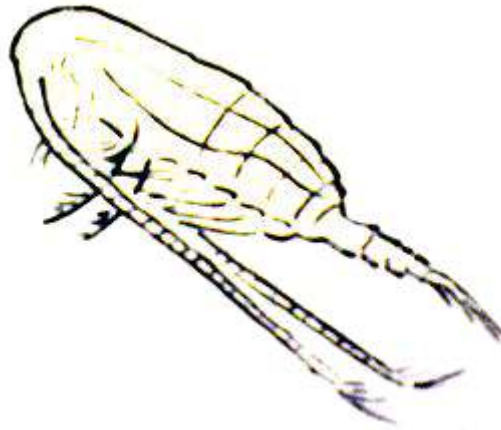
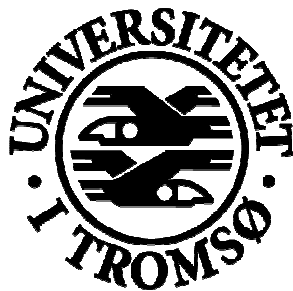


Olje fra raudåte (*Calanus finmarchicus*).
Oksidativ stabilitet, fettklasser og
karotenoidinnhold



Alice Marie Pedersen

Masteroppgave i biologi
Studieretning – Marin bioteknologi
(60stp)



Institutt for marin bioteknologi
Norges fiskerihøgskole
Universitetet i Tromsø
November 2007

Forord

Denne oppgaven ble utført i samarbeid med Calanus AS. En stor takk til Kurt Tande og Gunnar Rørstad for å ha gitt meg interessante arbeidsoppgaver og problemstillinger. Jeg har fått muligheten til å jobbe med raudåte både som masterstudent og via internship i bedriften.

Tiden som masterstudent ved IMAB har utvilsomt vært en positiv og lærerik periode og jeg har fått jobbe med et spennende fagfelt i et flott arbeidsmiljø. Tusen takk til Ragnar L. Olsen for rolig, kyndig og tålmodig hjelp, enkelt oppsummert: alle tiders veiledning.

Tusen takk til Hanne for uvurderlig hjelp på laboratoriet og for mange hyggelige kaffepauser, og til Svein Kristian for god hjelp og forklaring. Takk til Silje for punktering av ”rosa bobler” og livets realiteter servert med en herlig humor.

Til min fantastiske Jørgen; tusen takk. Du stiller opp, er tålmodig som få og det finnes ikke et problem du ikke kan løse. Tusen takk til mamma, pappa og Siw Anne for all slags støtte og oppmuntring gjennom alle mine år som student.

Og til slutt, tusen takk til de trivelige medstudentene Karoline, Ole, Birthe og Ingvill som har vært med å skape et veldig hyggelig arbeidsmiljø og bidratt til en storartet studietid.

Alice Marie Pedersen
Tromsø, november 2007

Sammendrag

Nord-Atlanteren rommer store mengder krill (for eksempel *Thysanoessa inermis*), raudåte (*Calanus finmarchicus*) og andre grupper dyreplankton. De fungerer som et viktig bindeledd mellom primærprodusentene (planteplankton) og våre kommersielt utnyttede fiskearter. Det er hevdet at produksjonen av zooplankton i Norskehavet ligger omkring 350 - 600 millioner tonn per år. Bare 10 - 15 % av energien fra et trofisk nivå blir tatt med videre opp til neste trinn i næringskjeden og dermed er det store ressurser tilgjengelig som råstoff til blant annet fiskefôr. I senere tid har oppmerksomhet blitt rettet mot fangst av raudåte i de norske havområdene. Det har blitt utviklet egne fangstmetoder og prosesseringsteknikker, og bruksområdene for raudåteprodukter kan være flere. Olje er et av produktene som utvinnes fra raudåten. Den har blant annet et høyt innhold langkjedede n-3 fettsyrer, voksesterer og naturlige antioksidanter som gjør den svært interessant. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke raudåteoljens oksidative stabilitet ved langtidslagring, samt karakterisere innholdet av fettklasser, fettsyrer og karotenoider. Oljer med et høyt innhold av flerumettede fettsyrer er svært utsatt for oksidasjon hvor fettsyrene brytes ned og oljen forringes. Nedbrytningsproduktene gir en uønsket harsk lukt og smak samtidig som næringsverdien reduseres. Raudåteoljen produsert fra frosset råstoff inneholdt ganske mye frie fettsyrer (ca. 4 %) som antageligvis blir dannet av fosfolipaser aktive under fangst og eventuelt under fryselagring. Både karotenoidinnhold og antagelig også fettsyresammensetning var stabile under langtidslagring ved lav temperatur under nitrogenfase. Langtidslagring med luft ga en klar nedgang (opptil 50 %) i innholdet langkjedede n-3 fettsyrer. Både kommersiell raudåteolje og raudåteolje ekstrahert med ulike løsemidler hadde et høyt innhold av EPA, 20:5 n-3 (8,6 %), DHA, 22:6 n-3 (7,5 %) og SDA, 18:4 n-3 (15,7 %). Voksesterer var den dominerende fettklassen uavhengig av ekstraksjonsmetode benyttet for å få ut oljen. Kjennetegn for voksesterfraksjonen var et høyt innhold av SDA (18,9 %). Fettsyresammensetningen i fraksjonen med frie fettsyrer har likhetstrekk med sammensetningen som er kjent for membranlipider. Dette støtter antagelsen om aktiv fosfolipase i raudåteråstoff. Raudåteolje har et spesielt høyt innhold (ca. 1500 ppm) av karotenoider sammenlignet med andre naturlige krepsdyrkilder. Det kan også sammenlignes med noen av de nivåene som er funnet i enkelte mikroorganismer. Analysene viste at astaxanthin mono- og diesterer er hovedgrupper karotenoider i raudåteoljen. Raudåteoljen kan være et alternativ til syntetisk astaxanthin i fôr til økologisk laks.

Summary

The North Atlantic contains large amounts of krill (e.g. *Thysanoessa inermis*), copepods (e.g. *Calanus finmarchicus*) and other zooplankton. They act as an important link between the primary producers (phytoplankton) and our commercially important species of fish. The production of zooplankton in the Norwegian Sea is estimated to about 350 - 600 million tons per year. Only 10-15 % of the energy is transferred from one trophic level to the next, thus remaining vast resources available as possible fish feed ingredients. In recent years there has been brought attention on the harvest of *C. finmarchicus*. There has been developed unique harvesting and processing methods, and the products to come from this copepod may have many areas of application. Oil derived from *C. finmarchicus* has high levels of long chained n-3 fatty acids, wax esters and natural antioxidants. The aim of this study has been to evaluate the oxidative stability of calanus-oil and also examine the composition of fatty acids, lipid classes and carotenoids. Oils with high levels of n-3 fatty acids are highly susceptible to oxidation which will deteriorate the fatty acids. Oxidation reduces the nutritional value and gives rise to undesirable taste and smell. Calanus-oil produced from frozen material contained fairly large amounts of free fatty acids (ca. 4 %), probably formed by phospholipases active during harvesting and during freezing. The levels of carotenoids and also the fatty acid composition are stable during storage at low temperatures with nitrogenflush. Long-term storage of calanus-oil exposed to air gave an evident decrease (50 %) in n-3 levels. Both commercially produced oil and oil extracted with different solvents contained high levels of EPA, 20:5 n-3 (8,6 %), DHA, 22:6 n-3 (7,5 %) and SDA, 18:4 n-3 (15,7 %). Wax ester was the main lipid class present in all the oil-samples. High concentrations of SDA (18,9 %) were distinctive for the wax ester fraction isolated from the oil. The fatty acid composition of the free fatty acids has similarity to that of membrane lipids. This supports the assumption of an active phospholipase in *C. finmarchicus*. Calanus-oil has large amounts (ca.1500 ppm) of carotenoids compared to the contents of other natural crustacean sources. It can also be compared to the levels of carotenoids found in some microorganisms. The results show evidence of astaxanthin mono- and diesters being the dominant groups of carotenoids in the oil. Calanus-oil may serve as a natural alternative to synthetic astaxanthin as feed ingredients to organic farmed salmon.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Summary.....	III
Innholdsfortegnelse.....	IV
Forkortelser.....	V
1 Innledning.....	1
2 Generell bakgrunn.....	3
2.1 Marine zooplankton og depotfett.....	3
2.2 Karotenoider.....	5
2.3 Fettsyrer og oksidasjon.....	6
3 Materialer og Metoder.....	8
3.1 Materialer.....	8
3.2 Lagringsforsøk.....	8
3.3 Metoder.....	8
3.3.1 Fettekstraksjon.....	8
3.3.2 Frie fettsyrer.....	9
3.3.3 Karotenoidinnhold.....	9
3.3.4 Fettsyresammensetning.....	10
3.3.5 Fettklasseanalyse.....	11
3.3.6 Fast fase ekstraksjon.....	11
3.3.7 Karotenoidprofil.....	12
3.3.8 Høypresisjons væskechromatografi, HPLC.....	12
3.3.9 Alkalisk hydrolyse.....	13
4 Resultater.....	14
4.1 Stabilitet av langtidslagret raudåteolje.....	14
4.2 Fettklasser i raudåteolje.....	19
4.2.1 Fettklasser analysert ved tynnsjiktskromatografi.....	19
4.2.2 Fettklasser isolert ved Fast fase ekstraksjon.....	21
4.2.3 Fettsyresammensetning i voks og frie fettsyrer fra raudåteolje.....	24
4.3 Raudåteolje ekstrahert med løsemidler.....	25
4.3.1 Fettsyresammensetning.....	25
4.3.2 Fettklasser.....	26
4.4 Karotenoidprofil i raudåteolje.....	28
4.4.1 Karotenoidprofil analysert ved tynnsjiktskromatografi.....	28
4.4.2 Karotenoidprofil analysert ved normalfase HPLC.....	29
4.4.3 Karotenoidprofil analysert ved revers fase HPLC.....	30
5 Diskusjon.....	32
6 Referanser.....	37

Forkortelser

C	Kolesterol
CE	Kolesterylester
DAG	Diacylglycerol
DHA	Docosaheksaensyre
EPA	Eicosapentaensyre
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FFA	Frie fettsyrer
HPLC	Høypresisjons væskrokromatografi (high performance liquid chromatography)
LC-PUFA	Langkjedede flerumettede fettsyrer
MAG	Monoacylglycerol
NL	Nøytrale lipider
p.a.	Pro analysis
PCB	Polyklorete bifenyler
PL	Fosfolipid
ppm	Parts per million
PUFA	Flerumettede fettsyrer
R _f	Retardasjonsfaktor
SDA	Stereodonsyre
SPE	Fast fase ekstraksjon (solid phase extraction)
TAG	Triacylglycerol
TLC	Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography)

1 Innledning

I løpet av de seneste årene har det vært en betraktelig økning i både norsk og internasjonal fiskeoppdrett. Et økt oppdrettsvolum har ført til et økt behov for protein og olje til fiskefôr. De tradisjonelle fôrkildene til oppdrettsnæringen er fiskemel og fiskeolje, men en intensivert vekst i oppdrettsnæringen krever nye ressurser til fôrproduksjon (Waagbø *et al.*, 2001). I følge verdens matvareorganisasjon (FAO, 2006) er 70 % av verdens fiskebestander overfisket eller uttømt og det er derfor ikke mulig å øke fangstvolumene. Vegetabilske råstoffer til fôr for marine arter kan ofte bare benyttes i moderate mengder. Komplett erstatning av fiskemel med vegetabilske proteiner kan være vanskelig for enkelte fiskearter på grunn av ernæringsmessig ubalanse i aminosyresammensetning (Mundheim *et al.*, 2004). Vegetabilske oljer inneholder ikke de viktige langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrene (LC-PUFA) som finnes i marine kilder. Forsøk som har blitt gjennomført viser at tilsetning av vegetabilsk olje i fôr til blant annet atlantisk laks (*Salmo salar*) vil føre til redusert næringsverdi i fiskemuskel med hensyn til innholdet av omega-3 fettsyrer (Bell *et al.*, 2002).

Dyreplankton, en til nå lite utnyttet ressurs, har vist seg å være et gunstig alternativ som kan bidra til å dekke en del av behovet for protein og fett i fiskefôr, men til nå er prisen relativt høy sammenlignet med fiskeoljer og fiskemel. Nord-Atlanteren rommer store mengder krill (for eksempel *Thysanoessa inermis*), raudåte (*Calanus finmarchicus*) og andre grupper dyreplankton. De fungerer som et viktig bindeledd mellom primærprodusentene (planteplankton) og mange av våre kommersielt utnyttede fiskearter. Det er hevdet at produksjonen av zooplankton i Norskehavet ligger omkring 350 - 600 millioner tonn per år (Lekang & Guitierrez, 2007). Bare 10 - 15 % av energien fra et trofisk nivå blir tatt med videre opp til neste trinn i næringskjeden og dermed er store ressurser tilgjengelig som råstoff. Innhøsting av små mengder dyreplankton til fiskefôr eller andre anvendelser vil trolig ikke forstyrre næringsgrunlaget for fisk og sjøpattedyr (Lekang & Guitierrez, 2007).

Dyreplankton befinner seg på et lavere trofisk nivå enn fisk og de vil derfor ha et lavere innhold av miljøgifter, for eksempel PCB og dioksiner. Zooplankton har også et gunstig innhold av blant annet vitaminer, aminosyrer og pigmenter og kan brukes som erstatning for, eller tilskudd til, fiskemel i fiskefôr (Olsen *et al.*, 2006; Suontama *et al.*, 2007). Siden 1970-tallet har det fortrinnsvis vært fokus på innhøstning av antarktisk krill (*Euphausia superba*) med en årlig fangst på omtrent 100 000 tonn (Constable *et al.*, 2000). I senere tid har oppmerksomhet blitt rettet mot fangst av raudåte i de norske havområdene. Det har blitt utviklet egne fangstmetoder og prosesseringsteknikker, og bruksområdene for raudåteprodukter kan være flere. Olje er et av produktene som utvinnes fra raudåten. Den har

blant annet et høyt innhold LC-PUFA, voksestere og naturlige antioksidanter som gjør den svært interessant. De positive helseeffektene av omega-3 fettsyrer er godt dokumentert, spesielt når det gjelder reduisering av risiko for hjerte- og karsykdommer (oppsummert av Psota *et al.*, 2006). Det er også foreslått at omega-3 fettsyrene kan ha gunstig innvirkning på andre sykdommer som involverer betennelsesreaksjoner og til og med redusere mulighet for utvikling av noen kreftformer (Lunn & Theobald, 2006). Omega-3 fettsyrene er også viktige for normal fosterutvikling under svangerskap, senere kognitiv utvikling og utvikling av syn (Ruxton *et al.*, 2004; Jensen, 2006). Det er derfor en bred enighet om at inntak av marine fettsyrer (LC-PUFA) bør økes. Den enkleste måten å få til dette på er å spise mer fisk og fiskeprodukter, men av ulike årsaker viser dette seg å være vanskelig og inntaket av omega-3 fettsyrene er ofte langt under det anbefalte (Gibney, 1997). Et mulig alternativ til tradisjonelle fiskeoljer og konsentrerte omega-3 produkter kan være omega-3 voksestere som kosttilskudd eller for tilsetning i ulike matvarer (Gorreta *et al.*, 2002; Bernasconi *et al.*, 2007).

