

# Ekstrakter av blåbær og blåskjell som naturlige antioksidanter

Av  
Ingvill Dreiem Aagesen



Masteroppgave i fiskerifag

Studieretning – Marine næringsmidler (60 stp)



Institutt for marin bioteknologi  
Norges fiskerihøgskole  
Universitetet i Tromsø  
September 2007



## **Forord**

Med denne oppgaven avslutter jeg mine 5 år som student ved Norges Fiskerihøgskole. Tiden har gått så utrolig fort og det har vært 5 fantastiske år, med mye arbeid og enda mer moro.

Forsøkene til denne oppgaven er utført ved Institutt for Marin Bioteknologi (IMAB) ved Norges Fiskerihøgskole i tett samarbeid med Anders Kvaløy Olsen. Han har med samme metoder undersøkt antioksidative effekter av ekstrakter fra tangmel og krekling.

I sammenheng med masteroppgaven vil jeg gjerne takke min veileder Edel Elvevoll for gode råd og inspirasjon, Hanne Mæhre for hjelp til det praktiske arbeidet i laboratoriet, Fortuna Oils AS for forsyning av selolje og Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) for økonomisk støtte som blant annet gjorde det mulig for meg å reise på bedriftsbesøk til Fortuna Oils AS i Kristiansund.

En stor takk til Anders for samarbeid og god underholding.

Jeg vil også takke kull-2002 for et kjempegodt klassemiljø, spesiell takk til Birthe, Line, Kristine, Thommy og Ole for å ha vært gode medstudenter, så vel som gode venner gjennom disse 5 årene.

Takk til Lisa-Marie for oppmuntring, tålmodighet og gode råd gjennom en stressende periode med masteroppgaveskriving.

Sist men ikke minst en stor takk til min familie for støtte og økonomisk hjelp gjennom hele studietiden.

Ingvill Dreiem Aagesen

Tromsø, September 2007

*Foto (forside); Opplysningskontoret for frukt og grønnsaker (blåbær) og Eksportutvalget for fisk (EFF) (blåskjell). Trykt med tillatelse.*



## Sammendrag

De siste tiårene har det vært et økende fokus på helse og kosthold. Sjømat er en viktig kilde til helsemessige gunstige fettsyrer. Spesielt er det de langkjedede, flerumettede omega-3 fettsyrene som har vist seg å ha flere positive effekter for human helse. Problemet med disse langkjedede marine fettsyrene når det kommer til å benytte dem i matproduksjon er at de har lett for å harskne. For å hindre eller forsinke denne oksidasjon har det blitt utviklet mange naturlige og syntetiske antioksidanter. De fleste matprodusenter vil foretrekke naturlige antioksidanter framfor syntetiske, og er interessert i nye kilder for naturlige alternativer. Tokoferoler og flavonoider er naturlige antioksidanter og ansees som mye tryggere enn de syntetiske antioksidantene BHA og BHT

Målet med dette arbeidet var å undersøke antioksidative egenskaper ekstrakter av rå blåbær, kokt blåbær og blåskjell hadde på selolje i et oljesystem og emulsjonssystem, i tillegg undersøkte vi hvordan de virket i et vandig system. Vi prøvde også å finne optimal mengde  $\alpha$ -tokoferol i selolje.

Vi fant at ekstrakter fra blåbær hadde gode antioksidative egenskaper i et oljesystem. I dette systemet viste likevel blåskjell å ha den beste antioksidative effekten da den ved siste uttaksdag bare hadde halvparten så høy PV og AV som seloljen (kontroll). I emulsjonene hadde verken blåbær eller blåskjell antioksidativ effekt. Ingen av ekstraktene så ut til å virke hemmende på oksidasjon i et vandig system.

I forsøket på å finne optimal konsentrasjon av  $\alpha$ -tokoferol fant vi i det siste forsøket hvor seloljen hadde stått lagret i 4 måneder ved 4°C at konsentrasjoner på 200, 300, 600 og 1000 ppm ga god inhiberende virkning på oksidasjon av seloljen.



# Innholdsfortegnelse

<b>1 Bakgrunn</b>	<b>9</b>
<b>2 Teori</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Helse og marine næringsmidler</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Selolje</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Funksjonell mat</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Oksidasjon av fettsyrer</b>	<b>13</b>
2.4.1 <i>Faktorer som påvirker autooksidasjon</i>	15
<b>2.5 Lipider</b>	<b>16</b>
2.5.1 <i>Depofett</i>	16
2.5.2 <i>Membranlipider</i>	16
2.5.3 <i>Lipider med spesifikke biologiske funksjoner</i>	16
2.5.4 <i>Fettsyrer</i>	16
2.5.5 <i>Essensielle fettsyrer</i>	17
2.5.6 <i>Eicosanoider</i>	17
<b>2.6 Antioksidanter</b>	<b>17</b>
2.6.1 <i>Naturlige antioksidanter</i>	18
2.6.2 <i>Syntetiske antioksidanter</i>	20
2.6.3 <i>Blåbær</i>	20
2.6.4 <i>Blåskjell</i>	21
<b>2.7 Emulsjoner</b>	<b>21</b>
<b>3. Materialer og metoder</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Materialer</b>	<b>23</b>
3.1.1 <i>Ekstrakter</i>	23
3.1.2 <i>Oljer</i>	23
3.1.3 <i>Emulgatorer</i>	23
<b>3.2 Oksidasjonsforsøk</b>	<b>24</b>
3.2.1 <i>Modellforsøk</i>	24
3.2.2 <i>Ekstrakt i olje</i>	24
3.2.3 <i>Ekstrakt i olje-i-vannemulsjon</i>	25
3.2.4 <i>Ekstrakt i et vandig system</i>	25
3.2.5 <i>Optimal mengde <math>\alpha</math>-tokoferol</i>	25
<b>3.3 Generelle metoder</b>	<b>26</b>
3.3.1 <i>Tørrstoffinnhold</i>	26
3.3.2 <i>Innhold av polyfenoler i blåbær</i>	26
3.3.3 <i>Ekstraksjon av blåbær- og blåskjellekstrakt</i>	26
3.3.4 <i>Ekstraksjon av fett</i>	27
3.3.5 <i>Identifisering av fettsyrer</i>	27
<b>3.4 Metoder for måling av oksidasjon</b>	<b>28</b>
3.4.1 <i>Vektøkning</i>	28
3.4.2 <i>Peroksidverdi (PV)</i>	28
3.4.3 <i>Anisidinverdi (AV)</i>	30
3.4.5 <i>Oksidasjon ved forbruk av oksygen (Oksypress)</i>	30
3.4.6 <i>Antioksidativ effekt i vandig-system (DHR)</i>	31
<b>4 Resultat og diskusjon</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Tørrvekt av ekstrakt</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Innhold av polyfenoler i blåbær</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Modellforsøk</b>	<b>32</b>
4.3.1 <i>Vektøkningforsøk</i>	32

4.3.2 Oksidasjon ved forbruk av oksygen (Oksypress).....	33
4.3.3 Fettsyresammensetning .....	34
<b>4.4 Ekstrakt i olje-i-vannemulsjon.....</b>	<b>36</b>
4.4.1 Fettsyresammensetning .....	36
4.4.2 PV målt med ferrothiocyanatmetoden.....	37
<b>4.5 Ekstrakter i oljesystem .....</b>	<b>39</b>
4.5.1 PV og AV .....	39
<b>4.6 Ekstrakt i et vandig system .....</b>	<b>41</b>
4.6.1 Kokt blåbærekstrakt .....	41
4.6.2 Rå blåbærekstrakt .....	42
4.6.3 Blåskjellekstrakt .....	42
<b>4.7 Samlet vurdering av ekstraktene .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8 Optimal mengde <math>\alpha</math>-tokoferol i selolje .....</b>	<b>47</b>
<b>5 Konklusjon .....</b>	<b>51</b>
5.1 Anbefalinger til videre arbeid .....	52
<b>Referanser .....</b>	<b>53</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>58</b>



## 1 Bakgrunn

De siste tiårene har det vært et økende fokus på helse og kosthold. Mye av dette skyldes at det har vært en utvikling i folkets helse, spesielt i den vestlige verden, som har skapt bekymring. Diabetes og fedme blir omtalt som folkesykdommer, og hjerte-karsykdommer er et stort problem. Mange av disse problemene skyldes folks manglende variasjon av matvarer. I den senere tid har det blitt mer tydelig hvilken betydning en god diett har for å hindre utvikling av kroniske sykdommer som blant annet diabetes, kreft og hyperaktivitet (Halvorsen *et al.* 2002). Forholdet mellom ugunstig fett og mer sunt fett er skjevfordelt. Norske myndigheter anbefaler et variert kosthold som inkluderer frukt og grønnsaker samt generelt mat som er lite prosessert. En slik diett kan være medvirkende til å forebygge utviklingen av overnevnte livsstilsykdommer.

Sjømat er en viktig kilde til helsemessige gunstige fettsyrer. Spesielt er det de langkjedede, flerumettede omega-3 fettsyrene som har vist seg å ha flere positive effekter for human helse. Markedet har derfor sett et potensial i å gi folk lettere mulighet til å kjøpe varer som inneholder disse sunne fettsyrene. Problemet med disse langkjedede marine fettsyrene når det kommer til å benytte dem i matproduksjon er at de har lett for å harskne.

For å hindre eller forsinke denne oksidasjon har det blitt utviklet mange naturlige og syntetiske antioksidanter. Men av de syntetiske er det bare butylhydroksyanisol (BHA) og butylhydrokyltoluen (BHT) som blir mye benyttet. Noen syntetiske antioksidanter blir mistenkt for å være kreftfremkallende. Det blir derfor spekulert i om disse antioksidantene vil bli forbudte eller at matprodusenter bestemmer seg for ikke å benytte slike antioksidanter for å tilfredsstille sine kunder. De fleste matprodusenter vil foretrekke naturlige antioksidanter framfor syntetiske, og er interessert i nye kilder for naturlige alternativer. Tokoferoler og flavonoider er naturlige antioksidanter og ansees som mye tryggere enn BHA og BHT, men er på langt nær like effektive og billige i bruk som de syntetiske (Asamarai *et al.*, 1996).

Det er også viktig å notere seg at selv om man kaller det naturlige antioksidanter må ikke inntaket av dem overdrives. Blir konsentrasjon av en naturlig antioksidant for høy, kan den også bli helseskadelig (Aune, 2007).

Fortuna oils ble opprettet i 2004 og har et eget raffineringsanlegg i Kristiansund. De er et globalt ledende selskap innen prosessering og handel av selolje for humant konsum. Fortuna oils har gjennom sitt morselskap GC Rieber Skinn tilgang på 50-60 % av all tilgjengelig selolje på verdensmarkedet. På hjemmesiden deres ([www.fortunaoils.com](http://www.fortunaoils.com)) beskriver de seg

selv slik, ”Fortuna oils tilbyr selolje til et internasjonalt marked som ved et daglig bruk skal bedre menneskers helse og livskvalitet”. Deres forretningsidè baserer seg på å kontrollere råvarene, ha tilgang på verdensledende raffineringsteknologi og ha sterk organisasjon på salg og markedsføring. De leverer olje til det norske og skandinaviske helsekostmarkedet, men eksporterer også i tillegg til det asiatiske og russiske markedet. Råvaren importeres hovedsakelig fra Canada, men det finnes også selolje fra norske farvann.

Målet med dette arbeidet er å undersøke antioksidative egenskaper ekstrakt fra rå blåbær, kokt blåbær og blåskjell har på selolje i et oljesystem og emulsjonssystem. I tillegg vil vi undersøke hvordan de virker i et vandig system. Vi vil også gjøre forsøk på å finne optimal mengde  $\alpha$ -tokoferol i selolje.

## 2 Teori

### 2.1 Helse og marine næringsmidler

Interessen for betydningen til marine næringsmidler i helsesammenheng begynte med legene H.O. Bang og J. Dyerberg. Etter å ha studert eskimoene på Grønland oppdaget de et mønster av påfallende lav dødelighet av hjertesykdom hos de grønlandske eskimoene sett i forhold til en kontrollgruppe med dansker. Bang og Dyerberg merket seg at eskimoene på Grønland hadde et kosthold som i hovedsak besto av mye marint føde, særlig sel og hval. I tillegg merket de seg at eskimoene hadde et kosthold som i mye mindre grad besto av mettede fettsyrer sammenlignet med den danske kosten. Det ble påvist at dietten til eskimoene innholdt særlig mye av de langkjedede omega-3 fettsyrene eicosapentaensyre (EPA) 20:5n-3 og docosaheksaensyre (DHA) 22:6n-3. Etter videre undersøkelser og sammenligninger ble det konstatert at grønlanderne hadde mye lavere dødelighetsrate knyttet til hjerte-karsykdommer enn den danske kontrollgruppen (Bang *et al.*, 1971, Dyerberg *et al.*, 1978).

Generelt mener de fleste helseeksperter at vi spiser for mye fett, og vi har fått betydelig kunnskap om at det ikke er likegyldig hvilke fettsyrer man får i seg. Allerede i 1961 anbefalte The American Heart Association (AHA) en omlegging av det amerikanske kostholdet for å redusere hyppigheten av hjerte- og karsykdommer. Omleggingen gikk blant annet ut på å senke det totale fettinnholdet, spesielt mettet fett. I 1962 kom den samme anbefalingen til Norge i forbindelse med Nicolaysen-komiteens innstilling om sammenhengen mellom fett og hjerte- og karsykdommer. Det ble anbefalt en reduksjon i det totale fettinnholdet til 30 % av energien og en økning av flerumettet fett til 10 % av kostens fettinnhold. I den senere tid har blant annet World Health Organization (WHO) kommet med tilsvarende anbefalinger som inneholder mål for den ønskelige fordelingen mellom de energigivende næringsstoffene, med vekt på reduksjon av totalt fettinnhold til 25-30% og mettet fett til 7-10 % av energien (Nes *et al.*, 1998).

Mengden enumettede og flerumettede fettsyrer i kosten kan gjerne økes. Det er imidlertid ikke likegyldig hvilke flerumettede fettsyrer man inntar. Det nåværende forholdet mellom omega-6 og omega-3 fettsyrer ligger rundt 10/1, mens det anbefalte forholdet er estimert til å være 4/1 (Parry *et al.*, 2005). Det er derfor gitt anbefalinger om å øke mengden omega-3 uten å øke inntaket omega-6 fettsyrer (Simopoulos *et al.*, 1999). Spesielt er det inntaket av de langkjedede omega-3 fettsyrene som man generelt burde spise mer av, og disse finner man bare i sjømat. Det er vitenskapelig bevist at langkjedede omega-3 fettsyrer har helbredende effekt på personer som har vært plaget med hjerte- og karsykdommer. Samtidig er det også

bevist at det har en forbyggende virkning på personer som aldri har vært utsatt for hjerte- og karproblemer (Jones, 2002). I tillegg finnes det gode indikasjoner på at langkjedede omega-3 fettsyrer kan ha positive effekter på flere andre sykdommer og på normal utvikling. Spesielt med tanke på utvikling av nervevev/hjerne hos foster, immunologiske sykdommer og betennelser (Connor, 2000, Ruxton *et al.* 2004). Spiser man lite fisk til daglig bør man ta kosttilskudd av omega-3, men de beste virkningene oppnås ved å spise varierte måltider fisk, her spesielt feit fisk, siden den har høyest innhold av de viktigste flerumettede fettsyrene.

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) publiserte i mars 2006 rapporten *Et helhetssyn på fisk og sjømat i norsk kosthold*. Her var det foretatt en vurdering som omfattet ernæringsmessige fordeler ved konsum av fisk og annen sjømat. Dette ble sett i forhold til helserisiko forbundet med inntak av forurensninger og andre uønskede stoffer som fisk og annen sjømat kan inneholde. Det viste seg at en gjennomsnittlig nordmann spiser ca. 2 fiskemåltider per uke, med en fordeling mellom mager og feit fisk på 2:1. Konklusjonen var at vi generelt kan spise mer fisk. Det kom også frem i rapporten at blant de som spiser lite fisk ville en gjennomsnittlig økning på 1 måltid fisk i uken redusere risikoen for fatalt hjerteinfarkt med 4 %.

