



Uit

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Næringsinnhold av mesopelagisk fisk

*Nedbrytning av laksesild (*Maurolicus muelleri*), med fokus på fett.*

Martin Skipperud Skarpeid

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp) - Mai 2019



Forord

Denne masteroppgaven i fiskeri- og havbruksvitenskap marker slutten på en utfordrende, lærerik og fantastisk studietid ved Universitetet i Tromsø. Jeg ønsker takke alle som har gjort mine år i Tromsø til en uforglemmelig tid.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Ida-Johanne Jensen og Edel Oddny Elvevoll for eksepsjonell og uvurderlig veiledning, støtte og oppfølging gjennom hele prosessen. Tusen takk for deres initiativ og handlekraft som gjorde det mulig for meg å oppfylle mitt ønske om å undersøke et nytt og spennende tema!

Videre vil jeg takke den inkluderende sjømatgruppa og spesielt takk til Guro Kristine Edvinsen, Carina H. Otnæs, Lars Dalheim og mine fantastiske medstudenter på laboratoriet for deres hjelp, råd og artige påfunn i hverdagen.

Til slutt ønsker jeg å rette en stor takk til mine nærmeste. Jeg er svært takknemlig for at jeg har dere, og dere har vært avgjørende støttespillere gjennom studietiden.

Martin Skipperud Skarpeid

Martin Skipperud Skarpeid

Tromsø, Mai 2019

Sammendrag

Det økende behovet for mat til en befolkning i vekst har ført til et utvidet søk etter nye ressurser og mer effektiv utnyttelse av eksisterende ressurser. For å øke det globale utbytte av den totale biomassen som produseres i havene, har det blitt foreslått å utnytte organismer lavere i næringskjeden, for å redusere tap av biomasse i energioverføringen blant organismene i næringskjeden. Mesopelagisk fisk er eksempler på slike underutnyttede arter. En av grunnene til at disse fiskeslagene i liten grad har blitt utnyttet, er at fiskene er små og skjøre, noe som fører til rask nedbrytelse. Det overordnede målet med oppgaven var å dokumentere den biokjemiske sammensetningen av den mesopelagiske fisken laksesild (*Maurolicus muelleri*), samt undersøke nedbryting av næringsstoffene, med særlig hensyn på fett.

Laksesild ble fangstet i Norskehavet i september 2018 og frosset i blokk (-20°C) inntil analysene ble utført (4-5 måneder etter fangst). Omtrent 100 fisk ble kvernet i en samleprøve og lagret i en tildekt lufttett beholder. Nedbrytelsesprosessen foregikk på kjølerom (3°C). Prøvene ble undersøkt ved tining, og 6, 12, 24 og 168 timer etter tining.

Ved tining var totalt prosentinnhold av fett, protein, vann og aske på henholdsvis 15; 10,5; 66 og 3, til sammen 94,5 % av fisken. Laksesild hadde en lav n-6/n-3 ratio (0,05) og av den totale fettsyresammensetningen utgjorde de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA 18 %. Laksesild hadde samtlige protein-bundne aminosyrer, med tilstrekkelig innhold av essensielle aminosyrer over referanseinntaket for både mennesker og fisk. I tillegg hadde samleprøven 143 mg/100 g av den frie aminosyren taurin.

Innholdet av fett, protein, vann og aske var uendret 168 timer etter tining. Det ble observert en reduksjon i flerumettede fettsyrer (PUFA) (25,7 → 22,5 %), inkludert de langkjedete flerumettede omega-3 fettsyrene (LC-n-3-PUFA) (18 → 14,5 %), samt en økning i mettede fettsyrer (SFA) (32 → 33 %) og enumettede fettsyrer (MUFA) (41 → 44 %). Det var et høyt innhold av frie fettsyrer (FFA) i det ferske råstoffet, som tyder på at det har foregått forringelse av fett før analysene ble utført. Graden av oksidasjon ble målt 7 måneder etter fangst, og ved tining ble råstoffet anslått å være i slutten av propageringsfasen, og termineringsfasen var startet.

Summary

The increasing demands for food supply for ever-growing population have led to an extensive search for new resources and more efficient use of existing resources. To increase the global yield of the total biomass produced in the oceans, it's suggested to harvest organisms of the lower part of the marine food chain, to ultimately reduce the loss of biomass in energy transfer among the organisms. Mesopelagic fish are examples of such underutilized fish species. A reason for that these species are underutilized are their small size, and that they are fragile and therefore disintegrate quickly. The aim of this study was to document the biochemical composition of the mesopelagic fish pearlside (*Maurolicus muelleri*), and investigate the decomposition of the nutrients, with particular focus on the fat.

The fish was caught in the Norwegian sea in September 2018 and frozen (-20°C) until the analyses was performed (4-5 months after catch). About 100 fish was minced together in a pooled sample and stored in a covered and sealed container. The decaying process took place in a cold-storage chamber (3°C). The samples were analyzed at the thawing point, and 6, 12, 24, and 168 hours after thawing.

At the point of thawing the total percentage of fat, protein, water and ash was respectively 15; 10,5; 66 and 3 % of the fish. It had a low n-6/n-3 ratio (0,05) and the omega-3 fatty acids EPA and DHA amounted to 18 % of the total fatty acid composition. All amino acids were found in the proteins and with sufficient levels of the essential amino acids over the reference level for both humans and fish. In addition it also had 143 mg/100 g of the free amino acid taurine.

The content of fat, protein, water and ash did not change within 168 hours after thawing. It was a reduction in the poly unsaturated fatty acids (25,7 → 22,5 %), included the long chained poly unsaturated omega-3 fatty acids (18 → 14,5 %), while there was a reduction in the saturated fatty acids (32 → 33 %) and the mono unsaturated fatty acids (41 → 44 %). It was also a high content of free fatty acids in the fresh samples, and this interpret that there has been a decay of the fat before the analyses was conducted. The degree of oxidation was measured 7 months after the fish was caught, and at the thawing point the fresh fish was estimated to be at the end of the propagation phase, while the termination phase was initiated.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	III
Summary	V
Forkortelser	VIII
1 Innledning	1
2 Bakgrunn	5
2.1 Mesopelagisk sone	5
2.2 Laksesild.....	5
2.3 Sjømat og helse	6
2.4 Marine næringsmidler	7
2.4.1 Marine lipider	7
2.4.2 Marine proteiner	8
2.5 Foringelse av næringsmidler	9
2.5.1 Foringelse av lipider	9
2.5.2 Hydrolyse av fett	10
2.5.3 Oksidasjon av fett	11
3 Materialer og metoder	13
3.1 Materialer	13
3.1.1 Råstoff	13
3.1.2 Forsøksdesign	13
3.2 Metoder	14
3.2.1 Vanninnhold	14
3.2.2 Askeinnhold	14
3.2.3 Fettekstraksjon	14
3.2.4 Fettsyresammensetning	15
3.2.5 Fettklassesammensetning	15
3.2.6 Måling av andel frie fettsyrer av det totale fettinnholdet	16
3.2.7 Aminosyresammensetning og proteininnhold	18
3.2.8 Bestemmelse av frie aminosyrer	18
4 Resultater	19
4.1 Lengde og vekt av laksesild	19
4.2 Biokjemisk sammensetning av laksesild	20
4.2.1 Endring i biokjemisk sammensetning	20
4.3 Fettsyresammensetning	21
4.4 Fettklassesammensetning	22
4.5 Måling av oksidasjon	24
4.5.1 Måling av andel frie fettsyrer av det totale fettinnholdet	24

4.5.2	Måling av primære oksidasjonsprodukt (peroksidverdi)	24
4.5.3	Måling av sekundære oksidasjonsprodukter (TBARS).....	25
4.6	Proteininnhold og aminosyresammensetning.....	26
4.6.1	Totale aminosyrer.....	26
4.6.2	Frie aminosyrer	27
5	Diskusjon.....	28
6	Konklusjon.....	35
7	Referanseliste	36
8	Vedlegg	41

Forkortelser

AA	Aminosyre
ALA	α -linolensyre
DAG	Diasylglyserol
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre
DVM	Daglig vertikal migrasjon (Diel vertical migration)
EAA	Essensielle aminosyrer
EPA	Eikosapentaensyre
FAA	Frie aminosyrer
FFA	Frie fettsyrer
LA	linolsyre
LC	Langkjedet
LC-PUFA	Langkjedet flerumettet fettsyre (poly unsaturated fatty acids)
LC-n-3-PUFA	Langkjedet flerumettet omega-3 fettsyre
MAG	Monoacylglyserol
MDA	Malondialdehyd-bis (diethylacetal)
MeOH	Metanol
MUFA	Enumettede fettsyrer (mono unsaturated fatty acids)
PL	Fosfolipid
RH	Fettsyre
SFA	Mettede fettsyrer (saturated fatty acids)
TAG	Triacylglyserol
TBARS	Thiobarbitursyre reaktive stoffer
TLC	Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography)
PV	Peroksidverdi

1 Innledning

Jordas befolkning øker årlig, og det antas at befolkningstallet øker med omtrent 1 milliard hvert tiår frem mot 2050 til 9,8 milliarder mennesker i 2050 (UN, 2017). Dette medfører utfordringer knyttet til dekning av matbehovet, og legger økende press på jordas ressurser. Det blir et større behov i fremtiden på å finne nye og mer effektive matkilder.

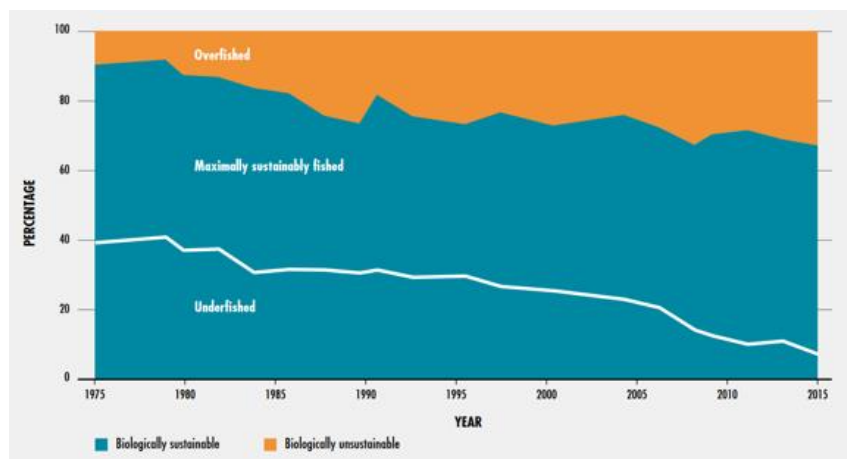
I 2015 kom FNs 193 medlemsland til enighet om Agenda 2030 (figur 1), som består av 17 mål og 169 delmål for bærekraftig utvikling av jorda. Disse 17 målene kalles FNs bærekraftsmål og er verdens felles arbeidsplan for blant annet å utrydde sult, oppnå matsikkerhet og bedre ernæring, fremme bærekraftig landbruk (mål 2), sikre god helse og fremme livskvalitet for alle uansett alder (mål 3) og bevare og bruke hav og marine ressurser på en måte som fremmer bærekraftig utvikling (mål 14) innen 2030 (FN, 2019). Sammenhengen mellom kosthold og god helse er godt dokumentert, og sjømat er sentral i en sunn diett. Sjømat har et høyt innhold av høyverdige og lett fordøyelige animalske proteiner hvor alle essensielle aminosyrer finnes. I tillegg har det et sunt fett med et relativt høyt innhold av de flerumettede langkjedede marine fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) dokopentaensyre (DPA) og dokosaheksaensyre (DHA) som har flere positive helse og forebyggende effekter, blant annet mot hjerte og karsykdommer. Til tross for dette står fisk og fiskeprodukter kun for omtrent 1-2 % av det daglige matinntaket målt i kalorier per hode på verdensbasis (FAO, 2018a).



Figur 1: FNs bærekraftsmål, verdens felles arbeidsplan (FN, 2019).

I dag er landbruk den viktigste og mest avanserte sektoren i verden for produksjon av mat (FAO, 2018b). Det er estimert at dagens landbruk beslaglegger omtrent 40 % av landjordas overflate (SAM, 2017) og står for 25 % av total årlig klimagassutslipp (Vermeulen *et al.*, 2012). For å dekke det fremtidige behovet for mat, må landbruksproduksjonen øke med 70 % (Bruinsma, 2009) og økningen i areal og produksjon vil bidra til et økt trykk på landlige habitat med påfølgende reduksjon i biodiversitet, økt behov for gjødsel og næringssalter, samt økte utslipp av klimagasser. Selv med ny teknologi og forbedringer i drift av landbruket vil en slik økning ytterligere forsterke det økologiske fotavtrykket.

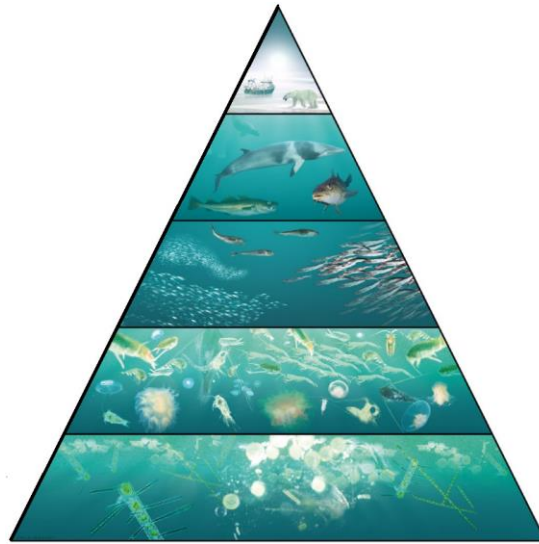
Den totale produksjonen fra havene i 2016 var 171 millioner tonn, hvorav 88 %, 151 millioner tonn, ble utnyttet til humant konsum (FAO, 2018a). Fra rapporten til FAO (2018a) som omhandler tilstanden til verdens fiskerier og akvakultur (SOFIA), vises det til at det i 2015 var 60 % av verdens fiskebestander som var maksimalt utnyttet på en bærekraftig måte og 7 % underfisket (figur 2). Andelen overbeskattede arter økt fra 10 % i 1975 til 33 % i 2015. Det totale kvantumet av villfanget fisk på verdensbasis har vært relativt stabilt siden 1990 (SAM, 2017) med ca. 90 millioner tonn rund vekt årlig (FAO, 2018a). Det er derfor urealistisk å forvente økt produksjon fra dagens kommersielle fiskebestander.



Figur 2: Global trend for fangst av verdens marine fiskebestander fra 1975-2015 (FAO, 2018a).

Alt liv på jorden livnærer seg av primærprodusentene, som omgjør sollys, CO₂ og mineraler til biologisk materiale. I havene utgjør mikroalger (planteplankton) og makroalger (tang og tare) nederste trinn i næringskjeden (figur 3), og danner grunnlaget for all biomasse. Primærprodusentene i akvatiske miljø estimeres til å produsere 40 000 millioner tonn årlig biomasse (Huss, 1995). Næringskjeden er delt inn i trofiske nivå, som beskriver overføringen av energi i et økosystem. I et økosystem er det vanligvis maksimalt 5 trofiske nivå, og for hvert

nivå som økes overføres bare 10 % av biomassen til neste ledd (Lindeman, 1942; Skelly *et al.*, 2011; Trebilco *et al.*, 2013). Det har derfor i den senere tid vært stor interesse for å se på mulig utnyttelse av organismer på lavere trofisk nivå enn de som vi tradisjonelt har utnyttet (SAM, 2017).



Figur 3: Trofisk pyramide av den marine næringskjeden i Barentshavet. Nederste del av pyramiden består av primærprodusenter som har størst biomasse, etterfulgt av sekundærprodusentene (zooplankton), pelagisk og filtrerende organismer, fiskespisende dyr og øverst er toppredatorer. Illustrasjon av: Arild Sæther (Bakketeig *et al.*, 2015).

Mesopelagisk fisk er slike organismer på lavt trofisk nivå i den marine næringskjeden, og er en underbeskattet fiskeressurs med stort potensial. I 1980 estimerte Gjørseter og Kawaguchi (1980) at det var ca. 1000 millioner tonn mesopelagisk biomasse, og dette ble i 2005 bekreftet av Lam og Pauly (2005). Nyere estimater fra Irigoien *et al.* (2014) viser til estimater på 10.000 millioner tonn mesopelagisk biomasse, 10 ganger mer enn først antatt.

