol og lysofosfolid.



Figur 8: 1,3 lipase er et enzym som hydrolyserer enkeltbindingen i posisjon 1 og 3 (sn-1 og sn-3) i TAG mens en uspesifikk lipase kan hydrolysere alle, inkludert enkeltbinding i posisjon sn-2. Fosfolipase A1 og A2 hydrolyserer enkeltbindingene i fosfolipider.

Tabell 1 viser en oversikt over øvre grenseverdier for ulike kvalitetsparametere for marine oljer som skal anvendes i fiskefôr. Her kommer det frem at FFA ikke må overskride 5 % mens Totox (total oksidasjonsverdi ikke må overskride 25).

Tabell 1: Grenseverdier for innhold av FFA, Totox, vann, urenheter (faste stoffer) dioxiner, tungmetaller og antioksidanter i marine oljer som skal brukes i fôr (R. L. Olsen, pers. med.).

Kvalitetsparametere	Maksimalt innhold
Frie fettsyrer (FFA)	5 %
Totox (2PV + AV)	25
Vann	0.5 %
Urenheter (faste stoffer)	0.5 %
Dioxiner	4.5 TEQ/kg
Tungmetaller	Skal ikke overskride EU's regler om innhold av tungmetaller
Antioksidanter	150 mg/kg

AV = anisidinverdi, PV = peroksidverdi, TEQ = Toksiske ekvivalenter (1 TEQ = 1 ng 2,3,7,8 tetraklorodibenzodioxin).

2.2.2 Effekter av frie fettsyrer

Innholdet av FFA i fiskeolje vil være en avgjørende faktor for oljens kommersielle verdi på grunn av sammenhengen mellom oljens kvalitet og FFA-verdier (Aidos et al., 2003). Frie fettsyrer er blant annet mer utsatt for autooksidasjon enn fettsyrer som er forestret i triglycider og vil fungere som prooksidanter (Choe og Min, 2006). I tarm kan de frie fettsyrene, i store konsentrasjoner, fungere som såpe og løse opp celleveggen til tarmceller hos fisk (Sæle et al., 2013). Mindre mengder frie fettsyrer er sannsynligvis ikke skadelig for tarmvev. Dyerberg et al. (2010) gjennomførte et forsøk med kommersielle konsentrerte omega-3 helsekostprodukter for å undersøke hvilken form av fettsyrene, reesterifisert TAG, etylestere eller FFA, som hadde best biotilgjengelighet. Forsøkspersonene rapporterte ingen negative effekter av å innta 3,1 til 3,6 g av preparatene (omega-3 fettsyre) daglig. Forøvrig hadde reesterifisert TAG og FFA produktene best biotilgjengelighet, noe bedre enn etylesterformen.

2.2.3 Effekter av kortkjedede organiske syrer i fôr

Bruk av kortkjedede organiske syrer er ikke bare en metode som enkelt konserverer marint restråstoff. De kan også ha positive effekter på vekst og overlevelse når de tilsettes fôr. Ikke-terapeutisk bruk av små doser antibiotika, det vil si for å stimulere vekst, ikke for å kurere sykdommer, tilsatt fôr, har vært brukt/ brukes i ganske mange land. Flere har foreslått at kortkjedede organiske syrer i fôr til gris og kylling kan erstatte slik bruk av antibiotika (Defoirdt et al., 2009; Dibner & Buttin, 2002; Khan & Iqbal, 2016). Slike syrer har i mange år blitt tilsatt

fôr til gris for økt vekst og overlevelse (Dibner & Buttin, 2002; Eisemann & van Heugten, 2007; Opheim et al., 2016).

Det konsentrerte proteinhydrolysatet man får fra ensilert marint restråstoff har vist seg å inneholde 4-5 % maursyre (B. Dulavik, Hordafor; pers. med.). Flere publikasjoner har vist at tilsetning av maursyre eller andre kortkjedede organiske syrer i fôr til fisk kan øke vekst og/eller øke overlevelseshastighet ved bakterielle smitteforsøk (Goosen et al., 2014; Churchird et al., 2015; Ng et al., 2015; Koh et al., 2016). Det vil imidlertid være små mengder maursyre i ensilasjeolje fordi den vanligvis bare inneholder små mengder vann.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Torskesloet benyttet i forsøkene var hentet fra forskjellige kilder. I del 4.1 ble det brukt slo hentet fra villfanget torsk som stod i merder ved Havbruksstasjonens anlegg på Ringvassøy. Fiskene hadde en vekt på 4-7 kg og hadde vært fôret med russisk lodde. I del 4.1 ble helt torskeslo (alt av innvoller) ensilert ved forskjellige pH-verdier. I del 4.2 ble det lagd ensilasje av fôret (frossen lodde), mageinnhold, hele innvoller med lever og tømte innvoller med lever. Magesekk og tarmsystem ble klippet og skjært opp med saks og kniv for å tømme innhold og lage ensilasje av mage-tarminnholdet. De tømte innvollene ble ikke vasket, som kan ha ført til rester av mage-tarminnhold i denne ensilasjen. Alle ensilasjer i andre del av forsøket ble tilsatte maursyre til pH 2,9.

I del 4.3 ble det lagd ensilasje av innvoller fra oppdrettstorsk slaktet ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Torsken hadde vært fôret med ekskludert pellets. pH-verdiene i disse ensilasjene ble justert til 2,9. Det ble også lagd ensilasje av innvoller fra oppdrettet laks og oppdrettet torsk fra Havbruksstasjonens landanlegg. Både laks og torsk hadde vært fôret med pellets. Fiskenes størrelse varierte fra 1-2,5 kg. pH i ensilasjene ble justert til 2,9.

I del 4.4 kom sloet fra villfanget torsk levert til Gunnar Klo Fiskemottak, Myre, Vesterålen. Det ble lagd ensilasje av lever, hele innvoller med lever, hele innvoller uten lever, rensede innvoller med lever, rensede innvoller uten lever og mage-tarminnhold. Det ble lagd ensilasjer med pH-verdier på 2,9, 3,5 og 4,0 av alle typer ensilasje.

Alle kjemikaliene som ble brukt var av p.a. kvalitet. Kloroform, metanol, isopropanol, heptan, hexan, dietyleter, NaOH, kobbersulfat, eddiksyre, fosforsyre, diklormetan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), maursyre (99 %), saltsyre, natriumacetat (Merck, Darmstadt, Tyskland), natriumklorid (VWR, Heverlee, Belgia). Fettsyrestandardene som ble brukt for å identifisere fettsyrene var PUFA 1, PUFA 2, PUFA 3 (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) og GLC 411 (Nu-Chek prep., Inc., Elysan, MN, USA). Det ble brukt to standarder til TLC-analysene (16:1A) som inneholdt monopalmitin (MAG), dipalmitin (DAG), tripalmitin (TAG), palmitinsyre (FFA), kolesterol, kolesteryl palmitat (kolesterylester) og lecithin (PL) eller 18:5A som inneholdt lecithin (PL), kolesterol, oljesyre (FFA), triolein (TAG) og kolesteryl oleate (kolesterylester) (Nu-Chek prep., Inc., Elysan, MN, USA) løst i diklormetan til en konsentrasjon på 20mg/ ml.

3.2 Metoder

3.2.1 Måling av pH

Det ble brukt et pH-meter av typen Phenomenal 111 (VWR, Tyskland) for å måle pH i ensilasjer. pH-metret ble rensert med destillert vann mellom hver måling.