## **2.2 Selolje**

Som nevnt tidligere har det vist seg at eskimoene har et kosthold som ikke bare inneholder mye fiskefett, men som også er rikt på lipider fra marine pattedyr.

Det gjennomsnittlige inntaket av selolje hos eskimoene ligger rundt 8-9 gram per dag, likevel er det relativt få studier om hvilken effekt selolje har for risikofaktorer på hjerte-karsykdommer. Docosapentaen syre (DPA) er tilstedeværende i mye større grad i selolje enn i fiskeolje, og den er derfor en signifikant komponent i eskimoenes diett. Men alt dette tatt i betraktning er det forsket betydelig mer på effekten fiskeolje har på hjerte- karsykdommer enn effekten til selolje (Conquer *et al.*, 1999).

### **2.3 Funksjonell mat**

Mange forbrukere, strategiplanleggere og matprodusenter har i den siste tiden blitt svært interessert i forholdet mellom kosthold og helse. Matprodusenter ser muligheten til å utvikle potensielle nye produkter, mens myndighetene ser utfordringen i hvordan dette kan reguleres i en mer gunstig helsemessig retning. Det er derfor blitt satt i gang forskning på hvordan man skal forbedre helseegenskapene til mat og matingredienser i den retning at det skal utvikles såkalt funksjonell mat (Malla *et al.*, 2007).

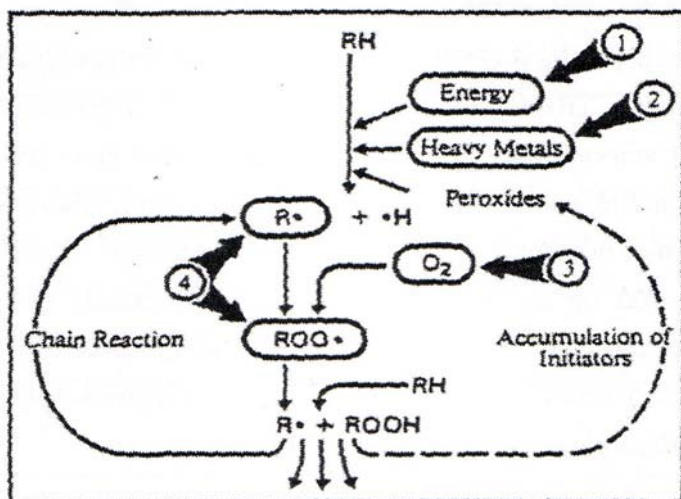
Mat blir definert som funksjonell hvis de inneholder eller er tilsatt komponenter som på en fordelaktig måte har innvirkning på en eller flere funksjoner i kroppen, men kan også være funksjonell hvis potensielle skadelige komponenter har blitt fjernet fra matvaren (Hornstra, 1999).

### **2.4 Oksidasjon av fettsyrer**

Informasjonen til denne delen er i hovedsak hentet i Olsens kompendium ”Lipidkjemi – med vekt på fisk” (2007).

Oksidasjon er en kjedereaksjon der oksygen og fettsyrer blir bundet sammen. Fettsyrene brytes deretter trinnvis ned til mindre og flyktige forbindelser som etter hvert vil gi ubehagelig lukt og smak. Noen av disse forbindelsene er svært reaktive og kan skade aminosyrer, karbohydrater, vitaminer og DNA. I marine oljer blir fettsyrer oksidert gjennom ikke-enzymatiske (autokatalytiske) mekanismer. Antall dobbeltbindinger har betydning for hvor raskt oksidasjonen vil gå. Dette er fordi dobbeltbindinger svekker bindingen mellom C-atom og hydrogen. Jo flere dobbeltbindinger, desto flere angrepspunkter har fettsyren og derved kan kjedereaksjon starte raskere. Sjømat med det høye innholdet av langkjedede flerumettede fettsyrer er særlig utsatt for oksidasjon.

Autooksidasjon av umettede fettsyrer deles inn i tre faser, initiering (induksjon), propagering (kjedereaksjon) og terminering (avslutning).

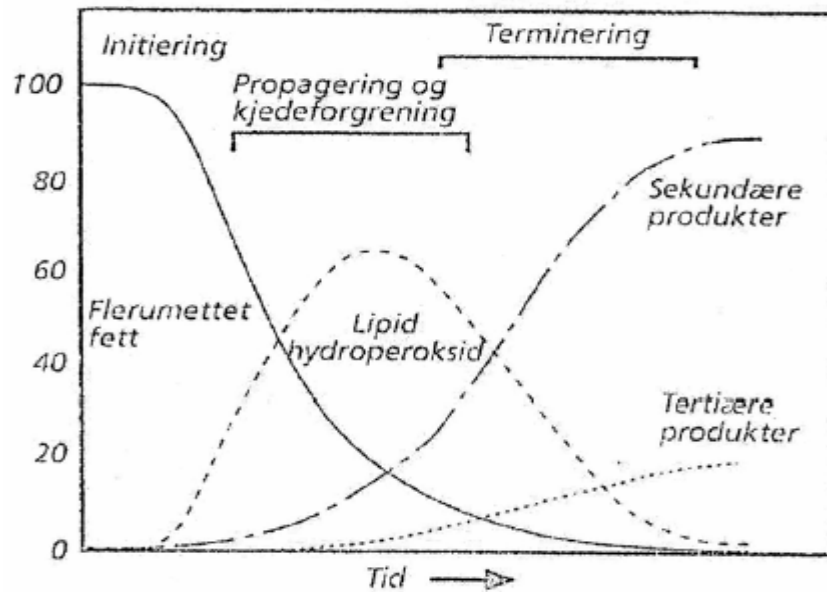


**Figur 2.1:** Gir et oversiktsbilde av hvilke mekanismer som ligger til grunn for fettsyreoksidasjonen (Olsen, 2007).

Initieringsfasen starter med at et hydrogenatom ( $\bullet\text{H}$ ) tapes i en ustabil binding i en umettede fettsyre (RH) og et fettsyreradikal ( $\text{R}\bullet$ ) dannes.

Kjedereaksjon settes i gang ved at dette reaktive fettsyreradikalet raskt reagerer med oksygen slik at det dannes et fettsyreperoksidradikal ( $\text{ROO}\bullet$ ). Dette vil så reagere med et nytt hydrogenatom i en ustabil binding i en umettet fettsyre. Resultatet er et fettsyreperoksid ( $\text{ROOH}$ ) og er nytt fettsyreradikal ( $\text{R}\bullet$ ) som binder oksygen. Dermed er kjedereaksjon oppstått.

Fettsyreperoksider er de primære harskningsproduktene og disse er uten lukt og smak. De er ustabile og brytes lett ned til nye radikaler. Både peroksider og radikaler kan virke tilbake på initieringsfasen ved å bidra til dannelsen av fettsyreradikaler ( $\text{RO}\bullet$ ). Dette fettsyreradikalet kan fragmenteres til mindre molekyler kalt sekundære harskningsprodukter som alkoholer, aldehyder og ketoner. Dette er flyktige forbindelser og gir opphav til harsk lukt og smak. Mengden reaktive fettsyreperoksider og oksidasjonsprodukter (radikaler) øker eksponentielt inntil de begynner å reagere med seg selv (termineringsfasen). På dette stadiet av oksidasjon har produktet ofte en svært ubehagelig harsk lukt og smak. Lukt- og smaksintensiteten av de sekundære harskningsproduktene er så sterk at degradering av en mindre mengde flerumettede fettsyrer er tilstrekkelig til at produkter blir uspiselige.



**Figur 2.2:** Illustrasjon av oksidasjonsforløpet i et lukket system (i en PUFA) med dannelse av primære, sekundære og tertiære oksidasjonsprodukter gjennom initiering, propagenering og terminering (Olsen, 2007).

I avslutningsfasen vil mengden peroksider reduseres og det vil dannes polymere fettsyreforbindelser. Nivået av sekundære harskningsprodukter flater ut siden de er flyktige vil man få en nedgang av disse. De kan også reagere med andre forbindelser i maten og gi en gulaktig farge på produktet.

#### **2.4.1 Faktorer som påvirker autooksidasjon**

For at det skal forekomme autooksidasjon, må det være tilgang til oksygen. Andre faktorer som temperatur, pro- og antioksidanter og lys vil også ha innvirkning på oksidasjon. Hastigheten på fettsyreoksidasjon øker når temperaturen øker. Prooksidanter vil stimulere oksidasjonen, mens antioksidanter vil hemme oksidasjon. Transisjonsmetaller som jern og kobber er kraftige prooksidanter siden de kan skifte mellom to valenser  $Fe^{2+} - Fe^{3+}$  og  $Cu^{+} - Cu^{2+}$ . Disse kan både virke i initieringsfasen ved å danne fettsyreradikal og i kjedereaksjon ved å bryte ned fettsyreperoksid.

Autooksidasjon er en nedbrytningsprosess som er uunngåelig og umulig å stoppe fullstendig. Men det finnes flere effektive metoder for å forsinke den. Ved for eksempel å fjerne oksygen fra produktet med vakuumpakking eller glassering vil dette forlenge holdbarheten. Oksidasjonen vil også hemmes hvis man reduserer energitilførselen ved å senke temperaturen eller skjerme produktet for lys.

## **2.5 Lipider**

Lipider er en stor, uensartet gruppe biologiske stoffer. Disse kan løses i organiske væsker og er tilnærmet uløselige i vann. Lipider som triglyserider er i praksis helt hydrofobe og løses best i organiske løsningsmidler som eter, kloroform og benzen. Mens membranlipider som fosfolipider og glykolipider har både en hydrofob og hydrofil del og løses best i polare organiske væsker som metanol og etanol.

Man kan inndele lipidene i 3 hovedkategorier etter hvilken funksjon de har i organismen.

### **2.5.1 Depofett**

Depotfettets hovedfunksjon er å fungere som energilager og består oftest av triacylglyseroler (triglyserider). Basisen for triglyseridenes funksjon som opplagsnæring er det høye energiinnholdet per vektenhet.

### **2.5.2 Membranlipider**

Av membranlipider skiller man mellom fosfolipider, glycolipider og kolesterol. Fettsyresammensetningen i membranlipidene er viktig for funksjonen til membranene. Organismens fettsyresammensetning reflekterer i betydelig grad fettsyreinnholdet i kosten. Hos fisk er fettsyresammensetningen i membranlipidene og i depotfettet (triglyseridene) forskjellig. Det totale nivået av flerumettede fettsyrer er på cirka 45-50 % i fosfolipidene, dvs. 3 til 4 ganger høyere enn det man finner i triglyseridene.

### **2.5.3 Lipider med spesifikke biologiske funksjoner**

Med kolesterol som utgangspunkt syntetiseres en rekke lipider med viktige biologiske funksjoner; steroider, hormoner, gallesalter og vitamin D<sub>3</sub>. Felles for alle disse er at de har fått koblet på kjemiske grupper (-OH, -COOH, -O-) som gjør at de er noe mer hydrofile enn kolesterol.

### **2.5.4 Fettsyrer**

Når man snakker om fett i kostholdssammenheng så mener man egentlig fettsyrer. Dette er alifatiske karboksylgrupper, R-COOH, der R er hydrokarbonkjeden og -COOH er karboksylgruppa. Det mest vanlige er at fettsyrene har mellom 12 og 22 karbonatomer. I plante og dyrefett finner man oftest fettsyrer med 16 og 18 C-atomer, mens marine organismer har store innslag av fettsyrer med 20 og 22 C-atomer.

Det fins 3 hovedklasser fettsyrer, mettede, enumettede og flerumettede, disse vil variere fra og ha mellom null til seks dobbeltbindinger.



Mettede fettsyrer finner man mye av i meierifett og dyrefett, og de mest dominerende mettede fettsyrene i mat er myristinsyre 14:0, palmitinsyre 16:0 og stearinsyre 18:0. Det er disse som man burde redusere inntaket av og som ikke burde utgjøre mer enn 7-10 % av energiinntaket. Enumettede fettsyrer som man finner mye av i blant annet planteoljer, som oliven- og rapsolje, finnes også i marint fett, samt nøtter. Eksempler på enumettede fettsyrer er palmitolensyre 16:1, oljesyre 18:1, disse er dominerende i mat. Det som er karakteristisk for umettet fett, er at det er mykt, evt. flytende ved romtemperatur og delvis flytende ved kjøleskapstemperatur. Jo flere dobbeltbindinger som forekommer i fettsyren, jo lavere smeltepunkt vil det ha. Flerumettede fettsyrer (polyunsaturated fatty acids, PUFA) har 2 til 6 dobbeltbindinger og 20 til 22 C-atomer. Disse fettsyrene finner vi mye av i marint og vegetabilsk fett.

### **2.5.5 Essensielle fettsyrer**

Det finnes enkelte fettsyrer som dyr og fisk ikke kan syntetisere selv og derfor må få tilført via kosten. Disse er essensielle fettsyrer. Dyr mangler enzymet som gjør det mulig å plassere dobbeltbindinger nærmere methylenen i fettsyrer enn karbonatom nummer 9. Bare planter og planteplankton har enzymer som kan gjøre dette. Linolsyre (18:2n-6) og  $\alpha$ -linolensyre (18:3n-3) er essensielle fettsyrer. Disse gir opphav til henholdsvis arakidonsyre 20:4n-6 og EPA 20:5n-3 som igjen gir opphav til eicosanoidene.

### **2.5.6 Eicosanoider**

Eicosanoidene betegnes ofte som hormonlignende stoffer eller fettsyrehormoner. Som viktige hormoner fungerer de ved små konsentrasjoner og regulerer mange fysiske prosesser. De spiller for eksempel en sentral rolle ved dannelse av blodpropp, betennelsesreaksjoner, allergiske reaksjoner og ved celledeling.

## **2.6 Antioksidanter**

Stoffer som hemmer oksidasjon blir ofte kalt antioksidanter.

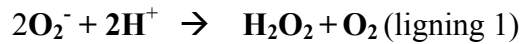
Disse kan fungere på flere måter:

1. Ved å redusere (tilbakedanne/fjerne) frie radikaler, inkludert fettsyreradikal, hydroksylradikal og fettsyreperoksidradikal (radikal scavengers; fri radikal fangere)
2. Ved å nøytralisere (quenching) singlet oksygen før dette får reagert med for eksempel fettsyrer.
3. Ved å binde opp (kjelatere) transisjonsmetaller slik at disse ikke (eller bare i liten grad) kan fungere som prooksidanter.

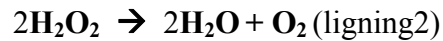
Man skiller mellom høymolekylære og lav molekylære antioksidanter.

Høymolekylære antioksidanter er proteiner og enzymer og disse virker gjennom å fjerne eller ufarliggjøre reaktive oksygenforbindelser (ROS) som dannes i den levende organismen.

Enzymet superoksid dismutase omdanner superoksid ( $O_2^-$ ) til hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) slik at dannelse av singlet oksygen ( $^1O_2$ ) hemmes (ligning 1).



Enzymet katalase bryter deretter  $H_2O_2$  ned til oksygen og vann (ligning 2).



Glutathione peroxidase er et enzym som katalyserer omdannelse av fettsyreperoksider til en stabil fettsyrealkohol (ROH) og dermed kan kjedereaksjon i fettsyreoksidasjon hemmes (ligning 3). Tripeptidet glutathion (glu-gly-cys) (GHS) virker som elektrondonor. Oksidert glutathion (GSSG) vil i en levende organisme tilbakedannes av enzymet glutathionreduktase til redusert GHS.



Nivåene av de antioksidative enzymene i organismen vil normalt bare i mindre grad kunne påvirkes av kosten.

### **2.6.1 Naturlige antioksidanter**

Lavmolekylære antioksidanter er kunstige eller naturlige stoffer som enten er fettløselige eller vannløselige. Det er de som ofte blir tilsatt i næringsmidler for å hemme harskningsutvikling eller for å berike produktene med hensyn på innhold av antioksidanter.