De tre største bestandene av mesopelagisk fisk i Norskehavet er nordlig lysprikkfisk (*Benthosema glaciale*) og laksesild (*Maurolicus muelleri*), liten laksetobis (*Arctozenus risso*) (Hauge, 2018). Et forskningstokt utført av SINTEF i det nordlige Atlanterhavet (NEAFC RA 1) viste at fangstsammensetningen var dominert av nordlig lysprikkfisk (44%) og laksesild (40%) (Grimsmo *et al.*, 2017). På 1970- og 80-tallet var det forsøk på å kommersialisere mesopelagisk fiskeri for produksjon av fiskemel, blant annet syd for Island og i Sør-Atlanteren (IMR, 2017). Det var imidlertid ikke mulig å etablere økonomisk fiske over lengre tid,

hovedsakelig på grunn av manglende forskning og investering i teknologiutvikling (IMR, 2017).

Det søkes altså kontinuerlig etter matkilder fra havet og potensialet for mesopelagisk høsting har ført til et mesopelagisk initiativ i Norge (IMR, 2017). Mesopelagiske organismer har vist seg å være vanskelige å studere, samt en utfordrende ressurs å beskatte, men kan være en mulig supplerende biomasse for å løse utfordringene knyttet til matsikkerhet og behovet for marine omega-3 (Hidalgo & Browman, 2019). Per 2017 har Fiskeridirektoratet gitt ut 50 forsøktillatelser til fiske av mesopelagiske arter i Norge, men kun 2 tillatelser har vært aktive (Fiskeridirektoratet, 2018).

Hovedmålet med oppgaven var å dokumentere næringsinnholdet i mesopelagisk fisk og nedbrytningen av næringsstoffer, med spesielt fokus på fett.

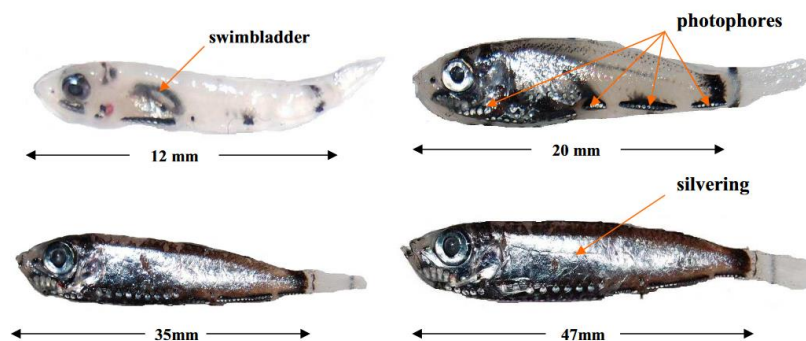
2 Bakgrunn

2.1 Mesopelagisk sone

De frie vannmassene i havet er inndelt i soner som beskriver blant annet dybde, trykk, temperatur og lysforhold (sikt). Den mesopelagiske sonen (skumringszone) er definert fra omtrent 200-1000 meter, og utgjør omtrent 60 % av jordas overflate og 20 % av havets volum (IMR, 2017). Denne sonen kjennetegnes av at det ikke er tilstrekkelig lys for fotosyntese, men tilstrekkelig lys for sikt.

2.2 Laksesild

Laksesild (eng. Pearlside, *Maurolicus muelleri*) tilhører familien marine øksefisker (*Sternoptychidae*). Fisken har sølvblanke sider med lysorganer (fotoforer) på buken (figur 4), slik at den kan regulere synligheten i vannsøylen (Staby, 2010). *M. muelleri* er vanlig i alle verdenshav (Gjøsæter & Kawaguchi, 1980; Parin & Kobylansky, 1996) og er en pelagisk fisk som oppholder seg i den mesopelagiske sonen, både i frie vannmasser og i dype fjorder (Gjøsæter, 1981). Laksesild har en gjennomsnittlig lengde på 4 cm og levetid på 3-5 år i norske farvann (Gjøsæter, 1981). Fisken blir kjønnsmoden i ettårsalderen og har en lengde på omtrent 2,4-3 cm, med gytningsperiode fra mars til september (Gjøsæter, 1981; Robertson, 1976; Staby, 2010).



Figur 4: Laksesild med ulike livsstadier, med varierende mengde lysorganer (fotoforer) og sølvblank side (Staby, 2010).

Laksesild benytter seg av daglig vertikal migrasjon (diel vertical migration – DVM) (Kaartvedt *et al.*, 1998) som er naturens største migrasjon med tanke på biomasse. Denne daglige vertikale migrasjonen er en strategi der organismer trekker mot overflaten ved solnedgang, for å beite og ned i det mørke dypet ved soloppgang. Strategien DVM er et kompromiss mellom beite og unngåelse av predatorer (Clark & Levy, 1988), og er avgjørende

for å bevare energioverføring i det marine økosystemets næringskjede, ettersom migrerende organismer fører til direkte og indirekte til mat for ikke-migrerende organismer (Staby, 2010). Laksesild er derfor et viktig byttedyr i mange marine økosystemer, for blant annet bunnfisk (Salvanes & Nordeide, 1993), hai (Ebert *et al.*, 1992), pelagisk fisk (Giske *et al.*, 1990), blekksprut (Lipiński, 1992), fugl (Jackson, 1988) og sel (David, 1987).

Fullvoksen laksesild livnærer seg på like deler hoppekreps og krill (Gjøsæter, 1981), som også benytter seg også av strategien DVM (Cresswell *et al.*, 2009; Fortier *et al.*, 2001). Laksesild (og annen mesopelagisk fisk) har samtlige protein-bundne aminosyrer (Grimsmo *et al.*, 2017; Wiech *et al.*, 2018). Fra laksesild fangstet i september, er det dokumentert at lipidene som utgjør 60 % av tørrvekt, består av 0,3 % frie fettsyrer (FFA), 4,3 % fosfolipid (PL) og 95,4 % triacylglyserol (TAG) (Falk-Petersen *et al.*, 1986).

2.3 Sjømat og helse

De positive effektene av sjømat har i hovedsak vært tillagt de langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrene (LC-n-3-PUFA) eicosapentaensyre (EPA; 20:5 n-3) og docosaheksaensyre (DHA; 22:6 n-3), som gir positive helseeffekter med hensyn på hjerte- og karsykdommer (Cederholm, 2017; Fielding, 2017) og spiller en viktig rolle i forebygging av en rekke livsstilsykdommer (Calder, 2006; Hedelin *et al.*, 2007). I tillegg har omega-3 fettsyrer blitt påvist å være sentralt under fosterutvikling (Jensen, 2006), kognitiv og mental utvikling (Cederholm, 2017; Schuchardt & Hahn, 2013), samt synsutvikling (Ruxton, 2004). På grunn av de godt dokumenterte positive helseeffektene knyttet til sjømat anbefaler Den Europeiske Myndighet for Næringsmiddeltrygghet (EFSA) et daglig inntak på 250-500 mg marint omega-3 fra sjømat eller kosttilskudd (EFSA, 2012).

Det vestlige kostholdet består av en økende andel prosesserte næringsmidler, med høyt innhold av mettet fett og vegetabiliske oljer (n-6), og lav andel sjømat (n-3). Økningen i mettet fett har ført til at balansen i kostholdet og forholdet mellom n-6 og n-3 fettsyrer, har blitt endret fra menneskets ordinære kosthold med n-6/n-3 forhold på 1-2:1 til dagens 10-20:1 forhold (Simopoulos, 2004). Den optimale forholdsrationen (n-6/n-3) i kostholdet varierer mellom 1:1 til 4:1 med hensyn på ulike sykdommer (Simopoulos, 2004).

2.4 Marine næringsmidler

Makromolekylene karbohydrat, fett og protein er de energigivende næringskomponentene i mat. Fiskemuskel har lavt innhold av karbohydrater, men er rik på fett og proteiner, inneholder en stor andel vann og 1-2 % aske (tabell 1). Fisk klassifiseres som fet eller mager etter hvor stort fettinnhold den har i muskelen. En mager fisk som torsk har et totalt høyt fettinnhold, men fett lagres i leveren. I tillegg til de energigivende næringsstoffene er fisk en god kilde til vitaminene A, B₃, B₆, B₁₂, D og E (Tacon & Metian, 2013) samt mineralene jod, selen, jern, sink, magnesium og kalsium (Sidhu, 2003). Den biokjemiske sammensetningen av næringsstoffer i fisk varierer fra art til art, og avhenger av alder, kjønn, miljø og førtilgang (Huss, 1995).

Tabell 1: Normal variasjon av bestanddeler i fiskemuskel/fillet. Modifisert fra Huss (1995).

Bestanddeler i fiskemuskel	Normal variasjon (%)
Protein	16 - 21
Lipid	0,2 - 25
Karbohydrat	<0,5
Akse	1,2 - 1,5
Vann	66 - 81

2.4.1 Marine lipider

Lipider er en samlebetegnelse for biologiske fettstoffer og fettlignende stoffer, som har til felles at de kan løses i organiske væsker, men er uløselige i vann.

2.4.1.1 Struktur og egenskap av fettsyrer

En fettsyre er en kjede med vanligvis 12-22 karbonatomer som har en metylgruppe (-CH₃) og en karboksylgruppe (-COOH). Fettsyrene kan være korte (4-18 C-atomer) eller lange (20-22 C-atomer). Plante- og dyrefett består av korte fettsyrer, mens marine organismer i tillegg har en stor andel av lange fettsyrer. Fettsyrer kan enten bestå av karbonkjeder med kun enkeltbindinger (mettet fettsyrer - SFA), eller av én eller flere dobbeltbindinger, henholdsvis enumettet og flerumettet fettsyrer – MUFA og PUFA. De marine fettsyrene, med lange hydrokarbonkjeder og flere dobbeltbindinger (LC-PUFA) er flytende ved lave temperaturer. De marine langkjedede flerumettete omega-3 fettsyrene (LC-n-3-PUFA) EPA og DHA er derfor viktige bestanddeler i cellemembranen hos marine vekselvarme organismer. De to fettsyrene α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) og linolsyre (LA; 18:2n-6) er essensielle for mennesker og fisk. Dette kommer av manglende enzymer til å forlenge og plassere dobbeltbindinger nærmere enn ni karbonatomer fra metylenden i fettsyrer.

2.4.2 Marine proteiner

Proteiner er makromolekyler bygd opp av aminosyrer (AA), bundet sammen med peptidbindinger. Et protein kan bestå av 20 forskjellige aminosyrer som ved ulike kombinasjon gir forskjellig struktur og egenskaper. Av de 20 forskjellige aminosyrene regnes henholdsvis ni og ti aminosyrer for essensielle for mennesker og fisk, det vil si at de ikke kan syntetiseres i kroppen og må bli tilført gjennom kosten. Proteinkvalitet bestemmes ut fra sammensetningen av aminosyrer, innhold av essensielle aminosyrer (EAA) og fordøyeligheten av proteinet. Proteiner med høy kvalitet inneholder alle EAA og i større kvantum enn referansenivå (FAO/WHO/UNU, 2007) (tabell 2) og har lik fordøyelighet enn eggehvite eller melkeprotein (Damodaran, 2012). Fisk inneholder normalt 16-21 % proteiner i fileten og fiskeprotein inneholder alle de essensielle aminosyrene (Huss, 1995). Proteiner fra sjømat kan blant annet inneholde funksjonelle AA (arginin, cystein, glutamin, leucin, prolin og tryptofan) som er vist å regulerer metabolske reaksjoner som blant annet forbedrer helse, vekst og utvikling (Wu, 2009), og bioaktive peptider som har vist å ha antioksidativ effekt, være kolesteroldempende og motvirke kreft (Kim & Wijesekara, 2010). Sjømat er også kjent for å inneholde den svovelholdige aminosyren taurin (2-aminoetanesulfonsyre), som er vist å ha en rekke forebyggende effekter for hjertet og lunger (Elvevoll *et al.*, 2008).

Tabell 2: Behovet for essensielle aminosyrer for voksne friske mennesker (mg/g⁻¹ protein) og for fisk g/Kg⁻¹ fôrprotein (Modifisert fra ¹FAO/WHO/UNU, 2007; ²Wilson & Halver, 1986).

Aminosyre	Mennesker: behov for mg/g protein¹	Fisk: behov for mg/g fôrprotein²
Arginin	Ikke essensiell	40-50
Histidin	15	15-21
Threonin	23	20-40
Isoleucin	30	20-26
Leucin	59	33-40
Valin	39	30-40
Lysin	45	40-60
Metionin (+Cystein)	22	20-40
Fenylalanin (+ Tyrosin)	38	50-65
Tryptofan	6	5

2.5 Foringelse av næringsmidler

I det døden inntreffer et dyr starter nedbrytningsprosessen, blodtransporten og oksygentilførselen stoppes og produksjonen av energi opphører gradvis. Fiskens celler bruker opp tilgjengelig energilagere og fisken blir dødsstiv (rigor mortis) når energilageret nærmer seg tomt. Det første trinnet i nedbrytningsprosessen av fersk fisk utføres av autolytiske prosesser, som betyr at fiskens egne enzymer bryter ned eget vev, en selvoppløsning. Størrelse, fettinnhold, skinn og post mortem pH er dermed avgjørende faktorer for lagringsstabiliteten og nedbrytningshastigheten av fisk (tabell 3) (Huss, 1995). For å bevare og hindre nedbrytelse av mat brukes konserveringsmetoder som for eksempel frysing, tørking eller salting. Disse metodene reduserer blant annet vannaktiviteten som hindrer mikrobiell vekst, men fungerer ikke som en endelig terminering av nedbrytelsen.

Tabell 3: Faktorer som påvirker nedbrytelsehastigheten av fersk fisk lagret på is. Modifisert fra Huss (1995).

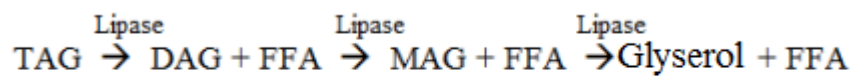
Faktorer som påvirker nedbrytningshastighet	Relativ nedbrytningshastighet	
	Rask	Sakte
Størrelse	Liten fisk	Stor fisk
Post mortem pH	Høy pH	Lav pH
Fettinnhold	Feit fisk	Mager fisk
Skinn	Tynn	Tykk

2.5.1 Foringelse av lipider

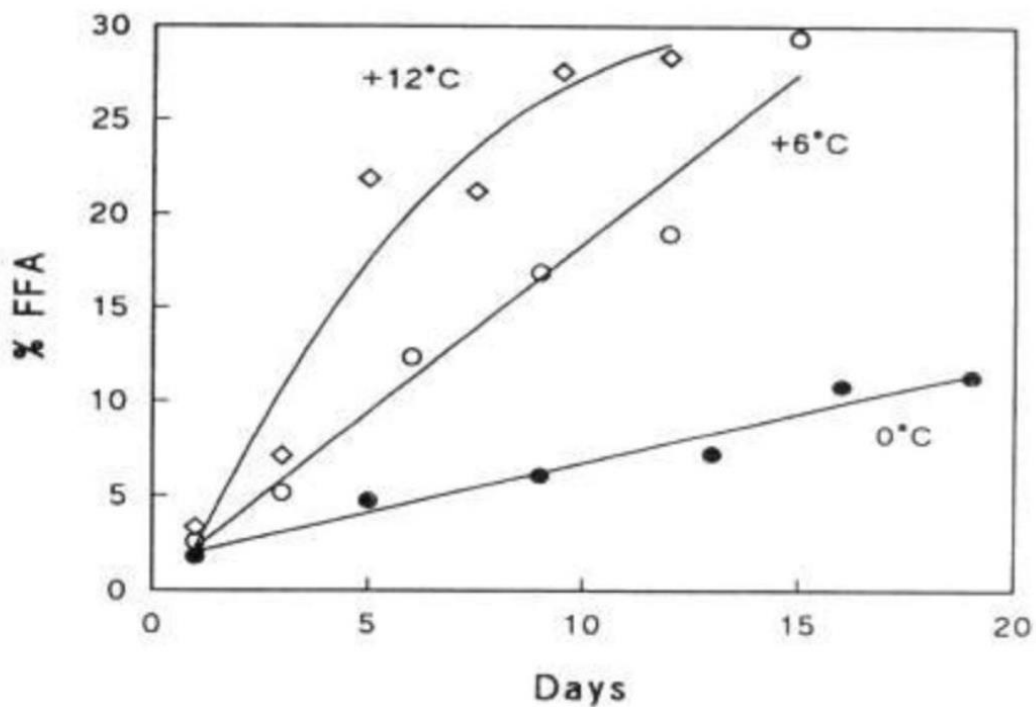
Den store andelen av LC-PUFA i sjømat gjør det svært utsatt for oksidativ harskning (Parker *et al.*, 2003). I levende organismer hindres oksidasjonen av fettsyrene ved hjelp av naturlige antioksidanter, men disse blir raskt brukt opp etter døden. Fettsyrer oksiderer raskere ved økende temperaturer (Shahidi & Spurvey, 1996) og kontakt med lys med lav bølgelengde (UV-lys) (Sattar *et al.*, 1976). Foringelse av lipider skjer hovedsakelig ved to distinkte reaksjoner, hydrolyse og oksidasjon. Lipidoksidasjonen endrer aroma, smak, tekstur, farge og næringskvalitet i mat, og kan begrense utnyttelsen av marine oljer i mat, kosttilskudd og fôr (Shahidi & Finley). Frie radikaler som produseres i lipidoksidasjonen kan blant annet reagere med og endre AA, karbohydrater, vitaminer, pigmenter, DNA (Whitaker, 1991), samt redusere andelen LC-PUFA i næringsmidlene (Dulavik *et al.*, 1998).