3.2.2 Frie fettsyrer

Andel frie fettsyrer ble målt ved å veie ut 0,1-1g olje med tre paralleller til hver prøve. Hver oljeprøve ble løst opp i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol (2:1:2). Det ble så tilsatt 4 dråper indikator (0,5 % meta-crescolpurpur). Løsningen ble rørt om med magnetrører og titrert med automatisk titrator (Schott Instruments, Mainz, Tyskland) til løsningen fikk et fargeskifte fra gul til fiolett.

Formel for beregning av andel FFA (%):

$$\text{Frie Fettsyrer (\%)} = \frac{(pr - bl) * M * 282}{m(g) * 1000 \left(\frac{ml}{l}\right)} * 100 \%$$

Hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

M = molaritet av NaOH (0,05 mol/l)

282 = molekylvekt av oljesyre (g/mol)

M = vekt av prøve (g)

3.2.3 Ensilering av torske- og lakseslo

Sloet ble oppmalt med kvern (Bosch MFW68660, Kina). Det oppmalte torskesloet ble flyttet over i beger og deretter ble det tilsatt maursyre (99 %). Maursyren ble blandet godt med det oppmalte sloet for å få en homogen blanding. pH ble målt og justert ved å tilsette maursyre med 1-3 dagers mellomrom til pH i ensilasjen hadde stabilisert seg. Hvor lenge prøvene ble ensilert før utvinning av olje varierte, og er spesifisert i Resultater. I del 4.3 av forsøket ble det brukt maursyre som var tilsatt antioksidanten ethoxyquin. Ved justering av pH av disse ensilasjene ble det brukt maursyre (99 %). Alle prøvene ble ensilert ved romtemperatur.

3.2.4 Utvinning av olje fra ensilasje

I ensilasjer av torskeslo som inneholdt lever ble det dannet en oljefase i øverste sjikt i begrene. Olje ble pipettert over i sentrifugerør og sentrifugert (Multifuge 1 S-R Heraceus, Osterode, Tyskland) i 10 minutter ved 2000 g for å fjerne urenheter. Etter sentrifuge ble oljefasen pipettert over i nye prøverør.

I ensilasjer hvor lever ikke var tilstede var det ett svært lavt fettinnhold. Det ble forsøkt å ekstrahere fett vha. Folch's metode for fett ekstraksjon (Folch et al., 1957) men resultatene her ga usannsynlig høye verdier av FFA og derfor ble disse resultatene forkastet. Årsaken til lavt

fettinnhold i ensilasjer uten tilsatt lever er at torsk er en art som lagrer fett i leveren, ikke rundt organene som hos laks.

3.2.5 Tynnsjiktskromatografi (TLC)

Oljeprøver fra ensilert torskeslo ble løst i diklormetan til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Inndampede fraksjoner fra fast-fase ekstraksjon ble også løst i diklormetan før TLC-analyse. Et elueringskar ble fylt med elueringsløsning (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:1) til bunnen av karet ble dekket. HP-TLC plater (Merck, Darmstadt, Tyskland) ble merket med blyant for å koordinere hvor prøvene og standard skulle appliseres. 2 µl av hver oljeprøve ble applisert på platen med kapillarrør. En standard (16:1A) som inneholdt monopalmitin (MAG), dipalmitin (DAG), tripalmitin (TAG), palmitinsyre (FFA), kolesterol, kolesteryl palmitat (kolesterylester) og lecithin (PL(fosfolipider)) eller 18:5A som inneholdt lecithin (PL), kolesterol, oljesyre (FFA), triolein (TAG) og kolesteryl oleate (kolesterylester) ble applisert for å kunne identifisere de separate fettklassene i oljeprøvene. Platen ble satt oppreist i elueringskaret til løsningen hadde trukket opp i platen til ca 1 cm av platen gjensto. Platen ble så tatt ut og plassert opp mot elueringskaret til den var tørr. Deretter ble platen sprayet med kobberløsning (10 % kobbersulfat, 8 % fosforsyre). Deretter ble platen lufttørket i ca 10 minutter før den ble plassert i en kald varmeovn som ble varmet opp til 180 °C i varmeskap (Termaks, Labolytics AS, Trondheim, Norge).

3.2.6 Fast-fase-ekstraksjon av lipidklasser (SPE)

SPE-engangskolonner (Varian Bond Elut NH₂) ble plassert i et vakuum-manifold og kolonnen ble aktivert ved å tilsette 7,5 ml hexan. 20 mg prøve ble løst i 150 µl hexan:kloroform:metanol (95:3:2) og tilsatt kolonnen. Det ble deretter tilsatt 5 ml kloroform for å separere ut nøytrale lipider (fraksjon 1). For å separere ut frie fettsyrer (fraksjon 3) ble det tilsatt 5 ml dietyleter:eddiksyre (98:2). Deretter ble polare lipider separert ut i to fraksjoner (fraksjon 3 og 4), først ble det tilsatt 2,5 ml metanol:kloroform (6:1) og til slutt ble det tilsatt 2,5 ml 0,05 M natriumacetat i metanol:kloroform (6:1). Fraksjon 3 og 4 ble blandet sammen og alle fraksjonene ble dampet tørr med nitrogen. Fraksjonene ble deretter løst opp i 1 ml diklormetan og det ble gjort TLC av fraksjonene for å dokumentere separasjonen av fettklassene.

Tabell 2: Oversikt over SPE-metoden.

Fraksjoner	Løsninger	Separerte fettklasser
Aktivering	7,5 ml hexan	-
Prøve	20 mg i 150 µl hexan:kloroform:metanol (95:3:2)	-
Fraksjon 1	5 ml kloroform	Nøytrale lipider (TAG)
Fraksjon 2	5 ml dietyleter:eddiksyre (98:2)	Frie fettsyrer (FFA)
Fraksjon 3	2,5 ml metanol:kloroform (6:1)	Polare lipider
Fraksjon 4	2,5 ml 0,05 M natriumacetat i metanol:kloroform (6:1)	Polare lipider

3.2.7 Fettsyresammensetning

Lipidprøver ble løst ut i DCM:MeOH (2:1) til en konsentrasjon på 10 mg/ ml. Deretter ble 100 µl prøve tilsatt Kimax-rør. Det ble så tilsatt 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2 % H₂SO₄ i metanol i hvert rør. Prøvene ble satt i varmebad med en temperatur på 100 °C i en time. Deretter ble det tilsatt 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl og prøvene ble blandet godt sammen med vortex (VF2 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Tyskland)). Det ble dannet to faser hvor den øverste besto av heptan og lipider. Lipid-heptanfasen ble pipettert over i nye rør og ble dampet tørr ved nitrogengass. Prøvene ble deretter løst opp i 100 µl heptan og overført til analyserør.

Fettsyresammensetningen ble analysert ved å benytte en Agilent 6890N gaskromatograf utstyrt med en 7683B autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor (FID). Helium ble benyttet som bæregass. De ulike fettsyrene ble separert som følge av ulik vandringshastighet gjennom en Varian CP7419 kapillærkolonne (50 m x 250 µm x 25 µm nominal). Temperaturen på injektoren var 240 °C og temperaturen i detektoren var 250 °C. De enkelte fettsyrene ble identifisert med basis på retensjonstiden som ble sammenliknet med kjente standarder.