Det har også blitt antatt at karotenoider kan ha positiv effekt på en rekke helsetilstander, som for eksempel hjerte- og karsykdommer og flere nedbrytningssykdommer (Alzheimers, diabetes og benskjørhet), men effektene kan nok ikke tilskrives karotenoidene alene, heller som en del av et sammensatt system i et variert kosthold. De viktigste rollene karotenoidene er kjent for er som forstadium til vitamin A og som antioksidant i blant annet planter (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Hovedmålet med denne oppgaven var å karakterisere olje utvunnet fra raudåte. Konkrete delmål:

1. Undersøke oksidativ stabilitet under langtidslagring av raudåteolje.
2. Undersøke fettsyre- og fettclassesammensetningen i raudåteolje utvunnet på ulike måter.
3. Undersøke karotenoidinnholdet i raudåteolje.

2 Generell bakgrunn

2.1 Marine zooplankton og depotfett

Krill og raudåte er zooplankton i klasse *Crustacea*, krepsdyr, med stor utbredelse og biomasse over hele verden (figur 1). Krillartene (familien *Euphausiidae*) varierer i størrelse. Antarktisk krill (*Euphausia superba*) er relativt stor (2-6 cm), mens krillartene i Nord-Atlanteren (*Thysanoessa inermis* og *T. raschii*) kan bli 6-8 mm. Raudåten er liten av størrelse, bare 1-2 mm og hører til familien *Calanidae*, men nevnes ofte som copepod (subklasse *Copepoda*). Krepsdyrene gjennomgår en rekke utviklingsstadier fra egg til voksent individ. For euphausiidene betyr det en rekke av nauplii-, metanauplii-, calytopis- og furcilia-stadier og copepodene gjennomgår flere nauplii- og copepoditt-stadier. Disse utviklingstrinnene har betydning for næringsinnholdet i dyrene, spesielt med hensyn på lipidinnholdet.



Figur 1 til venstre: Antarktisk krill, *Euphausia superba*, til høyre: raudåte, *Calanus finmarchicus* (bilder fra: Alfred Wegener Institute, Bremerhaven, Tyskland; University of California, San Diego, USA)

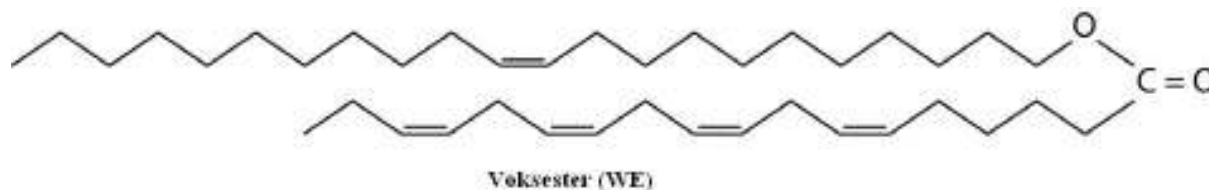
Store lipidlagre er et kjennetegn for zooplankton fra polare havområder, mens zooplankton fra tropiske havområder er registrert med relativt små lipidlagre (Lee *et al.*, 2006). Mengdeforhold og klasseinndeling av depotfettet (triacylglycerol og voksester) i krill og copepoder avhenger av art og livsstadium (tabell 1), men også årstidsvariasjon og lokalitet har innvirkning på lipidinnholdet. Raudåte og flere andre polare copepoder har et spesielt høyt fettinnhold i høstperioden. Beiting på rikelige mengder fytoplankton over sommerperioden fører til akkumulering av depotfett som en forberedelse til diapause, det vil si overvintringen på havdypet (Falk-Petersen *et al.*, 1987). Raudåte lagrer fett hovedsakelig i form av voksester, opptil 90 % av det totale lipidinnholdet (Falk-Petersen *et al.*, 1987; Hirche & Kattner, 1993) og mindre andeler triacylglycerol (TAG). I den antarktiske krillen *Euphausia superba* foreligger fett hovedsakelig som TAG og fosfolipider (Pond *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 1996), som også er tilfelle for flere andre antarktiske euphausiider (Falk-Petersen *et al.*, 2000). For andre krillararter, deriblant *Thysanoessa inermis*, er det voksester som dominerer

depotfettet, den resterende andelen av fett utgjøres i hovedsak av TAG og fosfolipider (Sargent & Falk-Petersen, 1981).

Tabell 1 Lipidinnhold i utvalgte zooplankton sammenfattet av Lee *et al.* (2006). C4-5 referer til copepodittstadium 4 og 5 og f: female, voksen hunn.

	Totalt lipid (TL) (% av tørrvekt)	Voksesterer (% av TL)	TAG (% av TL)
Copepoder			
<i>Calanus finmarchicus</i>			
C4	53	44	10
C5	34	68	5
f	24	62	6
<i>Calanus glacialis</i>			
C4	56	68	2
C5	62	72	6
f	70	68	8
<i>Calanus hyperboreus</i>			
C4	54	72	4
C5	65	75	8
f	62	75	6
Euphausiider			
<i>Euphausia superba</i>	44	-	51
<i>Euphausia crystallophias</i>	34	47	6
<i>Thysanoessa raschii</i>	38	10	44
<i>Thysanoessa inermis</i>	47	40	28

TAG lagret i raudåten benyttes som relativt lett tilgjengelig energi, mens voksesterene har flere funksjoner på grunn av strukturen. Voksesterer består av en langkjedet alkohol foresteret til en fettsyre (figur 2). Raudåten utnytter voksesterene til regulering av oppdrift og vertikal migrasjon, gonadedannelse og som et langvarig energilager i diapausen (Jonasdottir, 1999; Visser & Jonasdottir, 1999). Ved å endre tettheten i voksesterlageret kan raudåten holde seg på havdypet under diapause uten unødvendig forbruk av energi. Voksesterer rik på omega - 3 fettsyrer er mindre utsatt for oksidasjon enn TAG-oljer med omega - 3. Dette kommer av at voksesterer er mer kompakte og har et høyere smeltepunkt enn TAG og derfor kan foreligge i fast form ved temperaturer hvor fiskeoljer er flytende (Gorreta *et al.*, 2002).



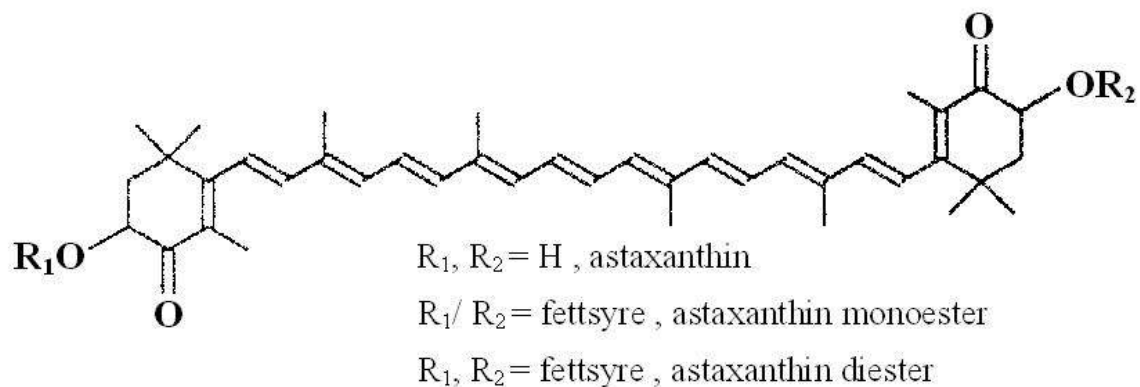
Figur 2 Voksester med 22:1 n-11 alkohol og 18:4 n-3 fettsyre (stearodonsyre)

Det har tidligere blitt antatt at oppdrettsfisk ikke kan fordøye fett i form av voksesterer i samme grad som TAG, men det er nylig vist at blant annet atlantisk laks effektivt kan utnytte voksesterer fra raudåteolje (Olsen *et al.*, 2004). Også hval synes å ha evnen til effektiv utnyttelse av voksesterer (Nordøy, 1995). Fordøyelse av voksesterer hos terrestriske pattedyr er

lite kjent, men det er vist at et høyt inntak av voksestere kan blant annet ha lakserende effekt (Yohannes *et al.*, 2002). Det er gjort en del undersøkelser med tanke på voksestere i cerealer og bivoks, men disse har betydelig lengre karbonkjeder enn de marine voksesterene. Det har blitt antydnet at langkjedede fettalkoholer fra voksestere kan redusere plasmakolesterol hos mennesker (Hargrove *et al.*, 2004).

2.2 Karotenoider

Typisk for krill og raudåte er høye konsentrasjoner av røde karotenoidpigmenter, hvorav astaxanthin kan utgjøre 85-90% (Funk & Hobson, 1991; Lotocka & Styczynska-Jurewicz, 2001). Karotenoider finnes i alle fotosyntetiserende organismer og er en av de mest utbredte gruppene av naturlige pigmenter. De fleste karotenoider er bygget opp av åtte isopren-enheter (C_{40}) og er fettløselige. Karotenoider finnes enten som usubstituerte hydrokarboner (karotener) eller som oksygenerte derivater av karotener (xanthofyller). Astaxanthin (figur 3) er et xanthofyll av β -karoten, og i raudåte og andre copepoder kan det foreligge som fritt astaxanthin, som monoester bundet til en fettsyre eller som diester bundet til to fettsyrer (Sommer *et al.*, 2006). Så mye som 90 % av astaxanthinet kan være bundet i esterform. Mono- og diestere har lavere biotilgjengelighet enn fritt astaxanthin i fisk (Christiansen, 2001). Astaxanthinets antioksidative egenskaper påvirkes også av esterformene. Rekken av konjugerte dobbeltbindinger i molekylet gir en kromofor (fargebærer) med evnen til å absorbere lys i bølglengdeområdet 400-600 nm, og gir farge i spekteret gult til rødt. Stereokjemi har innvirkning på astaxanthinets egenskaper og polyenkjeden fører til at astaxanthin kan eksistere som flere geometriske isomerer. Dette kalles E/Z-isomeri som er synonymt med *cis/trans* konfigurasjon, hvor *trans* tilsvarer E og *cis* tilsvarer Z. Astaxanthin forekommer for det meste som all-E isomere, men påvirkning av lys og varme kan føre til isomerisering. De vanligste geometriske isomerer av astaxanthin er 9Z og 13 Z.



Figur 3 Struktur av all-E astaxanthin, hvorav R_1 og R_2 kan foreligge som H eller fettsyrer.

Zooplankton produserer astaxanthin ved tilførsel av β -karoten fra fytoplankton (Matsuno, 2001; Andersson *et al.*, 2003). Astaxanthinets viktige funksjoner i både krill og raudåte innebærer blant annet deltakelse i lipidmetabolismen, som lysbeskyttelse, kamuflasje og som antioksidant (Lotocka & Styczynska-Jurewicz, 2001; Sommer *et al.*, 2006). De antioksidative egenskapene til astaxanthin innebærer blant annet å fange opp frie radikaler, nøytralisere ("quenche") singlet oksygen (1O_2) og nøytraliserer såkalte "sensitizer"-forbindelser (som i seg selv forårsaker oksidasjon eller danner singlet oksygen). Energien som tas opp av astaxanthinmolekylet ved "quenching" tapes igjen i små porsjoner til omgivelsene ved hjelp av den konjugerte polyenkjeden (Krinsky, 1994). Karotenoider er utsatt for oksidasjon og de taper farge og blekes når de oksideres (Woodall *et al.*, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2007). Metoder som analyserer fargetap har derfor ofte blitt benyttet for å undersøke oksidasjon i produkter som inneholder karotenoider (Krinsky, 1994).

Astaxanthin og canthaxanthin er med på å gi rødfargen i muskel, skinn eller ytre skjelett hos blant annet laksefisk og mange flere marine fiske- og skalldyrarter (Torrissen, 1989; Virtue *et al.*, 1995). Ofte er karotenoidene bundet til proteiner som gir en annen farge, for eksempel grønn-brunt og blått i henholdsvis ferskvannskreps og hummer. Koking fører til at karotenoidene frigjøres fra proteinene og rødfargen oppnås. Astaxanthinet er ikke bare viktig for pigmentering, det er også vist at astaxanthin er nødvendig for vekst og overlevelse ved startføring av oppdrettsfisk hvor astaxanthin kan ha en provitamin A funksjon (Christiansen *et al.*, 1995). Fisk og andre dyr kan ikke syntetisere karotenoider *de novo*, men er i stand til å modifisere karotenoidene de får tilført gjennom føden (Britton, 1995).

2.3 Fettsyrer og oksidasjon

Fettsyresammensetningen i marint fett er ofte preget av høye konsentrasjoner langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer (LC-PUFA), spesielt 20:5 n-3, eicosapentaensyre (EPA) og 22:6 n-3, docosaheksaensyre (DHA). Raudåte har et høyt innhold av EPA og DHA, samt den mettede fettsyren 16:0, palmitinsyre (Evjemo *et al.*, 2003). Disse tre fettsyrene er vanlig å finne igjen i membranlipidene (Falk-Petersen *et al.*, 2000). Fettsyresammensetningen i membraner er ganske stabil og påvirkes i mindre grad av føret enn fettsyresammensetningen i depotfettet. I tillegg har raudåten et høyt innhold 18:4 n-3, stearodonsyre (SDA) (Kattner & Hagen, 1995) som i all hovedsak foreligger i depotfettet. SDA finnes i dinoflagellater (planteplankton) som raudåten beiter på. Innholdet av SDA i raudåte viser at fettsyrene fra planteplankton kan innlemmes direkte i raudåtens depotfett (Kattner *et al.*, 1994; Graeve *et al.*, 1994).