2.5.2 Hydrolyse av fett

Hydrolyse av esterbindingene i lipider (lipolyse) kan forekomme av enzymer (Packter, 1994) eller ved varme og fuktighet, og fører til frigjørelse av frie fettsyrer (McClements & Decker, 2012). Fordøyelsesenzymer (lipaser - lipidspaltende enzymer) spalter TAG til glyserol og frie fettsyrer (FFA) ved hydrolyse som illustrert i figur 5. Hydrolyse er en enzymkatalyserende reaksjon og reaksjonen foregår raskere ved høyere temperatur (figur 6) (Huss, 1995) og enzymene vil være virksomme under fryselagring ved høyere temperaturer enn $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Olsen, 2017).



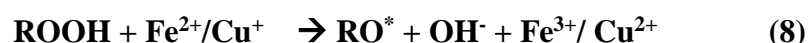
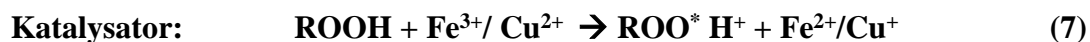
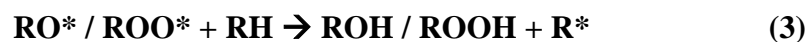
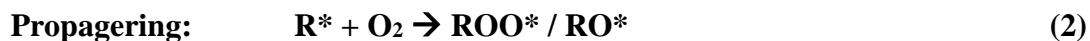
Figur 5: Enzymatisk hydrolyse av fettsyrer. Lipaser spalter fettsyrer TAG til FFA, DAG, MAG og glyserol.



Figur 6: Utvikling av frie fettsyrer i sild lagret ved $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Huss, 1995).

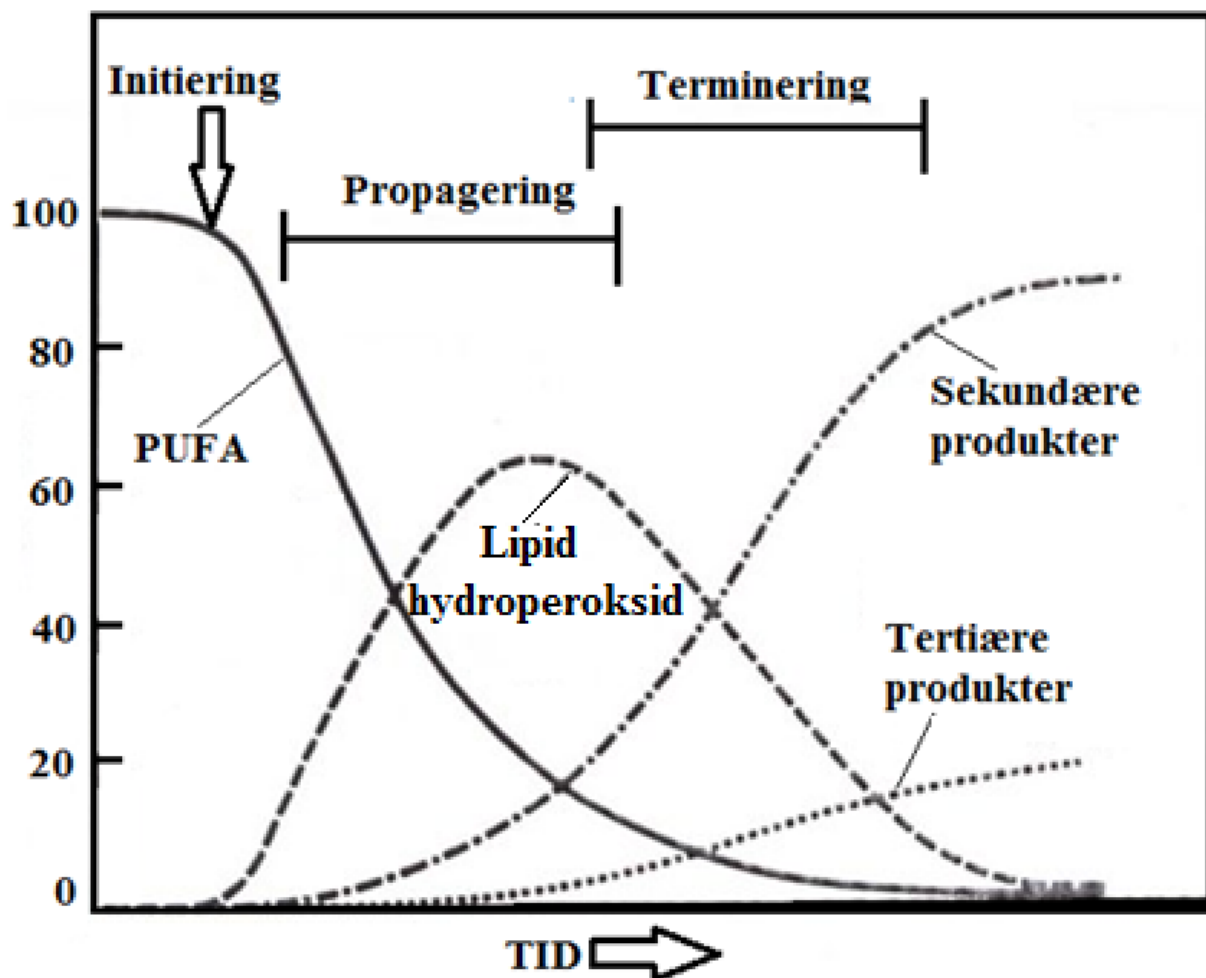
2.5.3 Oksidasjon av fett

Oksidasjon er en kjemisk reaksjon der en forbindelse eller substans får tilført oksygen, tap av elektroner eller hydrogen. Oksidasjon (autoksidasjon) av fettsyrer er en av hovedårsakene til kvalitetsforringelse frossen sjømat. Marint fett og oljer inneholder en stor andel flerumettede fettsyrer som gjør de særlig utsatt for oksidasjon, ettersom dobbeltbindinger i karbonkjeden svekker C-H bindingene. Jo mer umettet en fettsyre er desto flere angrepspunkter kan en fettsyre bli oksidert fra og oksidasjonen skjer raskere (Olsen, 2017). Autoksidasjon av umettede fettsyrer skjer med tre separate prosesser: initiering, propagering og terminering (McClements & Decker, 2012) (ligning 1-8; Olsen, 2017). En karakteristisk autoksidasjon av flerumettede fettsyre med de forskjellige faser er skissert i figur 7.



Initieringsfasen i autoksidasjonen startes ved tilføring av energi, transisjonsmetaller (Fe^{3+} og Cu^{2+}), reaktive oksygenforbindelser (ROS) eller frie radikaler (R^*) som reagerer med en fettsyre. Dette fører til at en fettsyre (RH) mister et hydrogenatom (H) og det dannes et fettsyreradikal (R^*) (1). Fettsyreradikalet (R^*) dannet i initieringsfasen reagerer raskt med oksygen og danner et fettsyreperosidradikal (ROO^*) (2). ROO^* vil reagere med en ny fettsyre (RH) og danne et fettsyreperoksid (ROOH) og enda et fettsyreradikal (R^*) (3), som fører til at propageringen (kjedereaksjonen) er i gang. I denne fasen dannes det mengder av det primære oksidasjonsproduktet fettsyreperoksid (ROOH). Fettsyreperoksid er uten lukt og smak, og er en ustabil forbindelse som brytes lett ned til nye radikaler som for eksempel fettsyreradikaler (RO^*) og fettsyreperoksidradikaler (ROO^*). Transisjonsmetallene jern og kopper, virker om prooksidanter i oksidasjonen av fettsyrer fordi de kan skifte mellom to valenser ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ og $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$) (Olsen, 2017). Jern og kopper i redusert eller oksidert form kan reagere direkte med

fettsyreperoksid (ROOH) og danne nye radikaler som fettsyreperoksid (ROO*), alkylradikal (RO*), hydroksyl radikal (OH*) og hydrogen (H⁺) (7) og (8). To fettsyreperoksid (2x ROOH) kan også reagere med hverandre og omdannes til et fettsyreperoksidradikal (ROO*) og et alkylradikal (RO*), ved hjelp av transisjonsmetallene som katalysator. I kjedereaksjonen blir mengden oksidasjonsprodukter økt eksponentielt og fører til stor konsentrasjonen av fettsyreradikaler og fettsyreperoksidradikaler. På et tidspunkt i kjedereaksjonen begynner avslutningsfasen, mengden peroksider reduseres og polymere fettforbindelser dannes (tertiære produkter) (4-6). I denne overgangsfasen avtar produksjonen av de sekundære harskningsprodukter for deretter å reduseres på grunn av forbindelsene er flyktige og oksidasjonsprosessen opphører gradvis (Olsen, 2017).



Figur 7: Typisk autooksidasjon av PUFA som en funksjon av tid, som viser de forskjellige fasene i reaksjonen. Modifisert fra: Gardner (1983)

3 Materialer og metoder

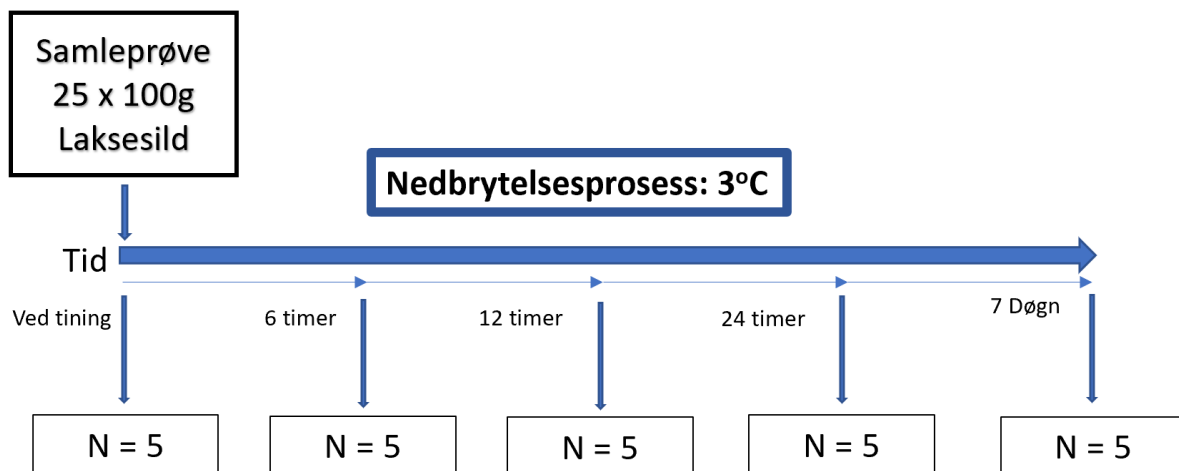
3.1 Materialer

3.1.1 Råstoff

Laksesild ble fisket i Norskehavet av Lie gruppen, september 2018, frosset i blokk og ankom UiT oktober 2018. Den ble oppbevart på -20°C frem til forsøk og analyser.

3.1.2 Forsøksdesign

Laksesild frosset i blokk ble oppbevart i mørke omgivelser på frys (-20°C) inntil analysene ble utført. Samleprøver av laksesild (hel fisk) på omtrent 100 gram ble spikket ut fra fiskeblokken og kvernet (Wilfa 700W, model: SM-1FP) i frossen tilstand. Fiskeprøvene ble markert og overført til tildekte lufttette «zip-lock» poser. Prøvene ble plassert på kjølerom (3°C) der nedbrytelsesprosessen foregikk. Etter henholdsvis 6, 12, 24 og 168 timer (7 døgn) ble prøvene tatt ut fra kjølerommet (figur 8) og analysene utført eller fryst ned til senere analyser. Nedbrytelsen av laksesild ble undersøkt etter bestemte tidsintervaller: 0 (ved tining), 6, 12, 24 og 168 timer etter tining.



Figur 8: Flytdiagram av forsøksdesignet.

3.2 Metoder

3.2.1 Vanninnhold

Vanninnhold ble beregnet ved bruk av metoden AOAC 950.46B (Horwitz, 2004) med noen modifikasjoner. Omtrent 5 gram prøvemateriale (n=3) ble inkubert i varmeskap (Termaks - Labolytics AS, Trondheim, Norge) på 100-110 °C til konstant vekt ble målt gravimetrisk (omtrent 48-72 timer). Vanninnholdet (%) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt (før tørking)} - \text{Vekt (etter tørking)}}{\text{Vekt (før tørking)}} \times 100 \%$$

3.2.2 Askeinnhold

Askeinnhold ble bestemt ved bruk av metoden AOAC 938.08 (Horwitz, 2004) med noen modifikasjoner. Vannfrie prøver ble fullstendig forbrent (Nabertherm GmbH, Program Controller S27, Lilienthal, Tyskland) i 16 timer (inkludert 4 timer oppvarming) ved 540°C. Askeinnholdet (%) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt (før tørking og forbrenning)} - \text{Vekt (etter tørking og forbrenning)}}{\text{Vekt (før tørking og forbrenning)}} \times 100 \%$$

3.2.3 Fettekstraksjon

Fett ble ekstrahert etter en metode beskrevet av Folch *et al.* (1957) med noen modifikasjoner. Prøvene (1g) ble tilsatt 1 ml internstandard (IS: C17:0, Heptadecanoic acid) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) løst til 10 mg/ml i diklormetan/metanol (DCM:MeOH) (2:1) og 19 ml DCM:MeOH (2:1) (diklormetan og metanol - Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Prøvene ble deretter blandet i en automatisk homogenisator (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland) i 30 minutter.

Løsningen ble videre filtrert gjennom foldefilter (Whatman, GE Healthcare, England) og tilsatt 4 ml 0,9 % natriumklorid (NaCl, VWR chemicals, VWR international, Conshohocken, PA, USA) og deretter sentrifugert (Heraeus Multifuge 1 SR, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) på 2000 x g i 10 min. Den øverste fasen ble pipettert ut, og den nedre fasen ble overført til forhåndsveide analyserør. Prøvene ble dampet tørr ved bruk av N₂-gass ved 20°C (Stuart SBH130D/3 Digital Block Heater, Staffordshire, Storbritannia) og fettprosenten ble beregnet basert på vektdifferansen i analyserørene ut fra følgende formel:

$$\text{Fett (\%)} = \frac{\text{analyserør med innhold} - \text{analyserør tom}}{\text{Innveid mengde prøve}} \times 100\%$$

3.2.4 Fettsyresammensetning

Undersøkelse av fettsyresammensetning ble gjennomført ved hydrolysering og metylering samtidig, ved bruk av metoden beskrevet av Stoffel *et al.* (1959). Ekstrahert fett ble løst i DCM:MeOH (2:1) til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Det ble tilsatt 100 µl prøve, 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2 % H₂SO₄ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland Svovelsyre 95-97 %) i metanol. Prøvene ble inkubert på varmeblokk (Digital Dry bath, Thermo scientific, Osterode, Tyskland) ved 100°C i 1 time. Deretter ble det tilsatt 3,5 ml heptan (Honeywell, Muskegon, USA) og 3,5 ml 5 % NaCl før prøvene ble blandet ved hjelp av vortex (Reax top, VWR international, Conshohocken, PA, USA) i 15 sekunder. Den øverste fasen i løsningen bestående av heptan og lipider ble dampet tørr ved N₂-gass ved 20°C og deretter tilsatt 100 µl heptan. Fettsyrene ble separert og analysert av gasskromatograf (Agilent 6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med 7683 autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor. Det ble brukt en kapillærkolonne (50 m x 250 µm nominal, Varian CP7419, Varian Inc., Middelburg, Nederland) med helium (AGA, Oslo) som bæregass. Injektoren ble satt til temperaturen 240 °C og detektoren til 250 °C. For identifisering av fettsyrer ble følgende FAME-standarder benyttet: PUFA 1, PUFA 2, PUFA 3 (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Fettsyrer med arealprosent under 0,5, ikke analysert. Arealprosenten av de individuelle fettsyrene ble beregnet ut fra totalarealet av alle fettsyrene ut i fra følgende formel:

$$\text{Fettsyrer (g) pr. 100 gram prøve} = \frac{\text{Areal topp FA}}{\text{Areal topp IS}} \times \frac{\text{Tilsatt IS (g)}}{\text{Vekt prøve (g)}} \times 100g$$

3.2.5 Fettklassesammensetning

Tynnsjiktskromatografi (TLC) ble gjennomført etter metode fra Rose og Oklander (1965) med noen modifikasjoner. Ekstrahert fett ble løst i diklormetan til en konsentrasjon på 25 mg/ml og 1 µl prøve og internstandard (16:1A og 18:5, Nu-chek Prep., Elysian, MN, USA) ble avsatt på en high performance thin layer chromatography (HP-TLC) Silica gel (HP-TLC Silica gel 60 VWR 1.05633.0001, Merck, Darmstadt, Tyskland). HP-TLC platen ble satt oppreist et lufttett glasskar og euleringsløsning tilsatt (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:1) (heptan, dietyleter og eddiksyre - Sigma Aldrich, St. Louis, USA) til bunnen var dekket, vakuutfett ble anvendt og lokket satt på karet. HP-TLC platen ble tatt ut av karet når den mobile fasen var ca. 1 cm fra toppen av platen, og ble deretter lufttørket i ca. 10 minutter i avtrekksskap. Videre ble platen sprayet jevnt over med kobberløsning (10 % kobbersulfat, 8% fosforsyre, Sigma Aldrich, St. Luis, USA) og ble lufttørket i 10 minutter. Platen ble satt i kaldt varmeskap som ble varmet opp til 180 °C.