4 Resultater

4.1 Ensilering av torskinnvoller I - Effekt av ulik pH på FFA-nivå

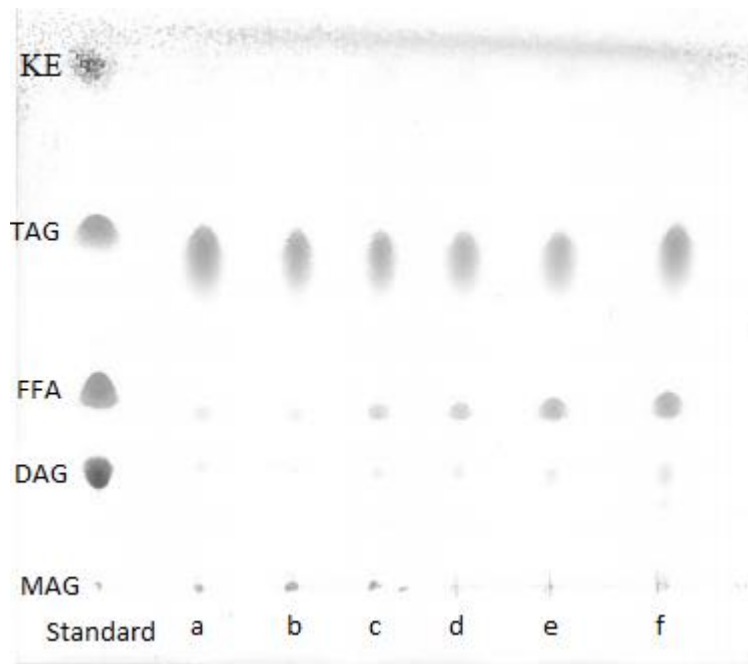
I dette forsøket ble torskinnvoller, inkludert lever, fra villfanget torsk fôret med frossen lodde ensilert ved ulike pH-verdier. Ensilasjen ble lagret i 10 måneder før utskilt olje ble analysert for innhold av FFA. To parallelle ensileringer ble gjennomført ved hver pH-verdi.

Olje fra de to parallelle ensileringene ved pH 2,9 hadde et FFA-nivå på 3,2 og 4,2 % (tabell 3 a og b). Verdiene fra ensilering ved pH 3,5 (c og d) var på 13,3 og 14,8 %. Ensilering ved pH 4,0 (e og f) ga et FFA-innhold på 25,8 og 26,8 %.

Tabell 3: Frie fettsyrer (FFA %) i olje fra torskeslo ensilert ved ulik pH. Ensilasjen hadde vært lagret i 10 måneder ved 20 °C før analysen.

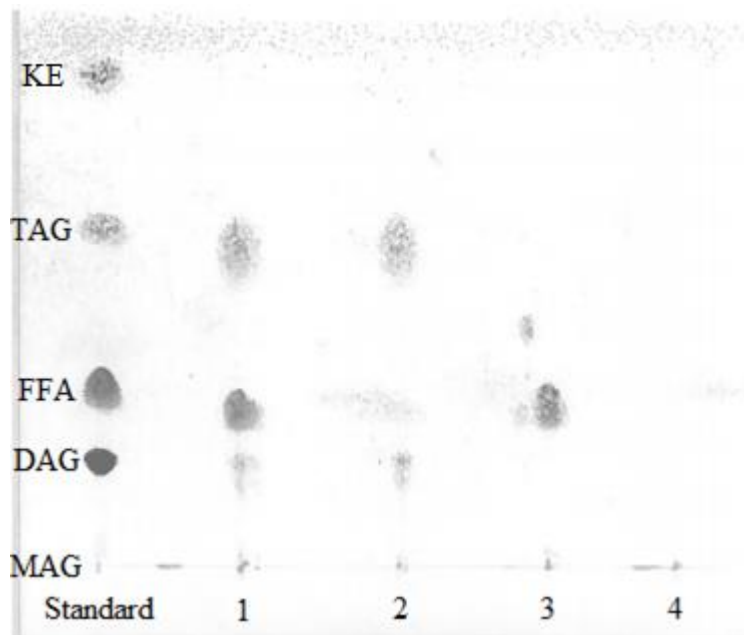
Prøve	pH	FFA %
a	2,9	3.2
b	2,9	4.2
c	3,5	13.3
d	3,5	14.8
e	4,0	25.8
f	4,0	26.8

Oljene fra ensileringen ved de ulike pH-verdiene ble også analysert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi (figur 9). Resultatene viste at ensilering ved pH 2,9 ikke hadde påvisbart innhold av frie fettsyrer, men bare triacylglyserol. Ved økende ensilerings-pH ble FFA synlig på tynnsjiktspata. Ved pH 4,0 var FFA-flekken kraftigst og samtidig kunne spor av diacylglyserol (DAG) skimtes. Alle prøvene hadde en svak flekk nær eller på påsetningspunktet.



Figur 9: Tynnsjiktskromatografi (TLC) av oljer fra ensilasje av torskeslo (tabell 3). Ensilasjen ble lagret i 10 måneder før analyse. Ensilering ved: a og b: pH 2,9, c og d: pH 3,5, e og f pH 4,0. Standard: 18:5A

Triacylglycerol og frie fettsyrer i oljen utvunnet ved ensilering ved pH 4,0 (prøve f, tabell 3) ble fraksjonert ved hjelp av fast-fase ekstraksjon (SPE) som beskrevet i Materialer og Metoder (3.2.6). De eluerte fraksjonene ble analysert ved hjelp av tynnsjiktskromatografi (figur 10). Resultatet viste at TAG og DAG ble eluert med kloroform mens FFA kom ut av SPE-kolonnen ved å bruke dietyleter:eddiksyre (98:2 v/v). Polare lipider (fosfolipider) ble forsøkt eluerte som beskrevet i metoden uten at noen klar flekk kunne påvises i TLC-analysen (spor 4).



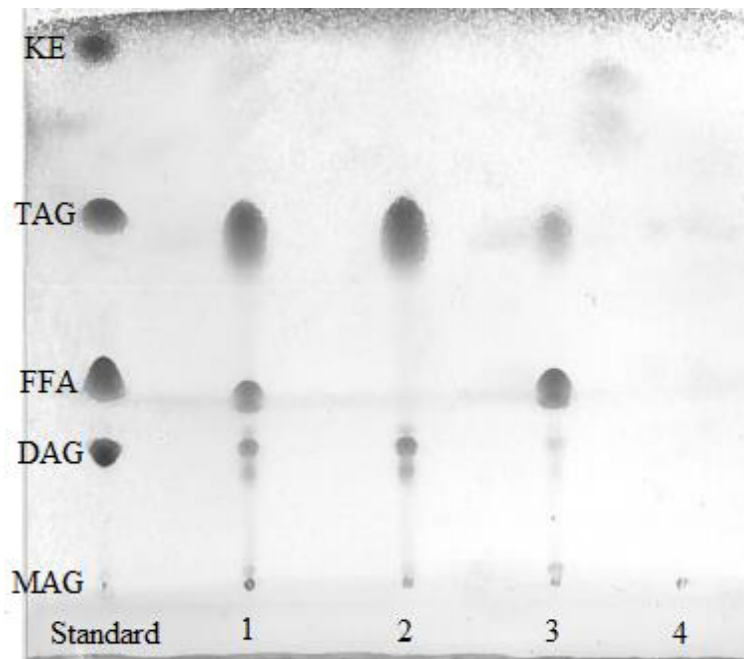
Figur 10: TLC av prøve f (tabell 3) hvor spor 1: er useparert olje; spor 2: TAG; spor 3: FFA og spor 4: Polare lipider. TAG, FFA og polare lipider har blitt separert ved fast-fase ekstraksjon (SPE). Standard: 18:5A

Fettsyresammensetningen i den ufraksjonerte oljen utvunnet ved ensilering ved pH 4,0 og i SPE isolerte TAG og FFA fraksjoner ble analysert. Resultatene viste ingen tydelige forskjeller i det prosentvise innholdet av de enkelte fettsyrene i TAG og FFA (tabell 4). Innholdet av de langkjedede omega-3 fettsyrene (EPA, DPA og DHA) var 22 og 20,9 % i henholdsvis TAG og FFA.