Oljer med et høyt innhold av LC-PUFA er svært utsatt for oksidasjon hvor fettsyrene brytes ned og oljen forringes. Oksidasjon av marine lipider vil føre til at andelen LC-PUFA reduseres (Dulavik *et al.*, 1998). Nedbrytningsproduktene gir en uønsket harsk lukt og smak samtidig som næringsverdien reduseres. Oksygen bindes til fettsyrer og fører til videre degradering og dannelse av flere oksidasjonsprodukter via en tretrinns radikal – kjedereaksjon; autooksidasjon. Dette innebærer fasene initiering (induksjon), propagering (kjedereaksjon) og terminering (avslutning) (Olsen, 2007). Dobbeltbindingene i umettede fettsyrer gjør at de lettere kan angripes av et radikal, som fører til dannelsen av et fettsyreradikal. Dette oppstår i initieringsfasen av oksidasjonen. Fettsyreradikalet er ustabilt og vil raskt reagere med oksygen og gi dannelsen av et fettsyreperoksidradikal, som igjen angriper en ny umettet fettsyre. Dette fører til dannelsen av et fettsyreperoksid (primært nedbrytningsprodukt) og et nytt fettsyreradikal som igjen reagerer med oksygen og viderefører reaksjonen (propagering). De primære oksidasjonsproduktene som brytes ned forårsaker dannelsen av alkoholer, aldehyder og ketoner (sekundære nedbrytningsprodukter), som er årsaken til harsk lukt og smak. Mengden oksidasjonsprodukter øker fram til de tvinges til å reagere med hverandre og danner polymere forbindelser (terminering). Det er flere faktorer som påvirker initieringen av autooksidasjon; spesielt tilgang på oksygen, men også mengde umettede fettsyrer, temperatur, lys og tilstedeværelse av mulige pro – og antioksidanter (Cozzolino *et al.*, 2005). Frie fettsyrer er mer utsatt for oksidasjon enn fettsyrer forestret til alkoholer, og vil også kunne fungere som prooksidanter. Vanlige metoder for å måle oksidasjon i oljer er bestemmelse av peroksid- og anisidinverdi, som gir uttrykk for mengde av henholdsvis primære og sekundære oksidasjonsprodukter i oljen. Undersøkelser av fettsyresammensetning kan også være med på å registrere oksidasjon i en olje.

3 Materialer og Metoder

3.1 Materialer

Raudåteolje, raudåtepulver og hel, frosset raudåte ble levert av Calanus AS (Tromsø, Norge). Produksjonsmetoden innebar kverning og oppvarming (ca 85 °C, 10-20 min.) av frosset raudåte og deretter dekantering av væskefasen fra fast stoff (graks). Oljen ble separert ut fra væskefasen og deretter renset. Væskefasen ble dampet inn, blandet med graksen og tørket til mel (raudåtepulver). Astaxanthinberiket olje til laksefôr ble gitt av Ewos AS (Bergneset, Troms, Norge). Dersom ikke annet nevnes, er alle kjemikalier benyttet av p.a. kvalitet (Merck, Darmstadt, Tyskland).

3.2 Lagringsforsøk

Kommersielt framstilt raudåteolje og en astaxanthinberiket laksefôrolje ble satt opp parallelt i et lagringsforsøk. Glassflasker (50 ml) med olje (50 ml), enten med tett lokk hvor luft i flasken var erstattet med nitrogengass (N₂) eller med hull i kork (luft), ble fordelt på tre områder: kjøleskap (mørkt, 4 °C), på benk ved romtemperatur (lys, 20 – 22 °C) og i skap ved romtemperatur (mørkt, 20 – 22 °C). Ved starttidspunkt og deretter hver tredje måned ble det tatt ut prøver fra oljene og frosset (-55 °C) i påvente av analyser. Etter uttakene ble de aktuelle flaskene fylt med N₂-gass. Oljene ble lagret i til sammen 425 dager.

3.3 Metoder

3.3.1 Fettekstraksjon

Frosset raudåte ble tørket med en Heto FD3 frysetørker (Heto Labequipment, Holten, Danmark) før fett ble ekstrahert med kloroform og metanol (Folch *et al.*, 1957), ren heptan eller ren etanol (Arcus Kjemi, Vestby, Norge). Ekstraksjonene ble beskyttet mest mulig mot lys. Frysetørket, hel raudåte (100 g) ble tilsatt heptan eller etanol, 750 – 1000 ml og rystet. Løsningene ble filtrert etter en times henstand. Ekstraksjonene ble gjentatt med filtratet fram til råstoffet var tilnærmet fargeløst. Endelig filtrat ble dampet inn til tørrhet ved å benytte en rotavapor (Heidolph Laborata 4000, Büchi Vacuum Controller B-721, Flawil, Sveits) ved 100 mbar og 50 °C. Det ble i tillegg foretatt heptanekstraksjon av olje fra raudåtepulver.

3.3.2 Frie fettsyrer

Mengden frie fettsyrer (FFA) i olje ble målt ved å benytte en titreringsmetode beskrevet av Ke *et al.* (1976). Olje (0,1-1 g) ble løst i 75 ml kloroform:metanol:isopropanol 2:1:2 (v/v), tilsatt 4 dråper indikator (0,5 % meta-cresolpurpur) og deretter titrert med 0,05 M NaOH til omslag fra klar til fiolett farge. En blindprøve med løsemiddel og indikator ble titrert på samme måte. Prosentandelen frie fettsyrer ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{Frie fettsyrer(\%)} = \frac{(pr - bl) \times M(\text{mol/l}) \times 282(\text{g/mol})}{m(\text{g}) \times 1000(\text{ml/l})} \times 100\%$$

hvor:

pr = titreringsvolum av prøve (ml)

bl = titreringsvolum av blindprøve (ml)

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

282 = molekylvekt til oljesyre (g/mol)

m = vekt av prøve (g)

Isopropanol ble levert av Arcus Kjemi (Vestby, Norge). Det ble analysert tre paralleller av hver oljeprøve.

3.3.3 Karotenoidinnhold

Olje (50 µl) ble veid, tilsatt aceton (30 ml) og blandet på en reagensrørmikser. Absorpsjon ble målt spektrofotometrisk (Hitachi U-2001, Mannheim, Tyskland) ved 470 nm, mot blank prøve aceton. Mengde karotenoid i prøven ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{ppm karotenoider (mg/kg)} = \frac{OD \times 10(\text{mg/ml}) \times 30(\text{ml}) \times 1000(\text{g/kg})}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m(\text{g})}$$

OD = absorpsjon ved 470 nm

m = prøve (g)

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1900 \text{ cm}^{-1}$, ekstinksjonskoeffisient for 1 % karotenoider i aceton (Foss *et al.*, 1984)

Det ble analysert tre paralleller av hver oljeprøve.

3.3.4 Fettsyresammensetning

En modifisert metode av Stoffel *et al.* (1959) ble benyttet for å analysere fettsyresammensetningen i oljeprøvene. Olje ble løst i kloroform:metanol 1:1 (v/v) til en endelig konsentrasjon på 20 mg/ml. Løsningen (100 µl) ble tilsatt kloroform (0,9 ml) og 2 % H₂SO₄ metanol (2,0 ml) og kokt ved 100 °C i en time. Heptan (3,5 ml) og 5 % NaCl (3,5 ml) ble tilsatt. Rørene ble ristet godt, heptanfasen ble overført til egne rør og deretter dampet tørr med nitrogengass i en N-EVAP (Organomation Assoc. Inc., Berlin, Tyskland). Prøvene ble løst i heptan (100 µl) og de metylerte fettsyrene ble separert ved å bruke en gasskromatograf (Agilent 6890N med en 7638B autoinjektor, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med en kapillærkolonne (CP7419 50 m x 25 µm, Varian Inc., Middelburg, Nederland). Separasjonen foregikk med helium som bæregass. Fettsyrene ble identifisert ved å sammenligne retensjonstid mot kjente fettsyrestandarder; 1891-1AMP, 1893-1AMP, 1895-1AMP, PUFA-1 og PUFA- 3 fra Supelco (Bellafonte, PA, USA) og GLC 68D fra NuChek Prep. Inc. (Elysian, MN, USA) (tabell 2). Det ble analysert tre paralleller av hver oljeprøve.

Tabell 2 Oversikten viser fettsyresammensetning i fettsyrestandarder. x angir fettsyrer tilstede i standard.

Fettsyrer	1891-1 AMP	1893-1 AMP	1895-1 AMP	PUFA-1, marin kilde	PUFA-3, Menhaden olje	GLC 68D
08:0		x				
10:0		x				
12:0		x				
14:0		x		x	x	x
14:1						x
16:0	x	x	x	x	x	x
16:1 n-7				x	x	x
16:2 n-4					x	
16:3 n-4					x	
18:0	x		x	x	x	x
18:1 n-9				x	x	x
18:1 n-7	x			x	x	x
18:2 n-6	x			x	x	x
18:3 n-3	x				x	x
18:3 n-4					x	
18:4 n-3				x	x	
20:0			x			x
20:1 n-9				x	x	
20:2						
20:3						
20:4 n-6					x	
20:4 n-3					x	
20:5 n-3				x	x	x
22:0			x			x
22:1 n-11						x
22:1 n-9						
22:5 n-3				x	x	
22:6 n-3				x	x	x
24:0						x
24:1 n-9				x		x

Med utgangspunkt i fettsyresammensetningen ble grad av oksidasjon angitt som polyeneratio (Lin *et al.*, 1995):

$$\text{Polyeneratio} = \frac{[20 : 5 n - 3] + [22 : 6 n - 3]}{[16 : 0]} \times 100$$

3.3.5 Fettklasseanalyse

Fettklasser i oljeprøvene ble separert via tynnsljtskromatografi (TLC). Prøvene ble løst til 25 mg/ml i kloroform og avsatt på HP-TLC plater (Silica gel 60, 10x10 cm, Merck) som ~ 2mm flekker. Platene ble satt i elueringskar med heptan:dietyleter:eddiksyre 70:30:1 (v/v) i mettet atmosfære og ble tatt ut når mobilfasen var ca 1 cm fra toppen på platene. Platene ble så sprayet med 10 % kopparsulfat og 8 % fosforsyre som beskrevet av Vaghela & Kilara (1995). Platene fikk lufttørke i 10 minutter og fremkalt ved oppvarming til 180 °C i varmeovn og deretter holdt ved 180 °C i 10 minutter. Fettklassene kunne da ses som svarte bånd på platene. En GelDoc plateleser (BioRad GelDoc XR, Hercules, CA, USA) dokumenterte resultatene ved 350 nm. Fettklassene ble identifisert ved å sammenligne båndmønstre mot kjente TLC-standarder: myristyloleat, 16-0A og 18-5A (NuChek Prep. Inc., Elysian, MN, USA). Voksesterstandarden myristyloleat inneholdt fettalkoholen 14:0 og fettsyren 18:1 n-9. Standard 16-0A inneholdt en blanding av nøytrale fettklasser med palmitinsyre (16:0): monopalmitin, dipalmitin, tripalmitin og metylpalmitat. Standard 18-5A bestod av en blanding polare og upolare fettklasser med oljesyre (18:1 n-9): kolesterol, kolesteryloleat, triolein, oljesyre og lecithin (1,2 distearoyl).

3.3.6 Fast fase ekstraksjon

Fettklassene i oljeprøvene ble isolert med Fast fase ekstraksjon (SPE) ved å bruke en noe modifisert variant av metoden til Vaghela & Kilara (1995). Mega Bond Elut (5 g) aminopropyl SPE engangskolonner fra Varian Inc. (Middelburg, Nederland) ble benyttet. Kolonnene ble plassert på en Visiprep vakuum manifold (Supelco, Bellafonte, PA, USA) og løsningene ble eluert gjennom med undertrykk. Fraksjoneringen ble utført i to trinn med to kolonner per prøve. Olje (100-80 mg) i kloroform (2 ml) ble tilsatt første kolonne etter at den var blitt vasket gjennom med 20 ml heptan. Kloroformen fikk eluere ut og etterlot de totale lipidene igjen i kolonnen. Kolonnen ble fortløpende tilsatt elueringsmiddel A, B og C som eluerte henholdsvis nøytrale lipider (NL), frie fettsyrer (FFA) og fosfolipider (PL) (se tabell 3

for detaljert informasjon om elueringsmidlene). Etter separasjonen ble hver fraksjon dampet tørr ved å bruke en rotavapor (100-300 mbar, 40 °C). Fraksjon A, som inneholdt NL, ble løst i 1 ml heptan og tilsatt kolonne 2 etter at denne var vasket gjennom med 20 ml heptan. Kolonnen ble så fortløpende tilsatt elueringsmiddel D, E, F, G og H som eluerte henholdsvis kolesterylester (CE), triacylglycerol (TAG), kolesterol (C), dialcylglycerol (DAG) og monoacylglycerol (MAG). Hver fraksjon ble dampet inn til tørrhet, løst i 1 ml kloroform og lagret ved -55 °C i påvente av videre analyser. Metoden ble kvalitetskontrollert ved å kjøre samme prosedyre på fettklassestandardene myristyloleat og 18-5A (NuChek Prep. Inc., Elysian, MN, USA).

Tabell 3 Løsninger nødvendig for separasjon av fettklasser ved Fast fase ekstraksjon, Mega Bond Elut (NH₂) kolonne. Lipidklasser: nøytrale lipider (NL), frie fettsyrer (FFA), fosfolipider (PL), kolesterylester (CE), triacylglycerol (TAG), kolesterol (C), diacylglycerol (DAG) og monoacylglycerol (MAG).

Elueringsmiddel	Volum (ml)	Lipidklasser eluert
A Kloroform:isopropanol 2:1 (v/v)	20	NL
B 2 % eddiksyre i dietyleter	20	FFA
C Metanol	20	PL
D Heptan	50	CE
E 1 % dietyleter, 10 % diklormetan i heptan	50	TAG
F 5 % etylacetat i heptan	50	C
G 15 % etylacetat i heptan	50	DAG
H Kloroform:metanol 2:1 (v/v)	50	MAG

3.3.7 Karotenoidprofil

Karotenoidprofilen til raudåteolje ble undersøkt ved tynnsjiktskromatografi (Sarada *et al.*, 2006). Raudåteolje, samt G og H fraksjon fra SPE ble løst i aceton til 25 mg/ml og avsatt som ~ 2 mm flekker på HP-TLC plater (Silica gel 60, 10x10 cm, Merck, Darmstadt, Tyskland). Platene ble eluert med aceton:heptan 30:70 (v/v), lufttørket og scannet direkte (Canon Solutions, NY, USA). Karotenoidprofilene kunne ses som røde bånd på platene. Ren krystallinsk astaxanthin (Hoffman-La Roche, Basel, Sveits) i aceton (mettet løsning) ble applisert på platene for sammenligning.

3.3.8 Høypresisjons væskechromatografi, HPLC

Analytisk HPLC ble utført med en Waters Alliance 2695 Separation modul tilkoblet en photodiode array detektor (Waters, Saint-Quentin, Frankrike). To HPLC metoder ble testet for å analysere astaxanthin i raudåteolje; normalfase HPLC og revers fase HPLC. Kommersielt framstilt olje ble løst i aceton med konsentrasjon 40 mg/ml. 25 µl prøve ble analysert på

HPLC normalfase kolonne (LiCrospher 100 NH₂, 4,6 x 250 mm, Merck, Darmstadt, Tyskland) med strømningshastighet 1 ml min⁻¹ og eluenter var aceton (0 – 25 %) og metanol (100 – 75 %) i gradientsystem. Analysetid per prøve var 30 minutter og deteksjonsbølglengden ble satt til 480 nm. Ren astaxanthin (Hoffman-La Roche, Basel, Sveits) i aceton (mettet løsning) og oljeprøve:astaxanthinstandard 2:1 (v/v) ble også analysert via normalfase HPLC. Ved revers fase HPLC ble olje løst i diklormetan:metanol 1:3 (v/v) med konsentrasjon 40 mg/ml. 25 µl prøve ble analysert på revers fase kolonne (Discovery HS C18, 4,6 x 250 mm, Supelco, Bellafonte, PA, USA) med strømningshastighet 1 ml min⁻¹ i isokratisk system med eluentene aceton (10 %) og metanol (90 %). Kjøretime per prøve var 30 minutter og deteksjonsbølglengden ble satt til 480 nm.