3.2.6 Måling av andel frie fettsyrer av det totale fettinnholdet

Frie fettsyrer ble målt ved å benytte titreringsmetoden beskrevet av Ke *et al.* (1976). Ekstrahert fett (ca. 0,1 g) ble veid ut og løst i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol (2:1:2) (kloroform - Sigma Aldrich, St. Louis, USA og isopropanol - Honeywell, Muskegon, USA). Løsningen ble tilsatt 4 dråper indikator (0,5% meta-crescolpurpur) og kontinuerlig rørt med magnetrører (RH Basic, IKA Magnetic Stirrers, Staufen, Tyskland). Løsningen ble titrert (automatisk titrator - Schott Instruments, Mainz, Tyskland) med 0,05 M NaOH (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) til løsningen fikk omslag til fiolett farge. På samme måte ble blindprøver med kun indikator titrert. For hver prøve ble 3 paralleller analysert. Andelen FFA (%) ble beregnet ved bruk av formelen:

$$\text{FFA (\%)} = \frac{(pr-bl) \times M \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right) \times 282 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{m(\text{g}) \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{l}}\right)} \times 100 \%$$

Hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

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

282 = molekylvekt oljesyre (g/mol)

m = vekt av prøve (g)

3.2.6.1 Måling av primære oksidasjonsprodukt (peroksidverdi)

Peroksidverdi (PV) ble bestemt ved metoden beskrevet av Ueda *et al.* (1986) med noen modifikasjoner. Analysen ble gjennomført med tre paralleller for prøvene og to paralleller for standardprøvene. Standardkurven ble benyttet for beregning av peroksidverdier i fiskeprøvene og til standardkurven ble det tilsatt volum angitt i tabell 4 i sentrifugerør (15 ml).

Tabell 4: Tilsetningsvolum for kjemikaler til standardkurven. Etanol (ethanol absolute, VWR chemicals, VWR international, Conshohocken, PA, USA), isooktan (Merck, Darmstadt, Tyskland), Fe(III)klorid hexahydrat løsning (1 mg/ml i 3,7 % HCl, Merck, Darmstadt, Tyskland), og 3,7 % HCl (Konsentrert saltsyre, 37 %, Merck, Darmstadt, Tyskland) og ammoniumthiocyanat (30 % i dH₂O, Sigma Aldrich, St. Luis, USA)

Konsentrasjon Fe(III)	Etanol mL	Isooktan µL	Fe (III)- løsning µL	HCl (3,7%) µL	Ammoniumth iocyanat µL
0	10	200	0	200	200
25	10	200	25	175	200
50	10	200	50	150	200
100	10	200	100	100	200
150	10	200	150	50	200
200	10	200	200	0	200

Ammoniumthiocyanat ble tilsatt i ett og ett rør og ble blandet i 15 sekunder med vortex, og prøvene ble målt spektrofotometrisk ved 500 nm eksakt 3 minutter etter tilsetning.

Fett fra fiskeprøvene (20-25 mg) ble løst ut i 2 ml isooktan, og fortynnet tilstrekkelig. To hundre µl oljeprøve løst i isooktan, 10 ml EtOH og 200 µl Fe(II)klorid tetrahydrat (20 mM i 3,7 % HCl) (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) ble blandet og tilsatt 200 µl ammoniumthiocyanat. Ligningen til standardkurven (vedlegg 2) ble brukt for å beregne milliekvivalenter av oksygen per kg olje (M-eq oksygen/kg):

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

Hvor:

PV = milliekvivalenter av oksygen per kg olje (M-eq oksygen/kg)

L = Stigningskoeffisient standardkurve

m_o = analysert mengde fett (g)

55,84 = Molekylvekt jern

3.2.6.2 Måling av sekundære oksidasjonsprodukt (TBARS)

Lipidoksidasjon ble også estimert ved å analysere utvikling av sekundære oksidasjonsprodukter i fiskeprøvene ved å måle mengden 2-thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARS) etter metoden beskrevet av Witte *et al.* (1970) og Dulavik *et al.* (1998) med noen modifikasjoner. Omtrent 4 g fiskeprøve (n=2) og 15 ml ekstraksjonsløsning TCA (10 % trikloreddiksyre (Merck, Darmstadt, Tyskland), 0,1 % propylgallat (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) og 0,1 % etylendiamintetraeddiksyre (EDTA, BDH, England) løst i vann) ble homogenisert i 30 sekunder. Prøvene ble deretter inkubert i vannbad (SW22 Shaking water bath, Julabo, Seelbach, Tyskland) ved 100°C i 30 minutter. Videre ble prøvene filtrert med Whatman folkdefilter. Prøvene ble avkjølt og fortynnet 1:100 med ekstraksjonsløsning. Så ble 1 ml prøve og 1 ml TBA-reagens (0,6 % thiobarbitursyre, Sigma Aldrich, St. Luis, USA) ble blandet, og inkubert på varmeblokk (Grant instruments, Cambridge, England) i 30 min ved 100°C. Deretter ble absorpsjonen målt med spektrofotometer (GENESYS™ 20, Thermo scientific, waltham USA) ved 532nm.

Monodialdehyd-bis løst i ekstraksjonsløsning (0-10 nmol/L MDA) ble brukt som standardkurve. Ligningen til standardkurven (vedlegg 1) ble brukt for å beregne nmol MDA-ekvivalenter/ml ekstrakt i fiskeprøvene:

$$\text{nmol MDA-eq/mL ekstrakt} = \frac{(\text{avlest absorbans-b ledd i ligningen})}{\text{a ledd i ligningen}}$$

nmol MDA-eq/g prøve ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{nmol MDA-eq/g ekstrakt} = \frac{(\text{nmol MDA-eq/L ekstrakt} * 15 \text{ ml})}{4 \text{ g prøve}}$$

3.2.7 Aminosyresammensetning og proteininnhold

Proteinanalyser ble utført ved aminosyre analyse.

Analyser av totale aminosyrer ble utført etter metoden beskrevet av Moore og Stein (1963). Prøvemateriale (200 mg), 0,7 ml destillert vann, 0,5 ml 20 mM norleucin (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) og 1,2 ml 37% HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) ble blandet, flushet med N₂-gass (AGA AS, Oslo, Norge) i 10 sekunder, og satt i varmeskap på 110°C i 22 timer. Prøvene ble avkjølt og 100 µl ble dampet tørt med N₂-gass og deretter løst ut i 1 ml loading buffer (Lithium citratbuffer med pH 2,2, Biochrom Co. Cambridge, Storbritannia).

Prøvene ble kromatografisk separert og analysert med en Biochrom 30 aminosyreanalysator (Biochrom 30 aminosyreanalysator, Biochrom Co., Storbritannia) med litiumcitrat kolonne og postkolonne-derivatisering med ninhydrin. I aminosyreanalysatoren ble aminosyrene separert i kolonnen på en ionebytter med trinnvis bufferskifte, og derivatisert med ninhydrin og detektert ved 440 og 540 nm. Ved hjelp av kjente standarder ble aminosyrene identifisert basert på retensjonstiden, og mengden aminosyrer ble bestemt ved hjelp av norleucin som internstandard.

3.2.8 Bestemmelse av frie aminosyrer

Analyser av fire aminosyrer ble utført etter metoden beskrevet av Mæhre *et al.* (2016) modifisert fra Mierke-Klemeyer *et al.* (2008). Prøvemateriale (1 g) ble tilsatt 1 ml norleucin 20 mM (IS) og 9 ml destillert H₂O, før homogenisering ved bruk av utraturrax (Ultra Turrax T25 basic, IKA, Staufen, Tyskland) i 15 sekunder. Videre ble 1 ml 35 % SSA (sulfosalicylic syre) tilsatt og blandingen ble sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter (4°C). Supernatanten (200 µl) ble tilsatt 800 µl loading-buffer og analysert ved hjelp av aminosyreanalysatoren.

4 Resultater

4.1 Lengde og vekt av laksesild

Lengde og vekt av 111 laksesild ble bestemt (tabell 5). Det gjennomsnittlige lengden var $4,11 \pm 0,83$ cm. Maksimal lengde ble observert til 6,4 cm. For vekt var gjennomsnittet $0,54 \pm 0,42$ g. Maksimal og minimal vekt ble målt til henholdsvis 2,04 og 0,17 g. Omtrent 100 individer av laksesild ble tilfeldig utvalgt og fordelt i en samleprøve, fisken var ofte helt eller delvis uten skinn (figur 9).

Tabell 5: Gjennomsnittlig lengde (cm) og vekt (g), samt minimal og maksimal lengde og vekt av laksesild. Resultatet er presentert som gjennomsnitt og standardavvik av $n=111$.

Laksesild	Gjennomsnitt	Minimal	Maksimal
Lengde (cm)	$4,11 \pm 0,83$	2,90	6,40
Vekt (g)	$0,54 \pm 0,42$	0,17	2,04



Figur 9: Størrelsesfordeling av laksesild i en samleprøve, individene ble tilfeldig utplukket. Fiskene var ofte helt eller delvis uten skinn, og dekt med en hinne av fett.

4.2 Biokjemisk sammensetning av laksesild

Den biokjemiske sammensetningen av laksesild ble målt i en samleprøve på 100 g (tabell 6). Innholdet av fett ble analysert ved Folch's ekstraksjon, protein ble bestemt ved hjelp av aminosyre analyse og vann og aske ble bestemt ved tørking og forbrenning. Laksesild hadde et totalt innhold av fett, protein, vann og aske på henholdsvis på $15,0 \pm 0,8$, 10,6, $65,9 \pm 0,4$ og $3,1 \pm 0,0$ %.

Tabell 6: Biokjemisk sammensetning av laksesild. Resultatet er oppgitt som gjennomsnitt og standardavvik av fett (n=15), protein (n=1), vann og aske (n=3).

Timer etter tining	Fett (%)	Protein (%)	Vann (%)	Aske (%)
0	$15,0 \pm 0,8$	10,6	$65,9 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,0$

4.2.1 Endring i biokjemisk sammensetning

Den biokjemiske sammensetningen ble analysert ved tining og 6, 12, 24 og 168 timer etter tining. Det ble observert liten endring i den biokjemiske sammensetningen av laksesild målt ved de forskjellige tidspunktene etter tining (tabell 7). Fettinnholdet var mellom 14,6 og 17,5 % og ingen trend ble observert mellom tidsmålingene. Innholdet av protein var i underkant av 12 % bortsett fra målingen etter 6 timer (12,4 %). Vanninnholdet var stabilt mellom 65,1 – 65,9 % de første 24 timene etter tining, og det økte til $67,0 \pm 0,8$ % etter 168 timer (7 døgn). Askeinnholdet var 3,1 ved tining og stabilt på 3,0 % 6, 12, 24, 168 timer etter tining.

Tabell 7: Biokjemisk sammensetning av laksesild ble målt fra en 100 g samleprøve ved forskjellig tidspunkt etter tining. Totalt innhold av fett (n=15), proteiner (n=1), vann og aske (n=3) er oppgitt som gjennomsnitt og standardavvik.

Timer etter tining	Fett (%)	Protein (%)	Vann (%)	Aske (%)
0	$15,0 \pm 0,8$	10,6	$65,9 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,0$
6	$17,9 \pm 2,1$	12,4	$65,5 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,1$
12	$15,4 \pm 1,5$	11,5	$65,2 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,1$
24	$14,7 \pm 0,9$	10,5	$65,7 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,1$
168	$15,4 \pm 2,2$	10,8	$67,0 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,1$

4.3 Fettsyresammensetning

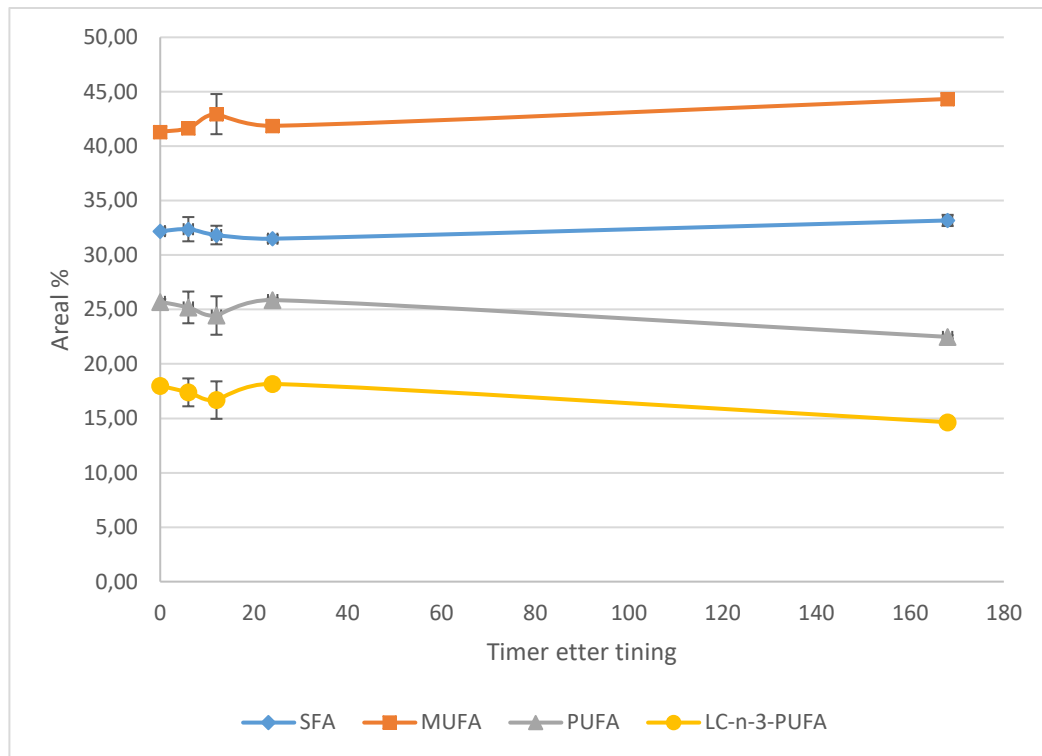
Fettsyresammensetningen i ekstrahert fett fra samleprøven av laksesild ble analysert. Ved tining hadde fettene en stor andel av SFA og MUFA i fettsyresammensetningen (tabell 8). Den største prosentandelen var MUFA ($41,31 \pm 0,16$), med spesielt stort innhold av 18:1 n-9 ($11,56 \pm 0,05$), 20:1 n-9 ($7,12 \pm 0,03$), 22:1 n-11 ($14,62 \pm 0,09$). Den nest største prosentandelen var SFA ($32,2 \pm 0,33$), der 14:0 ($7,04 \pm 0,11$) og 16:0 ($22,08 \pm 0,25$) hadde størst andel. Minst prosentandel av fettsyresammensetningen var PUFA ($25,7 \pm 0,25$), hvorav innholdet av EPA (C20:5 n-3) og DHA (C22:6 n-3) var henholdsvis $5,27 \pm 0,05$ og $11,99 \pm 0,13$ ved tining. Overordnet var fordelingen av fettsyresammensetningen uendret til og med 24 timer etter tining. Ved endt lagringsforsøk, 168 timer etter tining var prosentandelen SFA og MUFA økt til henholdsvis $33,18 \pm 0,51$ og $44,34 \pm 0,37$, mens PUFA ($22,48 \pm 0,15$), inkludert LC-n-3-PUFA ($14,46 \pm 0,45$) ble redusert (figur 10). Det prosentvise innholdet av DHA ble redusert i større grad enn EPA.