Tabell 4: Fettsyresammensetning (areal %) av olje utvunnet fra torskeslo ensilert ved pH 4,0 (tabell 3, prøve f). Sammensetning ble også bestemt i TAG- og FFA-fraksjon isolert ved SPE. C18:1 n-9¹: inneholder også mindre mengder C18:1 n-7. -: ikke påvist.

	Ufraksjonert olje	TAG	FFA
C14:0	2,5	2,3	3,1
C16:0	11,6	11,0	13,5
C18:0	4,7	4,9	4,6
∑ Mettede FA	18,8	18,2	21,2
C16:1 n-7	4,7	4,3	5,3
C18:1 n-12	-	1,9	1,4
C18:1 n-9 ¹	26,3	29,9	28,9
C20:1 n-9	2,8	6,6	4,4
C22:1 n-11	-	4,9	3,0
C22:1 n-9	5,0	1,2	1,1
∑ Enumettede FA	38,8	48,8	44,1
C18:2 n-6	6,0	5,6	6,8
C18:3 n-3	1,6	1,3	2,2
C18:4 n-3	-	3,6	3,0
C20:5 n-3	8,4	7,5	9,7
C22:5 n-3	1,4	1,6	1,1
C22:6 n-3	12,1	12,9	10,1
∑ Flerumettede FA	29,5	32,5	32,9
∑ LC-PUFA n-3	21,9	22	20,9
∑ FA	87,1	99,5	98,2

Triacylglycerol og frie fettsyrer i oljen utvunnet ved ensilering ved pH 3,5 (tabell 3 prøve d) ble også fraksjonert ved SPE. De eluerte fraksjonene ble analysert ved hjelp av TLC (figur 11). Resultatet viste at TAG-fraksjonen (spor 2) var fri for FFA mens FFA-fraksjonen inneholdt en liten andel TAG. Polare lipider ser ikke ut for å være tilstede i oljen (spor 4). TAG-fraksjonen inneholdt også litt DAG og noe som tentativt kunne være kolesterol.



Figur 11: Separering av TAG og FFA i olje fra torskeslo ensilert ved pH 3,5 (tabell 3, prøve d). Spor 1: ikke fraksjonert olje, spor 2: Isolert TAG og DAG, spor 3: FFA, spor 4: polare lipider, KE = kolesterylester (standard). Standard 18:5A

Fettsyresammensetningen i den ufraksjonerte oljen utvunnet ved ensilering ved pH 3,5 og i SPE isolerte TAG og FFA fraksjoner ble analysert. Resultatene viste her heller ingen tydelige forskjeller mellom det prosentvise innholdet av de enkelte fettsyrene i TAG og FFA (tabell 5). Innholdet av de langkjedede omega-3 fettsyrene (EPA, DPA og DHA) var 20,2 og 23 % i henholdsvis TAG og FFA.

Tabell 5: Fettsyresammensetning (areal %) av olje utvunnet fra torskeslo ensilert ved pH 3,5 (tabell 3, prøve D). Sammensetning ble også bestemt i TAG- og FFA-fraksjon isolert ved SPE. C18:1 n-9¹: inneholder også mindre mengder C18:1 n-7. -: ikke påvist.

	Ufraksjonert olje	TAG	FFA
C14:0	2,5	2,5	2,7
C16:0	12,7	12,2	15,7
C18:0	5,1	5,0	5,4
∑ Mettede FA	20,3	19,7	23,8
C16:1 n-7	4,7	4,7	4,6
C18:1 n-12	-	-	1,4
C18:1 n-9	26,1	26,5	26,5
C20:1 n-9	5,9	6,2	4,4
C22:1 n-11	-	4,6	2,9
C22:1 n-9	5,0	1,2	1,0
∑ Enumettede FA	36,7	43,2	40,8
C18:2 n-6	6,0	6,0	6,0
C18:3 n-3	1,6	1,5	1,8
C18:4 n-3	3,4	3,6	2,7
C20:5 n-3	8,2	7,6	9,4
C22:5 n-3	1,4	1,4	1,2
C22:6 n-3	11,7	11,2	12,4
∑ Flerumettede FA	32,3	31,3	33,5
∑ LC-PUFA n-3	21,3	20,2	23
∑ FA	89,3	94,2	98,1

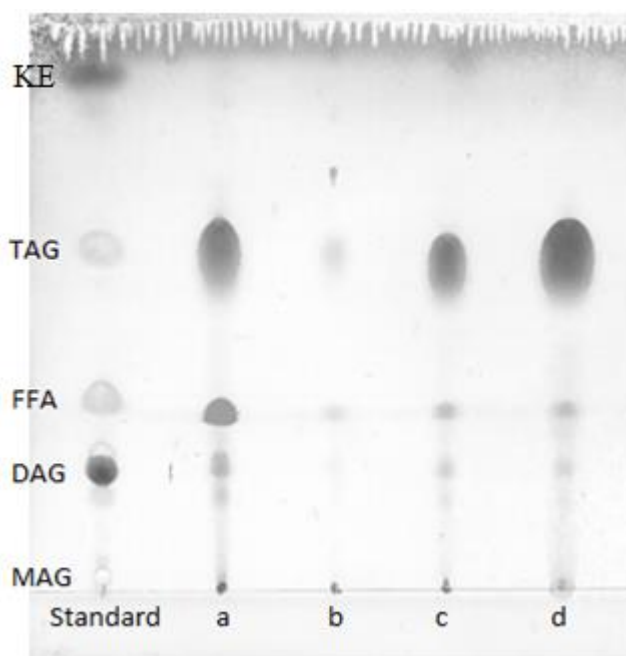
4.2 Ensilasje av slo fra levendelagret torsk

I dette forsøket ble slo fra villfanget torsk som hadde blitt fôret med frossen lodde ensilert ved pH 2,9. Det ble laget separate ensilasjer av intakte innvoller, innvoller hvor mage-tarminnhold var fjernet, mage-tarminnhold og fôret (frossen lodde). Ensilasjen ble lagret i 9 måneder før utskilt olje ble analysert for innhold av FFA (tabell 6). Oljen fra den ensilert lodde hadde et FFA-nivå på 15,9 %. Ensilert mageinnhold hadde et FFA-innhold på 21,8 %, mens hele innvoller m/ lever hadde et FFA-innhold på 5,9 %. Tømte innvoller m/ lever hadde et FFA-nivå på 1,9%.

Tabell 6: FFA (%) i olje fra ensilasje av lodde (fôr), mage-tarminnhold, hele innvoller og tømte innvoller fra villtorsk torsk som holdes i merder. Alle ensilasjene ble lagd med pH 2,9. Ensilasjen ble lagret i 9 måneder ved 20 °C før analyse.