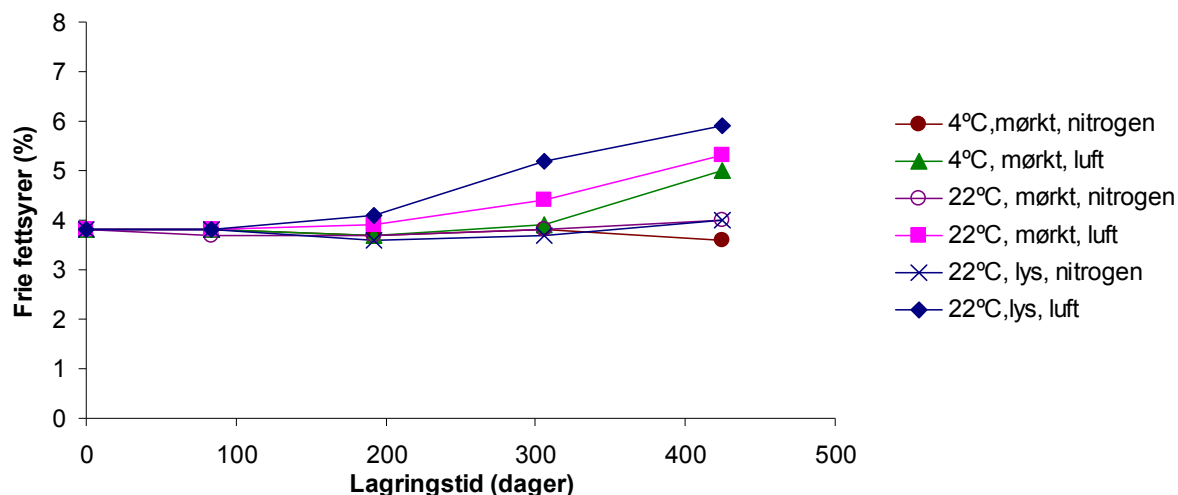
3.3.9 Alkalisk hydrolyse

Astaxanthinester i raudåteolje ble spaltet til fritt astaxanthin ved forsåpning. Kommersielt framstilt olje ble løst i diklormetan:metanol, 1:3 (v/v) til konsentrasjon 40 mg/ml. Det ble tilsatt 1 ml 0,05 M NaOH i metanol til 5 ml oljeløsning. Prøven ble konsentrert til 5 ml med nitrogen gass og forsåpningen foregikk deretter ved romtemperatur (Yuan & Chen, 1998). Det ble tatt ut prøver etter 24 og 43 timer og analysert direkte på revers fase HPLC. Forsåpning ble også utført på astaxanthinstandard i mettet løsning.

4 Resultater

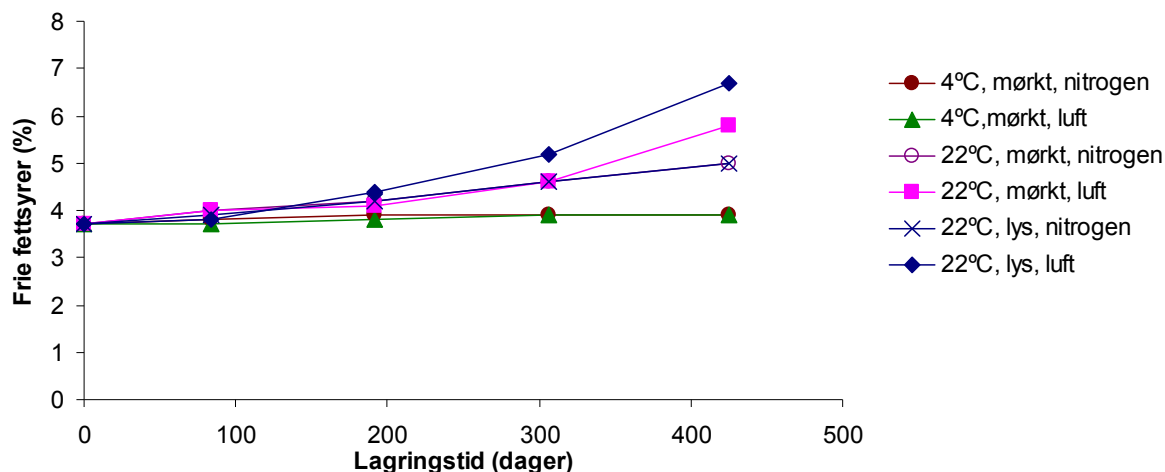
4.1 Stabilitet av langtidslagret raudåteolje

Kommersielt framstilt raudåteolje ble lagret i 425 dager ved ulike betingelser. For sammenligningens skyld ble det også lagret en astaxanthinberiket lakseförolje. Analysene viste at raudåteoljen hadde 3,8 % FFA i utgangspunktet (figur 6). Etter omtrent 300 dagers lagring så man en svak økning av FFA i raudåteoljene lagret ved romtemperatur i luft. Ved lagringsforsøkets avslutning ble høyeste innhold FFA målt til 5,9 % i oljeprøven lagret ved 22 °C, eksponert for lys og luft. Oljeprøvene med N₂-lokk og tett emballasje viste ingen forandring i FFA-innholdet gjennom hele lagringsperioden.



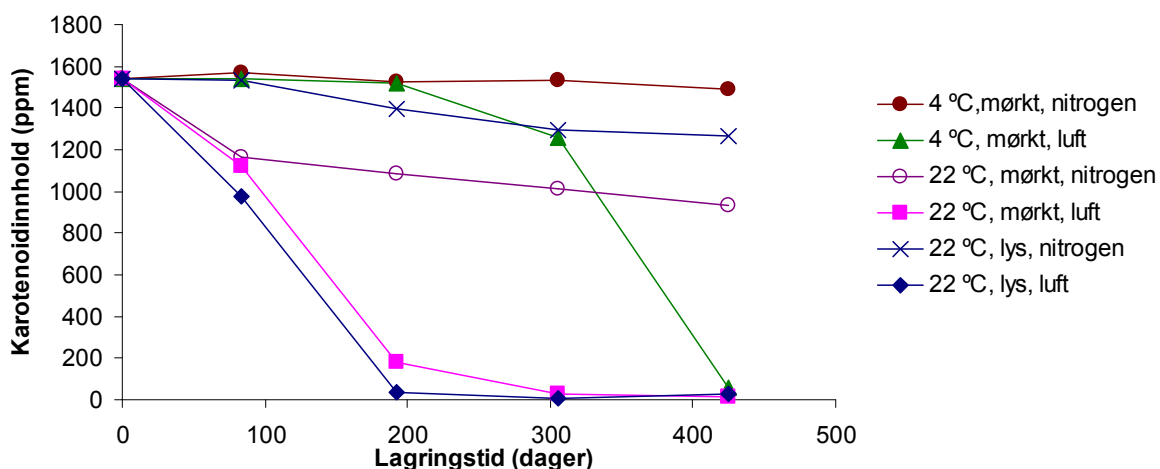
Figur 6 Dannelse av frie fettsyrer (%) i raudåteolje lagret mörkt 4 °C, mörkt 22 °C, lys 22 °C, med luft eller N₂ i 425 dager.

Den astaxanthinberikede lakseföroljen hadde ved lagringens start 3,7 % FFA (figur 7). Alle prøvene lagret ved romtemperatur viste en svak økning etter 300 dagers lagring. Etter 425 dager hadde oljene som ble oppbevart i romtemperatur, i lys med lufteksponering og mörkt med lufteksponering det høyeste FFA – innholdet, henholdsvis 6,7 og 5,8 %. Oljene lagret i romtemperatur med nitrogenbeskyttelse hadde en svakere økning, begge inneholdt 5,0 % FFA etter 425 dager. Oppbevaring i kjøleskap ga ingen forandring i FFA gjennom lagringsperioden.



Figur 7 Dannelse av frie fettsyrer (%) i astaxanthinberiket laksefôrolje lagret mørkt 4 °C, mørkt 22 °C, lys 22 °C, med luft eller N₂ i 425 dager.

Forandringer i karotenoidinnholdet i oljene ble også analysert i løpet av langtidslagringen. I utgangspunktet hadde raudåteoljen et innhold på 1500 ppm karotenoider (figur 8).

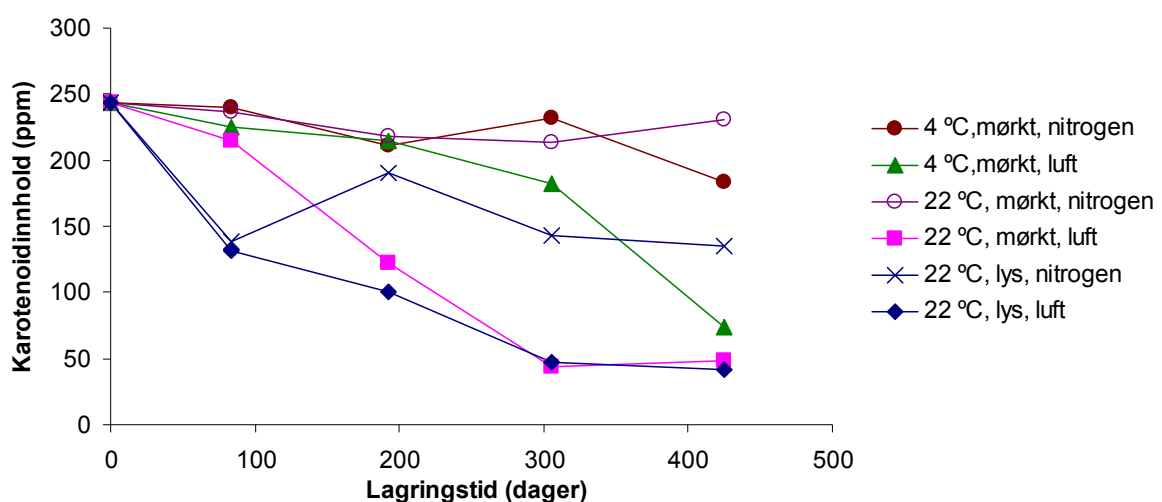


Figur 8 Endring i karotenoidinnhold (ppm) i raudåteolje lagret mørkt 4 °C, mørkt 22 °C, lys 22 °C, med luft eller N₂ i 425 dager.

Allerede etter de første 80 dagene var innholdet redusert med omtrent en tredel i oljene lagret i romtemperatur, utenom oljen lagret under N₂ i lys, denne hadde et stabilt innhold av karotenoider. Etter 190 dager hadde innholdet i oljene som ble eksponert for luft ved romtemperatur, sunket dramatisk. Under 150 ppm karotenoider gjenstod og nedgangen fortsatte ut lagringsperioden. På dette tidspunktet kunne det ikke ses noen nedgang i karotenoidinnholdet for de kjølelagrede oljene, men ut over denne perioden sank innholdet for

den lufteksponerte oljen helt ned til 60 ppm mens oljen med N₂-beskyttelse hadde tilsynelatende ingen forandring i karotenoidinnholdet gjennom hele forsøket. Oljen lagret ved 22 °C mørkt under N₂ hadde et relativt stabilt karotenoidinnhold etter den initielle nedgangen i løpet av de første 80 dagene. Ved avslutningen av lagringsforsøket var innholdet cirka 940 ppm. Karotenoidtapet for oljen oppbevart ved 22 °C i lys under N₂ var relativt svakt gjennom lagringen og endte med 1270 ppm etter 425 dager. Det ble også observert fargeforandringer i oljen underveis i lagringsperioden. Ved start hadde raudåteoljen en dyp rød farge. Gjennom lagringen mistet de lufteksponerte oljeprøvene rødfarge og ble til slutt tydelig gule. Raudåteoljene lagret under N₂ beholdt tilsynelatende rødfargen gjennom 425 dagers lagring

For den astaxanthinberikede laksefôroljen ble det målt et karotenoidinnhold på 240 ppm ved lagringsforsøkets start (figur 9). Forløpet for karotenoidtap viste samme tendenser som beskrevet for raudåteoljen, men i motsetning til raudåteoljen sank ikke karotenoidinnholdet lenger ned enn 50 ppm ved avslutning. Begge oljene lagret ved 22 °C og lufteksponering viste tydelig nedgang i karotenoidinnhold med et innhold på omkring 50 ppm etter 425 dagers lagring. Etter en svak nedgang de første 300 dagene (180 ppm) ble det også målt et tydelig karotenoidtap for oljen lagret ved 4 °C og lufteksponering. Avslutningsvis var karotenoidinnholdet 70 ppm. Laksefôroljen oppbevart mørkt og N₂-beskyttet ved 22 °C og 4 °C hadde tilsynelatende liten eller ingen nedgang i karotenoidinnhold. Oljen lagret med N₂ i lys ved 22 °C endte i midtsjiktet (135 ppm ved avslutning). Fargeforandringer i disse oljene ble også observert. Fargen gikk fra rødbrun ved start til gulbrun ved endt lagring. Også her beholdt oljen med N₂-lokk mer av rødfargen enn oljen eksponert for luft.



Figur 9 Endring i karotenoidinnhold (ppm) i astaxanthinberiket laksefôrolje lagret mørkt 4 °C, mørkt 22 °C, lys 22 °C, med luft eller N₂ i 425 dager.

Fettsyresammensetningen ble også analysert i oljeprøvene ved start og etter lagring i 425 dager ved de ulike betingelsene (tabell 4). Raudåteolje hadde i utgangspunktet et innhold av 18:4 n-3, stereodonsyre (SDA), 20:5 n-3, eicosapentaensyre (EPA) og 22:6 n-3, docoheksaensyre (DHA), på henholdsvis 15,8, 12,3 og 6,9 %. Innholdet av SDA i raudåteoljene lagret i 425 dager sank fra 15,8 % for startprøve til laveste innhold, 7,7 % for oljen lagret mørkt ved 22 °C i luft og 8,9 % for oljen lagret i lys ved 22 °C i luft. Oljene lagret med N₂-lokk og oljen eksponert for luft i kjøleskap hadde et mindre tap av SDA og innholdet i disse fire oljene var redusert til 11,9 – 13,2 %. Med et utgangspunkt på 12,3 % og 6,9 % for henholdsvis EPA og DHA, var innholdet nede i 4,5 og 1,8 % for oljen lagret mørkt ved 22 °C i luft. Oljen lagret ved 22 °C i lys og luft hadde et innhold på henholdsvis 5,0 og 2,3 % for EPA og DHA ved endt lagring. De nitrogenbeskyttede oljene, samt kjølelagret og lufteksponert olje hadde et sluttinnhold av EPA på 7,9 – 9,5 % og av DHA 4,0 – 4,6 %. Polyeneratio beregnet for raudåteoljen var ved start 160. Etter endt lagring var polyeneratio 95,4 – 109,3 for de nitrogenbeskyttede oljene. Verdien var lavere for oljene eksponert for luft, henholdsvis 89,5, 51,1 og 35 for olje lagret mørkt og kjølig, olje i lys ved romtemperatur og olje mørkt ved romtemperatur.