Tabell 8: Fettsyresammensetning (areal %) av laksesild. Prøver fra en samleprøve (ca. 100g) av laksesild lagret over tid (3°C); 0: ved tining, 6, 12, 24 og 168 timer (7 døgn) etter tining. Resultatet er oppgitt som gjennomsnitt og standardavvik av 3 paralleller.

Fettsyrer	Timer etter tining				
	0	6	12	24	168
C14:0	$7,04 \pm 0,11$	$7,21 \pm 0,22$	$6,98 \pm 0,30$	$7,02 \pm 0,06$	$6,94 \pm 0,07$
C16:0	$22,08 \pm 0,25$	$21,97 \pm 0,68$	$21,77 \pm 0,49$	$21,56 \pm 0,22$	$22,69 \pm 0,21$
C16:1 n-7	$3,60 \pm 0,05$	$3,56 \pm 0,22$	$3,55 \pm 0,05$	$3,62 \pm 0,03$	$3,82 \pm 0,11$
C18:0	$3,07 \pm 0,10$	$3,19 \pm 0,22$	$3,09 \pm 0,10$	$2,92 \pm 0,10$	$3,55 \pm 0,38$
C18:1 n-9	$11,56 \pm 0,05$	$11,39 \pm 0,16$	$11,49 \pm 0,06$	$11,65 \pm 0,06$	$12,27 \pm 0,10$
C18:1 n-7	$1,37 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,02$
C18:2 n-6	$1,36 \pm 0,01$	$1,37 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,09$
C18:3 n-3	$1,17 \pm 0,08$	$1,39 \pm 0,18$	$1,23 \pm 0,09$	$1,15 \pm 0,15$	$1,77 \pm 0,54$
18:3 n-4	$1,19 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,04$
C18:4 n-3	$4,00 \pm 0,03$	$3,88 \pm 0,22$	$3,97 \pm 0,14$	$3,96 \pm 0,02$	$3,54 \pm 0,07$
C20:1 n-9	$7,12 \pm 0,03$	$7,31 \pm 0,09$	$7,37 \pm 0,13$	$7,24 \pm 0,03$	$7,79 \pm 0,10$
C22:1 n-11	$14,62 \pm 0,09$	$15,06 \pm 0,69$	$15,23 \pm 0,41$	$14,95 \pm 0,07$	$15,97 \pm 0,27$
C22:1 n-9	$1,67 \pm 0,02$	$1,62 \pm 0,05$	$1,63 \pm 0,07$	$1,63 \pm 0,02$	$1,56 \pm 0,04$
C20:5 n-3	$5,27 \pm 0,05$	$5,10 \pm 0,40$	$5,25 \pm 0,32$	$5,32 \pm 0,07$	$4,48 \pm 0,10$
C24:1 n-9	$1,37 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,05$
C22:5 n-3	$0,73 \pm 0,00$	$0,71 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,05$	$0,73 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,04$
C22:6 n-3	$11,99 \pm 0,413$	$11,57 \pm 0,85$	$11,98 \pm 0,85$	$12,11 \pm 0,16$	$9,59 \pm 0,31$
Ukjent FA*	$0,79 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,00$	ID
Σ SFA	$32,2 \pm 0,33$	$32,37 \pm 1,11$	$31,84 \pm 0,85$	$31,5 \pm 0,34$	$33,18 \pm 0,51$
Σ MUFA	$41,31 \pm 0,16$	$41,66 \pm 0,33$	$41,99 \pm 0,33$	$41,87 \pm 0,2$	$44,34 \pm 0,37$
Σ PUFA	$25,7 \pm 0,25$	$25,19 \pm 1,46$	$24,45 \pm 1,77$	$25,87 \pm 0,16$	$22,48 \pm 0,15$
Σ LC-n-3-PUFA	$17,99 \pm 0,18$	$17,39 \pm 1,28$	$16,68 \pm 1,72$	$18,17 \pm 0,22$	$14,46 \pm 0,45$

* Ukjent FA: ukjent fettsyre i henhold til kjente standarder

IS: Intern standard (17:0, Heptadecanoic acid), ID: ikke detektert (<0,5 %), SFA: mettet fettsyre, MUFA: enummettet fettsyre, PUFA: flerumettet fettsyre og LC-n-3-PUFA: langkjedet flerumettet omega-3 fettsyre).

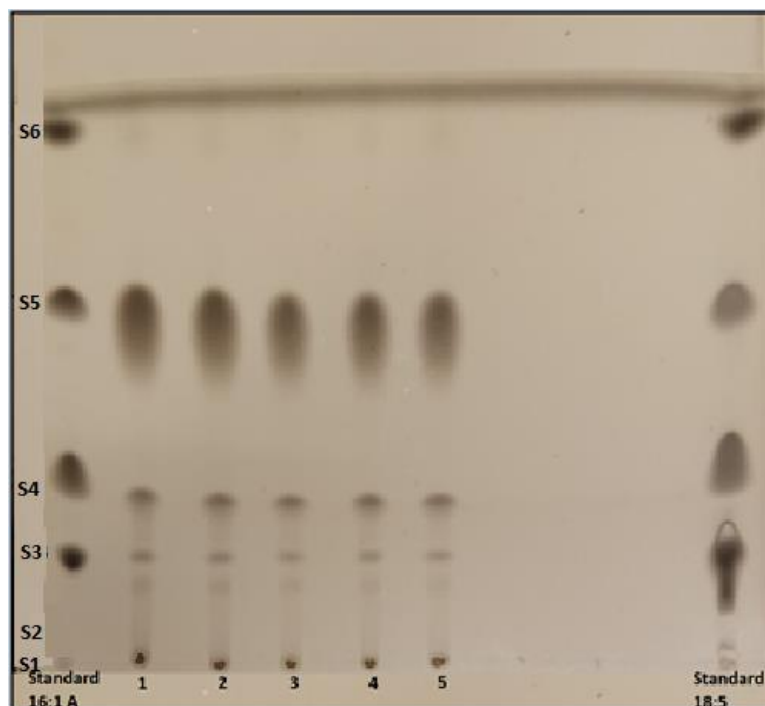


Figur 10: Endring i fettsyresammensetning fra fett ekstrahert fra laksesild over tid. Økning i prosentandel av SFA og MUFA, reduksjon i PUFA og LC-n-3-PUFA. SFA: mettet fettsyre, MUFA: enumettet fettsyre, PUFA: flerumetta fettsyre og LC-n-3-PUFA: langkjedet flerumettet omega-3 fettsyre.

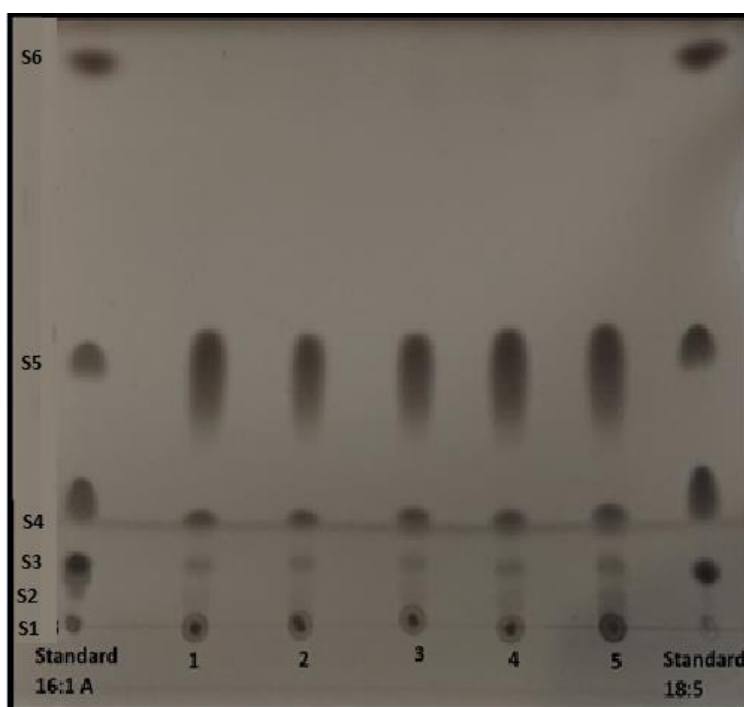
4.4 Fettklassesammensetning

Ekstrahert fett fra laksesild ble analysert ved tynnsjikt-kromatografi (TLC) og ble brukt for å visuelt bestemme fettklassene (n=5). Fettklassene i laksesild ved tining (figur 11) bestod av fettklassene: lecithin (fosfolipid, PL), monoasylglyserol (MAG), diasylglyserol (DAG), frie fettsyrer (FFA), triasylglyserol (TAG) og kolesterolster (KE). Fettklassene PL (S1) og MAG (S2) overlapper hverandre, og oppfattes som samme «flekk» der prøven ble avsatt. De to dominerende fettklassene i prøvene er TAG og FFA, mens KE kun kan skimtes.

Fettklassene i fett ekstrahert fra laksesild lagret over tid er vist i figur 12 (n=1). På TLC-platen ble det observert at samtlige prøver hadde samme fettklasser, som bestod av: PL, MAG, DAG, FFA, og TAG. Fettklassene i samtlige prøver varierer lite og følger samme trend, der TAG er den dominerende fettklassen, etterfulgt av FFA, PL, DAG og MAG. Det ble ikke påvist KE i prøvene. Fettklassene PL (S1) og MAG (S2) overlapper hverandre, og oppfattes som samme «flekk» der prøven ble avsatt. Fra figuren under kan det tyde på at andelen FFA økes gradvis mot høyre, fra spor 1 (ved tining) til spor 5 (168 timer).



Figur 11: Tynnsjiktskromatografi av fettklasser i fett ekstrahert fra laksesild ved tining (5 paralleller). Til venstre i figuren er kjent standard 16:1A som inneholder S1: Lecithin (fosfolipid (PL)), S2: Monopalmitin (MAG), S3: dipalmitin (DAG), S4: Tripalmitin (TAG), S5: Palmitinsyre (FFA), S6: Kolesteryl palmitat (KE). Kjent standard 2 (høyere), 18:5 inneholder 18:5: Lecithin (PL), Kolesterol, Triolein (TAG) og oljesyre (FFA), Kolesteryl oleate (KE)

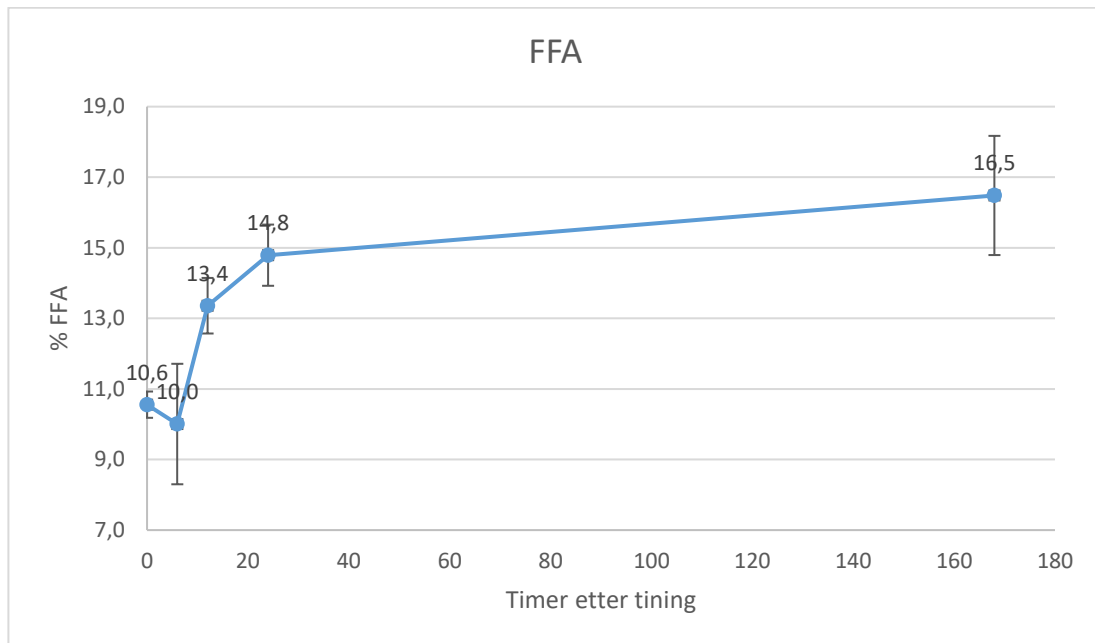


Figur 12: Tynnsjiktskromatografi av fettklasser fra Laksesild analysert 0 (spor 1), 6 (spor 2), 12 (spor 3), 24 (spor 4) og 168 timer (spor 5) etter tining. Til venstre i figuren er kjent standard 16:1A som inneholder S1: Lecithin (fosfolipid (PL)), S2: Monopalmitin (MAG), S3: dipalmitin (DAG), S4: Tripalmitin (TAG), S5: Palmitinsyre (FFA), S6: Kolesteryl palmitat (KE). Kjent standard 2 (høyere), 18:5 inneholder 18:5: Lecithin, (TAG) og oljesyre (FFA), Triolein kolesteryl oleate (KE).

4.5 Måling av oksidasjon

4.5.1 Måling av andel frie fettsyrer av det totale fettinnholdet

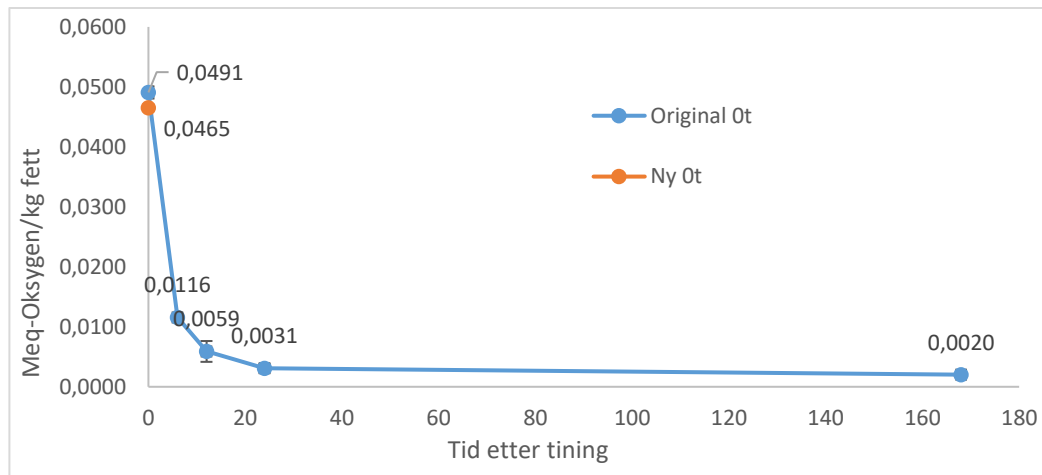
Mengde FFA ble målt i ekstrahert fett som en markør på nedbrytning og oksidasjon. Andel FFA i fett ekstrahert fra laksesild økte ved antall timer etter tining som en eksponentiell funksjon (figur 13), bortsett fra 6 timer etter tining. Gjennom lagringsperioden økte andelen FFA fra 10,6 % ved tining til 16,5 % 168 timer etter tining.



Figur 13: Endring i andelen FFA av det totale fettinnholdet fra en 100g samleprøve med laksesild timer etter tining. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik av 3 paralleller.