Prøve	Prøve	FFA %
a	Fôr (frossen lodde)	15.9
b	Mage-tarminnhold	21.8
c	Hele innvoller m/ lever	5.9
d	Tømte innvoller m/ lever	1.9

Olje fra ensilasje av prøvene i tabell 6 ble også analysert ved hjelp av tynnsjiktskromatografi (figur 12). Resultatene viste at olje fra ensilert lodde (spor a) hadde et tydelig innhold av triacylglyserol, frie fettsyrer og diacylglyserol. Olje fra ensilert mageinnhold (spor b) hadde meget svake flekker av både TAG og FFA. Det var omtrent tilsynelatende like mye av disse to fettklassene tilstede. Utskilt olje fra både ensilasje av hele innvoller m/ lever (spor c) og av tømte innvoller m/ lever (spor d) viste tydelig innhold av TAG. Betydelig mindre mengder FFA og DAG var tilstede. Den relative andelen av FFA sammenlignet med TAG var imidlertid høyere i hele innvoller med lever (spor c) enn i tømte innvoller (spor d).



Figur 12: TLC av oljeprøver fra ensilasje av torskeslo i tabell 6. spor a: fôr (frossen lodde), spor b: mage-tarminnhold, spor c: intakte innvoller, d: innvoller hvor mage-tarminnhold var fjernet. Standard: 16:1A

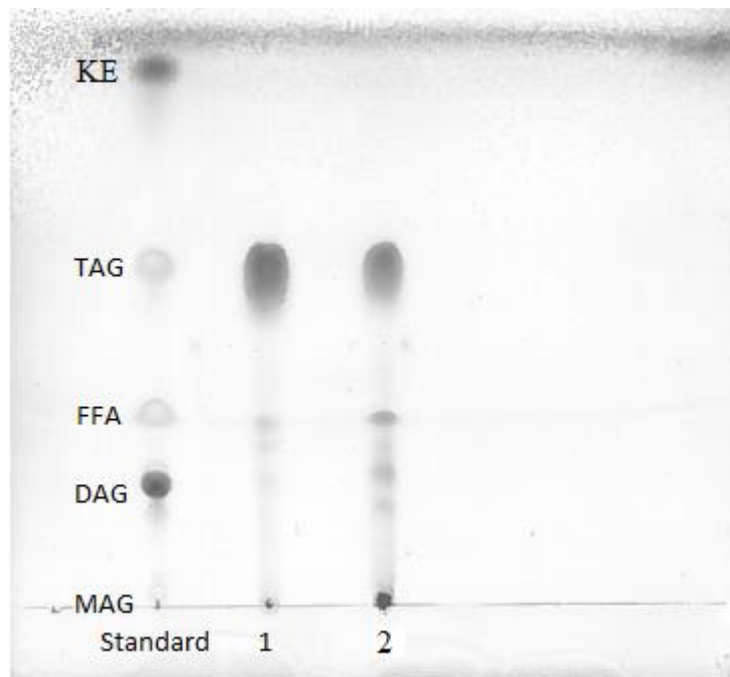
4.3 Ensilering av slo fra oppdrettstorsk og oppdrettslaks

Først i dette forsøket ble det laget ensilasjer av innvoller med og uten lever og ren lever fra oppdrettstorsk fôret med ekskludert pellets. Ensilasjene ble lagret i 9 måneder ved 20 °C før olje ble utvunnet og analysert. Ensilasje av torskinnvoller uten lever ga ikke tilstrekkelig fett til å gjennomføre analysen. FFA-nivå i olje av ensilert torskelever var på 1,4 % etter 9 måneders lagring. Innvoller med lever hadde et noe høyere FFA-innhold på 11,2 %.

Tabell 7: FFA (%) i olje fra ensilert lever og ensilerte innvoller med lever av oppdrettstorsk fra havbruksstasjonens landanlegg i Kårvika. Ensilasjene ble lagd med pH 2,9 og lagret i 9 måneder ved 20 °C før analyse.

Prøve	FFA %
Lever	1.4
Innvoller med lever	11.2

Oljene utskilt fra ensilasjer i tabell 7 ble analysert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi (figur 13). Olje fra ensilert torskelever (spor 1) viste et tydelig innhold av TAG, mens FFA kan nesten ikke synes på platen. Oljen fra ensilerte torskeinnvoller m/ lever viste tydelig innhold av TAG og FFA.



Figur 13: TLC av olje fra ensilering av slo fra oppdrettstorsk (tabell 7). 1: olje fra ensilert lever, 2: olje fra ensilerte innvoller med lever. Standard 16:1A

Ensilasjer av innvoller (m/ lever) fra oppdrettslaks og oppdrettstorsk ble produsert ved pH 2,9. Etter tre ukers lagring ved romtemperatur ble oljen utvunnet og analysert for FFA. Oljen fra lakseslo og torskeslo hadde henholdsvis 1,9 og 4,8 % FFA.

Tabell 8: Frie fettsyrer fra ensilerte innvoller m/ lever fra oppdrettslaks og oppdrettstorsk. Ensilasjene ble laget med pH 2,9 og ble lagret i 3 uker ved 20 °C før analyse.

Prøve	FFA %
Laks	1.9
Torsk	4.8

4.4 Ensilering av slo fra villfanget Vesterålstorsk

Det ble laget ensilasjer av innvoller fra villfanget torsk levert til Gunnar Klo Fiskemottak, Myre, Vesterålen. Det ble lagd ensilasjer med pH 2,9, 3,5 og 4,0 av lever, hele innvoller med lever og innvoller der mage-tarminnhold var fjernet (rensedede innvoller). Det ble også gjennomført ensilering uten lever og av mage-tarminnhold. I disse to sistnevnte prøvene var det ikke mulig å isolere fett ved sentrifugering. Ensilasje av hele innvoller m/ lever ensilert ved pH med 3,5 ga heller ikke tilstrekkelig fett til analyse. Trolig på grunn av at leverinnholdet var svært lavt sammenlignet med de andre ensilasjene. Ensilasjene ble lagret i en måned før utskilt olje ble analysert for første gang. Deretter ble olje utvunnet og analysert etter 3 og 7 måneders ensilering.

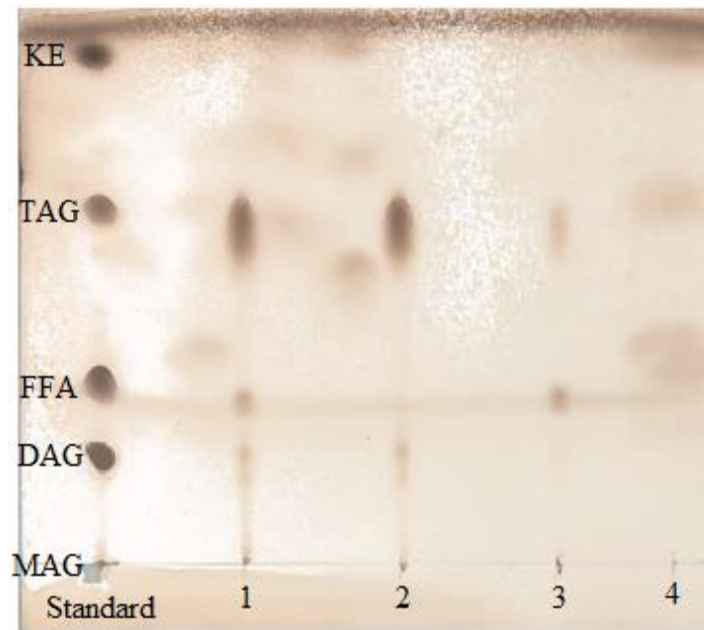
Utskilt olje fra ensilasjene av lever pH ved 2,9, 3,5 og 4,0 hadde etter én måneds lagring et FFA-nivå på 0,6, 2,8 og 6,3 %. Etter 3 måneders lagring hadde FFA-innholdet økt i ensilasjene, henholdsvis til 2,3, 10,9 og 11,5 %. Nye analyser ble gjennomført etter 7 måneders lagring og FFA-innhold hadde på dette tidspunktet blitt redusert i samtlige ensilasjene av lever. FFA-innhold var på dette tidspunktet 0,6, 4,7 og 6,0 %. Det ble gjort nok en analyse av ensilert lever fire dager senere som viste omtrent like FFA-verdier, henholdsvis 0,4, 3,9 og 5,6 %.