Tabell 4 Fettsyresammensetning (arealprosent) for raudåteolje ved start av lagringsforsøk (0 tid) og etter 425 dager lagret mørkt 4 °C, mørkt 22 °C, lys 22 °C, med luft eller N₂. Tabellen viser også polyeneratio. Standardavvik beregnet for analyser med tre paralleller av samme oljeprøve.

Fettsyrer	4 °C			22 °C , mørkt		22 °C , lys	
	0 tid	N ₂	luft	N ₂	luft	N ₂	luft
14:0	21,7 ± 2,7	24,8 ± 0,2	21,7 ± 5,1	22,1 ± 0,2	33,1 ± 3,8	24,6 ± 3,2	26,2 ± 1,3
16:0	12,0 ± 0,4	13,0 ± 0,4	13,3 ± 0,8	12,5 ± 0,6	18,0 ± 2,1	12,9 ± 2,0	14,3 ± 1,1
16:1 n-7	6,0 ± 0,2	4,8 ± 0,0	8,1 ± 1,6	5,0 ± 0,2	4,2 ± 1,0	4,9 ± 0,5	6,0 ± 0,3
18:1 n-9	5,1 ± 0,9	3,9 ± 0,1	5,9 ± 0,4	3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,7	3,7 ± 0,2	4,5 ± 0,1
18:1 n-7	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:2 n-6	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0
18:3 n-3	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,7	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,4	2,3 ± 0,3	1,9 ± 0,1
18:4 n-3	15,8 ± 1,5	11,9 ± 1,4	12,9 ± 2,9	13,2 ± 1,1	7,7 ± 2,1	13,1 ± 1,4	8,9 ± 0,7
20:1 n-9	3,9 ± 0,7	2,9 ± 0,1	4,4 ± 0,9	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,6	2,9 ± 0,2	3,4 ± 0,2
22:1 n-11	6,1 ± 0,3	5,0 ± 0,6	7,8 ± 2,2	5,4 ± 0,3	5,0 ± 0,9	5,4 ± 0,3	6,2 ± 0,7
22:1 n-9	1,4 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:5 n-3	12,3 ± 0,2	8,4 ± 1,1	7,9 ± 2,2	9,3 ± 1,1	4,5 ± 1,4	9,5 ± 1,1	5,0 ± 0,5
22:6 n-3	6,9 ± 0,8	4,0 ± 0,4	4,0 ± 2,1	4,3 ± 0,6	1,8 ± 0,6	4,6 ± 0,6	2,3 ± 0,5
Sum	95,7	84,2	91,4	84,2	83,1	86,8	79,9
Polyene ratio	160,0	95,4	89,5	108,8	35	109,3	51,1

Analysene av fettsyresammensetningen for den astaxanthinberikede laksefôroljen viste at innholdet EPA og DHA ved start var henholdsvis 16,9 og 7,8 % (tabell 5). Innholdet av EPA i oljene med N₂-lokk var relativt stabilt, 16,9 – 16,2 %. For oljene eksponert for luft var innholdet EPA lavere, 10,8 og 11 % for henholdsvis 22 °C lys og 22 °C mørkt og 15,6 % for oljen lagret kjølig. Innhold av DHA i oljene med N₂-lokk var relativt uforandret etter lagringen; 7,7 – 7,4 %. Lagring med luft førte til en reduksjon i DHA-innhold. Etter kjølelagring var innholdet 6,9 % mens lagring ved romtemperatur førte til et DHA-innhold på 4,4 % for både prøvene lagret med og uten lys. Polyeneratio for oljen ved lagringsforsøkets start var 49,5. Denne verdien endret seg lite for oljen lagret kjølig med N₂-lokk som ble beregnet til 49. Verdien ble omtrent halvert for oljene lagret ved 22 °C og lufteksponering. De resterende oljene, 22 °C med N₂-lokk og 4 °C i luft hadde alle en polyeneratio på over 40, henholdsvis 46 for oljeprøvene ved romtemperatur og 41, 5 for den kjølelagrede oljen.

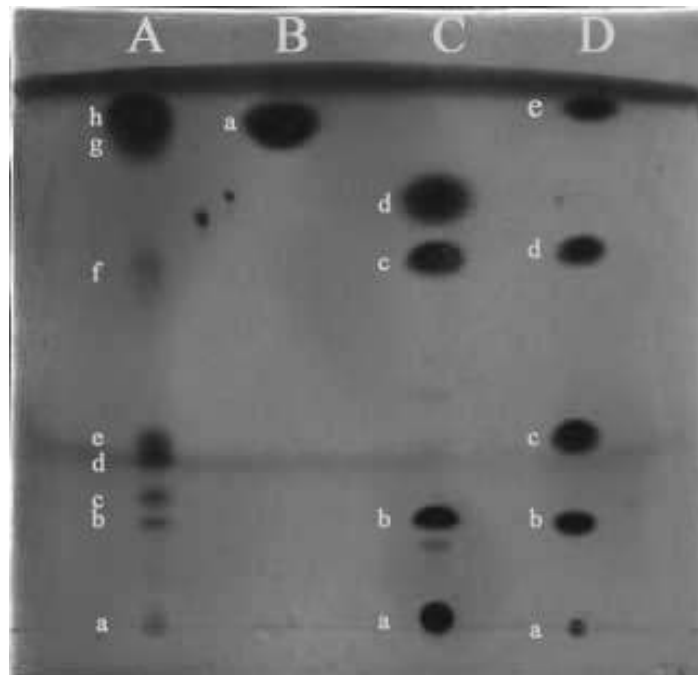
Tabell 5 Fettsyresammensetning (arealprosent) for astaxanthinberiket laksefôrolje ved start av lagringsforsøk (0 tid) og etter 425 lagret ved 4 °C, 22 °C mørkt, 22 °C lys, med luft eller N₂. Tabellen viser også polyeneratio. Standardavvik beregnet for analyser med tre paralleller av samme oljeprøve.

Fettsyrer	4 °C			22 °C , mørkt		22 °C , lys	
	0 tid	N ₂	luft	N ₂	luft	N ₂	luft
14:0	7,9 ± 0,4	8,3 ± 0,2	8,9 ± 0,8	8,9 ± 0,4	11,4 ± 0,3	8,4 ± 0,3	9,7 ± 0,2
16:0	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,4	21,2 ± 1,3	20,4 ± 1,0	25,7 ± 0,4	20,4 ± 0,4	24,0 ± 0,5
16:1 n-7	8,2 ± 0,2	8,6 ± 0,3	8,9 ± 0,1	8,9 ± 0,0	10,5 ± 0,2	8,5 ± 0,3	10,0 ± 0,2
16:2 n-4	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
16:3 n-4	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
18:0	3,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,1	4,5 ± 0,1	3,8 ± 0,0	4,6 ± 0,1
18:1 n-9	9,6 ± 0,2	9,9 ± 0,0	10,2 ± 0,1	9,8 ± 0,0	11,4 ± 0,3	9,7 ± 0,3	11,7 ± 0,2
18:1 n-7	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,0	3,5 ± 0,0	3,3 ± 0,0	3,8 ± 0,1	3,3 ± 0,1	4,0 ± 0,0
18:2 n-6	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0
18:3 n-3	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0
18:4 n-3	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1
20:1 n-9	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,0	3,3 ± 0,0	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1
22:1 n-11	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,0
22:1 n-9	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,0 ± 0,3
20:5 n-3	16,9 ± 0,4	16,9 ± 0,3	15,6 ± 0,3	16,8 ± 0,2	11,0 ± 0,4	16,2 ± 0,5	10,8 ± 0,3
24:0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,1
24:1 n-9	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0
22:5 n-3	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,0
22:6 n-3	7,8 ± 0,3	7,7 ± 0,2	6,9 ± 0,1	7,5 ± 0,2	4,4 ± 0,1	7,4 ± 0,3	4,4 ± 0,1
Sum	94,8	96,1	96,2	96,5	97,1	94,6	95,3
Polyene ratio	49,5	49,0	41,5	46,6	22,6	46,1	24,2

4.2 Fettklasser i raudåteolje

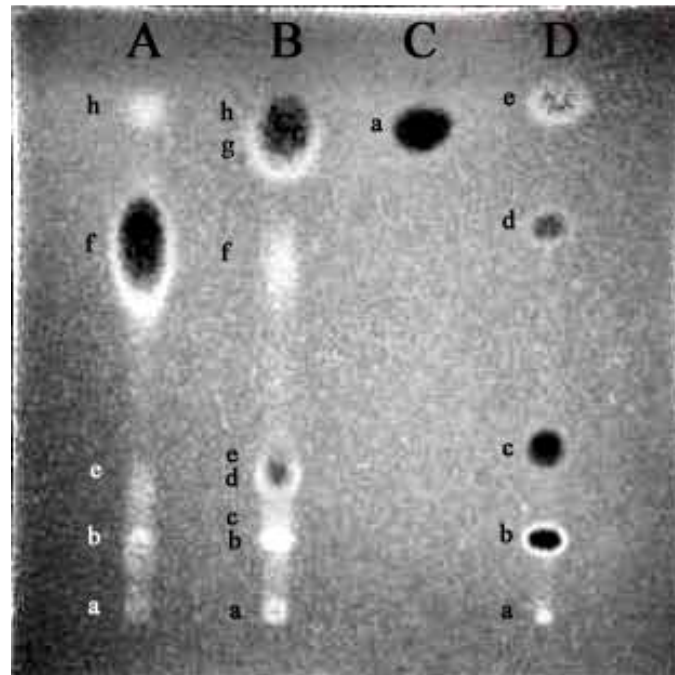
4.2.1 Fettklasser analysert ved tynnsjiktskromatografi

Fettklasser i raudåteolje ble kvalitativt analysert ved å benytte tynnsjiktskromatografi (TLC). Identifisering av enkeltkomponenter i raudåteoljen ble gjennomført med utgangspunkt i 3 standardblandinger. Prøven av kommersielt framstilt raudåteolje inneholdt flere klasser, største mengde var klassene g og h (figur 10, spor A). På figuren kan det se ut som én klasse, men ved påsetting av mindre mengder kunne man tydelig se to separate klasser. Klassene g) og h) ble forsøksvis identifisert som voksestergrupper, klasse f) som spor av TAG, klassene e) og d) som FFA, klassene b) og c) som kolesterol og DAG, og klasse a) som fosfolipid og MAG. Det kan også være mulig at c) er fettalkoholer, men raudåteoljen ble ikke sammenlignet med standardblandinger med innhold av fettalkoholer.



Figur 10 Tynnsjiktskromatografi av raudåteolje (A) og 3 standardblandinger (B, C, D). Standard B inneholdt voksesterforbindelsen myristyloleat (a). Standard C inneholdt MAG; monopalmitat (a), DAG; dipalmitat (b), TAG; tripalmitat (c) og metylpalmitin (d). Standard D inneholdt lecithin (a), kolesterol (b), oljesyre (c), TAG; triolein (d) og kolesteryloleat (e).

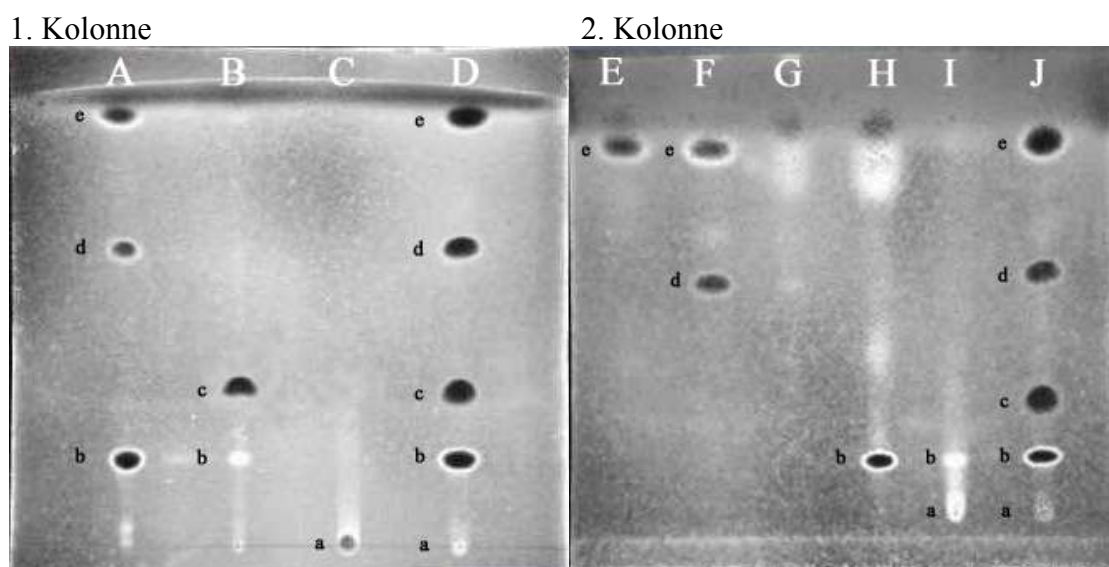
Analysen ble gjentatt med tran som kontroll (figur 11, spor A) Fettklasseinnholdet i tran ble antatt å være MAG og fosfolipider (a), DAG og kolesterol (b) og FFA (e). Hovedinnholdet var TAG (f). Den svake flekken h) kan være spor av voksester eller kolesterylester i tran. Ellers bekrefter resultatene (spor B, figur 11) det som er vist i figur 10 med henhold på fettklasser i raudåteolje.



Figur 11 Tynnsjikt-kromatografi av tran (A), raudåteolje (B) og 2 standardblandinger (C og D). Standard C inneholdt voksesterforbindelsen myristyleat (a). Standard D inneholdt lecithin (a), kolesterol (b), oljesyre (c), TAG; triolein (d) og kolesteryleat (e).