Fenoler er naturlige antioksidanter. Disse fungerer ved å avgi et hydrogenatom og dermed fjerne reaktive radikaler som for eksempel fettsyreradikaler  $R\bullet$ , fettsyreperoksidradikal;  $ROO\bullet$ , fettsyrealkylradikal;  $RO\bullet$ , eller hydroksylradikal;  $\bullet OH$  som er dannet i mat eller i levende organismer:



TH<sub>2</sub> kan være tokoferol eller en annen fenolisk antioksidant. Produktene som dannes kan enten være en intakt fettsyre (RH), et fettsyreperoksid (ROOH), en fettsyrealkohol (ROH) eller vann. TH• er et antioksidantradikal som er lite reaktivt (ligning 4).

Tokoferoler er de mest kjente og mest brukte antioksidantene. Naturlig finnes det 4 forskjellige former for tokoferoler ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  og  $\delta$ ), disse er tilstede i ulike mengdeforhold i planteoljer.  $\alpha$ -Tokoferol har høyest vitamin-E aktivitet (100 %) og er den som blir mest brukt. Tokoferolenes sterke side er at de klarer seg relativt godt i varme omgivelser, og er derfor velegnet i produkter som skal bevares under varmebehandling. De har best virkning hvis de blir tilsatt i matvarer hvor innholdet av tokoferol er liten eller lik null. Det er også vist at tokoferol også kan ha prooksidativ virkning og føre til økt harskning i vegetabiliske oljer. Det har vist seg at  $\alpha$ -tokoferol gir prooksidativ virkning ved konsentrasjoner høyere enn 0,01 % i løpet av de tidlige autooksidasjon stadiene i flekk, korn og olivenolje triacylglyceroler (Pokorny *et al.*, 2001).

I de fleste plante og planteprodukter finner man polyfenoler, noen inneholder mer enn andre. Deres biologiske funksjon er å beskytte plantene mot UV-stråling og generelt hindre oksidasjon av biologiske molekyler. De gir også farge til frukt, bær og andre plantedeler. Polyfenoler blir ansett å ha sterke antioksidative egenskaper. Deres antioksidative aktivitet er mye høyere in vitro enn andre kjente antioksidanter.

Flavonoider er en stor gruppe av polyfenoliske antioksidanter som finnes naturlig i blant annet grønnsaker, frukt, te og vin (Hertog *et al.* 1993). Det er blitt identifisert over 4000 forskjellige flavonoider i planter. Flavonoidene er vannløselige, ofte fargerike med et C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> karbonskjelett. De viktigste gruppene flavonoider er anthocyaniner, flavonoler, flavoner og flavanoler. Disse fungerer som radikalfangere og vil også kunne binde metaller. Grunnstrukturen til flavonoider består av A og B aromatiske ringer som er forbundet med en 3-karbon alifatisk kjede som oftest er kondensert med et oksygenatom. B-ringene kan ha hydroksylgrupper og methoxygrupper (R<sub>2</sub>-R<sub>5</sub>) på en eller flere av karbonatomene. Man mener det er disse hydroksylgruppene i B-ringene som gir stoffene antioksidative egenskaper (Olsen 2007). Forholdet mellom inntak av flavonoider og en reduksjon i risikoen for å utvikle enkelte sykdommer som hjerte-karsykdommer og kreft er blitt bekreftet i en rekke epidemiologiske studier (Mattila *et al.*, 2006).

### **2.6.2 Syntetiske antioksidanter**

Av syntetiske antioksidanter er det BHA og BHT som oftest blir benyttet som tilsetningsstoffer i næringsmidler. BHA er en syntetisk fenol mens BHT er en syntetisk antioksidant. Begge er nokså stabile i forhold til varme og brukes i stor grad for å hindre harskning av fett og olje. Det er diskusjonen rundt kreft som har påkalt størst oppmerksomhet ved bruk av disse antioksidantene. Det er blitt påvist kreft i formagen hos en andel rotter (30 %) som fikk 2 % BHA i fôret hver dag i 6-12 måneder. Doser på 0,5 % BHA gav ikke svulster. Hos dyr uten formager fant man ikke holdepunkter for kreftutvikling. Dette gjør det vanskelig å vurdere kreftisiko for mennesker på grunn av at vi mangler formage. Men Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) har likevel satt akseptabelt daglig inntak (ADI) på BHA til 0-0,5 mg/kg kroppsvekt. Som antioksidant har BHA en mengdebegrensning på 100-200 mg/kg av fett i varen. I Norge har man et dagsinntak på 0,03-0,05 mg/kg kroppsvekt.

Hos mennesker blir 75 % av inntatt BHT skilt ut av urinen. BHT anses ikke for å representere en risiko for genotoksisitet hos mennesker. Men høye doser (500 mg/kg kroppsvekt/dag) har den vist å øke antall leversvulster hos rotter. I studier for kombinasjonseffekter mellom BHT og andre kjente kreftfremkallende stoffer har den vist seg (ved høy dose) å virke som en kreftpromotor. JECFA har satt ADI-verdi av BHT til 0-0,3 mg/kg kroppsvekt og den har samme mengdebegrensning som BHA (Aune, 2007).

I fôr er ethoxyquin et mye tilsatt syntetisk antioksidant. Enkelte er bekymret for dyrenes helse og for at stoffet skal overføres til mennesker via kjøttet. Enkelte bivirkninger er påvist ved bruk av ethoxyquin som er tillatt å bruke med konsentrasjoner opptil 150 mg/kg(-1) (0,015 %) i dyrefôr. Det er derfor gjort undersøkelser for å også finne mindre skadelige antioksidanter til fôrprodukter (Blaszczyk & Skolimowski, 2007).

### **2.6.3 Blåbær**

Blåbær (*Vaccinium myrtillus*) hører til lyngfamilien og er vanlig over de nordlige og sentrale delene av Europa, Amerika og Asia. Den er en av Norges vanligste planter, og vokser fra lavlandet og til langt opp på snaufjellet, fra helt nord i landet til helt i sør. Den trives best i granskog og foretrekker litt fuktige og solfylte steder, og modnes i juli/august. Den er også blant bærene som er best kjent for sine potensielle gunstige helsemessige egenskaper.

En analyse av totalt innhold av antioksidanter som ble gjort på blant annet blåbær viste at blåbær var av dem som fikk høyest utslag på innhold av antioksidanter med 8,23 mmol/100g (gjennomsnitt) (Halvorsen *et al.*, 2002).

Av blåbærs mange aktive komponenter inneholder den mye anthocyaniner. Dette er en av de viktigste gruppene av plantepigmenter og er mye brukt som fargestoff i matvarer. Sammen med andre fenoliske komponenter har de evne til å hemme frie radikaler. Men det er ennå uvisst om anthocyaniner har helsemessig god effekt alene eller om det er deres samvirkning med andre fenoliske komponenter som gir de gode antioksidative egenskapene (Konczak & Zhang, 2004). Epidemiologiske studier har vist at et høyt fruktinntak har en positiv sammenheng med reduksjon i dødelighet av hjerte- karsykdommer og enkelte typer kreft (Faria *et al.*, 2005).

En analyse målte totalt innhold i blåbær av fenol (milligram gallesyre ekvivalent/g pulver) og anthocyanin (milligram cyanidin-3-glucoside ekvivalent/100g frøpulver). Blåbær fikk et innhold på henholdsvis  $15,8 \pm 0,63$  fenol og  $7,4 \pm 0,35$  anthocyanin (Parry *et al.*, 2006).

#### **2.6.4 Blåskjell**

Langs store deler av norskekysten kan man finne blåskjell av typen *Mytilus edulis* liggende med tangen i fjæra. Blåskjell vokser ved temperaturer fra 0-25°C, men ideell temperatur ligger på 15-20°C. Blåskjell er en god kilde til jern, selen og vitamin B12, og de inneholder lite (1-2 %), men sunt fett (Eksportutvalget for fisk). Av den totale mengden fett i blåskjell inneholder de mye av de langkjedede flerumettede fettsyrene (Khan *et al.* 2006).

Biokjemien til blåskjell variere i forhold til mattilgang, reproduksjon og forurensningsforhold. Blåskjell er derfor mye benyttet som indikator for kontrollering av miljø og forurensningsforhold. Den brukes på grunn av dens evne til å samle forurensninger og organismens mange biologiske reaksjonene til xenobiotiske kjemikalier kan deretter bli brukt som markør med hensyn på eksponering av slike stoffer (Regoli *et al.*, 1998)

Det har de siste årene blitt stor interesse for enzymaktiviteten involvert i metabolismen av xenobiotiske kjemikalier i blåskjell.

### **2.7 Emulsjoner**

En emulsjon består av to ikke-blandbare væsker (vanligvis olje og vann), hvor den ene er fordelt i den andre i form av dråper. Man skiller mellom to typer fettemulsjonssystemer alt etter om det er oljedråper fordelt i en vannfase eller omvendt. Typiske olje-i-vann emulsjonsprodukter er majones, melk og supper. Mens margarin og smør er typiske vann-i-olje produkter. For å kunne lage en emulsjon som er kinetisk stabil over lengre tid (uker, måneder eller år) kan man benytte kjemiske substanser kalt emulgatorer. Dette er overflateaktive molekyler som tilsettes før homogenisering og disse vil blande seg i

henholdsvis olje- og vanddråper under homogeniseringen. Disse tilsettes før emulsjonen homogeniseres. Prøver man å homogenisere rein olje med rent vann, vil man først observere en emulsjon, men etter kort tid vil fasene separeres. Det vil da ligge et lag olje over et lag vann. Det er store forskjeller mellom lipidoksidasjon i bulk oljer og emulgert olje. Lipidoksidasjon er blitt grundig studert i bulk oljer og det er en forholdsvis god forståelse av hvilke faktorer som påvirker oksidasjon i slike systemer. Emulsjonssystemer er derimot mindre utforsket, og kunnskapen rundt hvilke faktorer som påvirke lipidoksidasjon i systemer hvor fett er spredt som emulsjonsdråper er fremdeles begrenset (Coupland & McClements, 1996). Denne manglende kunnskapen er overraskende med tanke på den store mengden mat som foreligger enten delvis eller fullstendig som emulsjon.

## 3. Materialer og metoder

### 3.1 Materialer

#### 3.1.1. Ekstrakter

Ekstraktene som ble benyttet var fra blåbær, blåskjell og vitamin E.

- **Blåbæra** var av typen *Vaccinium myrtillus* og ble håndplukket høsten 2006 i Kvæfjord i Troms.
- **Blåskjell** (*Mytilus edulis*) kom fra sjøanlegget Vestfjord skjell i Kvæfjord. Blåskjellene var atmosfærisk frysetørket ved varmeteknisk avdeling ved NTNU-SINTEF i Trondheim. Frysetørkeprosessen er en patentert tørkeprosess basert på varmpumpe og fluidized bed. Blåskjell benyttet i denne oppgaven ble dyrket i juni 2005. Med temperatur på ca 12°C. Blåskjellene ble fyst 08.06.05 og tint igjen oktober 2006.
- **Vitamin E**, ekstraktet var av typen  $\alpha$ -tocopherol approx. 95 % HPLC fra Sigma Aldrich Inc., St.Louis, USA.
- **Trolox**, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, Aldrich Inc., St.Louis, USA.

#### 3.1.2 Oljer

- **Selolje** ble levert av Fortuna Oils AS, Kristiansund. Både tilsatt og ikke tilsatt vitamin E (tokoferol). Oljen ble porsjonert, skyllet med nitrogen og fryst ned.
- **Møller's tran (tran)** og **Gaea extra virgin oil (olivenolje)** ble kjøpt på Kræmer, Tromsø.

#### 3.1.3 Emulgatorer

- **Fettløselig emulgator**, bestående av polare (phospho-, lyso.phospho og glyko-) lipider. Basert på soya lektin.
- **Vannløselig stabilisator**, bestående av carrageenan standardisert med sukker, xanthangum og guar gum.

## **3.2 Oksidasjonsforsøk**

### **3.2.1 Modellforsøk**

Poenget med modellforsøket var å bli kjent med analysemetodene, samt å kunne karakterisere stabiliteten og fettsyresammensetningen til seloljen vi videre skulle benytte i analysene av antioksidantekstraktene. For å karakterisere seloljen benyttet vi to andre oljer i forsøket. Seloljen som var levert fra Fortuna Oils var ikke tilsatt  $\alpha$ -tokoferol eller noen annen form for antioksidant. Dermed for å få et begrep om hvor stabil seloljen var ble den analysert mot en olje tilsatt antioksidant, samt en olje som inneholdt lite flerumettet fett. Vi benyttet tran som er tilsatt dl- $\alpha$ -tokoferylacetat (2mg/ml) fra fabrikanten, og olivenolje.

Det ble først gjort et vektøkingsforsøk hvor 5 gram av hver olje (3 paralleller) ble satt til inkubasjon med temperatur på 30°C. Det ble tatt daglige veieprøver av oljene og forsøket gikk over en periode på 27 dager.

De samme oljene ble også testet i en Oksypress (Mikrolab, Aarhus, Danmark). Det ble veid opp ca. 3 g av hver olje (2 paralleller) og ble kjørt på 50°C med trykk på 3,5 bar i 140 timer. Olivenolje ble kjørt på 90°C. Det ble også gjort en identifisering av fettsyresammensetningen til oljene hvor prøvene ble metylert etter en modifisert metode av Stoffel, Chu & Ahrens (1959). Vi målte også anisidinverdi (AV) og peroksidverdi (PV) av oljene.

### **3.2.2 Ekstrakt i olje**

Seloljen som ble brukt som kontroll og testolje i dette forsøket var allerede tilsatt 1100 ppm da den ble sendt fra Fortuna Oils i Kristiansund. 2000 ppm med ekstrakt fra rå blåbær, kokt blåbær og blåskjell ble det veid ut og overført til 6 kolber (à 2 paralleller) hver fylt med 30 g selolje. For å få oljen til å harskne i ønsket tempo ble prøvene inkubert i varmeskap. Dette ville øke de fysiske påvirkningene til oljen og framskynder harskningsprosessen. Oljen ble satt i ristemaskin (Innova 4300 Incubator Shaker, New Brunwich Scientific) ved 45°C. Forsøkene ble utført etter utgangspunkt fra Pettersens (2006) modell for testing av naturlige antioksidanter beskrevet i "Natural antioxidant assessment: Stabilizing effect on marine lipids". Prøvene ble tatt ut av inkubering etter 4, 17, 21 og 25 timer og testet for peroksider og anisidininnhold.



### **3.2.3 Ekstrakt i olje-i-vannemulsjon**

Emulsjonene ble laget med følgende mengdeforhold (vises i prosent av total mengde):

- 15 % selolje
- 75 % H<sub>2</sub>O
- 0,3 % fettløselig emulgator
- 0,5 % vannløselig stabilisator
- 0,05 % ekstrakt

Under tillagingen ble det benyttet en thermomix (Thermomix, Vorwerk).

Emulgatorene ble blandet med seloljen i 1 minutt på moderat hastighet. Deretter ble vannfasen tilsatt og rørt på maks fart i 1 minutt. Alt ble deretter kjørt i 5 minutter ved 70°C ved moderat hastighet. Det siste minuttet ble alt kjørt med full hastighet.

Siden blåskjell og bare halvparten av blåbæra ikke hadde gjennomgått varmebehandling, ble ikke disse kjørt med en temperatur på 70°C. Dette for ikke å ødelegge komponenter som kanskje ikke ville tåle varmebehandlingen.

### **3.2.4 Ekstrakt i et vandig system**

Forsøket ble utført etter metode beskrevet i artikkelen "A Microtiter Plate Assay for Screening Antioxidant Activity in Extracts of Marine Organisms" (Dunlap *et al.*, 2003). Det ble målt relativ absorbans ved 492 nm som et uttrykk for oksidasjon. Poenget var å få et inntrykk av ekstraktens evne til å forhindre oksidasjon av dihydrorhodamine- 1,2,3 (DHR) som er et substrat som farges gulrødt ved oksidering.