Resten av prøvene ble analysert etter 1 og 3 måneders lagring. Olje utskilt fra ensilasje av hele innvoller m/ lever pH ved 2,9 og 4,0, hadde henholdsvis ved første analyse et FFA-innhold på 12,5 og 14,6 %. Ved andre analyse hadde FFA-innholdet økt til 16,2 og 19,2 %. Utskilt olje fra ensilasje av rensede innvoller m/ lever pH 2,9, 3,5 og 4,0 hadde etter en måned lagring et FFA-innhold på henholdsvis 3,9, 7,7 og 8,8 %. Etter tre måneder hadde FFA-nivået steget til 6,7, 8,2 og 14,1 %. Prøvene med høy FFA prosent hadde en utfelling under analysen og disse verdiene er derfor usikre.

Tabell 9: Ensilasje av lever, hele innvoller, rensede innvoller m/ lever, hele innvoller u/ lever, rensede innvoller u/ lever. Det ble lagd ensilasjer med pH 2.9, 3.5 og 4.0. Ensilasjen ble produsert så raskt som mulig etter sløying. Prøvene med veldig høy FFA verdi hadde en utfellingsreaksjon, uvisst hva som er årsaken til utfellingen. Ensilasjen ble lagret i en måned før første analyse.

Prøve	Prøve	pH	FFA % 1mnd	FFA % 3 mnd	FFA % 7 mnd	FFA % 7 mnd
1	Lever	2.9	0.6	2.3	0.6	0.4
2	Lever	3.5	2.8	10.9	4.7	3.9
3	Lever	4.0	6.3	11.5	6.0	5.6
4	Hele innvoller	2.9	12.5	16.2	IA	IA
5	Hele innvoller	3.5	IA	IA	IA	IA
6	Hele innvoller	4.0	14.6	19.2	IA	IA
7	Rensede innvoller m/ lever	2.9	3.9	6.7	IA	IA
8	Rensede innvoller m/ lever	3.5	7.7	8.2	IA	IA
9	Rensede innvoller m/ lever	4.0	8.8	14.1	IA	IA

Triacylglycerol og frie fettsyrer i oljen utvunnet ved ensilering av lever ved pH 4,0 (tabell 9, prøve 3) ble separert ved SPE. De eluerte fraksjonene ble analysert ved hjelp av TLC (figur 14). Resultatene viste at TAG-fraksjonen (spor 2) var fri for FFA, mens FFA-fraksjonen (spor 3) inneholdt en liten andel TAG. Polare lipider ser ikke ut til å være tilstede i oljen. TAG-fraksjonen inneholdt også litt DAG og noe som tentativt kunne være kolesterol.



Figur 14: TLC av olje fra ensilert lever ved pH 4,0 (tabell 9 prøve 3). TAG og FFA har blitt separert ved SPE. Spor 1: ufraksjonert olje, spor 2: TAG, spor 3: FFA og spor 4: Polare lipider. Standard 18:5A

Fettsyresammensetningen i den ufraksjonerte oljen utvunnet ved ensilering av torskelever ved pH 4,0 og i SPE isolerte TAG- og FFA-fraksjoner ble analysert. Resultatene viste ingen tydelige forskjeller mellom det prosentvise innholdet av de enkelte fettsyrene i TAG og FFA (tabell 10). Innholdet av de langkjedede omega-3 fettsyrene (EPA, DPA, DHA) var 26,0 og 22,3% i henholdsvis TAG og FFA.

Tabell 10: Fettsyresammensetning (areal %) av olje utvunnet fra torskelever ensilert ved pH 4,0 (tabell 8, prøve 3). Sammensetning ble også bestemt i TAG- og FFA-fraksjon isolert ved SPE. C18:1 n-9¹: inneholder også mindre mengder C18:1 n-7. -: ikke påvist.

	Ufraksjonert olje	TAG	FFA
C14:0	4,2	4,1	4,5
C16:0	11,7	11,1	13,4
C18:0	3,1	2,9	3,4
∑ Mettede FA	19	18,1	21,3
C16:1 n-7	7,0	7,0	7,0
C18:1 n-12	-	2,3	1,9
C18:1 n-9	18,0	20,0	19,1
C20:1 n-9	10,1	9,6	7,6
C22:1 n-11	-	-	5,9
C22:1 n-9	9,2	8,5	1,3
∑ Enumettede FA	44,3	47,4	42,8
C18:2 n-6	2,2	2,2	2,3
C18:3 n-3	1,2	1,2	1,4
C18:4 n-3	3,2	3,9	3,7
C20:5 n-3	9,2	9,4	9,0
C22:5 n-3	1,2	1,3	1,1
C22:6 n-3	14,4	15,3	12,2
∑ Flerumettede FA	30,2	33,3	29,7
∑ LC-PUFA n-3	24,8	26,0	22,3
∑ FA	93,5	98,8	93,8

5 Diskusjon

Ensilering med maursyre er en enkel, veletablert og lønnsom teknologi for konservering av restråstoff fra foredling av fisk. I Norge er det to store bedrifter, Hordafør AS og Scanbio AS, som utnytter denne metoden for å ta vare på restråstoff både fra oppdrettsnæringen og fra foredling av villfisk.

Forskning har tradisjonelt rapportert at ensileringen bør skje ved pH 4,0 eller lavere for å hindre bakteriell vekst (Tatterson, 1982; Espe & Lied, 1999; Gallardo et al., 2012; van 't Land, Vanderperren & Raes, 2017). Industriell erfaring og publiserte resultater tyder imidlertid på uønskede forandringer i innholdet av frie fettsyrer ved lengere tids lagring av slik ensilasje (Gildberg & Raa, 1977; Reece, 1981; Tatterson, 1982).

I denne oppgaven ble det undersøkt hvordan pH påvirket innholdet av FFA i ensilasje av slo fra villtorsk fôret med frossen lodde. Selv etter 10 måneders ensilering ved pH 2,9 var FFA i utvunnet olje under grenseverdien til bruk i fôr (tabell 3). Ensilering ved høyere pH (3,5 og 4,0) ga verdier langt over grenseverdien. Analyse med TLC bekreftet resultatet ved at flekken som viser FFA var av økende intensitet når ensileringen skjer ved pH 2,9 til 4,0 (figur 9). Denne pH-avhengige dannelsen av FFA i torskeslo er tilsvarende det som ble funnet i slo fra oppdrettslaks (Habbestad, 2016). En sannsynlig årsak til høyere FFA-verdier ved ensilering ved høyere pH er aktive fettspaltende enzymer, f. eks lysosomale enzymer som er aktive ved sur pH. Alternativt så kan det være enzymer fra sopp (*Aspergillus flavus*) som har vist seg å kunne vokse i maursyreensilasje ved pH 4,0 (Strøm et al., 1980).