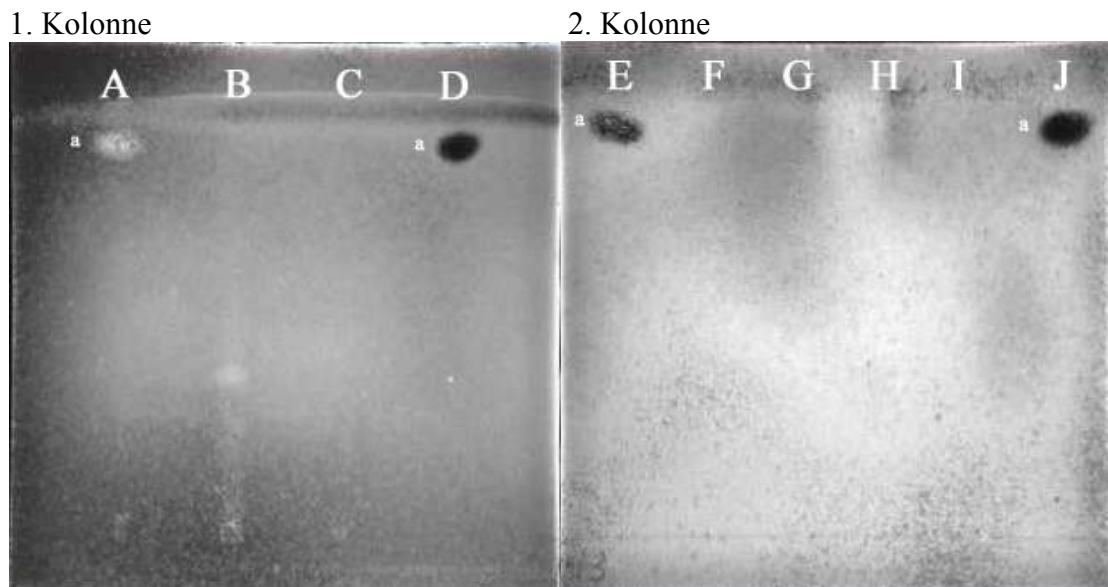
4.2.2 Fettklasser isolert ved Fast fase ekstraksjon

Heptanekstrahert olje fra frysetørket raudåte og kommersielt framstilt raudåteolje ble fraksjonert ved en to trinns Fast fase ekstraksjon (SPE). To fettklassestandarder ble fraksjonert i SPE-systemet som en kvalitetskontroll. Figur 12 viser tynnsjiktskromatografi av alle eluerte fraksjoner fra fettklassestandard (18-5A) som inneholdt lecithin, kolesterol, oljesyre, triolein og kolesteryloleat. Separering av fettklassestandard via 1.kolonne ga 3 fraksjoner, hvor fraksjon A som inneholdt nøytrale lipider, ble applisert på kolonne 2 for videre separasjon. Fettklassene påvist i de enkelte fraksjonene stemte overens med metodebeskrivelsen, med unntak av kolesterylester, kolesterol og spor av lecithin. Kolesterylester ble påvist i både fraksjon D og E (henholdsvis spor E og F), og kolesterol ble påvist i fraksjon G og H (henholdsvis spor H og I), men ikke i fraksjon E (spor G) som beskrevet i SPE-metoden (se materialer og metoder, tabell 3, for detaljert informasjon om elueringsmidler).



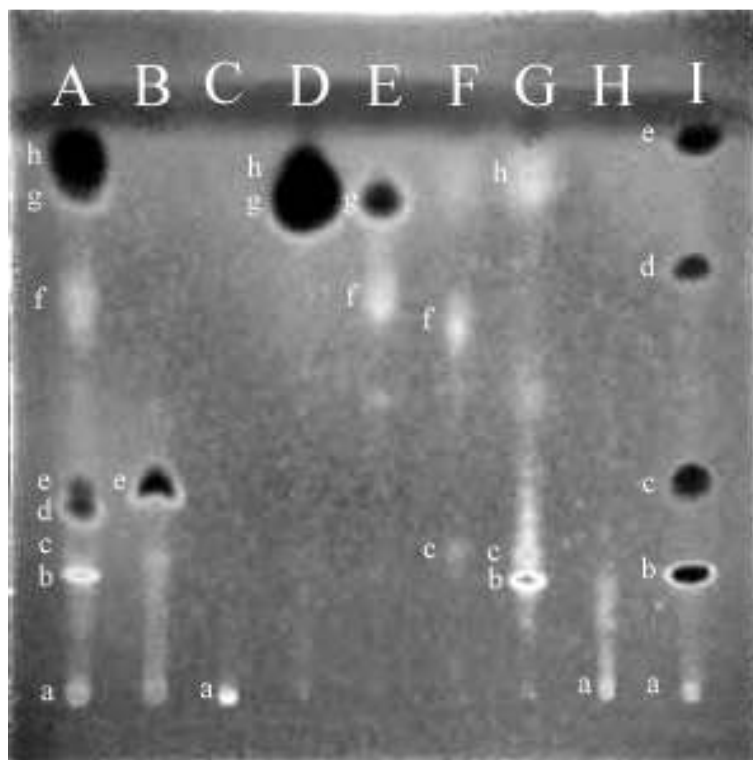
Figur 12 Tynnsjiktskromatografi av fettklassestandard 18-5 A etter SPE trinn 1 og 2. Spor D og J viser ikke-fraksjonert standard: lecithin (a), kolesterol (b), oljesyre (c), TAG; triolein (d), kolesteryloleat (e). Fraksjoner fra fra SPE-separering 1. kolonne: spor A (elueringsmiddel A): kolesterol (b), TAG; triolein (d), kolesteryloleat (e), spor B (elueringsmiddel B): kolesterol (b), oljesyre (c), spor C (elueringsmiddel C): lecithin (a). Fraksjoner fra SPE-separering 2. kolonne: spor E (elueringsmiddel D): kolesterylester (e), spor F (elueringsmiddel E): TAG; triolein (d), kolesteryloleat (e), spor G (elueringsmiddel F): ikke påvist fettklasse, spor H (elueringsmiddel G): kolesterol (b), spor I (elueringsmiddel H): lecithin (a), kolesterol (b).

SPE utført på fettklassestandard myristyloleat viste at voksestere ble eluert via nøytrale lipider i fraksjon A 1. kolonne (figur 13, spor A) og deretter eluert via fraksjon D fra 2. kolonne (spor E).



Figur 13 Tynnsjikt-kromatografi av fettklassestandard myristyloleat etter SPE trinn 1 og 2. Spor D og J viser ikke-fraksjonert standard: myristyloleat (a). Fraksjoner fra SPE-separering 1. kolonne: spor A (elueringsmiddel A): myristyloleat (a). Ikke påvist fettklasser i spor B og C (henholdsvis elueringsmiddel B og C). Fraksjoner fra SPE-separering 2. kolonne: spor E (elueringsmiddel D): myristyloleat (a). Ikke påvist fettklasser i spor F, G, H og I (henholdsvis elueringsmiddel E, F, G og H).

Raudåteolje fraksjonert med SPE-systemet ble analysert ved å benytte tynnsjikt-kromatografi (figur 14) og sammenlignet med en fettklassestandard. Analysene viste tydelige mengder FFA (spor B, elueringsmiddel B) og fosfolipider (spor C, elueringsmiddel C) isolert fra oljen. Innholdet av voksesterer i raudåteoljen ble hovedsakelig påvist i elueringsmiddel D (spor D, klasse g og h) men en gruppe kunne også ses i elueringsmiddel E (spor E, klasse g) og TAG (klasse f). Fettklassene synlig i fraksjon F var mulig svake rester av kolesterol og DAG (spor F, klasse c) og TAG (spor F, klasse f). I tillegg til et mulig innhold av kolesterol og DAG (spor G, klasse b og c) inneholdt fraksjon G rødlige pigmenter. Fraksjon H inneholdt også pigmenter i tillegg til spor av MAG og fosfolipider (spor H, klasse a).



Figur 14 Tynnsjikt-kromatografi av raudåteolje etter SPE trinn 1 og 2 (B – H), ikke-fraksjonert raudåteolje (A), ikke-fraksjonert fettklassestandard (I). Standard I inneholdt lecithin (a), kolesterol (b), oljesyre (c), TAG; triolein (d) og kolesteryloleat (e).

4.2.3 Fettsyresammensetning i voks og frie fettsyrer fra raudåteolje

Utvalgte fraksjoner fra Fast fase ekstraksjon av kommersiell raudåteolje og heptanekstrahert olje fra frysetørket raudåte ble analysert med hensyn på fettsyresammensetning. Fraksjonene som inneholdt frie fettsyrer (B-fraksjon, SPE trinn 1) og voksester (D-fraksjon, SPE trinn 2) ble analysert og sammenlignet med fettsyresammensetningen i total olje (tabell 6). Innholdet av SDA i kommersielt produsert raudåteolje var 15,7 %. I FFA-fraksjonen var innholdet SDA til dels lavere, 8,4 %, og i voksester-fraksjonen 18,9 %. Innhold av EPA i prøvene fra kommersiell olje fordelte seg slikt: 8,6 % i total olje, 18,8 % i FFA-fraksjon og 7,8 % i voksesterfraksjon. DHA-innholdet i den kommersielle oljen var 7,5 %, 25,7 % og 3,5 % for henholdsvis total olje, FFA-fraksjon og voksesterfraksjon. SDA-innholdet for den heptanekstraherte oljen og dens fraksjoner var 13,2 % for total olje, 8,6 % for FFA-fraksjon og 18,2 % for voksesterfraksjon. EPA og DHA i oljen og SPE- fraksjoner ble analysert til henholdsvis 7,9 % og 5,3 % for total olje, 25,1 % og 35 % for FFA-fraksjon, 8,6 % og 3,5 % for voksesterfraksjonen.

Tabell 6 Fettsyresammensetning (arealprosent) i kommersiell raudåteolje og heptanekstrahert raudåteolje og deres respektive FFA- og voksestersfraksjoner etter SPE trinn 1 og 2. Standardavvik beregnet for analyser med 3 paralleller av samme oljeprøve.

Fettsyrer	Kommersiell olje			Heptanekstrahert olje		
	Total olje	FFA-fraksjon	Voksester fraksjon	Total olje	FFA-fraksjon	Voksester fraksjon
14:0	18,7 ± 2,2	4,8 ± 0,3	23,1 ± 2,1	24,2 ± 4,9	2,3 ± 0,5	22,7 ± 1,6
16:0	13,2 ± 1,9	22,5 ± 1,4	13,5 ± 0,9	14,7 ± 2,7	9,0 ± 1,5	14,3 ± 0,5
16:1 n-7	2,5 ± 0,4	1,2 ± 0,0	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,5	1,7 ± 0,0	5,3 ± 0,1
18:1 n-9	4,0 ± 0,3	3,3 ± 0,4	5,0 ± 0,2	4,8 ± 0,3	3,5 ± 0,1	5,6 ± 0,2
18:1 n-7	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:2 n-6	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,9	1,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:3 n-3	3,4 ± 0,7	3,0 ± 0,1	4,1 ± 0,2	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,0	4,3 ± 0,2
18:4 n-3	15,7 ± 3,4	8,4 ± 0,2	18,9 ± 0,8	13,2 ± 1,8	8,6 ± 0,1	18,2 ± 0,9
20:1 n-9	3,7 ± 0,4	1,0 ± 0,0	5,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2	0,9 ± 0,0	4,3 ± 0,2
22:1 n-11	5,8 ± 0,8	0,8 ± 0,0	8,7 ± 0,6	4,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	6,9 ± 0,3
22:1 n-9	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:5 n-3	8,6 ± 2,0	18,8 ± 0,3	7,8 ± 0,1	7,9 ± 1,1	25,1 ± 0,4	8,6 ± 0,5
22:6 n-3	7,5 ± 2,0	25,7 ± 0,3	3,5 ± 0,1	5,3 ± 0,5	35,0 ± 0,5	3,5 ± 0,2
Sum	85,8	93,3	93,3	87,3	93,7	93,7

4.3 Raudåteolje ekstrahert med løsemidler

4.3.1 Fettsyresammensetning

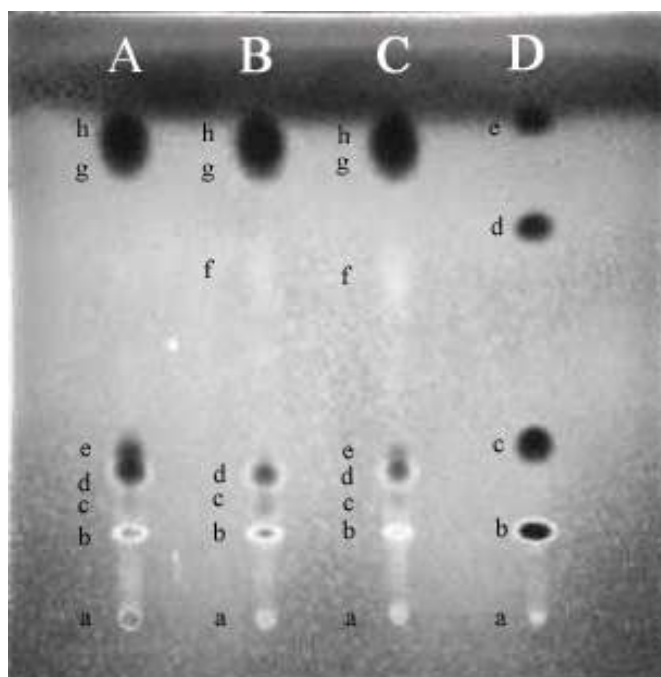
Fettsyresammensetningen ble analysert for oljer utvunnet fra raudåteprodukter med ulike løsemidler samt en kommersielt framstilt raudåteolje. Tabell 7 viser at kommersielt framstilt olje hadde et innhold på 15,7 % SDA, 8,6 % EPA og 7,5 % DHA. Denne kommersielle oljen var produsert fra et annet parti råstoff enn den som er vist i tabell 4. Olje fra frysetørket raudåte ekstrahert med Folchs metode hadde et lavere innhold av SDA (10,9 %) enn den kommersielle oljen, men hadde et tilsynelatende høyere nivå EPA og DHA, henholdsvis 9,1 og 9,4 %. Etanolekstrahert olje fra frysetørket råstoff hadde et lignende innhold; 12,1 % SDA, 9,8 % EPA, og 9,6 % DHA. Heptanekstraksjon av frysetørket raudåte ga en olje med 13,7 % SDA, 7,9 % EPA og 5,3 % DHA. De høyeste verdiene ble påvist i oljen ekstrahert med heptan fra raudåtepulver; 17,5 % SDA, 11,8 % EPA og 10,0 % DHA.

Tabell 7 Fettsyresammensetning (arealprosent) for kommersielt framstilt raudåteolje, Folchs ekstrahert olje fra frysetørket raudåte, heptanekstrahert olje fra frysetørket raudåte, etanolekstrahert olje fra frysetørket raudåte og heptanekstrahert olje fra raudåtepulver. Standardavvik beregnet for analyser med 3 paralleller av samme oljeprøve.