4.5.2 Måling av primære oksidasjonsprodukt (peroksidverdi)

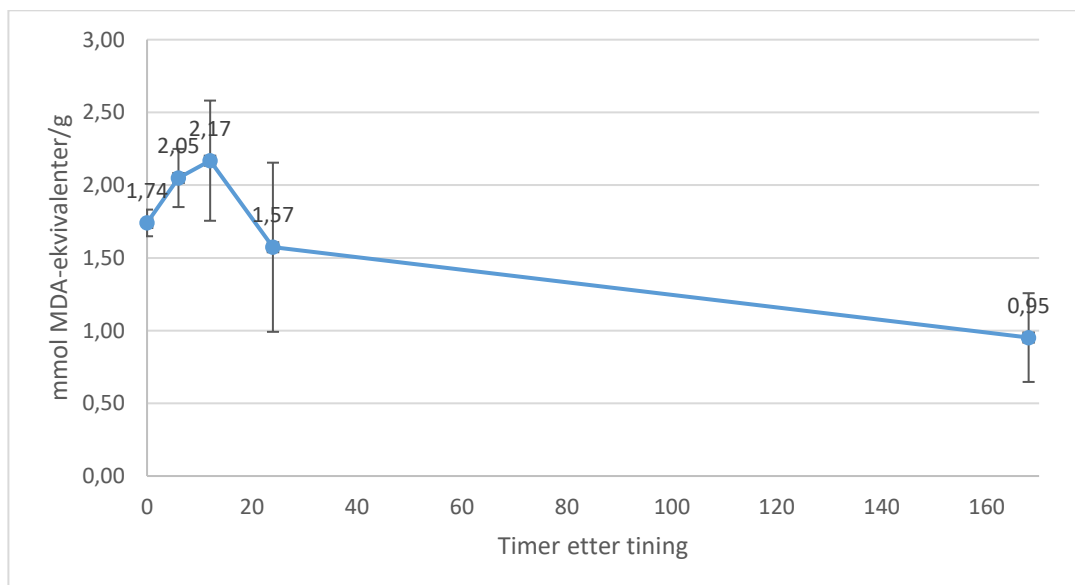
Primære oksidasjonsprodukt ble målt ved å analysere fett for peroksidverdi (PV) og resultatet ble presentert som milliekvivalenter oksygen/kg fett (M-eq O/kg). Det ble observert en tydelig trend (figur 14) i peroksidnivået. Ved tining innholdet fett 0,0491 ± 0,001 M-eq O/kg og det ble redusert raskt, innen 24 timer etter tining var peroksidnivået 0,0031 M-eq O/kg. Fra 24 til og med 168 timer etter tining ble det ikke observert betydelig endring, 0,002 M-eq O/kg 168 timer etter tining.



Figur 14: Endring i M-ekvivalenter Oksygen/kg av det primære oksidasjonsproduktet peroksid fra en 100g samleprøve med laksesild timer etter tining. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik av 2 paralleller. Rødt merke: ny 0 timer etter tining prøve.

4.5.3 Måling av sekundære oksidasjonsprodukter (TBARS)

TBARS kan reagere med en rekke sekundære oksidasjonsprodukt. Resultatene fra TBARS (figur 15) ble presentert som mmol MDA-ekvivalenter/g prøve. Fra samleprøven av laksesild timer etter tining, viste resultatene en tendens til en økning i MDA-ekvivalenter/g prøve fra og med 0, 6 og 12 timer etter tining. Deretter, fra 24 timer og ut lagringsforsøket ble MDA-ekvivalentene redusert til og med 168 timer (7 døgn) etter tining.



Figur 15: Endring av det sekundære oksidasjonsprodukt MDA i mmol MDA-ekvivalenter/g fra en 100g samleprøve med laksesild timer etter tining. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik av 2 paralleller.

4.6 Proteininnhold og aminosyresammensetning

Proteinsammensetning ble bestemt ved hjelp av aminosyreanalyse av totale aminosyrer. For beregning og presentasjon av innhold av protein i prøvene ble aminosyrer som var proteinbundet, subtrahert et vannmolekyl (totalt 17 av 20 AA).

4.6.1 Totale aminosyrer

Det totale aminosyreinnholdet (TAA) varierte mellom 104,94 – 124,25 mg/g laksesild fra tining frem til 7 dager etter tining (tabell 9). Resultatene viser en økning i mengde aminosyrer 6 og 12 timer etter tining (124,25 – 115,39 mg/g), for deretter å stabiliseres til 104,69 og 107,94 mg/g etter henholdsvis 24 og 168 timer etter tining. Det totale innholdet av essensielle aminosyrer (44,05 – 52,77 mg/g) og ikke essensielle aminosyrer (51,84 - 61,01 mg/g) følger samme trend som det totale aminosyreinnholdet.

Tabell 9: Aminosyresammensetning i laksesild, målt i en samleprøve på 100 g, ved tining, 6, 12, 24, 168 timer etter tining. Inndelt i ni essensielle AA og ti ikke essensielle AA (n=1).

Aminosyrer		Timer etter tining (mg/g laksesild)				
		0	6	12	24	168
Essensielle AA						
His	Histidin	2,63	3,25	3,04	2,54	2,64
Thr	Threonin	5,10	5,85	5,57	5,01	5,22
Ile	Isoleucin	4,37	5,19	4,88	4,36	4,47
Leu	Leucin	8,98	10,21	9,67	8,90	9,12
Val	Valin	5,24	6,08	5,72	5,17	5,35
Lys	Lysin	9,58	10,90	10,43	9,56	9,83
Met	Metionin	3,72	5,12	4,50	3,60	3,76
Phe	Fenylalanin	5,00	6,18	5,70	4,91	4,97
Trp	Tryptofan**	ID	ID	ID	ID	ID
Σ Essensielle AA		44,63	52,77	49,53	44,05	45,36
Ikke essensielle AA						
Arg	Arginin	9,82	10,29	8,57	10,42	10,08
Ala	Alanin	6,64	7,54	7,17	6,54	6,83
Asp	Asparginsyre*	8,22	9,84	9,14	8,06	8,39
Cys	Cystein	0,98	1,49	1,69	1,07	1,12
Gly	Glycin	5,80	6,82	6,32	5,43	5,73
Glu	Glutamatsyre*	16,55	19,66	18,15	16,34	17,14
Pro	Prolin	4,55	5,39	5,00	4,41	4,63
Ser	Serin	4,57	5,65	5,23	4,48	4,69
Tyr	Tyrosin	4,03	4,82	4,60	3,89	3,96
Tau	Taurin***	1,43	1,58	1,48	1,35	1,46
Σ ikke essensielle AA		61,16	71,48	65,86	60,64	62,58
Σ Proteinbundet AA		105,78	124,25	115,39	104,69	107,94

* Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamat- og asparginsyre.

** Tryptofan ble ikke detektert, ettersom det ødelegges fullstendig under syrehydrolysen.

*** Taurin (ikke proteinbundet AA) ikke tatt med i beregningene av det totale aminosyreinnholdet.

ID: Ikke detektert.

4.6.2 Frie aminosyrer

Frie aminosyrer (FAA) ble bestemt ved å fjerne store peptider og proteiner fra prøvene. Det totale innholdet av FAA (tabell 10) økte i mengde (mg/g) i takt med tid etter tining fra 0,57, 1,15, 2,50, 3,44 til 9,40 mg/g, henholdsvis 0, 6, 12, 24 og 168 timer etter tining. Andelen av EAA i de FAA økte i mengde (mg/g) i takt med tid etter tining fra 0,22, 0,60, 1,05, 1,65 til 4,78 mg/g, henholdsvis 0, 6, 12, 24 og 168 timer etter tining. Andelen av ikke-EAA var betraktelig større enn de EAA i de FAA, og økte i mengde (mg/g) i takt med tid etter tining fra 0,35, 0,55, 1,46, 1,79 til 4,61 mg/g, henholdsvis 0, 6, 12, 24 og 168 timer etter tining.

Tabell 10: Totalt frie aminosyrer gitt i mg/g fra en 100 g samleprøve laksesild lagret over tid. Inndelt i ni essensielle AA (for mennesker) og ti ikke essensielle AA (n=1).

Aminosyrer		Timer etter tining (mg/g laksesild)				
		0	6	12	24	168
Essensielle AA						
His	Histidin	ID	ID	ID	ID	0,23
Thr	Threonin	ID	0,13	0,15	0,18	0,47
Ile	Isoleucin	ID	ID	ID	0,12	0,40
Leu	Leucin	0,10	0,19	0,29	0,39	1,12
Val	Valin	ID	0,09	0,13	0,17	0,51
Lys	Lysin	0,12	0,20	0,32	0,41	0,98
Met	Metionin	ID	ID	ID	0,15	0,42
Phe	Fenylalanin	ID	ID	0,16	0,24	0,66
Trp	Tryptofan**	ID	ID	ID	ID	ID
Σ Essensielle AA		0,22	0,60	1,05	1,65	4,78
Ikke essensielle AA						
Arg	Arginin	ID	ID	0,23	0,28	0,74
Ala	Alanin	0,14	0,20	0,26	0,32	0,73
Asp	Asparbinsyre*	ID	ID	0,13	0,17	0,57
Cys	Cystein	ID	ID	ID	ID	ID
Gly	Glycin	0,06	0,08	0,09	0,11	0,23
Glu	Glutamatsyre*	0,15	0,18	0,26	0,26	0,80
Pro	Prolin	ID	ID	0,15	0,20	0,42
Ser	Serin	ID	0,09	0,14	0,19	0,47
Tyr	Tyrosin	ID	ID	0,20	0,27	0,65
Tau	Taurin***	0,65	0,62	0,66	0,67	0,62
Σ ikke essensielle AA		0,35	0,55	1,46	1,79	4,61
Σ Frie AA		0,57	1,15	2,50	3,44	9,40

* Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamat- og asparbinsyre.

** Tryptofan ble ikke detektert, ettersom det ødelegges fullstendig under syrehydrolysen.

*** Taurin (ikke proteinbundet AA) ikke tatt med i beregningene av de frie aminosyrene.

ID: ikke detektert.

5 Diskusjon

Det økende behovet for mat til en befolkning i vekst har ført til et ekstensivt søk etter nye og mer effektiv utnyttelse av eksisterende ressurser. Akvakultur står i dag for 47 % av den totale matproduksjonen fra havet og vokser årlig med 6 % biomasse (2000-2016), raskere enn noen annen matproduksjon på verdensbasis (FAO, 2018a). Akvakulturproduksjon av marin rovfisk, som for eksempel atlantisk laks (*Salmo salar*) krever fortsatt et stort kvantum av marine råvarer, til tross for at fôret over tid har fått et økende innslag av plantebaserte næringsstoffer (Ytrestøyl *et al.*, 2015). For å øke det globale utbytte av den totale biomassen som produseres i havene, og for å redusere biomassen som «går tapt» i energioverføringen blant organismene i den marine næringskjeden har det blitt foreslått å undersøke muligheten til utnyttelse av organismer fra lavere trofisk nivå. Det mesopelagiske fiskesamfunnet i Norskehavet domineres av fisk med lavt trofisk nivå (Hauge, 2018) og flere av disse artene er lite studert (IMR, 2017). Som nevnt innledningsvis, er disse nå av stor interesse på grunn av større biomasse enn først antatt. Det er en rekke utfordringer tilknyttet foredling, fangst, teknologiutvikling, kunnskap og investering før økonomisk og biologisk bærekraftig fangst og utnyttelse av mesopelagiske fiskearter kan oppnås (IMR, 2017). En av grunnene til at mesopelagisk i liten grad har vært fisket på, er at de ofte er små, skjøre og nedbrytes raskt (Hauge, 2018). Det overordnede målet med oppgaven var å dokumentere den biokjemiske sammensetningen av den mesopelagiske fisken laksesild, samt undersøke nedbryting av næringsstoffene, med særlig hensyn på fett.

Omtrent 20.000 fiskearter er kjent per i dag. Av disse, er få analysert for biokjemiske sammensetningen, og det er i hovedsak fisk med kommersiell verdi og som oftest fra den spiselige delen, fiskemuskelen.

Den mesopelagiske fisken laksesild ble analysert i denne oppgaven. Analyser ble utført på en samleprøve på ca. 100 g hel fisk (omtrent 100 fisk). Ved tining hadde laksesild et prosentinnhold av fett, protein, vann og aske på henholdsvis 15; 10,5; 66 og 3, til sammen 94,5 % av fisken. Prosentandelen som ikke er gjort rede for i den biokjemiske sammensetningen kan være karbohydrater, men siden fisk vanligvis har et lavt innhold av karbohydrater, er en plausibel forklaring at nøyaktigheten av utførelsen av metodene ikke har vært tilstrekkelig. I sammenlikning med en annen kommersiell mesopelagisk fisk som vassild (*Argentina silus*) med et fettinnhold på 3,3 g/100g i fiskemuskel (Sigurgisladóttir & Pálmadóttir, 1993), har laksesild altså et høyere fettinnhold med 15 %. Fettinnholdet er den bestanddelen som varierer mest hos fisk, og har vanligvis en karakteristisk sesongbasert kurve, med lavest fettinnhold rundt gytings sesong (Huss, 1995). Laksesilden som ble analysert i denne oppgaven ble fangstet

i september, som er i slutten av gytnings sesongen og det kan derfor antas at fettinnholdet skal være på det laveste. Tidligere forskning utført av Falk-Petersen *et al.* (1986) viste til at fettinnholdet (og fettsyresammensetning) ikke varierte i laksesild som ble fangstet i april og september. Det er også rapportert om høyt fettinnhold i andre mesopelagiske fiskeslag (lysprikkfisk (13%) og liten laksetobis (14%)) fra norske farvann (Wiech *et al.*, 2018). Ettersom fettinnholdet var uendret kan det antas at det høye fettinnholdet i laksesild er viktig for deres levesett som omfatter en DVM i vannmassene, som en måte å redusere bruken av energi på migrasjonen.

Laksesild har flere fettlagre i kroppen, spesielt rundt fordøyelseskanalen, gonadene, leveren og ved lysorganene, samt under fiskeskinnet og intramuskulært (Falk-Petersen *et al.*, 1986). Det kan derfor antas at disse fettlagrene, som brukes til både opplagsnæring og nøytral oppdrift (Falk-Petersen *et al.*, 1986), er begrunnelsen for det høye fettinnholdet. Ved tining av laksesild ble det observert store mengder fritt fett, ettersom fisken var dekt med en hinne av olje. De fleste fiskene var delvis eller helt uten skinn, som antageligvis har ført til at fettlagrene under skinnen ble frigjort ved håndtering og fangst. Dette kan være en av årsakene til at fisken går i oppløsning når den tas ut av vannet. Det vil dermed være svært viktig å finne en skånsom fangstmetode, slik at fiskeskinnet forblir intakt og fettene ikke blir frigjort, kontamineres eller forsvinner før det kommer til anvendelse.

Resultatene fra fettsyresammensetning av ferskt tint råstoff viste høyest innhold av MUFA, etterfulgt av SFA og lavest andel PUFA i laksesild. Dette bekrefter tidligere rapporterte funn (Falk-Petersen *et al.*, 1986). Innholdet av de essensielle fettsyrene LA og ALA var lavt i laksesild (<1,5 %), men innholdet av de helse- og forebyggende marine fettsyrene EPA og DHA var høyt. Det høye innholdet av omega-3 fettsyrer i forhold til omega-6 fettsyrer, ga laksesild et n-6/n-3 forhold på 0,05. Det lave innholdet av LA i laksesild gjør at den kan være fordelaktig som fôrkomponent, eller som erstatning for den store andelen av soyaolje (60% LA) som brukes i fôrindustrien, samt å gi oppdrettsfisk et høyere innhold av LC-n-3-PUFA. Laksesild er en god kilde til LC-n-3-PUFA, ettersom EPA og DHA utgjorde 18 % av det totale fettsyreinnholdet. Dette er på nivå med olje fra sild (*Clupea harengus*) (McGill & Moffat, 1992) og tran fra torsk (*Gadus morhua*) (Olsen, 2017) med henholdsvis 20,1 og 23,9 % LC-n-3-PUFA.