Det er kjent fra analyse av sildeolje (Addison et al., 1969) og av raudåteolje (Vang et al., 2013) at FFA i oljene i stor grad stammer fra fosfolipider. Dette basert på at fosfolipider har et mye høyere innhold av langekjedede omega-3 fettsyrer enn triacylglyseroler. De fant et tilsvarende høyt innhold av EPA og DHA i FFA som fins i fosfolipider. For å undersøke dette ble TAG og FFA i oljene utvunnet etter 10 måneders ensilering ved pH 3,5 og 4,0 fraksjonert med fast-fase ekstraksjon. Fraksjoneringen ble verifisert med TLC analyse (figur 10 og 11). Deretter ble fettsyresammensetningen i TAG og FFA analysert. Resultatene viste et ganske likt innhold av EPA og FFA i TAG og FFA (tabell 4 og 5). Dette må bety at det ikke er noen selektiv hydrolyse av fettsyrer i fosfolipider under ensilering ved pH 3,5-4,0. Sildeoljen og raudåteoljen nevnt ovenfor var produsert med nøytral pH.

I del 4.2 av Resultater ble det undersøkt om fôret (torskens mageinnhold) var en kilde til høyt FFA-innhold i olje fra ensilasje. Denne torsken var villfanget og hadde vært fôret i merd med frossen lodde. Resultatene viste at olje fra ensilert fôr og mage-tarminnhold hadde et svært høyt innhold av FFA. Dette er ikke overaskende fordi det er kjent at innholdet av frie fettsyrer øker under frysing av fet fisk særlig ved høy temperatur (Refsgaard et al., 2000). At det er noe høyere FFA i mage-tarminnholdet enn i fôret kan forklares med at fiskens egne enzymer har frigjort fettsyrer. FFA i ensilasjeoljen fra hele innvoller med lever var 5,9 % mens i de tømte innvoller med lever var den bare på 1,9 %. Forskjellen forklares med at mage-tarminnholdet er tilstede i det første tilfellet. Torsk fôret i merd med frossen lodde har god appetitt og kan få en leverindeks på hele 12 % (Kristoffersen et al., 2006). Den store andelen lever forklarer det betydelig lavere FFA-innholdet i hele innvoller sammenlignet med mage-tarminnholdet. Tynnsjikt-kromatografi av ensilasjeoljene bekreftet resultatene fra titrering av fettsyrenivåene. Spor a viste tydelig at olje fra ensilert lodde har et høyt innhold av FFA og DAG. Spor b (mage-tarminnhold) skulle etter beregninger av FFA ha det tydeligste utslaget av FFA på platen, men

både TAG, FFA og DAG var svært utydelig. Relativ mengde FFA i forhold til TAG viser at prøven har et høyt innhold av FFA. Hele innvoller med lever hadde et relativt lavt innhold av FFA (spor c). Innvoller uten innhold hadde minst relativt innhold av FFA og DAG (spor d).

I del 4.3 av Resultater ble det først analysert oljer fra ensilasjer av lever, innvoller med og uten lever av oppdrettstorsk som føres med pellets. Selv etter 9 måneders ensilering av lever var FFA-innholdet svært lavt (tabell 7), noe som også kom fram på tynnsjiksplaten (figur 13). Dette betyr at ensilering av fersk torskelever kan være en konserveringsmetode før tran produseres. På mindre plasser langs kysten kan volumene av landet lever være så små at det ikke er lønnsomt å produsere tran av ferskt råstoff. Fryselagring av lever er et dårlig alternativ fordi det fort dannes et høyt FFA-nivå (Karlsdottir et al., 2016). Innvoller med lever hadde et høyere FFA-innhold og dette kom også frem på tynnsjiksplaten. Et FFA-innhold på 11,2 % etter 9 måneders ensilering ved pH 2,9 er vanskelig å forklare og er omtrent tilsvarende det som ble funnet ved ensilering ved pH 3,5 i det første forsøket (tabell 3). Ekstudert får gitt oppdrettstorsken inneholder ikke aktive enzymer på grunn av varmebehandling og kan derfor ikke sammenlignes med den frosne lodden gitt villtorsk. I ettertid kan man si at oljen utvunnet fra innvoller med lever burde ha vært analysert ved starten av ensileringen og så ved noen tidspunkter senere i lagringsperioden. Dette kunne fortalt oss om innvollene hadde hatt et høyt FFA-innhold i utgangspunktet eller om disse ble dannet enzymatisk i løpet av ensileringen. Resultatet i det neste forsøket (tabell 8) kan tyde på dette. I forsøk presentert i tabell 8 ble slo med lever fra oppdrettstorsk ensilert i 3 uker ved pH 2,9. FFA-innholdet i oljen ble funnet å være 4,8 %. I dette forsøket ble slo fra oppdrettslaks også ensilert men her ble FFA etter 3 uker funnet å være 1,9 %. En mulig forklaring på forskjellen kan være artsspesifikk. For eksempel så er fett i lakseslo i depoter i bukhalen mens i torskeslo er det i levra, et aktivt metabolsk organ som antakelig inneholder ganske mye enzymer.

I del 4.4 av Resultater ble det lagd mange ensilasjer med forskjellige sammensetninger av innvoller fra villfanget torsk. Det ble lagd flere ensilasjer hvor lever ikke var tilstede, og alle disse ensilasjene manglet fett til analyser. Dette innebærer at ensilasje av torskeslo hvor lever (og rogn) er fjernet, antakelig ikke trenger å separere oljen før inndampingen til et konsentrert hydrolysat. Resultatene presentert i tabell 9 bekrefter generelt de funnene som er rapportert tidligere i oppgaven. Det er tydelig en pH-avhengig dannelse av FFA hvor pH 2,9 gir lavest verdi. Samtidig ser man når hele innvoller ensileres så blir FFA høyere en når mage-tarminnholdet er fjernet. Den sannsynlige årsaken er at enzymer fra byttedyr i fordøyelseskanalen bidrar til hydrolyse av forsåpbart fett. Ved analyse av oljer med et FFA-innhold høyere enn omtrent 10 % fikk man en utfelling under titreringsanalysen. Dette kan ha

bidratt til for eksempel det tilsynelatende lavere innhold av FFA etter 7 måneders ensilering av lever sammenlignet med analyser etter 3 måneder. Årsaken til utfellingen var det ikke tid til å undersøke nærmere.

Analysen av fettsyresammensetning i isolert TAG og FFA fra ensilering av lever ved pH 4,0 (tabell 10) bekreftet det tidligere resultatet om at de frie fettsyrene kommer fra TAG og ikke fosfolipider spesielt.

Konklusjonen på denne oppgaven er at fiskeslo bør ensileres ved lav pH (f. eks 2,9) for å unngå dannelse av frie fettsyrer. Et forhøyet nivå av frie fettsyrer kan også stamme fra innholdet i torskens fordøyelseskanal. Ensilasjeolje fra torskelever har et lavere innhold av frie fettsyrer enn olje fra ensilasje lagd av resten av sloet. Sammenligningen av de frie fettsyrene i ensilasjeoljer tyder på at de stammer fra hovedsakelig triacylglyserol, ikke fra fosfolipider. Olje fra ensilert lakseslo hadde lavere FFA-verdier enn olje fra ensilert torskeslo, årsaken til dette kan være artsspesifikke forskjeller.