Fettsyrer	Kommersielt framstilt olje	Folchs ekstraksjon av frysetørket raudåte	Heptanekstraksjon av frysetørket raudåte	Etanolekstraksjon av frysetørket raudåte	Heptanekstraksjon av raudåtepulver
14:0	18,7 ± 2,2	21,6 ± 3,9	24,2 ± 4,9	17,5 ± 2,6	11,0 ± 4,4
16:0	13,2 ± 1,9	22,2 ± 5,3	14,7 ± 2,7	15,6 ± 1,9	9,9 ± 0,7
16:1 n-7	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5	3,4 ± 0,3	2,2 ± 0,3
18:1 n-9	4,0 ± 0,3	5,4 ± 0,8	4,8 ± 0,3	5,2 ± 1,5	5,2 ± 0,6
18:1 n-7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:2 n-6	1,5 ± 0,2	0,9 ± 1,3	1,1 ± 0,9	1,9 ± 0,6	1,7 ± 0,2
18:3 n-3	3,4 ± 0,7	2,7 ± 0,5	3,1 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,3
18:4 n-3	15,7 ± 3,4	10,9 ± 1,8	13,2 ± 1,8	12,1 ± 1,0	17,5 ± 0,6
20:1 n-9	3,7 ± 0,4	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2	5,1 ± 1,0
22:1 n-11	5,8 ± 0,8	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,2	7,8 ± 0,4
22:1 n-9	1,3 ± 0,1	0,8 ± 1,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,0
20:5 n-3	8,6 ± 2,0	9,1 ± 1,6	7,9 ± 1,1	9,8 ± 1,3	11,8 ± 1,7
22:6 n-3	7,5 ± 2,0	9,4 ± 1,5	5,3 ± 0,5	9,6 ± 1,4	10,0 ± 1,7
Sum	85,8	93,0	87,3	86,7	88,2

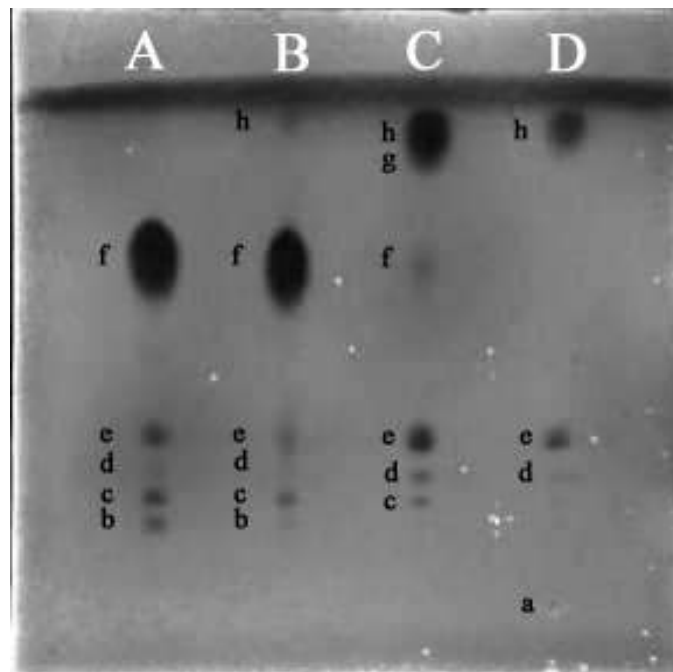
4.3.2 Fettklasser

Forskjellige raudåteoljer ble også analysert ved TLC (figur 15). Olje ekstrahert fra frysetørket råstoff med Folchs metode (spor A,) og olje ekstrahert med heptan fra frysetørket raudåte (spor B) hadde lignende innhold som den kommersielle raudåteoljen (spor C). Den største mengden var innenfor voksesterklassene (g og h). Olje ekstrahert med Folchs metode (spor A) hadde tydelig et høyere innhold av mer FFA (d og e) enn de to andre raudåteoljene (spor B og C). I motsetning til de andre to oljene kunne det ikke påvises TAG i den Folchs ekstraherte oljen.



Figur 15 Tynnsjiktskromatografi av Folchs ekstraksjon av frysetørket raudåte (A) heptanekstraksjon av frysetørket raudåte (B), kommersielt framstilt raudåteolje (C) og fettklassestandard (D). Standard D inneholdt lecithin (a), kolesterol (b), oljesyre (c), TAG; triolein (d) og kolesteryloleat (e).

Olje ekstrahert med heptan fra raudåtepulver og olje ekstrahert med etanol fra frysetørket raudåte (figur 16, henholdsvis spor C og D) ble analysert med TLC sammen med lakseolje og tran (henholdsvis spor A og B). Lakseolje og tran hadde noenlunde lignende fettklasseinndeling og mengdeforhold hvorav største del var TAG (klasse f). De andre fettklassene tilstede var mest framtrødende for prøven av lakseolje, men det kunne ikke påvises MAG eller fosfolipder. Heptanekstrahert olje fra raudåtepulver (spor C), viste noe av det samme, men svakere mønster som de foregående raudåteoljene analysert ved TLC. Fosfolipider og MAG kunne derimot ikke påvises i denne prøven. Olje ekstrahert med etanol fra frysetørket raudåte (spor D) hadde også et svakt fettklasse-mønster. Mest framtrødende i denne oljeprøven var FFA (e), og bare én voksestergruppe (h).

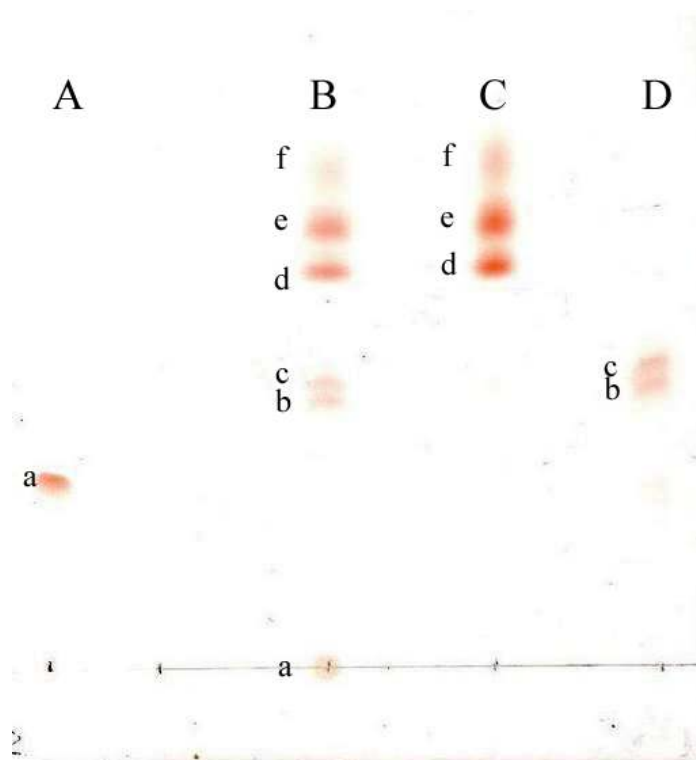


Figur 16 Tynnsjikt-kromatografi av lakseolje (A), tran (B), heptanekstrahert olje fra raudåtepulver (C) og etanolekstrahert olje fra frysetørket raudåte (D).

4.4 Karotenoidprofil i raudåteolje

4.4.1 Karotenoidprofil analysert ved tynnsjiktskromatografi

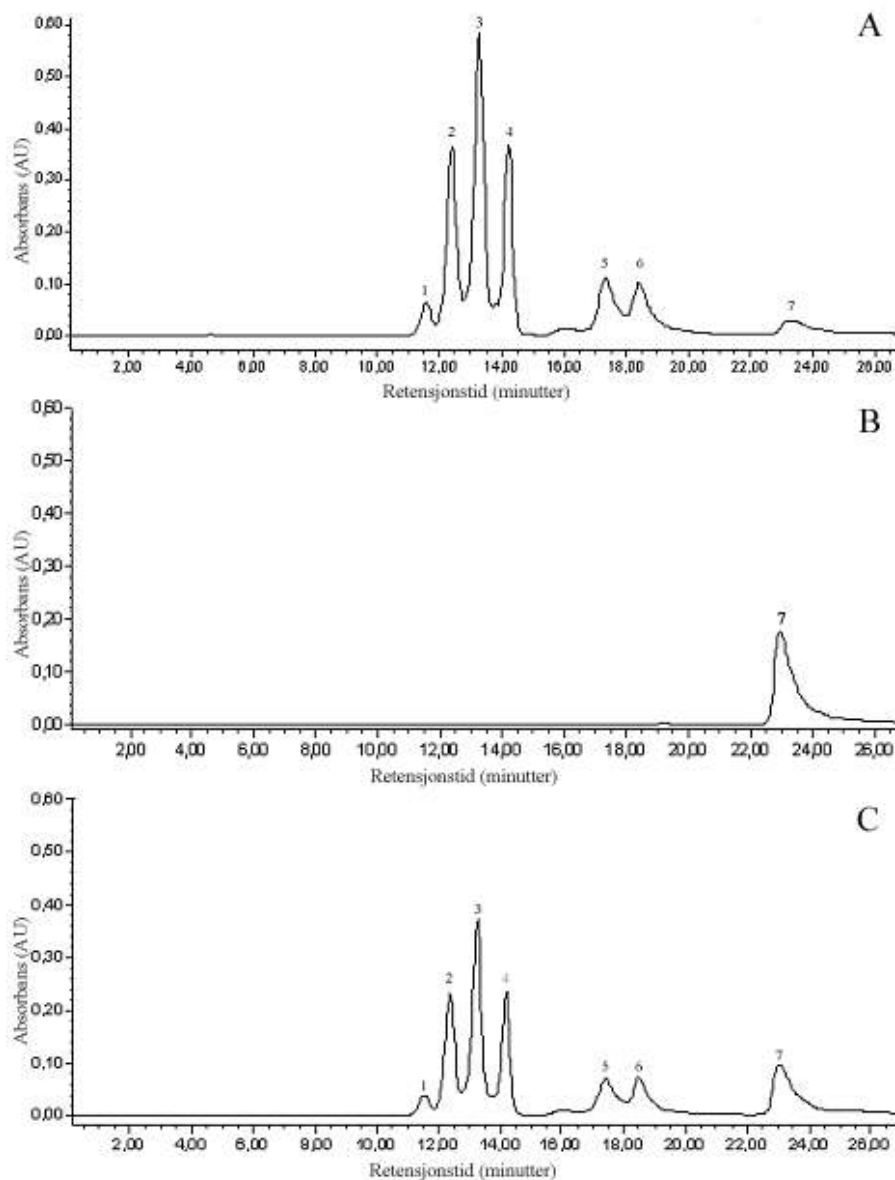
Karotenoidprofilen til raudåteolje og SPE-fraksjonene G og H ble analysert ved å benytte et TLC system tilpasset karotenoidpigmenter. Seks røde bånd med ulik retensjon kunne ses av raudåteoljen (figur 17, spor B). Ingen hadde samme retensjon som astaxanthinstandard (spor A). Pigmentbåndene d, e og f i raudåteoljen (spor B) ble gjenfunnet i fraksjon G (spor C) og båndene b og c ble gjenfunnet i fraksjon H (D). Pigmentbånd a i raudåteoljen ble ikke gjenfunnet i SPE-fraksjonene.



Figur 17 Tynnsjiktskromatografi av astaxanthinstandard (spor A), raudåteolje (spor B), raudåteolje etter SPE-separering: elueringsmiddel G (spor C), elueringsmiddel H (spor D).

4.4.2 Karotenoidprofil analysert ved normalfase HPLC

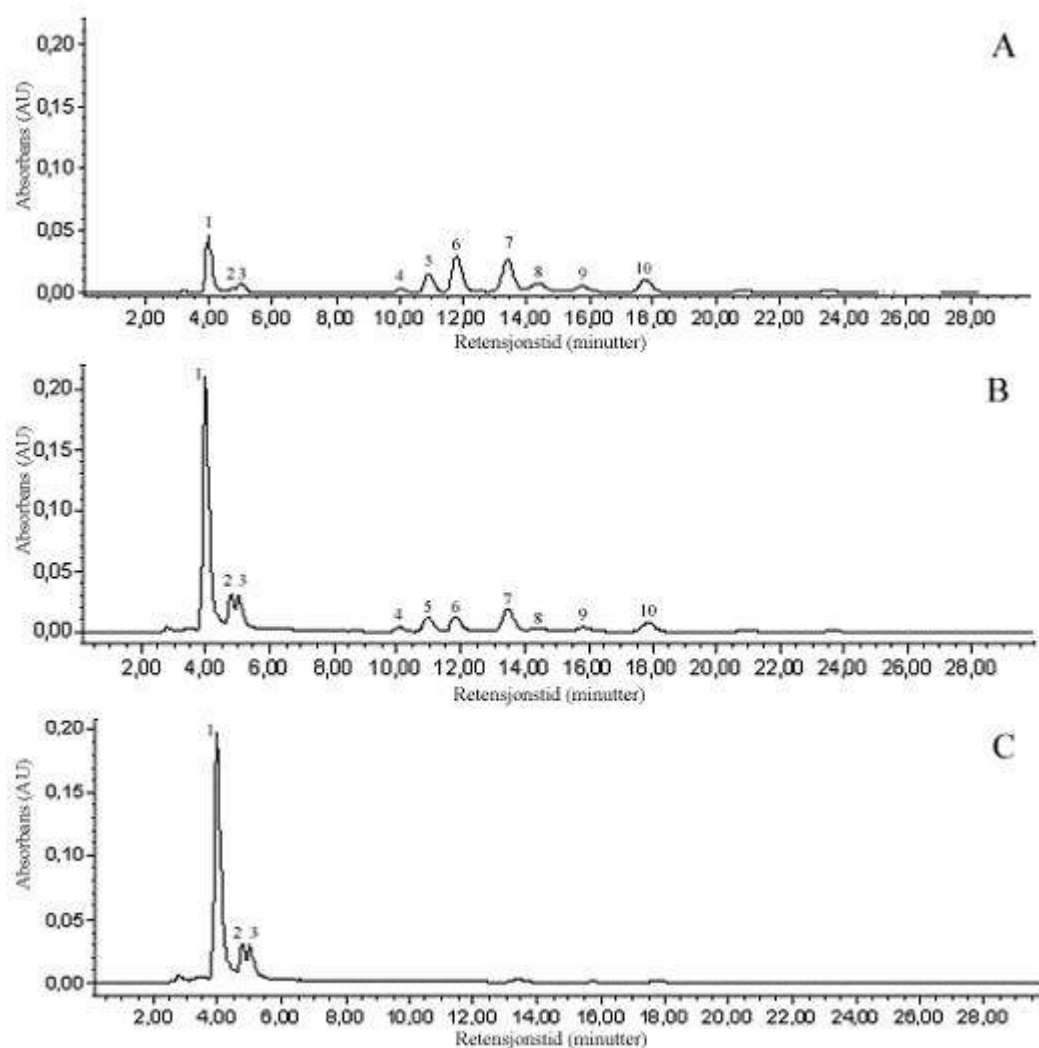
Kommersielt produsert raudåteolje ble analysert ved å benytte et HPLC normalfase gradientsystem (figur 18). Ut fra kromatogram A kunne man se at oljen hadde syv definerte topper med ulik retensjonstid og absorbens ved bølgelengde 480 nm. Astaxanthinstandard analysert ved samme HPLC-system viste en topp (kromatogram B, topp 7) med samme retensjonstid (23 minutter) som for topp 7 i raudåteoljen. Ved å tilsette astaxanthinstandard til raudåteoljen og analysere via HPLC-systemet kunne man se at absorbensen for topp 7 (kromatogram C) økte.



Figur 18 Normalfase HPLC av raudåteolje (A), astaxanthinstandard (B), raudåteolje tilsatt astaxanthinstandard (C).