En grunn til at mesopelagisk fisk generelt sett har vist seg vanskelig å utnytte til human konsum er på grunn av det høye innholdet av voksesterer (wax esters, WE) (Catul *et al.*, 2001; IMR, 2017). Av de tre vanligste mesopelagiske fiskeartene i Norskehavet laksesild, nordlig lysprikkfisk og liten laksetobis (Hauge, 2018) er det imidlertid bare laksesild som ikke har et høyt innhold av WE (Falk-Petersen *et al.*, 1986; Wiech *et al.*, 2018). Dette bekreftes fra

resultater fra tynnsljktkromatografien (TLC) der fettklassene i laksesild ble analysert ved separasjon, og det bare ble funnet en antydning til WE i råstoffet. I påfølgende TLC analyse ved samtlige tidsintervaller etter tining var det derimot ikke påvist WE. Dette er i overenstemmelse med tidligere forskning av Falk-Petersen *et al.* (1986) hvor det ikke ble funnet WE i laksesild. Forekomsten av WE rett etter tining kan kun skimtes, og ettersom det ikke ble påvist WE i de påfølgende analysene, samt at det ikke er påvist i annen forskning velges det å ikke legge vekt på dette funnet videre. Lysprikkfisk og laksetobis har henholdsvis 105 og 130 g WE/kg, eller i overkant av 10% WE av våtvekt (Wiech *et al.*, 2018), som kommer av at disse mesopelagiske fiskene bruker WE som opplagsnæring og til å fremme oppdrift (Falk-Petersen *et al.*, 1986). Ettersom WE ikke blir absorbert i tarmen hos mennesker har det ifølge rapporten til Ling *et al.* (2008) blitt observert at konsum av oljefisk (*Ruvettus pretiosus*) og escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) som inneholder store mengder WE førte til «keriorrhea», en form for olje-diaré uten tap av veske. Det er ikke etablert et tolerabelt inntak for WE, men et inntak av 140 g escolar kan føre til keriorrhea (Ling *et al.*, 2009), og samme nivå av WE vil nås ved konsum av 240 g nordlig lysprikkfisk og 195 g liten laksetobis (Wiech *et al.*, 2018). Det kan dermed antas at konsum av disse mesopelagiske fiskeslagene fra norske farvann også vil kunne føre til uønskede symptomer. Voksestere blir ikke brutt ned ved koking eller frysing (Ling *et al.*, 2009) og ved bruk av disse fiskeslagene til humant konsum må det tas hensyn til innholdet av WE. I motsetning til mennesker, kan laksefisk absorbere WE, men fordøyelsen av WE er tregere enn TAG (Bogevik, 2011). I et fôringsforsøk med *Calanus finmarchicus* rik på WE til Atlantisk laks viste imidlertid Olsen *et al.* (2004) til ingen ugunstig effekt på vekst eller fettsyresammensetningen, med opp mot 30% av lipidene som WE i fôret. Det kan derfor antas at disse tallrike mesopelagiske fiskeslagene i Norskehavet kanskje er mer egnet til fiskefôr fremfor til humant konsum.

Oksidasjonsnivå er en viktig faktor i bestemmelsen av kvaliteten til fett. I denne oppgaven ble kvalitet av fett med hensyn på oksidasjonsnivå analysert ved måling av andel frie fettsyrer (FFA), primære oksidasjonsprodukt (PV) og sekundære oksidasjonsprodukt (MDA ekvivalenter) i laksesild. Et høyt innhold av FFA i fiskeolje reduserer kommersiell verdi siden det er bevist en direkte sammenheng mellom fiskeoljens kvalitet og FFA innhold (FAO, 1986). Dette kommer av at FFA er mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer bundet i TAG eller PL (Kinsella *et al.*, 1978) og er vist å fungere som prooksidanter i autoksidasjonen (Miyashita & Takagi, 1986). Det er derfor satt en øvre grenseverdi for innhold av FFA i marine oljer på 5 % til fiskefôr og 2 % til humant konsum (Windsor, 2001).

Innholdet av FFA av laksesild ved tinetidspunkt, var 10,6 %. Som tidligere nevnt er det ikke stor andel FFA i levende celler eller i ferskt råstoff, og ifølge rapporten til Falk-Petersen *et al.* (1986) hadde laksesild kun 0,3 % FFA. Analysen av FFA ble utført omtrent 4-5 måneder etter fangst, og fiskene hadde vært lagret ved -20°C i mørk beholder, med kontinuerlig eksponering til luft. Det er kjent at fet fisk ved fryselagring ved høy temperatur får et økt innhold av FFA (Refsgaard *et al.*, 2000). I kombinasjon med temperaturen, den ytre hinnen av olje som dekket laksesilden og kontinuerlig eksponering av oksygen, kan det høye innholdet av FFA i ferskt tint råstoff tyde på at det har pågått en lipolyse av TAG til FFA før de første analysene ble utført. En annen mulig årsak til den høye prosentandelen FFA er relatert til analysen. Andel FFA ble analysert ved bruk titreringsanalyse, der andelen FFA ved subjektiv vurdering når løsningen fikk fargeomslag. Denne subjektive vurderingen kan ha gitt usikre resultater og er antageligvis begrunnelsen for de store standardavvikene. Før lagringsforsøket ble en samleprøve av omtrent 100 g frossen laksesild kvernet og samlet i en tildekt lufttett «zip-lock» pose, for å sikre jevnest mulig fordeling av innhold i prøvene. Dette førte imidlertid også til at fordøyelsesenzymer fra fisken og føde fra mage- og tarmsystemet ble blandet med fiskekjøttet. Enzymatisk hydrolyse er en velkjent utfordring og vanlig hos industrifisk og usløyd fisk som lagres med innvollene in takt (Lynum & Rustad, 1997). Fisk kan ha store mengder lipaser som ved død vil bryte ned fiskens eget vev. Hydrolyse av fettsyrer er en enzymkatalysert reaksjon, reaksjonshastigheten avhenger av temperatur og kan også være virksomme ved fryselagring ved høy temperatur (Huss, 1995).

Laksesilden er en liten og fet fisk med tynt skinn, alle faktorer som påvirker nedbrytningshastigheten i uønsket retning (Huss, 1995). Den økte temperaturen (tining) i sammenheng med homogenisering av fiskene i kombinasjon med en stor mengde fritt fett som var eksponert til luft, førte sannsynligvis til den raske økningen i FFA (24 timer). Prøven som ble analysert 6 timer etter tining hadde ikke forhøyet innhold av FFA sammenliknet med tinetidspunktet (figur 13). Ved dette tidspunktet var imidlertid standardavviket høyt (1,8) og det er vanskelig å trekke en konklusjon. Økning i innholdet av FFA fra 24 timer til 168 timer (7 døgn) etter tining var imidlertid moderat.

Det ble ikke observert en reduksjon i TAG på TLC-platen over tid i lagringsforsøket, selv om det er å forvente at TAG har blitt spaltet til FFA, DAG og MAG av triglyserid lipaser. Analysen av TLC er en enkel kvalitativ analyse for å klassifisere fett, men resultatene fra dette forsøket kan indikere at analysen ikke er egnet til å kvantifisere nedbrytning, ettersom det er for liten endring i fettclassesammensetningen til å oppdage en endring.

Det ble ikke observert noen endring i fettsyresammensetningen de 24 første timene etter tining i lagringsforsøket. Ved enden av lagringsforsøket, etter 7 døgn, ble en trend observert, der andelen PUFA inkludert LC-n-3-PUFA ble redusert, samtidig som det var en økning i andelen SFA og MUFA.

Som tidligere nevnt kan resultatene tyde på at det foregikk nedbrytelse og oksidasjon av fett allerede før de første analysene ble gjennomført (4-5 måneder). Det er rapportert at degraderingen av LC-n-3-PUFA skjer raskere ved høy frysetemperatur og i sei (*Pollachius virens*) fryselagret ved -10°C i 9 måneder ble LC-n-3-PUFA redusert med 25% (Dulavik *et al.*, 1998). Det kan antas at oksidasjon av fettsyrene, spesielt LC-n-3-PUFA har ført til at innholdet av EPA og DHA var lavere enn det sannsynligvis skulle ha vært i ferskt råstoff. Innholdet av EPA og DHA var henholdsvis 5,3 og 12 % ved tining. Sammenliknet med fettsyresammensetningen av laksesild (fangstet i september) undersøkt i rapporten Falk-Petersen *et al.* (1986) ble det rapportert at EPA og DHA var henholdsvis 5,3 og 0,8 % av det fettsyresammensetningen. Resultatene i denne oppgaven, sannsynliggjør at innholdet av de helsefremmende omega-3 fettsyrene utgjør en større andel av det totale fett enn tidligere antatt, selv etter en lengre periode med oksidasjon.

Graden av oksidasjon av laksesild lagret ved forskjellige tidsintervall etter tining ble målt, 7 måneder etter fangst. Dette ble analysert ved å måle innholdet av primære (figur 14) og sekundære (figur 15) oksidasjonsprodukter. Også ut fra disse resultatene kan det antas at oksidasjon i laksesilden var langt på vei da de første analysene ble utført. Laksesild var frosset i blokk med samtlige bestanddeler intakt, som medfører at det også har vært blod tilstede i fisken. Blod inneholder transisjonsmetallene jern og kobber, kjente prooksidanter, som antas å ha bidratt i oksidasjonsforløpet. Den store andelen flerumettede, lett oksiderte, LC-PUFA (25 %) bidrar også til ustabilitet (Olsen, 2017). Det er derfor rimelig å anta at laksesilden allerede ved tining var kommet til slutten av kjedereaksjonen, samtidig som termineringsfasen var påbegynt.

De primære oksidasjonsproduktene (peroksid) var på det høyeste nivået målt ved tining og innholdet sank deretter raskt de påfølgende timene. De sekundære oksidasjonsproduktene (MDA) økte til og med 12 timer for deretter å reduseres. Tolv timer etter tining er det nærliggende å tro at termineringsfasen slo inn for fullt og at de sekundære oksidasjonsforbindelsene reagerte med hverandre noe som førte til en reduksjon i de sekundære oksidasjonsproduktene.

Det sekundære oksidasjonsproduktet MDA dannes ved oksidasjonsprosesser av fettsyrer med 3 eller flere dobbeltbindinger. Metoden som ble brukt for å måle andelen MDA i laksesild var spektrofotometrisk. Den mørke fargen til samleprøven av laksesild gjorde at prøvene måtte fortynnes 100 ganger, og dette første antageligvis til de store standardavvikene mellom parallellene. Metoden er også lite egnet til bruk av sammenligning av produkter med oksidativ endring, ettersom forskjellig fettsyresammensetning påvirker dannelsen av MDA forskjellig (McClements & Decker, 2012). Det ble ikke sett noen endring i fettsyresammensetningen av laksesild lagret inntil 24 timer, men 7 døgn etter tining ble det observert en reduksjon i andel PUFA. Denne reduksjonen i PUFA kan antageligvis ha ført til at mindre mengde MDA ble dannet.

Det totale proteininnholdet i laksesild ble bestemt til omtrent 10,5 %, omtrent 105 g protein per kg. Av dette var 45 g per kg laksesild essensielle aminosyrer. Protein er den mest kostbare og viktigste fôringrediensen (Wilson, 2003), og kvaliteten av proteinene spiller en viktig rolle. Fordøyeligheten av fiskekjøtt er som kjent bedre enn animalsk kjøtt på grunn av det lave innholdet av bindevevsproteinene kollagen. Kvaliteten av proteinene i fiskens skinn, bein og bindevevsproteiner og innvoller er av lavere kvalitet enn de resterende delene av fisken (Huss, 1995). Resultatene viste (tabell 9) at laksesild inneholdt samtlige EAA, bortsett fra tryptofan. Tryptofan blir ødelagt i syrehydrolysen og blir derfor ikke detektert. Det er kjent at aminosyrene metionin, histidin og tryptofan kan bli oksidert av oksidasjonsprodukter (Damodaran, 2012), men det ble ikke påvist en endring i disse AA. De vanligste begrensende AA i mat er lysin, threonin, tryptofan, samt de svovelholdige AA metionin og cystein (Damodaran, 2012). Laksesild hadde et høyt innhold av disse begrensede AA, som var over referansenivået etablert av FAO/WHO/UNU (2007), for behovet for EAA for voksne friske mennesker og fisk (tabell 2). Som fôrprotein, for fisk, var innholdet av fenylalanin (og tyrosin) i laksesild så vidt over referansenivået. Metionin er ofte den første begrensende AA i fiskefôr med et høyt innhold av planteprotein (Mai *et al.*, 2006; Nordrum *et al.*, 2000) og innholdet av metionin i laksesild var godt over minstemålet for referansenivået for fôrprotein. I sammenligning med soyamel var innholdet av aminosyren metionin (mg/g prøve) over dobbelt så høyt i laksesild (Rackis *et al.*, 1961). Metionin brukes blant annet til syntese av taurin i fisk (Wilson, 2003). Taurin er en svovelholdig ikke-proteinbundet AA, som spiller en viktig rolle i blant annet fordøyelse av fett, antioksidativt forsvar og utvikling av muskulære systemer (Fang *et al.*, 2002). Taurin er i rikelig kvantum i fiskemel og resultatene i denne oppgaven viser at laksesild er intet unntak. Fra samleprøven fra laksesild var innholdet av taurin 143 mg/100 g. Resultatene viste til at laksesild har et høyere innhold av taurin enn filet fra oppdrettslaks, torsk

og hyse (Dragnes *et al.*, 2008). Det er vist at tilsetning av taurin i fiskefôr basert på kun planteprotein (til rovfisk) øker fôreffektiviteten (Gibson Gaylord *et al.*, 2007).

Ved fordøyelse av proteiner, spaltes de av enzymer (pepsiner) i fordøyelsessystemet, til peptider eller frie AA. Over tid i lagringsforsøket ble det et økende innhold av frie aminosyrer i samleprøven av laksesild. Dette kommer antageligvis av at når laksesilden ble kvernet, ble også pepsiner blandet sammen med fiskekjøttet. Normalt sett er innholdet av FAA i organisk vev lavt, ettersom AA i kroppen bundet sammen og er bestanddeler i proteiner. Fisk er kjent for å være avhengig av mer aminosyrer som energikilde i metabolismen enn terrestriske dyr (rotter) (Wilson, 2003). Innholdet av det ikke-proteinbundne AA taurin holdes stabil gjennom det 7 dager lange lagringsforsøket.

6 Konklusjon

Målet med oppgaven var å dokumentere næringsinnholdet i mesopelagisk fisk, samt nedbrytningen av næringsstofferene i laksesild.

Den mesopelagiske fisken laksesild hadde et prosentinnhold av fett, protein, vann og aske på henholdsvis 15; 10,5; 66 og 3, til sammen 94,5 %. Laksesild hadde en lav n-6/n-3 ratio (0,05) og de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA utgjorde 18 % av fettsyrene. Laksesild inneholder tilstrekkelig av EAA for både mennesker og fisk. Laksesild har et relativt høyt innhold av den svovelholdige AA taurin.

Laksesild er en liten fet fisk, fettene er umettet og tynt skinn, faktorer som fører til hurtig nedbrytning. Etter 7 dager lagring var andelen PUFA redusert, spesielt LC-n-3-PUFA, andelen SFA og MUFA var økt. Det totale innholdet av fett, protein, vann og aske var uendret. Råstoffet av laksesild hadde et høyt innhold av FFA, fettene var nedbrutt før arbeidet startet. Syv måneder etter fangst ble oksidasjonen anslått å være i slutten av progagerinsfasen, og termineringsfasen var startet.

7 Referanseliste

- Bakketeig, I. E., Gjøsæter, H., Hauge, M., Sunnset, B. H. & Toft, K. Ø. (Red.) 2015. Havforskningsrapporten 2015. Fisken og havet, særnr. 1-2015.
- Bogevik, A. S. (2011). Marine wax ester digestion in salmonid fish: a review. *Aquaculture Research*, 42(11), 1577-1593.
- Bruinsma, J. (2009). The resource outlook to 2050: by how much land, water and crop yields need to increase by 2050? *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 33.
- Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86 (6), 1505-1519.
- Catul, V., Gauns, M. & Karuppasamy, P. (2001). A review on mesopelagic fishes belonging to family Myctophidae. *Rev Fish Biol Fisheries*, 21, 339–354.
- Cederholm, T. (2017). Fish consumption and omega-3 fatty acid supplementation for prevention or treatment of cognitive decline, dementia or Alzheimer's disease in older adults – any news? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(2), 104-109.
- Clark, C. W. & Levy, D. A. (1988). Diel vertical migrations by juvenile sockeye salmon and the antipredation window. *American Naturalist*, 131(2).
- Cresswell, K. A., Tarling, G. A., Thorpe, S. E., Burrows, M. T., Wiedenmann, J. & Mangel, M. (2009). Diel vertical migration of Antarctic krill (*Euphausia superba*) is flexible during advection across the Scotia Sea. *Journal of Plankton Research*, 31(10), 1265-1281.
- Damodaran, S. (2012). Amino Acids, Peptides, and Proteins. S. Damodaran, K. L. Parkin & O. R. Fennema (Red.), *Fennema's Food Chemistry* (utg. 4, s. 217-330). Boca Raton: CRC Press.
- David, J. H. M. (1987). Diet of the South African fur seal (1974–1985) and an assessment of competition with fisheries in southern Africa. *South African Journal of Marine Science*, 5(1), 693-713.
- Dragnes, B. T., Larsen, R., Erntsen, M. H., Mæhre, H. & Elvevoll, E. O. (2008). Impact of processing on the taurine content on processed seafood and their corresponding unprocessed raw materials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2), 143-152.
- Dulavik, B., Sørensen, N. K., Barstad, H., Horvli, O. & Olsen, R. L. (1998). Oxidative stability of frozen light and dark muscles of saithe (*Pollachius virens* L.). *Journal of Food Lipids*, 5(3), 233-245.
- Ebert, D. A., Compagno, L. J. V. & Cowley, P. D. (1992). A preliminary investigation of the feeding ecology of squaloid sharks off the west coast of southern Africa. *South African Journal of Marine Science*, 12(1), 601-609.
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal*, 10(7).
- Elvevoll, E. O., Eilertsen, K.-E., Brox, J., Dragnes, B. T., Falkenberg, P., Olsen, J. O., Østerud, B. (2008). Seafood diets: Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids. *Atherosclerosis*, 200(2), 396-402.
- Falk-Petersen, I.-B., Falk-Petersen, S. & Sargent, J. (1986). Nature, origin and possible roles of lipid deposits in *Maurolicus muelleri* (Gmelin) and *Benthosema glaciale* (Reinhart) from Ullsfjorden, northern Norway. *Polar Biology*, 5(4), 235-240.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- FAO. (1986). The production of fish meal and oil. F. F. T. Paper, vol. 142, FAO, Roma, 63.