6 Referanser

- Addison, R. F., Ackman, R. G., & Hingley, J. (1969). Free fatty acids of herring oils: Possible derivation from both phospholipids and triglycerids in fresh herring. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 26(6), 1577-1583.
- Aidos, I., Van Der Padt, A., Boom, R. M., & Luten, J. B. (2003). Quality of crude fish oil extracted from herring byproducts of varying states of freshness. *Journal of Food Science*, 68(2), 458-465.
- Aune T. (2007). *Næringsmiddeltoksikologi*. Høyskoleforlaget, Kristiansand.
- Bower, C. K., & Hietala, K. A. (2008). Acidification methods for stabilization and storage of salmon by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17, 459-478.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.
- Chuchird, N., Rorkwiree, P., & Rairat, T. (2015). Effects of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *SpringerPlus*, 4(1), 440.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier P. (2009). Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27(6), 680-685.
- Dibner, J., & Buttin. P. (2002). Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), 453-463.
- Dong, F. M., Fairgrieve, W. T., Skonberg, D. I., & Rasco, B. A. (1993). Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacterial ensiled salmon viscera. *Aquaculture*, 109, 351-366.
- Dyerberg, J., Madsen, P., Møller, J. M., Aardestrup, I., & Schmidt, E. B. (2010). Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 83(3), 137-141.
- Eisemann, J. H., & Van Heugten, E. (2007). Response of pigs to dietary inclusion of formic acid and ammonium formate. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1530-1539.
- Espe, M., & Lied, E. (1999). Fish silage prepared from different cooked and uncooked raw materials: Chemical changes during storage at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(2), 327-332.

- Fagbenro, O., & Yauncey, K. (1995). Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) fed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish-silage and protein feedstuffs. *Bioresource Technology*, 51(1), 29-35.
- Faid, M., Zouiten, A., Elmarrakchi, A., & Achkari-Begdouri, A. (1997). Biotransformation of fish waste into a stable ingredient. *Food Chemistry*, 60(1), 13-18.
- Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond. (2015). *Pilotanlegg for storskala ensilasjeproduksjon på M/S Nordstar*. Hentet 26. oktober 2018 fra <https://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901131>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gallardo, P., Gaxiola, G., Soberano, S., Taboada, J. G., Pérez, M., Rosas, C., Cuzon, G., Espinosa, L. G., & Sotelo, A. (2012). Nutritive value of diets containing fish silage for juvenile *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2320-2325.
- Gildberg, A., & Raa, J. (1977). Properties of a Propionic Acid/Formic Acid Preserved Silage of Cod Viscera. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 28(7), 647-653.
- Goosen, N. J., De Wet, L. F., Jacobs, K., & de Bruyn, A. (2014) Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, 47, 329-340.
- Haarslev Industries. (2018). Onboard fishmeal plant. Hentet 26. oktober 2018 fra <https://www.haarslev.com/products/onboard-fish-meal-plant/>
- Habbestad, A. A. (2016). Frie fettsyrer i olje utvunnet fra ensilert lakseslo. Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap, Norges fiskerihøgskole, UiT Norges arktiske universitet.
- Hertrampf, J.W., & Piedad-Pascual F. (2000). Marine Oils. I: *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. s. 282.
- Huss H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical paper nr 348*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Håndbok for sildemelindustrien. (1993). Råstoffbehandling. Sildemelindustriens Arbeidsgiverforening.
- Karlsdottir, M., Arason, S., Thorarinsdottir., Nguyen, M. V., & Kristinsson, H. (2016). Lipid Degradation of Cod Liver During Frozen Storage as Influenced by Temperature,

- Packaging Method and Seasonal Variation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6), 802-810.
- Khan, S. H., & Iqbal, J. (2016). Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 359-369.
- Koh, C. B., Romano, N., Zahrah, A. S., & Ng, W. K. (2016). Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 47(2), 357-369.
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A., Seppola, M. A., & Olsen, R. L. (2006). Effects of pre-rigour filleting on quality aspects of atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 37(15), 1556-1564.
- Mattilsynet. (2014). *Veileder til biproduktforordningen*. Hentet 8. oktober 2018 fra [https://www.mattilsynet.no/om_mattilsynet/gjeldende_regelverk/veiledere/veileder_animalske_biprodukter_10692009_og_1422011.17525/binary/Veileder%20animalske%20biprodukter%20\(1069-2009%20og%20142-2011\)](https://www.mattilsynet.no/om_mattilsynet/gjeldende_regelverk/veiledere/veileder_animalske_biprodukter_10692009_og_1422011.17525/binary/Veileder%20animalske%20biprodukter%20(1069-2009%20og%20142-2011))
- Ng, W. K., Koh, C. B., Teoh, C. Y., & Romano, N. (2015). Farm-raised tiger shrimp *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture*, 449, 69-77.
- Olsen, R. L., & Toppe, J. (2017). Fish silage hydrolysates: Not only a feed nutrient, but also a useful feed additive. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 93-97.
- Olsen, R. L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 144-151.
- Opheim, M., Strube, M. L., Sterten, H., Øverland, M., & Kjos, N. P. (2016). Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate in diets for weaning piglets – effects on growth performance, intestinal morphometry and microbiota composition. *Archives of Animal Nutrition*, 70(1), 44-56.
- Petersen, H. (1953). Acid preservation of fish and fish offal. *FAO Fisheries Bulletin*, 6, 18-25.
- Raa J., & Gildberg A. (1982). Fish Silage – A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16(4), 383-419.
- Raa J., Gildberg A., & Strøm T. (1983). Silage production – theory and practice. I: Upgrading Waste for feeds and food. Ledward D.A., Taylor A.J., & Lawrie R.A. (red.) Butterworths, London 117-132.
- Reece, P. (1981). Recovery of high quality oil from mackerel and sprat by the silage process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(6), 531-538.

- Refsgaard, H. H., Brockhoff, P. M., & Jensen, B. (2000). Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3280-3285.
- Ricke, S. C. (2003) Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632-639.
- Richardsen, R., Strandheim, G., & Martinussen, A. (2017). Analyse marint restråstoff, 2016. Rapport, Sintef Fiskeri og Havbruk AS. Hentet 16. august 2018 fra: <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2446152>
- Seliussen, J. (2016). Foredrag: *Turning waste into profit*. FAO, Roma, Italia.
- Strøm, T., Gildberg, A., Stormo, B., & Raa., J. (1980). Fish silage: Why not use propionic and formic acid? I *Advances in Fish Science and Technology*. s. 352-355. J. J. Connel, (red), Fishing News Books Ltd, Farnham, Surrey, England.
- Sun, M. (1981). Study Shows Formaldehyde Is Carcinogenic. *Science*, 213(4513), 1232.
- Sæle Ø., Nordgreen A., Olsvik P. A., Hjelle J. I., Harboe T., & Hamre K. (2013). Toxic effects of dietary hydrolysed lipids: an *in vivo* study on fish larvae. *British Journal of Nutrition*, 109(6), 1071-1081.
- Tatterson, I. N. (1982). Fish Silage-preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology*, 7(2), 153-159.
- Van 't Land, M., Vanderperren, E., & Raes, K. (2017). The effect of raw material combination of the nutritional composition and stability of four types of autolyzed fish silage. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 284-294.
- Vang, B., Pedersen, A. M., & Olsen, R. L. (2013). Oil extraction From the Copepod *Calanus finmarchicus* Using Proteolytic Enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(6), 619-628.
- Vidotti, R. M., Pacheco, M. T. B., & Goncalves, G. M. (2011). Characterization of the oils present in acid and fermented silages produced from tilapia filleting residues. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 240-244.
- Wilke T. (2015). *Acidifier concepts in aquafeeds*. Aquafeed horizons conference, juni 2015, Köln, Tyskland.