### **3.2.5 Optimal mengde $\alpha$ -tokoferol**

Det ble gjort tre ulike forsøk for å finne optimal mengde tokoferol.

Forsøk 1: Selolje ble tilsatt 500, 750, 1000, 1500 og 2000 ppm (2 paralleller)  $\alpha$ -tokoferolekstrakt. I tillegg ble det laget en kontrollprøve med ren selolje. Prøvene sto inkubert i varmeskap med temperatur på 60°C med full tilgang på oksygen. Det ble kjørt peroksidverdi analyse av prøvene etter 0, 24 og 48 timer.

Forsøk 2: Selolje ble tilsatt 200, 300, 400, 500, 600, 1000 og 2000 ppm  $\alpha$ -tokoferolekstrakt (2 paralleller). I tillegg ble det laget en kontrollprøve med ren selolje. Prøvene ble inkubert i varmeskap med temperatur på 45°C. Det ble kjørt peroksidverdi analyse etter 0, 22, 55 og 74 timer.

Forsøk 3: En kontrollprøve med ren selolje og selolje tilsatt 200, 300, 400, 600, 1000 og 2000 ppm ble overført til mørke glassflasker, forseglet og satt i kjøleskap ved temperatur på 4°C. Etter å ha stått inkubert i kjøleskapet i 4 måneder ble prøvene ble testet for peroksid og anisiditall.

### 3.3 Generelle metoder

#### 3.3.1 Tørrstoffinnhold

Ved bruk av varmebehandling ble vannet fordampet, slik at tørrstoffet ble oppkonsentrert. Tre paralleller à 5 g ble veid og innkubert i varmeskap (Termaks, Heigar) ved 95 °C og veid til konstant vekt var oppnådd. Tørrvektprosenten ble regnet ut ved hjelp av følgende formel.

$$\frac{V_c - V_a}{V_b} * 100 = \% \text{ tørrstoff}$$

V<sub>a</sub> = Vekt skål

V<sub>b</sub> = Vekt prøve

V<sub>c</sub> = Vekt av skål med tørket prøve

#### 3.3.2 Innhold av polyfenoler i blåbær

Denne delen av forsøket ble utført av Ida Johanne Jensen ved Instituto del Frio, Ciudad universitaria i Madrid (Jensen, 2007). Innholdet av polyfenoler ble bestemt ved å bruke Folin-Ciocalteus metode (Singelton *et al.*, 1999).

#### 3.3.3 Ekstraksjon av blåbær- og blåskjellekstrakt

Ekstraksjon ble gjort etter en metode beskrevet i artikkelen ”Citrus peel extract – A natural source of antioksidant ” (Rehman, 2006) men utført med noen modifikasjoner. Blåbær (420 g) ble homogenisert ved hjelp av stavmikser. Halvparten ble kokt i 15 minutter. Deretter ble blåbær og blåskjell (50 g) overført til ulike Dural kolber (1000 ml). Disse ble dyppet i flytende nitrogen for å fordele massen jevnt over et så stort areal av kolben som mulig for å effektivisere den påfølgende frysetørkingen. Prøvene sto i vakuumbrysetørker (Heto FD3, Medinor Produkter) i to døgn tildekket i aluminiumsfolie for beskyttelse mot lyspåvirkning. Vakuumbrysetørking er en dehydreringsteknikk som går ut på å fjerne vann fra frosset produkt via sublimasjon. Det vil si at vannet går fra frosset tilstand til dampform uten først å smelte.

Fordelen med dette er at det bevarer de naturlige komponentene i produktet mye bedre enn ved for eksempel varmebehandling (Di Matteo, 2003). Tørrstoff (blåbær og blåskjell (10 g)) ble knust til pulverform med morter og overført til Erlenmeyerkolber, tilsatt 100 ml metanol, skyllet med nitrogen og forseglet med parafilm. Prøvene ble deretter satt på risting på en platerotator (Laboratory-model G2 New Brunwich Scientific) ved romtemperatur (20°C) i 12 timer. Væsken ble filtrert gjennom kaffefilter (no 4). Den flytende væsken ble skyllet med nitrogen, forseglet og satt i kjøleskap. Den gjenværende massen i kaffefilteret ble på nytt tilsatt 100 ml metanol og satt til risting i nye 12 timer og samme prosedyre ble gjentatt. Løsningene ble blandet sammen og løsemiddel (metanol) ble fjernet vha rotavapor (Heidolph Laborota 4000, Büchi Vacuum Controller B-721) ved temperatur 35°C. Ekstraktene ble deretter undersøkt for antioksidative egenskaper.

### **3.3.4 Ekstraksjon av fett**

Ekstrahering av fett ble gjort ved ekstraksjon med metanol og kloroform (Bligh & Dyers, 1959). Fra emulsjonene laget av blåbærekstrakt, kokt blåbærekstrakt og blåskjellekstrakt ble 7 g ble veid ut og overført til teflonrør (3 paralleller) og tilsatt lik mengde (200 µl) internstandard av fettsyren 17:0 (10mg/ml). Denne blir tilsatt slik at man kan kvantifisere innholdet av de andre fettsyrene. Prøvene ble blandet godt. Deretter ble løsningene filtrert gjennom et foldefilter for å skille væske fra massen. Teflonrøret ble skylt en ekstra gang med 5 ml kloroform og væsken filtrert en gang til for å få med mest mulig av prøven. Filtratet ble tilsatt 9 ml 0,88% kaliumklorid (KCL) og mikset godt. Løsningene ble deretter sentrifugert i 10 minutt for å skille vann/metanol fasen fra kloroform/fett fasen. Den førstnevnte fasen ble sugd vekk ved hjelp av vannsug, mens kloroform/fett fasen ble helt over i en rundkolbe og dampet inn via rotavapor (30°C, 100 bar). Det fettete som var igjen i kolben etter dampingen ble løst i 5ml heptan, og dampet til tørrhet under N<sub>2</sub>-gass. Det totale fettinnholdet i emulsjonene ble bestemt ved veiing.

### **3.3.5. Identifisering av fettsyrer**

Lipidet metyleres med syre og trykkoking som derivatiserer fettsyrene til metylestere. Prøvene ble metylert ved en modifisert metode etter Stoffel, Chu & Ahrens (1959). Fettet/oljen ble løst i kloroform /metanol (1:1) slik at det ble 10 ml fett/olje per ml løsemiddel. For å kunne bestemme fettsyresammensetningen ble det tatt 100 µl løsning ut av prøvene og blandet med 0,9 ml kloroform og 2 ml 2% svovelsyre i metanol i kimaxrør. Disse ble trykkokt ved 100°C i 1 time. Etterpå ble de tilsatt 3,5 ml Heptan og 3,5 ml 5% NaCl og blandet godt slik at vi kunne se to atskilte faser. Heptanfasen ble pipettert over i et glassrør og inndampet

til tørrhet ved hjelp av N<sub>2</sub>-gass, og deretter tilsatt 100 µl heptan og overført til GC autosample rør.

Fettsyrer identifiseres som metylestere med gasskromatografi (GC) sammen med flammeioniserende detektor (FID).

Det benyttet en gasskromatograf 6890N fra Agilent technologies med autosampler 7683B, splitless autoinjektor med temperatur 240°C, bæregass helium og flammeionisasjonsdetektor som brant med mix av H<sub>2</sub> og luft med en temperatur på 250°C. Gasskromatografen var utstyrt med kolonne av typen Varian CP7419, kapilær 50,0m x 250µm x 0,25µm med temperatur ved start på 50°C som ble holdt i 2 minutter, deretter 10°C/min til 150, så steg det 2°C/min til 205 og deretter 15°C/min til 255°C som ble holdt i 10 minutter. Fettsyrene i prøvene ble identifisert ved å sammenligne retensjonstider med standarder, og arealet av hver enkelt fettsyre ble lest av de ulike kromatogrammene.

### **3.4 Metoder for måling av oksidasjon**

#### **3.4.1 Vektøkning**

Selolje, tran og olivenolje ble inkubert i varmeskap (Termaks, Heigar) ved temperatur på 31°C. Oljen ble fordelt i petriskåler (3 paralleller à 5 gram) og veid daglig i 27 dager med en vekt med nøyaktighet på 0,1 mg. Fettsyreradikalets binding til oksygen fra lufta gjorde at fettstoffer oksiderte og vekten på oljen økte som en følge av dette.

#### **3.4.2 Peroksidverdi (PV)**

En vanlig kjemisk måte å bestemme oksidasjonsgraden i oljer på er å benytte PV analyse. Metoden ble utført etter AOCS Official Method CD 8-53 (1993) og går ut på at fettsyreperoksid oksideres til fettsyrealkohol med iodid som da reduseres til molekylært iod. Videre titreres dannet iod med en standard natriumthiosulfatløsning, dette gjøres for å bestemme hvor mye oksidasjonsmiddel som har vært forbrukt.

Stivelse blir brukt som indikator, fordi dannet iod vil binde seg til stivelse og gi en mørk farge. Når iodet har blitt oksidert til iodid av thiosulfat, vil blåfargen forsvinne og endepunktet for titreringen er nådd. Ut fra forbrukt natrium tiosulfat (0,1 eller 0,01 M) kan mengden fettsyreperoksid bestemmes.

Siden det var vanskelig å få ekstrahert ut nok fett fra emulsjonene ble det gjort to ulike PV analyser.

### Metode 1

1 gram fett ble løst i 30 ml eddiksyre:kloroform (2:3). Blandingen ble tilsatt 500 µl mettet kalium iod. Dette fikk reagere 1 minutt før reaksjon ble stoppet med 30 ml H<sub>2</sub>O. Som fargeindikator ble det tilsatt 5 ml stivelsesløsning (5 %) som gav løsningen blåfarge. Deretter ble det titrert (715 Dosmal autotritator, Metrohm) med natrium thiosulfat løsning (0,1 eller 0,01 M) til fargeomslag.

PV kunne beregnes ut fra følgende formel:

$$PV = \frac{10(n_1 - n_2)}{m}$$

$n_1$  = Titrervolum av natrium tiosulfat

$n_2$  = Titrervolum av blindprøven

$m$  = Oljemengde i gram

PV uttrykkes her som milliequivalents av iod per kg olje (meq/kg) (Frankel, 2005).

### Metode 2

Bestemmelse av PV-innhold i små mengder olje ble gjort etter metode av Ueda *et al.* (1986), ferrothiocyanattmetoden. Metoden går ut på at hydroperoksidene i fett oksiderer Fe(II) til Fe (III). Fe (III) reagerer videre med ammoniumthiocyanat ved oppbygging av et rødt kompleks som har sitt absorpsjonsmaksimum ved 500 nm.

Bestemmelse av PV ble beregnet ut fra en standardkurve basert på Fe (III)-løsning. Mengden Fe (III) som ble brukt i standardkurven var 0, 50, 150, og 200 µl (Se vedlegg 1).

Alle prøvene ble mikset på en vortex-mikser i 15 sekunder, etter 2 minutter ble de mikset i nye 45 sekunder. Absorbansen ble målt ved 500 nm i spektrofotometer (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi Instruments Inc.)

PV ble regnet ut ved hjelp av følgende formel:

$$PV = \frac{(Abs_{prøve} - Abs_{blank}) * L}{(55,84 * m_o * 2)}$$

L = Stigningskoeffisient std-kurve (vedlegg 1)

$m_0$  = analysert mengde fett (g)

55,84 = atomvekt jern

Denne metoden gir PV i milliequivalents av oksygen per kg olje (meq oksygen/kg).

### **3.4.3 Anisidinverdi (AV)**

Metoden ble utført etter AOCS Official Method Cd 18-90 (1993) men med noen modifikasjoner. AV baserer seg på reaksjon mellom høymolekylære karbonylforbindelser i oljer og p-anisidin i iseddik. Metoden egner seg best når karbonylforbindelsene inneholder dobbeltbindinger. Reaksjonsproduktet blir gulfarget og kan måles ved bølgelengde 350 nm. AV egner seg spesielt godt for oljer som har vært varmebehandlet, f.eks frityroljer eller andre oljer der peroksidene er omdannet.

#### Reagenser

- Isooktan (2,2,4 tri metyl pentan ca 0 i OD ved 350 nm).

- 0,25 % p-anisidin i eddiksyre.

10 ml isooktan ble tilsatt 0,1 g olje. Av dette ble 2,5 ml overført til kyvetter. Det ble også laget en blindprøve som kun besto av 2,5 ml isooktan. Absorbansen ble målt ved 350 nm i et spektrofotometer (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi instruments Inc.). 500  $\mu$ l p-anisidin i eddiksyre fikk reagere i 10 minutter for så å måle ny absorbans.

AV ble beregnet ut fra følgende formel

$$AV = \frac{10 (1,2*(A_2-A_1))}{m}$$

$A_1$  = Absorbans før tilsetning av anisidinløsning

$A_2$  = Absorbans etter tilsetning av anisidinløsning

m = Innveid oljemengde i gram

### **3.4.5 Oksidasjon ved forbruk av oksygen (Oksypress)**

En Oksypress (Mikrolab, Aarhus, Danmark) måler oksidasjon etter forbruk av oksygen. Dette er en manipulert oksidasjonsanalyse hvor en beholder med olje varmes opp til ønsket

temperatur og fylles med O<sub>2</sub> til ønsket trykk (bar). Oksidasjon av oljen vil redusere trykket i beholderen og man kan få se en grafisk fremstilling av oksidasjonsforløpet til oljen.

### **3.4.6 Antioksidativ effekt i vandig-system (DHR)**

Som nevnt i kapitel 3.2.5 ville vi undersøke hvordan ekstraktene fungerte i et vandig system ved å sjekke deres inhiberende virkning på oksidasjon av DHR.

Reagensene her besto av:

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

Assayet ble overført til en 96-brønners microtiter plate. Avlesningen ble gjort på en Spectramax 190 og tolkningen av data ble SOFTmax Pro brukt.

#### Tillaging av løsningene

- DHR (500 µM) – kapsel ble fortynnet i 2.0 ml MeOH, 125 µl 10 mM EDTA (pH 8) og 7,875 ml Tris-HCL (100 µM, pH 7,4).

- Oksidanten APPH (50 µM) 67,8 mg (250 µmol) i 5,0 ml H<sub>2</sub>O

- Trolox (antioksidant, positiv kontroll). 5 fortynninger 50 µl/ml (80 µM), 25 µl/ml, 10 µl/ml, 5 µl/ml og 1 µl/ml.

- Stokkløsninger av ekstraktene (10 mg/ml metanol) ble det laget med fortynningene; 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml og 50 µg/ml.

Oppsett assay: 96 brønners plate

DHR	30 µl
APPH	60 µl
Prøve/kontroll (løst i MeOH)	60 µl
Til sammen	150 µl

Kinetisk data ble avlest ved 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter.

## 4 Resultat og diskusjon

### 4.1 Tørrvekt av ekstrakt.

Tørrstoffinnholdet til blåbæra hadde en gjennomsnittlig tørrvektprosent på  $10,5 \pm 1,2$ .

Blåskjellekstraktet som ble benyttet i dette arbeidet var laget fra kokte blåskjell (tørrstoffinnhold 18,7 %) som ble tørket ved atmosfærisk frysetørring ved NTNU i Trondheim. Dette materialet hadde et vanninnhold på 1,2 % (Lie, 2005). Materialet ble benyttet direkte i våre ekstraksjoner.