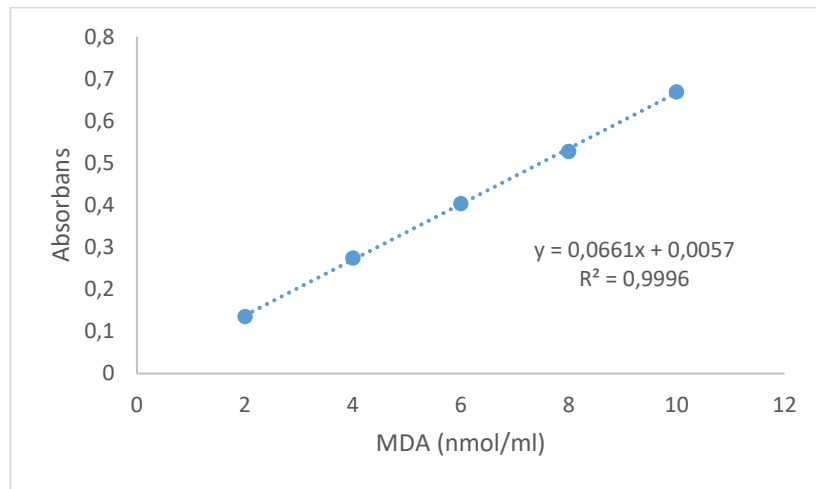
- FAO. (2018a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 (SOFIA) - Meeting the sustainable development goals. *The state of the world, 2019*. Roma.
- FAO. (2018b). Transforming Food and Agriculture to Achieve the SDGs: 20 interconnected actions to guide decision-makers. *Technical Reference Document*. Roma. 132.
- FAO/WHO/UNU (2007) *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*. World Health Organization, Geneva, Sveits.
- Fielding, B. A. (2017). Ω -3 index as a prognosis tool in cardiovascular disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 20(5), 360-365.
- Fiskeridirektoratet. (2018). *Handlingsplan 2018*: Fiskeridirektoratet.
- FN. (2019, 10. april). FNs bærekraftsmål. Hentet fra <https://www.fn.no/Om-FN/FNs-baerekraftsmaal>
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Fortier, M., Fortier, L., Hattori, H., Saito, H. & Legendre, L. (2001). Visual predators and the diel vertical migration of copepods under Arctic sea ice during the midnight sun. *Journal of Plankton Research*, 23(11), 1263-1278.
- Gardner, H. W. (1983). Effect of lipid hydroperoxides on food components. I J. W. Finley & D. E. Schwass (Red.), *Xenobiotics in Foods and Feeds* (bd. 234, s. 63-84). Washington American Chemical Society.
- Gibson Gaylord, T., Barrows, F. T., Teague, A. M., Johansen, K. A., Overturf, K. E. & Shepherd, B. (2007). Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 269(1), 514-524.
- Giske, J., Aksnes, D., Baliño, B., Kaartvedt, S., Lie, U., Nordeide, J., Aadnesen, A. (1990). Vertical distribution and trophic interactions of zooplankton and fish in Masfjorden, Norway. *Sarsia*, 75(1), 65-81.
- Gjørøseter, J. & Kawaguchi, K. (1980). A review of the world resources of mesopelagic fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, 193, 151.
- Gjørøseter, J. (1981). Life history and ecology of *Maurolicus muelleri* (Fonostomatidae) in Norwegian water. *Fiskeridirektorates skrifter, Serie Havundersøkelser*, 17, 109-131.
- Grimsmo, L., Almås, K. A. & Hognes, E. S. (2017). *Industriell utvikling av et mesopelagisk fiske - miljøeffekter*: SINTEF Ocean.
- Hauge, M. (2018, 7. mars). Mesopelagisk fiskeri: Muligheter og begrensninger. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/nyheter/2018/mars/mesopelagisk-fiskeri-muligheter-og-begrensninger>
- Hedelin, M., Chang, E. T., Wiklund, F., Bellocco, R., Klint, Å., Adolfsson, J., Bälter, K. A. (2007). Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *International Journal of Cancer*, 120(2), 398-405.
- Hidalgo, M. & Browman, H. I. (2019). Developing the knowledge base needed to sustainably manage mesopelagic resources. *ICES Journal of Marine Science* 76(3), 609-615.
- Horwitz, W. (2004). *Official methods of analysis of the AOAC international*. AOAC international, Gaithersburg, MD, USA.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical paper nr 348*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- IMR. (2017). Mesopelagic Initiative: Unleashing new marine resources for a growing human population. 36. Hentet fra https://www.hi.no/filarkiv/2017/rad-bestander_og_ressurser-mesopelagic-initiative-unleashing-new-marine-resources-for-a-growing-human-population.pdf/nb-no

- Irigoiien, X., Klevjer, T. A., Røstad, A., Martinez, U., Boyra, G., Acuña, J. L., Kaartvedt, S. (2014). Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean. *Nature Communications*, 5, 3271.
- Jackson, S. (1988). Diets of the White-Chinned Petrel and Sooty Shearwater in the Southern Benguela Region, South Africa. *The Condor: Ornithological Applications*, 90(1), 20-28.
- Jensen, C. L. (2006). Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1452-1457.
- Kaartvedt, S., Knutsen, T., Holst, J. & Kaartvedt, S. (1998). Schooling of the vertically migrating mesopelagic fish *Maurollicus muelleri* in light summer nights. *Marine Ecology Progress Series*, 170, 287-290.
- Ke, P. J., Woyeboda, A. D., Regier, L. W. & Ackman, R. G. (1976). An Improved Titrimetric Method for Determination of Free Fatty Acid in Fish Oils. *Environment Canada, Fisheries and Marine Service, Techn. Branch, Halifax, Nova Scotia*, 61, 1-4.
- Kim, S.-K. & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.
- Kinsella, J. E., Shimp, J. L. & Mai, J. (1978). The proximate composition of several species of freshwater fishes. *Food Life Sci Bull*, 69.
- Lam, V. & Pauly, D. (2005). Mapping the global biomass of mesopelagic fishes. *Sea Around Us Project Newsletter* 30(4).
- Lindeman, R. (1942). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23, 399.
- Ling, K. H., Cheung, C., Cheng, S., Cheng, L., Li, S., Nichols, P., Graham, A. (2008). Rapid detection of oilfish and escolar in fish steaks: A tool to prevent keriorrhea episodes. *Food Chemistry*, 110(2), 538-546.
- Ling, K. H., Nichols, P. D. & But, P. (2009). Chapter 1 Fish-Induced Keriorrhea. *Advances in Food and Nutrition Research*(57), 1-52
- Lipiński, M. R. (1992). Cephalopods and the Benguela ecosystem: trophic relationships and impact. *South African Journal of Marine Science*, 12(1), 791-802.
- Lynum, L. & Rustad, T. (1997). *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring* (utg. 2). Trondheim: Tapir.
- Maehre, H. K., Edvinsen, G. K., Eilertsen, K.-E. & Elvevoll, E. O. (2016). Heat treatment increases the protein bioaccessibility in the red seaweed dulse (*Palmaria palmata*), but not in the brown seaweed winged kelp (*Alaria esculenta*). *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 581-590.
- Mai, K., Wan, J., Ai, Q., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, L., Li, H. (2006). Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*, 253(1), 564-572.
- McClements, D. J. & Decker, E. A. (2012). Lipids. S. Damodaran, K. L. Parkin & O. R. Fennema (Red.), *Fennema's Food chemistry* (utg. 4, s. 155-217). Boca Raton: CRC Press.
- McGill, A. S. & Moffat, C. F. (1992). A study of the composition of fish liver and body oil triglycerides. *Lipids*, 27(5), 360-370.
- Mierke-Klemeyer, S., Larsen, R., Oehlenschläger, J., Maehre, H., Elvevoll, E. O., Bandarra, N., Lutén, J. (2008). Retention of health-related beneficial components during household preparation of selenium-enriched African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets. *European Food Research and Technology*, 227(3), 827-833.
- Miyashita, K. & Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(10), 1380-1384.

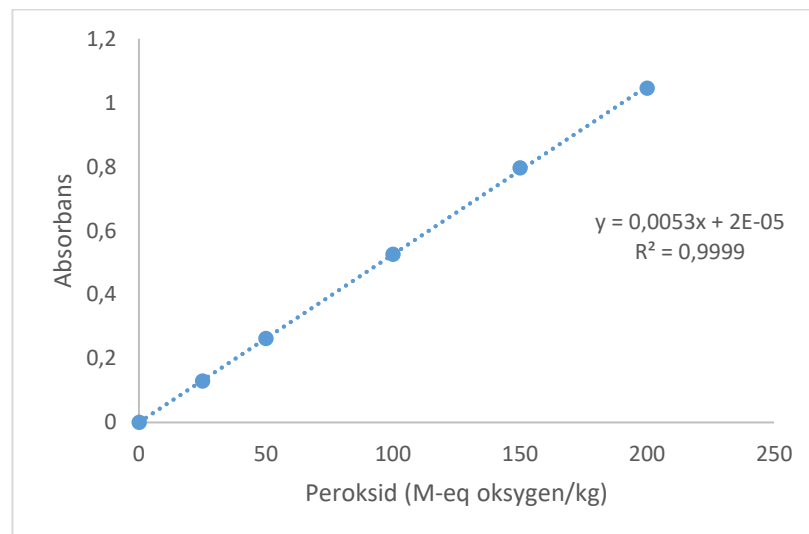
- Moore, S. & Stein, W. H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. I *Methods in Enzymology* (bd. 6, s. 819-831): Academic Press.
- Nordrum, S., Krogdahl, Å., Røsjø, C., Olli, J. J. & Holm, H. (2000). Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime. *Aquaculture*, 186(3), 341-360.
- Olsen, R. E., Henderson, R. J., Sountama, J., Hemre, G. I., Ringø, E., Melle, W. & Tocher, D. R. (2004). Atlantic salmon, *Salmo salar*, utilizes wax ester-rich oil from *Calanus finmarchicus* effectively. *Aquaculture*, 240(1), 433-449.
- Olsen, R. L. (2017). Lipidkjemi : med vekt på fisk. Kompendium 4. utg. Tromsø: Universitetet i Tromsø.
- Parin, N. V. & Kobylansky, S. G. (1996). Diagnosis and distribution of fifteen species recognized in genus *Maurolicus* cocco (Sternoptichydae, Stomiiformes) with a key to their identification. *Cybium*, 20, 185-195.
- Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M. & Yu, L. (2003). Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Cold-pressed Edible Seed Oils. *Journal of Food Science*, 68(4), 1240-1243.
- Rackis, J. J., Anderson, R. L., Sasame, H. A., Smith, A. K. & VanEtten, C. A. (1961). Amino acids in Soybean Hulls and oil meal fractions. *Agricultural and food chemistry*, 9, 409-412.
- Refsgaard, H. F., Brockhoff, P. M. B. & Jensen, B. (2000). Free Polyunsaturated Fatty Acids Cause Taste Deterioration of Salmon during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3280-3285.
- Robertson, D. A. (1976). Planktonic stages of *Maurolicus Muelleri* (Teleostei. Sternoptichidae) in New Zealand waters. *N. Z. J. Mar. Fre.thw*, (10), 311-328.
- Rose, H. G. & Oklander, M. (1965). Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res*, 6, 428-431.
- Ruxton, C. (2004). Health benefits of omega-3 fatty acids. *Nursing Standard*. 18(48), 38-42.
- Salvanes, A. G. & Nordeide, J. T. (1993). Dominating sublittoral fish species in a west Norwegian fjord and their trophic links to cod (*Gadus morhua* L.). *Sarsia*, 78(3-4), 221-234.
- SAM. (2017). *Food from the Oceans - How can more food and biomass be obtained from the oceans in a way that does not deprive future generations of their benefits?* (Scientific Opinion). Brussels: European Commission.
- Sattar, A., DeMan, J. M. & Alexander, J. C. (1976). Effect of wavelength on light induced quality deterioration of edible oils and fats. *Effect of wavelength on light induced quality deterioration of edible oils and fats.*, 9(3), 108-113.
- Schuchardt, J. P. & Hahn, A. (2013). Impact of long-chain polyunsaturated fatty acids on cognitive and mental development. F. D. Meester, R. Watson & S. Zibadi (Red.) *Omega-6/3 Fatty Acids. Nutrition and Health*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Shahidi, F. & Finley, J. W. (2001). *Omega-3 fatty acids: chemistry, nutrition, and health effects*, Washington, DC; New York.
- Shahidi, F. & Spurvey, A. (1996). Oxidative stability of fresh and heat-processed dark and light muscles of mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal of Food Lipids*, 3(1), 13-25.
- Sidhu, K. S. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(3), s. 336-344.
- Sigurgisladóttir, S. & Pálmadóttir, H. (1993). Fatty acid composition of thirty-five Icelandic fish species. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(11), 1081-1087.

- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*, 20(1), 77-90.
- Skelly, D. K., Post, D. M., Smith, M. D., Lovejoy, T. E. & Hutchinson, G. E. (2011). *The Art of Ecology*. New Haven, USA: Yale University Press.
- Staby, A. (2010). *Seasonal dynamics of the vertical migration behaviour of mesopelagic fish* (Doktoravhandling). University of Bergen, Bergen.
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H. (1959). Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 31(2), 307-308.
- Tacon, A. J. & Metian, M. (2013). Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 22-38.
- Trebilco, R., Baum, J. K., Salomon, A. K. & Dulvy, N. K. (2013). Ecosystem ecology: size-based constraints on the pyramids of life. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(7), 423-431.
- 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), 1-7.
- UN. (2017). *World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables*. United Nations, New York, USA.
- Vermeulen, S. J., Campbell, B. M. & Ingram, J. (2012). Climate Change and Food Systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 37(1), 195-222.
- Whitaker, J. R. (1991). lipoxygenases. I D. R. Robinson & N. A. M. Eskin (Red.), *Oxidative enzymes in foods* (s. 175 - 215). England: Elsevier science publishing.
- Wiech, M., Duinker, A. & Sanden, M. (2018). *Kartlegging av fremmedstoffer i mesopelagiske arter fra norske farvann-Mesopelagisk fisk fra Norskehavet og Sognefjorden*. (HI – rapport fra havforskningen 2018:36). Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Wilson, P. R. & Halver, J. E. (1986). Protein and Amino Acid Requirements of Fishes. *Annual Review of Nutrition*, 6(1), 225-244.
- Wilson, R. P. (2003). 3 - Amino Acids and Proteins. I J. E. Halver & R. W. Hardy (Red.), *Fish Nutrition (Third Edition)* (s. 143-179). San Diego: Academic Press.
- Windsor, M. L. (2001). Torry Advisory Note No. 49. *FAO, Department of trade and industry, Torry Research station*.
- Witte, V. C., Krause, G. F. & Bailey, M. E. (1970). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, (35)5, 582-585.
- Packer, N. M. (1994). Lipases: their structure, Biochemistry and Application. P. Woolley & S. Petersen (Red.). *Biochemical Education*, 22(4) (s. 216). Cambridge: university press.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17.
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374.

8 Vedlegg



Vedlegg 1: Standardkurve for absorpsjon av MDA (nmol/ml) målt ved 532 nm.



Vedlegg 2: Standardkurve for absorpsjon av peroksidverdi (M-eq oksygen/kg) målt ved 500 nm.