### 4.2 Innhold av polyfenoler i blåbær

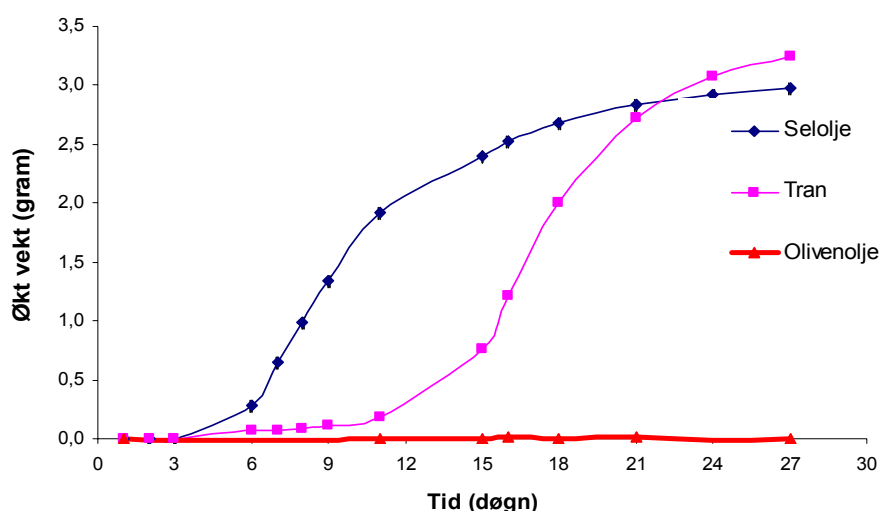
Blåbær hadde et innhold av ekstraherbare polyfenoler på  $7,2 \pm 0,3$  g per 100 gram tørrstoff.

Dette samsvarer med resultater fra forsøk utført av Zheng og Wang i 2003, der det totale innholdet polyfenoler i blåbær ble målt til 4,1 mg gallesyre ekvivalenter/g fersk prøve. Dette tilsvarer 6,8g ekstraherbare polyfenoler pr 100g tørrstoff.

### 4.3 Modellforsøk

Poenget med modellforsøket var å bli kjent med de ulike metodene vi skulle bruke i oppgaven, samt å få et begrep om stabiliteten til seloljen som skulle benyttes under de ulike analysene. Seloljen som ikke var tilsatt antioksidanter ble testet sammen med tran og olivenolje. Tran siden den var tilsatt antioksidant og olivenolje på grunn av den ulike fettsyresammensetningen.

#### 4.3.1 Vektøkningforsøk



**Figur 4.1:** Vektutvikling av oljene som uttrykk for oksidasjon. Selolje, tran og olivenolje (5 gram) ble inkubert i varmeskap ved temperatur  $30^{\circ}\text{C}$  i 27 døgn. St. avvik  $\pm 0,0$ .



Figur 4.1 viser at selolje var den minst stabile oljen med en initieringsperiode på ca. 3 dager. Fra dag 3 til dag 11 økte vekten med 1,9g. De neste 16 dagene øker vekten ytterligere med 1,1g. Mot slutten av forsøket (fra dag 21) flatet kurven ut, og det ble observert at oljen i petriskålene hadde størknet. Dette skyldtes i hovedsak polymerisasjon. Tran hadde en initieringsperiode på nærmere 12 dager. Deretter økte vekten med ca. 3g fram til siste forsøksdag. Olivenoljen holdt seg stabil gjennom hele forsøket.

#### **4.3.2 Oksidasjon ved forbruk av oksygen (Oksypress)**

I Oksypress målte vi stabiliteten til oljene etter hvor raskt de forbrukte oksygen.

Selolje hadde en initieringsperiode på 25 timer, mens oksidasjonen i tran startet etter 90 timer. Forsøket ble avsluttet etter 140 timer og da hadde ikke olivenoljen startet å oksidere. Et nytt forsøk med olivenolje ble kjørt med høyere temperatur (90°C), da fikk den en initieringsperiode på 25 timer.

Det oppsto hele tiden problemer med lekkasje ved gjennomføring av dette forsøksoppsettet, derfor ble metoden kun benyttet under modellforsøket.

### 4.3.3 Fettsyresammensetning

Tabell 4.1 viser fettsyresammensetningen til olivenolje, tran og selolje. Olivenolje inneholdt lite flerumettet fett og mye enumettet fett, spesielt inneholdt den mye (73 %) av fettsyren 18:1n-9 (oljesyre).

Fettsyresammensetningen til tran og selolje var relativt lik. Innholdet av de viktige langkjedede omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA (tabell 4.1) i tran var samlet 21,0 % mens seloljen inneholdt 18,8 %. Det kan imidlertid bemerkes at selolje inneholdt mer DPA.

**Tabell 4.1:** Fettsyresammensetning for olivenolje, tran og selolje angitt i areal %. Kun fettsyrer med < 1 % er tatt med. Oljene ble metylert ved metode av Stoffel, Chu og Ahrens (1959) og FFA-analyse gjort med gasskromatografi (GC-FID)

Fettsyrer	Olivenolje areal %	Tran areal%	Selolje areal%
14:0	0,0	3,9	5,2
14:1	0,0	0,0	1,0
16:0	11,9	11,8	9,2
16:1	1,1	7,2	17,7
18:0	2,9	2,5	1,4
Ukjent	0,0	2,6	4,2
Ukjent	0,0	0,0	1,4
18:1n-9	73,2	20,4	17,7
18:1n-7	2,0	4,3	4,5
18:2	6,3	2,1	2,0
18:3	0,0	1,2	0,0
Ukjent	0,0	4,6	1,5
20:1	0,0	11,0	9,3
22:1	0,0	7,3	2,1
20:5 EPA	0,0	8,3	6,7
22:5 DPA	0,0	1,1	4,0
22:6 DHA	0,0	11,6	8,1
Σ EPA, DPA, DHA	0,0	21,0	18,8

Som forventet hadde de tre oljene ulikt oksidasjonsforløp. Vektøkingsforsøket (figur 4.1) viste at vekten til tran var mye mer stabil enn seloljen. Dette skyldes sannsynligvis at tran var tilsatt antioksidant i form av dl- $\alpha$ -tokoferylacetat (2mg/ml). I tillegg kan plassering av fettsyrer i triglyserider være av betydning. De flerumettede fettsyrene i fiskeolje (tran) er i hovedsak plassert i 2. posisjon, mens selolje har nesten alle (98 % av EPA og DHA) i 1 og 3 posisjon (Vognild *et al.*, 1998). Dette kan ha en betydning om hvor lett de er eksponert for oksidasjon. Helt fersk raffinert selolje kontra tran kjøpt i butikk kunne selvsagt også bidratt til det ulike oksidasjonsforløpet. Tran kjøpt i butikk kan ha en holdbarhet fra 1-2 år, og nøyaktig hvor gammel vår var er vanskelig å vite. Tran kan da forventes å oksidere fortere enn den ville gjort i helt fersk tilstand og forskjellene ville da ha blitt større i tranens favør.

Fettsyresammensetningen (tabell 4.1) til selolje og tran viste seg å være relativt lik. Tran hadde en total mengde av de flerumettede fettsyrene EPA, DPA og DHA på 21,0 % bare 2,2 % mer enn selolje. Olivenolje derimot inneholdt ingen av disse fettsyrene. Dette forklarer selvsagt i hovedsak hvorfor den holdt seg stabil gjennom hele forsøket. Andelen flerumettede langkjedede fettsyrer har innvirkning på oljens stabilitet. Disse fettsyrene har opptil 5 og 6 dobbeltbindinger, og som nevnt tidligere gir det høye antallet dobbeltbindinger flere angrepspunkter under oksidasjonen. Dermed blir det en kortere induksjonsperiode og kjedereaksjonen vil starte raskere.

De samme grunnene som nevnt over kan være med å forklare resultatet av Oksypress forsøket. Selolje som inneholder mye PUFA og ingen antioksidanter oksiderte etter bare 25 timer. Tran som hadde samme andel PUFA som selolje innholdt antioksidanter som hemmet oksidasjon med 65 timer. Den lave andelen PUFA gjorde at olivenolje ved en temperatur på 50°C ikke viste tegn til oksidasjon etter 140 timer i Oksypresen.

Det ble som nevnt målt både AV og PV av de tre oljene, men da resultatene skulle behandles ble det oppdaget at vi hadde bruk feil løsning og resultatene var ubrukelige. Men metoden var likevel lært. Etter hvert lærte vi at AV og PV metodene var mye mer sensitive metoder for oksidasjon enn vektøkingsforsøket, og valgte derfor å kun benytte disse i de videre undersøkelsene.

#### 4.4 Ekstrakt i olje-i-vannemulsjon

Da det var særdeles vanskelig å ekstrahere olje til analyser av emulsjonene valgte vi å anvende noe av den oljen som var mulig å ekstrahere ut til fettsyresammensetning. Dette for å studere effekten av selve emulsjonsprosessen på fettsyrer. Antioksidativ virkning av ekstraktene ble besluttet målt som relativ forskjell i PV etter lagring.

##### 4.4.1 Fettsyresammensetning

Tabell 4.2 viser fettsyresammensetning i areal % fra olje-i-vannemulsjon av selolje tilsatt blåbærekstrakt. Emulsjonen hadde vært lagret i mørke flasker i kjøleskap med en temperatur på 4°C i 1 uke. Den samlede andelen av de langkjedede flerumettede fettsyrene EPA, DPA og DHA var på 19,0 %.

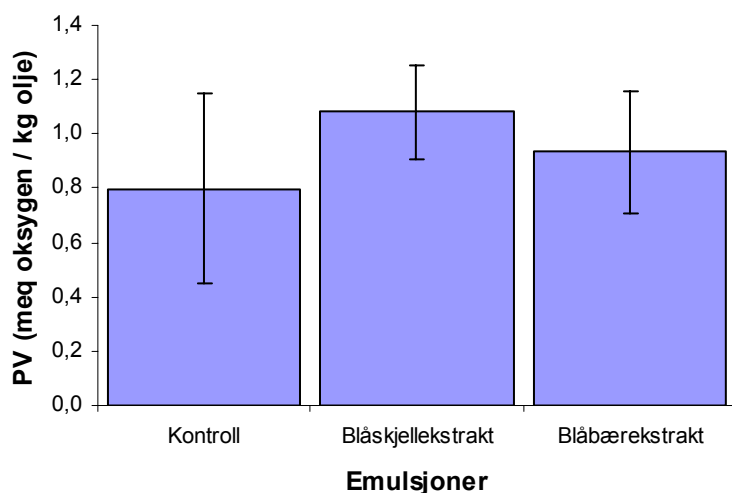
**Tabell 4.2:** Fettsyresammensetningen i areal%  $\pm$  st. avvik for olje-i-vannemulsjon av selolje tilsatt blåbærekstrakt lagret i kjøleskap ved 4°C i 1 uke. Olje ekstrahert med Bligh & Dyers metode (1959) og metylert ved metode av Stoffel, Chu og Ahrens (1959) og FFA-analyse gjort med gasskromatografi (GC-FID)

Fettsyrer	Selolje i emulsjon areal % $\pm$ st. avvik
14:0	5,6 $\pm$ 0,2
14:1	1,0 $\pm$ 0,0
16:0	9,4 $\pm$ 0,3
16:1	17,5 $\pm$ 0,1
18:0	1,3 $\pm$ 0,0
Ukjent	4,0 $\pm$ 2,5
Ukjent	1,8 $\pm$ 3,2
18:1n-9	17,3 $\pm$ 0,2
18:1n-7	4,5 $\pm$ 0,0
18:2	3,1 $\pm$ 0,1
Ukjent	3,9 $\pm$ 0,0
20:1	9,5 $\pm$ 0,2
22:1	2,2 $\pm$ 0,1
20:5 EPA	6,6 $\pm$ 0,1
22:5 DPA	4,2 $\pm$ 0,2
22:6 DHA	8,2 $\pm$ 0,3
$\Sigma$ EPA, DPA, DHA	19,0

For å få seloljen, vannfasen og emulgatorene godt homogenisert måtte de varmebehandles ved 70°C i 5 minutter. Vi ville se om prosesseringen av emulsjonen hadde noen påvirkning på seloljens fettsyresammensetningen med særlig vekt på de langkjedede flerumettede fettsyrene EPA, DPA og DHA. Sammenligner vi seloljens areal % i tabell 4.2 med tabell 4.1 ser vi at det ikke er vesentlig forandring i fettsyresammensetning.

#### 4.4.2 PV målt med ferrothiocyanatmetoden

Figur 4.2 viser kontrollprøven (seloljeemulsjon) og seloljeemulsjon tilsatt blåbær- og blåskjellekstrakt. Sistnevnte synes å ha en høyest PV etter lagring i 2 måneder ved 4°C. Seloljen tilsatt ekstrakt fra blåbær har også en noe høyere PV enn kontrollen, men standardavviket er såpass stort at dette ikke kan tillegges noen betydning.



*Figur 4.2: PV angitt i meq oksygen/kg olje fra vann-i- oljeemulsjon av selolje tilsatt blåbær- og blåskjellekstrakt lagret i kjøleskap ved 4 °C i 2 måneder. Olje ekstrahert ved Bligh & Dyers (1959) og PV etter Udea et al., (1986).*

Emulsjonene var tilsatt industrielle emulgatorer for å stabilisere emulsjonene. Derfor benyttet vi en annen metode da vi skulle måle PV på seloljeemulsjonene siden det var svært vanskelig å få ekstrahert ut nok olje til å kjøre en vanlig standard PV metode.

Ferrothiocyanatmetoden krever mye mindre olje og måles med spektrofotometer. Vi fikk kun ekstrahert ut nok olje til PV analyse og fikk derfor ikke målt AV på emulsjonene.

Oksidasjon ble derfor sammenlignet ved å måle relativ utvikling av PV etter 2 måneder ved 4°C. Figur 4.2 viser i hovedsak at oksidasjon i emulsjoner var svært lav ved disse betingelsene. Men de små forskjellene kan indikere at blåskjellekstraktet hadde en viss prooksidativ effekt i denne olje-i-vannemulsjonen. PV av emulsjon tilsatt blåbærekstrakt ligger innenfor standardavviket til kontrollprøven. Den viser ikke tegn til antioksidativ virkning men viser heller en svak tendens til å ha en prooksidativ effekt i emulsjoner.

Ferrothiocyanatmetoden og titeringsmetoden er to helt ulike metoder og kan derfor ikke direkte sammenlignes. PV måles også i to ulike systemer, rein olje og emulsjonssystem. Men metodene kan heller sammenlignes relativt til hverandre (Mäkinen, 1995).

For å nettopp øke inntaket av marine fettsyrer har det blitt gjort flere forsøk på å inkorporere fiskeoljer i forskjellige matprodukter som for eksempel brød og majones. Det har vist seg at det å finne en god beskyttelse av flerumettede marine oljer i emulgerte matsystemer er vanskelig å oppnå i praksis. Antioksidanter som er effektive i bulkoljer er vanligvis også effektive i emulsjoner. Imidlertid kan effekten til en antioksidant i en emulsjon være vesentlig forskjellig fra den samme antioksidanten tilsatt i en bulkolje. Hovedsakelig blir ikke-polare antioksidanter ( $\alpha$ -tokoferol, askorbyl palmitat) funnet å være mer effektive i en olje-i-vannemulsjon enn i bulkoljer, mens det motsatte er observert fra polare antioksidanter (trolox og askorbinsyre) (Coupland & McClements, 1996).

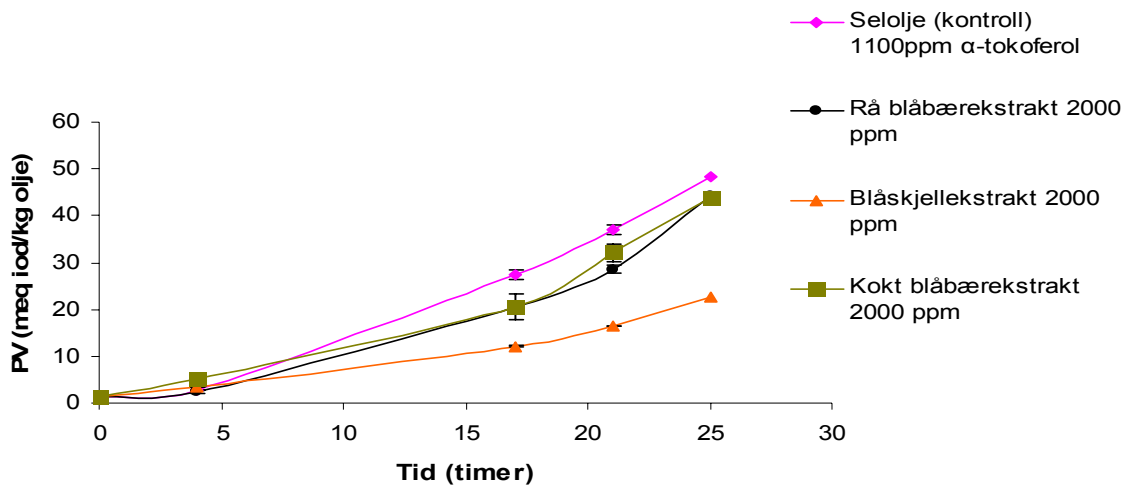
Sekundære oksidasjonsproduktene med ubehagelig smak og lukt har tendens til å havne i vannfasen av emulsjonen. Her vil de får lavere smaksterskelnivå enn de ville fått i bulkoljer.

Antioksidanters virkeevne i blandede (heterofase) lipidsystemer i mat avhenger av flere komplekse fysisk-kjemiske faktorer som fordeling av egenskapene til antioksidanten i de ulike fasene. Den fysiske strukturen til emulsjonen har også noe å si for antioksidantens effekt (Jacobsen *et al.* 2001).

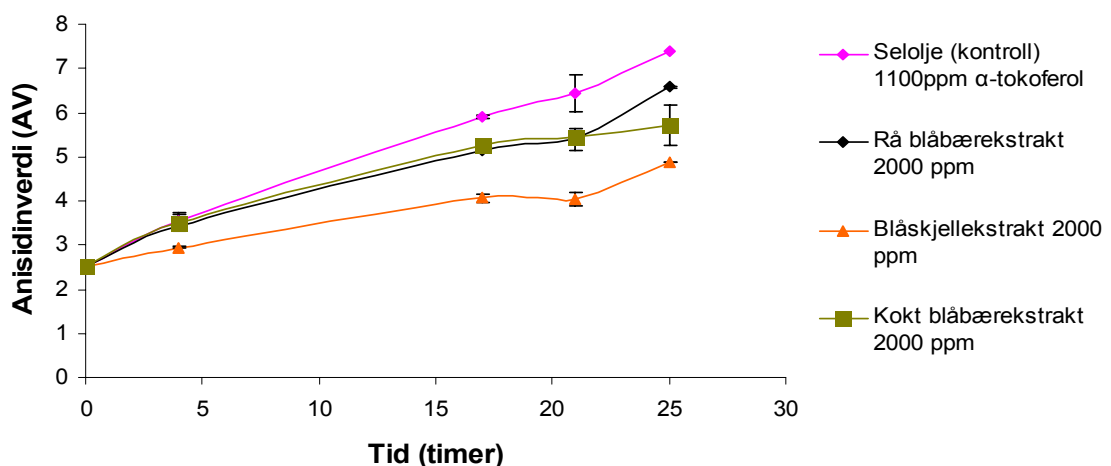
## 4.5 Ekstrakter i oljesystem

### 4.5.1 PV og AV

I beskrivelsen av prosedyren for PV analysen (AOCS Cd 8-53, 1993) skulle det veies ut 5 gram fett. Vi veide alltid 1 gram fett i dette forsøket på grunn av at vi hadde lite olje å analysere. Vi verifiserte at utslag for PV ble litt høyere enn det normalt ville vært med 5 gram.



**Figur 4.3:** PV i meq/kg olje (AOCS Cd 8-53, 1993) av selolje tilsatt rå blåbærekstrakt 2000 ppm, kopt blåbærekstrakt (kopt i 15 minutter) 2000 ppm og blåskjellekstrakt 2000 ppm.. Prøvene var inkubert med tilgang til oksygen ved 45°C, med uttak etter 4, 17, 21 og 25 timer.



**Figur 4.4:** AV (AOCS Cd 18-90, 1993) av selolje tilsatt rå blåbærekstrakt 2000 ppm, kopt blåbærekstrakt (kopt i 15 minutter) 2000 ppm og blåskjellekstrakt 2000 ppm. Prøvene var inkubert med tilgang til oksygen ved 45°C, med uttak etter 4, 17, 21 og 25 timer.

PV-analysen (figur 4.3) viser at kontrollen (seloljen) som fra Fortuna oils var tilsatt 1100 ppm  $\alpha$ -tokoferol hadde høyere PV enn selolje tilsatt ekstrakter (2000 ppm) av blåbær og blåskjell. Rå blåbærekstrakt og kokt blåbærekstrakt viste liten forskjell seg imellom. Ekstrakt fra blåskjell hadde gjennom hele forsøket lavest PV, og på siste uttak var PV fra blåskjellekstrakt bare halvparten så høy som kontrollprøven.

AV (figur 4.4) viser de samme tendensene som PV. Kontrollprøven har høyest AV, mens blåskjellekstrakt har lavest. Det ble observert en liten økning hos rå blåbærekstrakt ved siste måling (25 timer).

Den antioksidative effekten til rå og kokt blåbærekstrakt er ikke veldig sterk, men tatt i betraktning at seloljen allerede er tilsatt antioksidant viser forsøket at ekstrakt av blåbær hemmet oksidasjonen ytterligere.

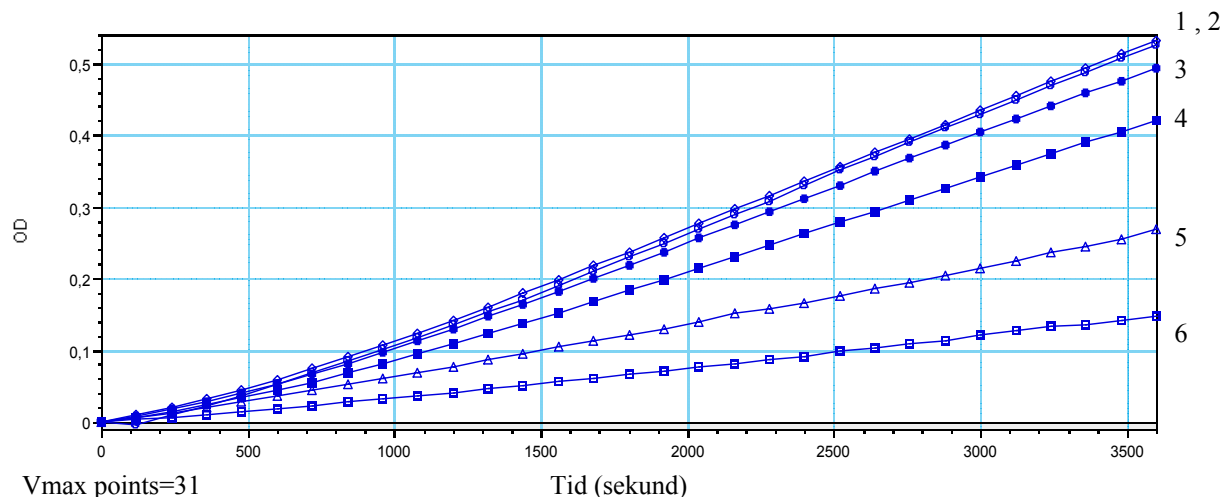
Blåskjellekstrakt har en helt tydelig hemmende effekt på oksidasjon, og virker veldig godt som antioksidant i dette forsøket.



## 4.6 Ekstrakt i et vandig system

For å undersøke blåbær- og blåskjellekstrakts evne til å forhindre oksidasjon av DHR ble det målt relativ absorbans ved 492 nm i et vandig system.

### 4.6.1 Kott blåbærekstrakt



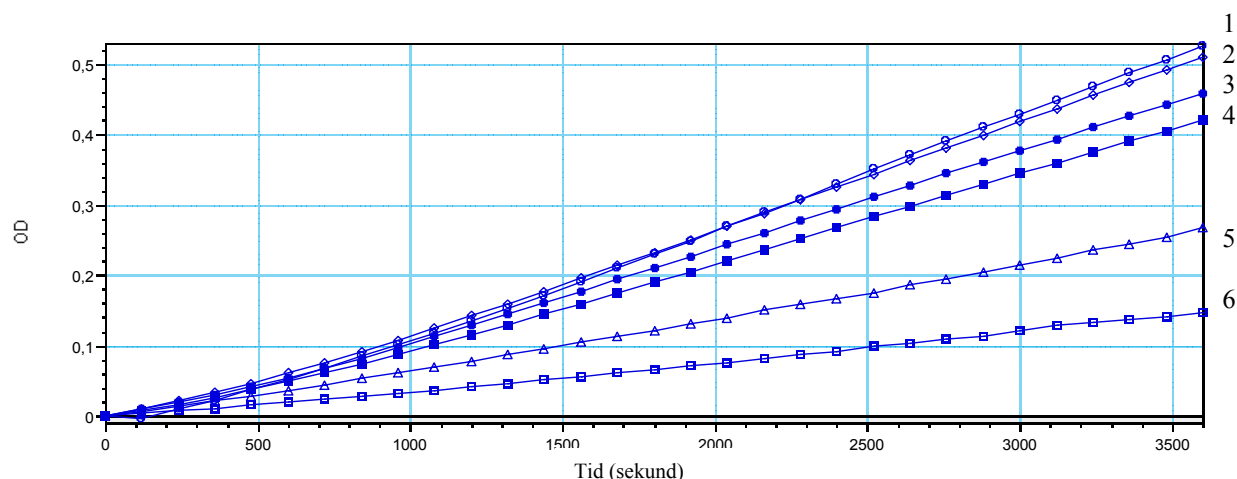
Vmax points=31

Tid (sekund)

Brønn	1	2	3	4	5	6
	Nullprøve	Blåbærekstrakt 50 µg/ml	Blåbærekstrakt 100 µg/ml	Blåbærekstrakt 500µg/ml	Trolox 10 µg/ml	Trolox 25 µg/ml
Vmax	9,458	9,210	8,582	7,297	4,455	2,507
R <sup>2</sup>	0,998	0,998	0,996	0,998	0,998	0,997

**Figur 4.5:** Måling av antioksidativ effekt av metanolekstrakt av kott blåbær i et vandig system (antioxidant screening (Dunlap et al., 2003)). Blåbærekstraktets inhiberende virkning på oksidasjon av DHR målt som absorbans med bølgelengde 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter. Vmax er uttrykk for oksidasjonshastighet.

#### 4.6.2 Rå blåbærekstrakt

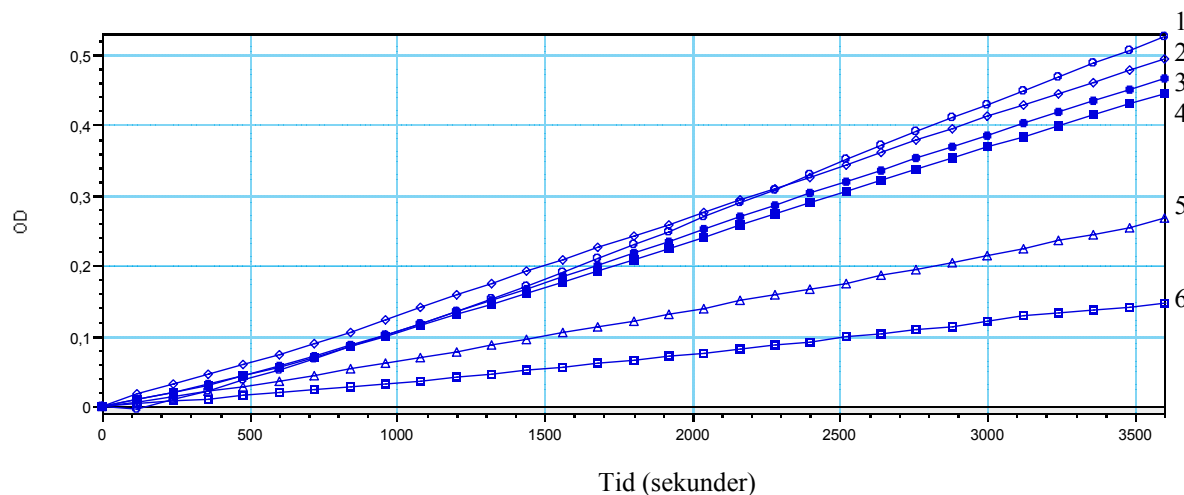


Vmax points=31

Brønn	1	2	3	4	5	6
	Nullprøve	Blåbærekstrakt 50 µg/ml	Blåbærekstrakt 100 µg/ml	Blåbærekstrakt 500µg/ml	Trolox 10 µg/ml	Trolox 25 µg/ml
Vmax	9,458	8,799	7,928	7,263	4,455	2,507
R <sup>2</sup>	0,998	0,997	0,998	0,997	0,998	0,997

**Figur 4.6:** Måling av antioksidativ effekt av metanolekstrakt av blåbær i et vandig system (antioxidant screening (Dunlap et al., 2003)). Blåbærekstraktets inhiberende virkning på oksidasjon av DHR målt som absorbans med bølglengde 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter. Vmax er uttrykk for oksidasjonshastighet.

#### 4.6.3 Blåskjellekstrakt



Vmax points=31

Brønn	1	2	3	4	5	6
	Nullprøve	Blåskjellekstrakt 50 µg/ml	Blåskjellekstrakt 100 µg/ml	Blåskjellekstrakt 500µg/ml	Trolox 10 µg/ml	Trolox 25 µg/ml
Vmax	9,458	8,340	8,060	7,666	4,455	2,507
R <sup>2</sup>	0,998	0,997	0,998	0,997	0,998	0,997

**Figur 4.7:** Måling av antioksidativ effekt av metanolekstrakt av blåskjell i et vandig system (antioxidant screening (Dunlap et al. 2003)). Blåskjellekstraktets inhiberende virkning på oksidasjon av DHR målt som absorbans med bølglengde 492 nm hvert andre minutt i 60 minutter. Vmax er uttrykk for oksidasjonshastighet.

Figur 4.5, 4.6 og 4.7 viser hvordan antioksidativ effekt ekstrakt fra rå blåbær, kokt blåbær og blåskjell har i et vandig oksidasjonssystem. OD fra ekstrakt fra kokt blåbær (figur 4.5) viser at de laveste fortynningene på 50 og 100  $\mu\text{g/ml}$  gir liten antioksidativ effekt og ligger svært tett under kontrollprøven. En konsentrasjon på 500  $\mu\text{g/ml}$  gir lavest  $V_{\text{max}}$  og derfor en antydning til antioksidativ effekt i forhold til de to andre konsentrasjonene.

Rå blåbærekstrakt (figur 4.6) hadde ved de to laveste fortynningene en svakt bedre antioksidativ effekt enn kokt blåbærekstrakt. Men de hadde samme  $V_{\text{max}}$  verdi ved 500  $\mu\text{g/ml}$ . Blåskjellekstrakt (figur 4.7) og rå blåbærekstrakt (figur 4.6) hadde rimelig like  $V_{\text{max}}$  verdier på alle konsentrasjonene. Ingen av ekstraktene viste noen god inhiberende effekt på oksidasjon av DHR i dette systemet. Men konsentrasjon av fortynningene kan ha noe å si for effekten. Den sterkeste fortynningen (500  $\mu\text{g/ml}$ ) var den eneste som viste å ha betydelig virkning til å hemme oksidasjon, alle ekstraktene hadde tilnærmet lik  $V_{\text{max}}$  verdi ved denne fortynningen. Trolox, en vannløselig tokoferol variant ble her benyttet som positiv kontroll, og fra figuren kan man tydelig se at den i dette systemet har sterke antioksidative egenskaper i forhold til våre ekstrakter

## 4.7 Samlet vurdering av ekstraktene

Den antioksidative effekten til ekstrakt fra blåskjell, rå-og koktblåbær ble vurdert etter hvor godt de hemmet oksidasjon i en marin olje i et oljesystem og et olje-i-vannemulsjonssystem. I tillegg ble ekstraktens evne til å redusere oksidasjon i et rent vandigsystem undersøkt.

### Blåskjellekstrakt

I oljesystemet hadde ekstrakt fra blåskjell en tydelig inhiberende virkning på oksidasjonen av seloljen. Det er vist at kjemiske komponenter i blåskjell varierer i forholdt til tilgang på mat, reproduksjonsstatus og grad av forurensning. Dette er forhold som kan varierer mye med årstid. Spesifikke biomolekyler, partikulære proteiner og variasjon i isoenzymprofil har vist seg å være sesongbasert. Blåskjell inneholder antioksidanter som glutathion, catalase, superoxid dismutase og glutathion peroksidase. Dette er enzymer med antioksidativ effekt, og innholdet av disse varierer med årstiden. Nivåene av disse antioksidantene viser seg å være lavest i vinterperioden (Power, 1996). Ekstrakter som ble brukt i disse forsøkene var ekstrahert fra blåskjell som var høstet i juni i Kvæfjord. Dette er etter noen relative varme sommermåneder og det kan derfor være sannsynlig at disse ekstraktene fra disse skjellene hadde høyere antioksidativ effekt enn hvis skjellene hadde vært høstet etter en kaldere vekstsesong.

En undersøkelse av antioksidativ effekt av ekstrakter i blåskjell (*Mytilus galloprovincialis*) (Moncheva *et al.*, 2004) viste at de inneholdt relativt store mengder polyfenoler. De var ekstrahert ut ved å benytte metanol og vann og surgjort med HCl. Disse polyfenolene ga antioksidativ effekt som var sammenlignbar med BHA og trolox. Ekstrakter av blåskjell dyrket på forurenset område ga best effekt. Dette kan tyde på at blåskjell muligens har forsvarsmekanismer som beskytter mot oksidasjon forårsaket av forurensninger og at den derfor kan inneholder mange antioksidative komponenter. Våre resultater fra ekstrakter i vandig system viste imidlertid at blåskjellekstrakt ikke hadde noen god antioksidativ effekt på oksidasjon av DHR. Her var Trolox mye bedre. Under ekstraksjonen av *Mytilus galloprovincialis* ble det brukt løsningsmiddel tilsatt HCl, og dette kan ha frigitt komponenter som vi ikke greide å ekstrahere ved våre betingelser og som kan ha betydning for den gode antioksidative effekten i deres resultat. Det hadde vært interessant og testet innhold av polyfenoler i våre blåskjellekstrakter og eventuelt optimalisert ekstraksjonsprosedyren for å få utnyttet dette. Det kan sannsynligvis gjøres med surgjøring under ekstraksjonen.

### Blåbærekstrakt

Blåbærekstrakt gir antioksidative effekter i oljesystem. I vandig system viste den mindre effekt på oksidasjon. Antall ekstraherbare polyfenoler ble målt til å være  $7,2\text{g} \pm 0,3/100\text{ g}$  tørrstoff. Disse ser man virkningen av i et oljesystem, mens de ikke har samme virkning i vann eller emulsjonssystem.

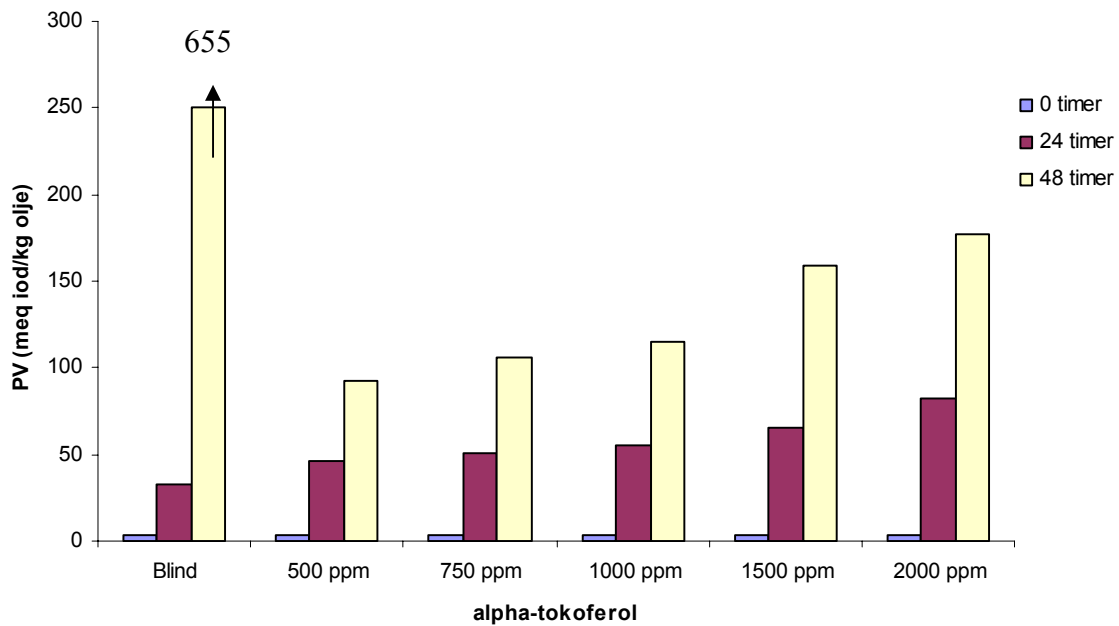
Blåbær inneholder mye flavonoider. En undersøkelse av stabilitet av marine oljer med flavonoider (Wanasundara & Shahidi, 1998) viste at flavonoidene hadde sterkere antioksidativ aktivitet enn BHA, BHT og  $\alpha$ -tokoferol. Disse flavonoidene var ikke ekstrahert på samme måte som våre ekstrakter men kjøpt fra Sigma Chemical Company og var nok mer konsentrert. Vi testet ikke våre ekstrakter mot BHA og BHT, men det var interessant at våre ekstrakter greide å forsinke oksidasjon ytterligere i en selolje som allerede var tilsatt  $\alpha$ -tokoferol. Det kan derfor tyde på at ekstrakt fra blåbær gir en viss tilleggseffekt under oksidasjonen. Blåbærekstrakt og  $\alpha$ -tokoferol kan også ha en synergieffekt som gjør at de sammen greier å reduserer hastigheten på oksidasjonen mer effektivt. Studier gjort av Barstad *et. al* (2006) viste synergieffekt mellom tokoferol og askorbinsyre. Brukt sammen hadde de større hemmende effekt på oksidasjon av fettsyrer enn de hadde hver for seg. Andre studier viste at det fantes en synergieffekt mellom  $\alpha$ -tokoferol og sinapinsyre hvor disse to antioksidantene sammen hemmet oksidasjon i oljer mer effektivt enn de gjorde separert (Thiyam *et al.*, 2006).

Siden vi anvendte metanol ved ekstraksjon av henholdsvis blåbær og blåskjell antar vi at ekstraktene i hovedsak inneholder polare forbindelser og at eventuelle antioksidanter i ekstraktene er relativt polare. Vi observerte imidlertid også at enkelte komponenter i ekstraktene hadde god løselighet i lipidfasen da oljedråpene ble farget. Resultatene viste best beskyttelse i oljesystemer noe som tyder på at disse lipidløselige komponentene fungerer best som antioksidant.

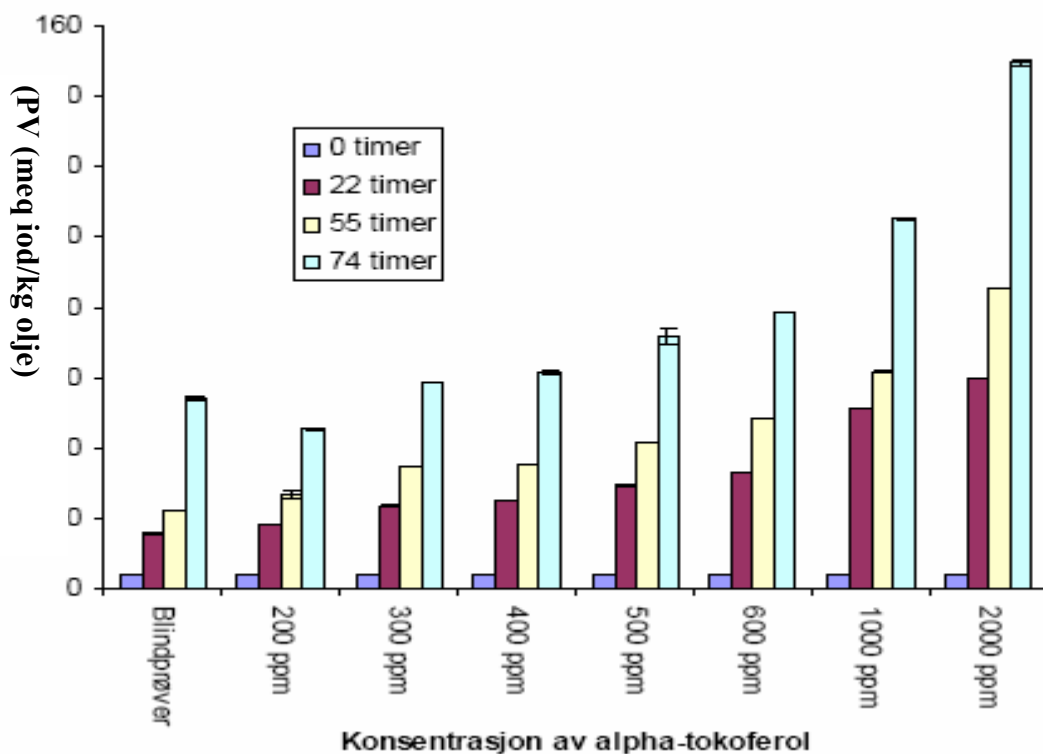
Blåbær inneholder som nevnt også anthocyaniner som er en av de viktigste flavonoidene i blåbæra. Før alle forsøkene var ferdig var blåbærekstraktet blitt frysetørket, frossen i  $-20^{\circ}\text{C}$ , tint og frosset igjen. Underveis var vi bekymret for at denne behandlingen kunne ha ødelagt noen av de gode antioksidative komponentene og at dette ville ha betydning for resultatene. Studier derimot viser at antioksidant aktiviteten til anthocyanin ekstrahert fra blåbær ikke hadde signifikant forskjell mellom frossen, tørket eller fersk tilstand (Lohachoopol *et al.*, 2004).

Det hadde vært interessant å se en forskjell på antioksidativ effekt fra rå blåbærekstrakt og blåbærekstrakt kokt i 15 minutter. Vi greide ikke ut ifra våre resultater å observere noen forskjell mellom dem. Studier har vist at varmebehandling både kan ødelegge enkelte næringsstoffer i mat, men samtidig øke tilgjengeligheten av andre næringsstoffer. Undersøkelser på cherrytomater har vist at biotilgjengeligheten på enkelte antioksidanter øker ved å koke tomatene i 15 minutter (Bugianesi *et al.*, 2004). En annen undersøkelse som også gikk på antioksidative egenskaper av tomater etter prosessering (Sahlin *et al.*, 2004) viste at koking (15 min) utgjorde en relativ liten forskjell på den antioksidative aktiviteten. Men det er mulig at 15 minutter koking er for lite til å frigjøre komponenter som utgjør noen forskjell. van Het Hof (1999) undersøkte tomater ved å koke dem på 100°C i 1 time og greide å frigjøre flere komponenter enn Bugianesi *et al.*

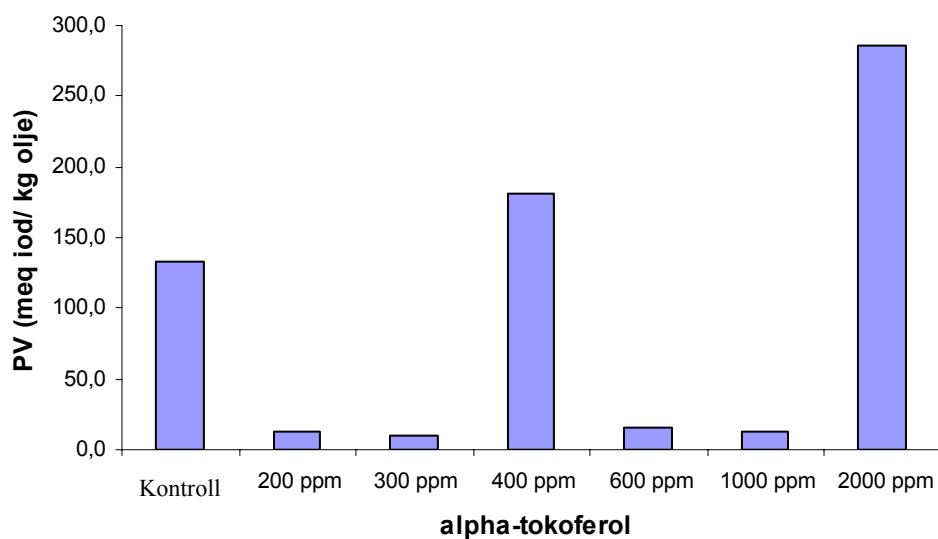
## 4.8 Optimal mengde $\alpha$ -tokoferol i selolje



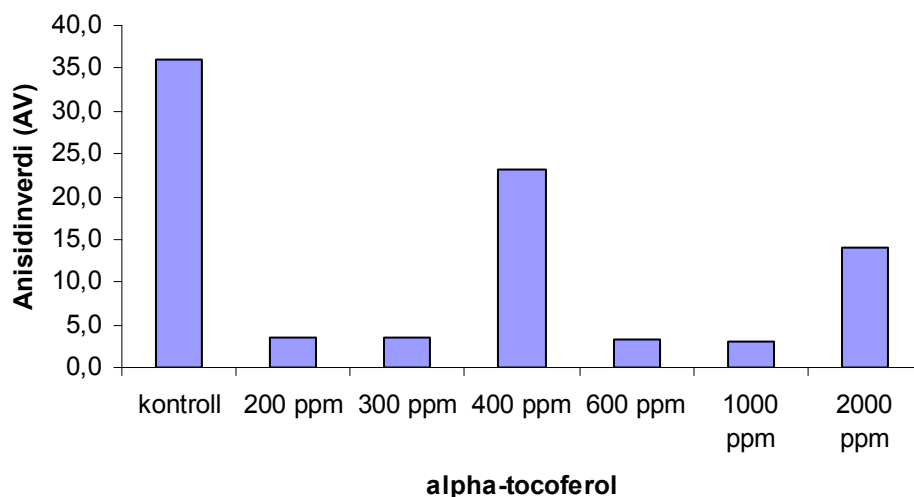
**Figur 4.8:** PV i meq/kg olje (AOCS Cd 8-53, 1993) av selolje tilsatt 500, 750, 1000, 1500 og 2000 ppm  $\alpha$ -tokoferol. Prøvene var inkubert med full tilgang på oksygen ved 60°C med uttak etter 0, 24 og 48 timer.



**Figur 4.9:** PV i meq/kg olje (AOCS Cd 8-53, 1993) av selolje tilsatt 200, 300, 400, 500, 600, 1000 og 2000 ppm  $\alpha$ -tokoferol. Prøvene ble inkubert med full tilgang til oksygen ved 45°C med uttak etter 0, 22, 55 og 74 timer.



**Figur 4.10:** PV i meq/kg olje (AOCS Cd 8-53, 1993) av selolje tilsatt 200, 300, 400, 600, 1000 og 2000ppm  $\alpha$ -tokoferol. Prøvene inkubert i kjøleskap ved 4°C uten tilgang på oksygen med uttak etter 4 måneder.



**Figur 4.11:** AV (AOCS Cd 18-90, 1993) av selolje tilsatt 200, 300, 400, 600, 1000 og 2000ppm  $\alpha$ -tokoferol. Prøvene inkubert i kjøleskap ved 4°C uten tilgang på oksygen med uttak etter 4 måneder.

Figur 4.8, 4.9, 4.10 og 4.11 viser forsøk på å finne optimal mengde  $\alpha$ -tokoferol i selolje. Det ble utført tre ulike lagringsforsøk. Det første forsøket (figur 4.8) som ble kjørt på 60°C viser at en  $\alpha$ -tokoferol konsentrasjon på 500 ppm hadde lavest PV etter siste analyseuttak (48 timer). Dette var et innledende forsøk og det ble derfor ikke foretatt AV-analyse.



I lagringsforsøket hvor  $\alpha$ -tokoferolprøvene var lagret ved 45°C i 74 timer (figur 4.9) fikk alle  $\alpha$ -tokoferol konsentrasjonene høyere PV enn blindprøven ved uttak etter 22 og 55 timer. Det siste uttaket (74 timer) visste at 200ppm  $\alpha$ -tokoferol hadde lavere PV enn blindprøven.

Det siste lagringsforsøket (figur 4.10) gikk over 4 måneder hvor prøvene hadde stått i kjøleskap uten tilgang på oksygen i mørke glassflasker. Blindprøven som ble kjørt før prøvene ble plassert til lagring i kjøleskapet hadde en start PV på 2,5. Etter 4 måneder hadde blindprøven en PV på ca.135.  $\alpha$ -Tokoferol konsentrasjoner på 200, 300, 600 og 1000 ppm hadde absolutt lavest PV. Det har mest sannsynlig oppstått en feil under forberedningen til 400 ppm konsentrasjonen. Enten en beregningsfeil av hvor mye  $\alpha$ -tokoferol som ble tilsatt seloljen eller at det eventuelt har vært lekkasje i glassflasken under lagringen. Lingnende uventede resultater er imidlertid rapportert tidligere (Lauritzsen & Olsen, 2004). Antioksidanter, her askorbinsyre, i fiskemuskel ga en uventet god beskyttelse i et lavt konsentrasjonsområde, deretter økte oksidasjonen før den endelig ga best beskyttelse ved høyere konsentrasjoner.

Figur 4.8 viser at etter 48 timer med en temperatur på 60°C er det  $\alpha$ -tokoferol med konsentrasjon på 500 ppm som har størst inhiberende effekt på seloljen. Siden alle prøvene med  $\alpha$ -tokoferol hadde prooksidantisk virkning etter 24 timer kan dette bety at  $\alpha$ -tokoferol trenger en tid før den virker antioksidativt. Dette er sannsynligvis fordi  $\alpha$ -tokoferol hemmer propageringsfasen av autooksidasjon ved å donere et fenolhydrogen atom til lipid peroksyradikaler (Barstad *et al.*, 2006).

Samme tendensen ser man i figur 4.9. Her står oljen i en temperatur på 45°C. Etter 22 og 55 timer har  $\alpha$ -tokoferol også her en prooksidantisk virkning. Mens det bare er 200 ppm som viser antioksidative egenskaper etter 74 timer. Her er temperaturen lavere enn ved forsøk 1 (figur 4.8) mens prøvene bare sto inkubert knappe 30 timer lengre. Hadde vi ventet et døgn eller to til hadde kanskje noen de andre  $\alpha$ -tokoferol konsentrasjonene også vist inhiberende effekt på seloljen. Ut i fra dette resultatet kan det virke som at jo lavere konsentrasjon  $\alpha$ -tokoferol desto raskere får den antioksidativ virkning.

Figur 4.8 og 4.9 viser hvordan  $\alpha$ -tokoferol virker hemmende på oksidasjons i et provosert lagringsforsøk med temperaturer på 60 og 45°C.

Figur 4.10 viser et lagringsforsøk hvor selolje tilsatt ulike konsentrasjoner  $\alpha$ -tokoferol ble lagret i kjøleskap ved 4°C i 4 måneder. Her ser man at konsentrasjoner på 200, 300, 600 og 1000 ppm  $\alpha$ -tokoferol hadde sterk inhiberende effekt på oljen. Det ikke er sannsynlig at en

konsentrasjon på 400 ppm  $\alpha$ -tokoferol skulle ha prooksidativ effekt. At 2000 ppm gir prooksidativ effekt er mer naturlig siden det er bevist at  $\alpha$ -tokoferol kan virke prooksidativt ved høy konsentrasjon (Aune, 2007).

## 5 Konklusjon

I denne oppgaven ble det sett på hvordan antioksidative egenskaper ekstrakter fra blåskjell, rå og kokt blåbær hadde på oksidasjon av selolje, seloljeemulsjoner og DHR i et vandig system. Det ble også gjort et forsøk på å finne optimal mengde  $\alpha$ -tokoferol i selolje.

Vi fant at ekstrakter fra blåbær hadde gode antioksidative egenskaper i et oljesystem. Seloljen som vi blandet ekstraktene i var allerede tilsatt  $\alpha$ -tokoferol og det viste seg at både rå og kokt blåbær hemmet oksidasjon av seloljen ytterligere. I dette systemet viste likevel blåskjell å ha den aller beste antioksidative effekten da den ved siste uttaksdag bare hadde halvparten så høy PV og AV som seloljen (kontroll).

I emulsjonene hadde verken blåbær eller blåskjell antioksidativ effekt. I dette systemet viste blåskjell en svak tendens til å virke prooksidativ.

Ingen av ekstraktene så ut til å virke hemmende på oksidasjon av DHR i et vandig system.

I resultatene var det ingenting som antydte at det fantes noen antioksidativ forskjell mellom rå og kokt blåbær.

Naturlige antioksidanter ansees for å være et tryggere alternativ enn syntetiske. Men for høye konsentrasjoner av naturlige antioksidanter kan også være helsemessig ugunstig da disse også i for store mengder virker prooksidativt. Derfor er det ønskelig og ha en variasjonsmulighet slik at man unngår overeksponering av enkelte antioksidanter.

Ut ifra resultatene kan det se ut til at ekstrakter for blåbær og blåskjell kan være alternative naturlige antioksidanter. Tilsynelatende ser de ut til å kunne fungere som antioksidanter i fettrike næringsmidler da det virker som at de er mest effektive i lipidfasen.

I forsøket på å finne optimal konsentrasjon av  $\alpha$ -tokoferol fant vi at i det siste forsøket hvor seloljen hadde stått lagret i 4 måneder ved 4°C at konsentrasjoner på 200, 300, 600 og 1000 ppm ga god inhiberende virkning på oksidasjon av seloljen.

## 5.1 Anbefalinger til videre arbeid

Ved et eventuelt videre arbeid hadde det vært interessant og funnet metoder som mer effektivt kunne ekstrahert ut alt av viktige antioksidanter. En idé hadde vært å prøve å surgjøre løsemidlene under ekstraksjon siden det i noen studier har vist seg å kunne effektivisere ekstraksjonen av polyfenoler. Det kunne også vært interessant å prøve å koke blåbæra lengre enn 15 minutter. Det kan være at enkelte komponenter trenger lengre koketid for å frigjøres. Det hadde også vært spennende å måle innhold av polyfenoler i våre blåskjellekstrakter, gjerne i ulike sesonger og utsatt for ulik grad av forurensning.

Dersom det hadde vært mer tid tilgjengelig burde forsøket med optimal konsentrasjon  $\alpha$ - tokoferol, vært gjentatt for å avklare om den dårlige beskyttelsen ved en konsentrasjon på 400 ppm skyldes feil eller var reel. I tillegg vill det vært interessant med en videre avklaring av oksidasjon spesielt i området mellom 1000 og 2000 ppm. Dette nye forsøket måtte da settes opp med tettere intervaller rundt 400 ppm og mellom 1000 – 2000 ppm. I tillegg må man selvfølgelig inkludere flere paralleller.

## Referanser

- AOCS (1993) Peroxide value, American Oil and Chemists` Society official method cd 8-53.
- AOCS (1993) Anisidin value, American Oil and Chemists` Society official method cd 18-90.
- Asamarai, A.M., Addis, P.B., Epley, R.J & Krick, T.P (1996) Wild Rice Hull Antioxidants. *American Chemical Society*. **44**. 126-130.
- Aune, T. (2007) Næringsmiddeltoksikologi-tilsetningsstoffer, miljøgifter og naturlige toksiner. 2 utgave. Høyskoleforlaget AS – Norwegian academic press. Kristiansand.145-158.
- Bang, H.O., Dyerberg, J. & Nilsen, Aa.B. (1971) Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*, **5**. 1143-1145.
- Barstad, H., Alvik, A.C & Løvaas, E. (2006) Antioxidant synergy effect between  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate on the autoxidation of liposomes. Seafood research from fish to dish. Editors, Lutén, J.B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Sæbø, A & Oehlenschläger, J. 87-94.
- Blaszczyk, A. & Skolimowski, J. (2007) Evaluation of the genotoxic and antioxidant effects of two novel feed additives (ethoxyquin complexed with flavonoids) by the comet assay and micronucleus test. *Food Additives and Contaminants*. **24**. 553-560.
- Bligh, E.G & Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **37**. 911-917.
- Bugianesi, R., Salucci, M., Leonardi, C., Ferracane, R., Catasta, G., Azzini, F. & Maiani, G (2004) Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and  $\beta$ -carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition*. **43**. 360-366.
- Conner, W.E. (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. **71**. 171-175.
- Conquer, J.A., Cheryk, L.A., Chan, E., Gentry, P.A. & Holub, B. J. (1999) Effect of supplementation with dietary seal oil on selected cardiovascular risk factors and hemostatic variables in healthy male subjects. *Thrombosis Research*. **96**. 239-250.
- Coupland, J.N. & McClements D.J. (1996) Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology* **7**. 83-91.
- Di Matteo, P., Donsì, G. & Ferrari, G. (2003) The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidised bed. *Journal of Food Engineering*. **59**. 267-275.

- Dunlap, W., Llewellyn, L., Doyle, J. & Yamamoto, Y. (2003) A Microtiter Plate Assay for Screening Antioxidant Activity in Extracts of Marine Organisms. *Marine Biotechnology*, **5**. 294-301.
- Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S. & Vane J. R. (1978) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet*, **2**. 117-119.
- Faria, A, Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. & Mateus, N (2005) Antioxidant properties of prepared blueberry (*vaccinium myrtikkus*) extracts. *Agricultural and Food Chemistry*, **53**. 6896-6902.
- Frankel, E.N (2005) Lipid Oxidation – the oily press. University of California, Davis, California, USA. Second edition. 103-106.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., Wold, A-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L. F., Moskaug, J.Ø., Jacobs, D.R. & Blomhoff, R. (2002) A systematic Screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*. **132**. 461-471.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan M.B. & Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. **342**. 1007-1011.
- Hornstra, G. (1999) Lipids in functional foods in relations to cardiovascular disease. *European Journal of Lipid Science and Technology* . **101**. 456-466.
- Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Thomsen, M.K., Skibsted, L.H., Hømer, G., Adler-Nilsen, J. & Meyer, A.S. (2000) Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise: 4. Effect of tocopherol concentration on oxidative deterioration. *European Food Research and Technology* **212**. 308-318.
- Jensen, I.J. (2007) Innhold av polyfenoler og antioksidativ kapasitet i krebling, blåbær og tang. *Spesialpensum i FSK-3815*, Norges Fiskerihøgskole.
- Jones, P.J.H. (2002) Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on risk reduction of sudden death. *Nutrition Reviews*. **60**. 407-413.
- Khan, A.H., Parrish, C.C. & Shahidi, F. (2006) Effects of mechanical handling, storage on ice and ascorbic acid treatment on lipid oxidation in cultured Newfoundland blue mussel (*Mytilus edulis*). *Food Chemistry*. **99**, 605-614.
- Konczak, I. & Zhang W. (2004) Anthocyanins – More Than Nature`s Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **5**. 239-240.
- Lie, R.K (2005) Oljer I blåskjell (*Mytilus edulis*) – Mulige biprodukter. Masteroppgave i fiskerifag – marine næringsmidler. Institutt for marin bioteknologi. Norges fiskerihøgskole.

- Lauritzsen, K. & Olsen R.L. (2003) Effects of antioxidants on copper induced lipid oxidation during salting of cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Food Lipids*. **11**. 105-122.
- Lohachoompol, V., Srzednicki, G. & Craske, J. (2004) The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **5**. 248-252.
- Mäkinen, M., Haila, K., Lampi, A.-M. and Viinanen, E. (1995). Determination of peroxide value - comparison of iodometric and ferric thiocyanate methods. In: Proceedings of the 18th Nordic Lipid Symposium, Editors, G.G. Haraldsson, S. Gudbjarnason and G.Lambertsen, p. 176. Lipidforum, Bergen
- Malla, S., Hobbs, J.E. & Perger, O. (2007) Valuing the health of a novel functional food. *Canadian journal of agricultural economics*. **55**. 115-136.
- Mattila, P., Hellström, J. & Törrönen R. (2006) Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**. 7193-7199.
- Moncheva, S., Trakhtenberg, S., Katrich, E., Zemser, M., Goshev, I., Toledo, F., Arancibia-Avila, P., Doncheva, V. & Gorinstein, S. (2004) Total antioxidant capacity in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Black Sea coasts. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. **59**. 475-484.
- Nes, M., Müller, H & Pedersen, J. I. (1998) Ernæringslære. Landsforeningen for kosthold og helse, Oslo. 62-64.
- Olsen, R. L. (2007) Lipidkjemi – med vekt på fisk. Kompendium 3.utgave
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J.N., Wang, J-Y. & Yu, L.L. (2006) Chemical Compositions, Antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**. 3773-3778.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M.P., Whittaker, P. & Yu, L. (2005) Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**. 566-573.
- Pettersen, J. (2006) Natural antioxidant assessment: Stabilizing effect on marine lipids. Notat fra Fiskeriforskning i Bergen.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001) Antioxidants in foods – Practical applications. *Woodhead publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge VB1 6AH, England*
- Power, A. & Sheehan, D. (1996) Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Complementary Biochemistry and physiology*. **114C**. No2. 99-103.

- Regoli, F., Winston, G.W., Mastrangelo, V., Principato, G. & Bompadra, S. (1998) Total oxyradical scavenging capacity in mussel (*Mytilus sp.*) As a new index of biological resistance to oxidative stress. *Chemosphere*. **37**. 2773-2783.
- Rehman, Z-u. (2006) Citrus peel extract – A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*. **99**. 450-454.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A. & Millington, K.J. (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. **17**. 449-459.
- Shalin, E., Savage G.P. & Lister C.E. (2004) Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. **17**. 635-647.
- Simopoulos, A.P., Leaf, A. & Salem jr.N. (1999) Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of Nutrition & Metabolism*. **43**. 127-130.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**. 152-178.
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens Jr., E.H. (1959) Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. **31**. (2), 307-308.
- Thiyam, U., Stöckmann, H. & Schwarz, K. (2006) Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interaction with tocopherols during lipid oxidation. *Institute of Human Nutrition and Food Science*. **83**. 523-528.
- Ueda, S., Hayashi, T. & Namiki, M. (1986) Effect of ascorbic Acid on Lipid Autoxidation in a model food system. *Agricultural and Biological Chemistry*. **50**. 1-7.
- van het Hof, K.H., de Boer, B.C.J., Tijburg, L.B.M., Lucius, B.R.H.M., Zijp, I., West, C.E., Hautvast, J.G.A.J. & Weststrate, J.A. (1999) Carotenoid Bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *Human nutrition and Metabolism*. **130**. 1189-1196.
- Vitenskapskommiteen for mattrygghet (2006) Oppsummering av rapporten "Et helhetssyn på fisk og anna sjømat I norsk kosthold"
- Vognhild, E., Elvevoll, E., Brox, J., Olsen, R.L., Barstad, H., Aursand, M. & Østerud B. (1998) Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acids composition platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids*. **33**. 427-435.
- Wanasundars, U.N & Shahidi, F. (1998) Stabilization of marine oils with flavonoids. *Journal of Food Lipids*. **5**. 183-196.



Zheng, W. & Wang S.Y. (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.51, 502-509.

(<http://www.fortunaoils.com>)

## Vedlegg

### Vedlegg 1

Standardkurve til PV ferrothiocyanatmetoden.