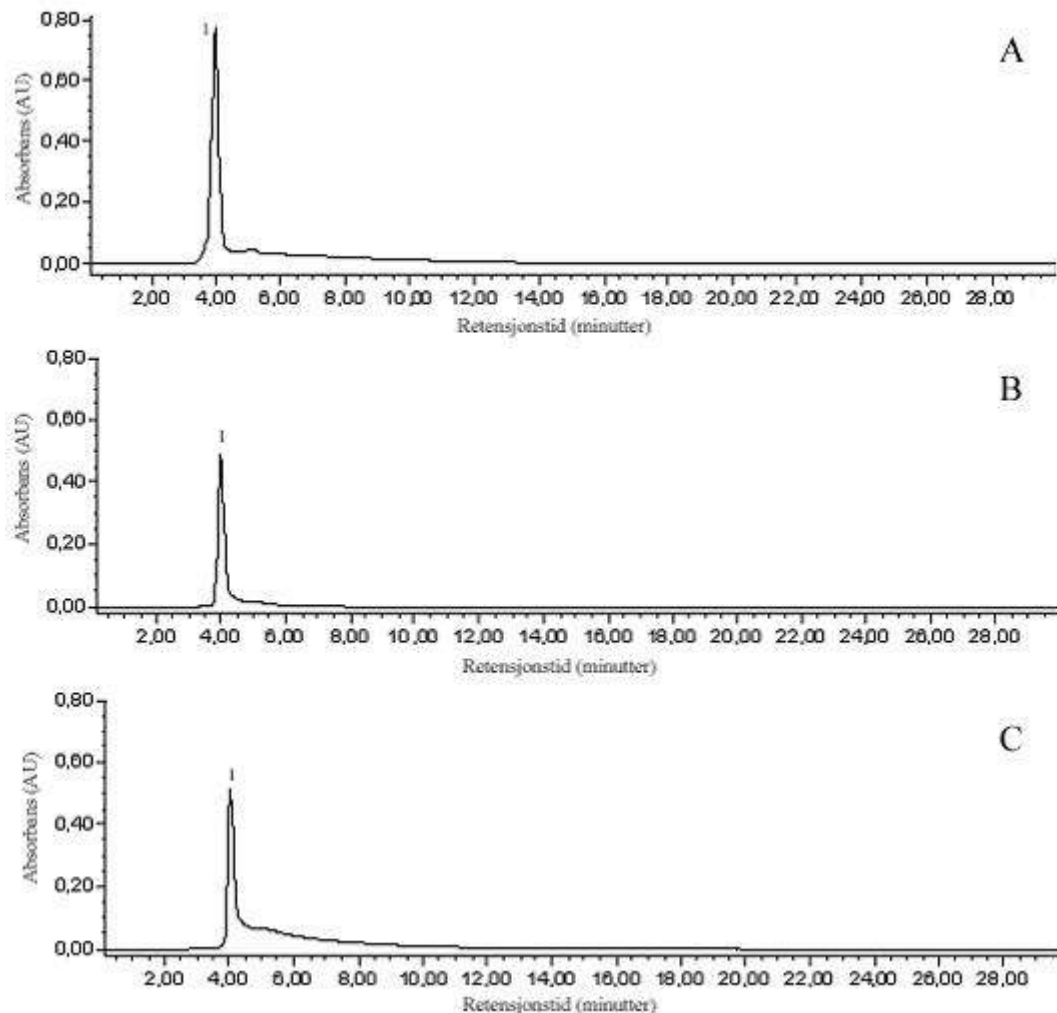
4.4.3 Karotenoidprofil analysert ved revers fase HPLC

Raudåteolje analysert ved revers fase HPLC inneholdt ti definerte toppar ved 480 nm (figur 19, kromatogram A). Ved å utsette oljen for en mild forsåpningsprosess i 24 timer sank absorbanse for toppene 4-10 (kromatogram B) samtidig som absorbanse økte kraftig for toppene 1-3. Etter 43 timers forsåpning kunne det ikke lenger ses mer enn 3 toppar (kromatogram C) og absorbanse for disse var tilnærmet lik som for toppene 1-3 fra kromatogram B.



Figur 19 Revers fase HPLC av raudåteolje (A), raudåteolje forsåpet i 24 timer (B), raudåteolje forsåpet 43 timer (C).

Som en kontroll ble samme forsåpningsprosess gjentatt for astaxanthinstandard. Ubehandlet astaxanthinstandard (figur 20, kromatogram A) hadde samme retensjonstid som topp 1 i raudåteoljen (4 minutter) i figur 19. Forsåpningsprosessen påvirket innholdet av astaxanthin og førte til en nedgang i absorpsjon fra 0,8 til 0,5 etter 24 timers forsåpning (kromatogram B). 43 timers forsåpning av astaxanthinstandard endret tilsynelatende ikke absorpsjonen mer enn for 24 timers forsåpning.



Figur 20 Revers fase HPLC av astaxanthinstandard (A), astaxanthinstandard forsåpet 24 timer (B), astaxanthinstandard forsåpet 43 timer (C).

5 Diskusjon

Raudåte kan være råstoff til flere nye produkter. Oljen utvunnet fra raudåten har et meget høyt innhold av karotenoider og en interessant fettsyresammensetning. I første del av oppgaven ble oksidativ stabilitet til karotenoidene og fettsyrene undersøkt ved langtidslagring av raudåteolje. Normalt benyttes måling av peroksid- og anisidinverdi for å bestemme oksidasjon av umettede fettsyrer. Disse metodene ble vanskelige å gjennomføre på grunn av raudåteoljens kraftige rødfarge. Det ble derfor valgt å undersøke forandringer i den prosentvise fettsyresammensetningen under lagringen.

Målinger av raudåteoljen viste at den i utgangspunktet hadde ca 4 % frie fettsyrer (FFA). Normalt skal det ikke finnes frie fettsyrer tilstede i animalske oljer (inkludert fiskeoljer) produsert fra helt ferskt råstoff. I følge fiskefôrprodusenter er øvre grense for FFA satt til 5 % for oljer som skal benyttes i fôr. For oljer til humant konsum er det satt en grenseverdi på 2 % (European Pharmacopoeia, 2005). Frie fettsyrer i oljer kan fjernes ved raffinering gjennom å nøytralisere med alkali (Gunstone, 2004). Normalt dannes FFA på grunn av enzymatisk aktivitet. I flere publikasjoner er det vist at FFA-innholdet i oljer fra zooplankton varierer og i utgangspunktet kan calanusartene inneholde så mye som 5 -15 % FFA (Ward *et al.*, 1996; Marker *et al.*, 2003). Raudåten kan dermed tenkes å inneholde spesielt aktive lipaser eller fosfolipaser.

Det er kjent at antarktisk krill inneholder svært aktive hydrolytiske enzymer som fører til rask nedbrytning etter fangst (Kawamura *et al.*, 1981). Kontinuerlig produksjon (tørking) av krill sies å ha blitt innført under tråling av antarktisk krill slik at oppholdstida etter at den har kommet inn i trålen blir kortest mulig. Under fangst av raudåte kan tråling foregå i flere timer før fangsten tas opp og fryses øyeblikkelig. Man kan tenke seg at enzymatisk hydrolyse av fett kan skje under dette relativt lange oppholdet i trålen. Dannelsen av FFA kan allerede ha skjedd selv om den fryses inn direkte etter at den har kommet ombord. Det er kjent at enkelte lipaser tåler svært lave temperaturer og at enzymaktiviteten kan opprettholdes spesielt hvis frysetemperaturen er for høy (Sikorski & Kolakowska, 1990; Fernández-Reiriz *et al.*, 1995). Raudåteoljen ble produsert ved oppvarming til 85 °C og eventuelle enzymer til stede ville derfor høyst sannsynlig ha blitt inaktiverte. Likevel kunne man se at under visse lagringsbetingelser oppstod det en svak økning i innhold av FFA, spesielt ved lagring i luft og ved romtemperatur. Prøvene lagret hvor luft var erstattet med N₂ viste ikke økning i FFA-innholdet. Dette kunne indikere at det skjer en kjemisk prosess som er avhengig av oksygen og fører til dannelsen av FFA. Man kan heller ikke utelukke at andre komponenter som dannes under lagring måles som FFA. I kontrollforsøket med en astaxanthinberiket marin olje

(laksefôrolje) fikk man omtrent tilsvarende verdier. Ved luft og høy temperatur var det en svak økning i FFA, mens prøvene lagret ved 4 °C var forholdsvis uendret.

Raudåteolje har et høyt karotenoidinnhold, 1500 ppm. Dette er betydelig høyere enn for eksempel karotenoidinnholdet i rekemel som har blitt målt til omtrent 230 ppm (Olsen & Jakobsen, 1995). Resultater fra målinger av karotenoidinnhold under lagring viste at temperatur og lufttilgang hadde betydning for karotenoidinnholdet. Ved høye temperaturer og lufteksponering ble oljen blek og etterhvert gul. For prøvene hvor luft var erstattet med N₂ holdt karotenoidnivåene seg stabile, spesielt for oljen lagret ved 4 °C. Det ble notert tilsvarende resultater ved målinger av laksefôroljen, hvor oljen lagret mørkt med N₂ kom best ut. Dette stemte overens med hva man forventer av prooksidative forhold. Luft og høy temperatur gir raskere oksidasjonshastighet. Resultatene fra FFA- og karotenoidmålingene må settes i sammenheng med forandringene i fettsyresammensetningen, som var spesielt interessante. LC-PUFA tilstede i oljene er spesielt utsatt for oksidasjon på grunn av det høye antallet dobbeltbindinger. Det var dermed ikke overraskende at mengden omega-3 fettsyrer i oljen ble redusert ved prooksidative lagringsbetingelser. Men selv under de mest beskyttede lagringsforhold, 4 °C og N₂ var omega-3 fettsyrene tydelig reduserte. For å få et mer helhetlig bilde av oksidasjonsforløpet i raudåteoljen hadde det vært en stor fordel å undersøke endringene i fettsyresammensetningen underveis i lagringsforsøket og ikke bare ved start og avslutning. Raudåteoljen var i utgangspunktet like flerumettet som laksefôroljen (omtrent 30 % n-3), men det kan antas at laksefôroljen hadde blitt stabilisert ved tilsetning av antioksidanter. Syntetisk astaxanthin som tilsettes olje foreligger kun som fritt astaxanthin. Raudåteoljen var ikke stabilisert med eksterne antioksidanter. Det burde også tas hensyn til at fettsyresammensetning for "0 prøve" av raudåteolje kunne ha vært en feilmåling og at n-3 tapet under de beste lagringsbetingelsene kanskje ikke var reell. To kommersielle raudåteoljer ble analysert for fettsyresammensetning. EPA- og DHA-innholdet ble ved tid 0 målt til henholdsvis 12,3 og 6,9 % (tabell 4). Tilsvarende for den andre kommersielle oljen var innholdet 8,6 % for EPA og 7,5 % for DHA (tabell 6). Dette innholdet er noenlunde likt det som ble funnet etter lagring av raudåteoljen under beskyttede betingelser; 4 °C og N₂ (tabell 4). Det kunne ikke påvises nevneverdige endringer i fettsyresammensetning for laksefôroljen mellom 0 prøve og oljeprøvene lagret ved optimale betingelser. Raudåteolje var i fast form ved lagring i kjøleskap samtidig som laksefôroljen var flytende, man skulle anta at dette var en faktor som kunne hatt stabiliserende effekt på raudåteoljen (Gorreta *et al.*, 2002).

I oppgaven ble det etablert et tynnsjiktskromatografisk system for analyse av fettklasseinnholdet. Dette er et kvalitativt system som bare gir en indikasjon på mengdeforholdene av fettklasser. Fettklasseanalyser av raudåteolje viste store mengder som

kunne antas å være voksestere, men innhold av for eksempel kolesterylestere kunne heller ikke utelukkes å være tilstede i samme gruppe. Dette på grunn av at voksestere og sterylestere har samme retardasjonsfaktor (R_f) i det aktuelle elueringsystemet. Det er rapportert at så mye som 90 % av de totale lipidene i raudåte kan foreligge som voksestere (Albers *et al.*, 1996). Innenfor voksesterklassen kunne man se to separerte voksestergrupper ved analysing av mindre mengder olje. Dette stemte overens med arbeid gjort av blant annet Webster *et al.* (2006) og Saito & Kotani (2000) hvor det ble funnet to grupper voksestere med omtrent samme R_f , men forskjellig polaritet. Den mest polare voksestergruppen inneholdt hovedsakelig flerumettede fettsyrer og den mindre polare gruppen inneholdt mettede og enumettede fettsyrer. Det vil derfor være nærliggende å anta at fettklasse g (spor A, figur 10) tilsvarer den polare voksestergruppen og fettklasse h tilsvarer den mindre polare gruppen. For å verifisere dette kunne man derfor ha analysert fettsyresammensetningen i de to gruppene ved å skrape av de aktuelle båndene fra tynnsjiktspatene. I motsetning til fiskeoljer hvor hovedgruppen av fettklasser er TAG, kunne det i raudåteolje kun ses spor av TAG. Fettklasser tilstede i mindre mengder ble forsøksvis identifisert som FFA (klasse d og e, spor A, figur 10) og klasse a hovedsakelig som fosfolipider, men også muligens som MAG. Flere av fettklassene har delvis eller helt like R_f -verdier som gjorde nøyaktig identifisering vanskelig. Det var også usikkert om alle fettklassene i oljen ble tilstrekkelig separerte, resultatene kunne tyde på at mengden av fettklasser tilstede i prøven hadde innvirkning på retensjonen.

For å kunne undersøke enkelte fettklasser i raudåteoljen ble de isolert ved å benytte Fast fase ekstraksjon (SPE). Først ble to fettklassestandarder separert med SPE for å undersøke om systemet fungerte. Resultatet var positivt. Både kommersiell raudåteolje og heptanekstrahert olje ble separert. Fettsyresammensetningen ble analysert i voksesterfraksjon og FFA-fraksjon. Analyser av voksesterfraksjon viste et spesielt høyt innhold av fettsyrene 14:0, 18:4 n-3, 20:1 n-9 og 22:1 n-11. Kattner & Greave (1991) har vist at så mye som 20 % av fettsyreinholdet i voksestere var 18:4 n-3, og de dominerende fettalkoholene var 20:1 n-9 og 22:1 n-11. De vanligste enumettede voksesterene i raudåte er 34:1 og 36:1 som tilsvarer fettsyren 14:0 i kombinasjon med de nevnte fettalkoholene (Albers *et al.*, 1996). Fettsyresammensetningen i FFA-fraksjon var preget av et høyt innhold EPA og DHA, som utgjorde opptil 60 % av den totale fettsyresammensetningen. Dette gjenspeiler fettsyresammensetningen i membranlipidene fra raudåte (Albers *et al.*, 1996). Også fettsyresammensetningen i for eksempel atlantisk sild viser et høyt innhold (45-50 %) av EPA og DHA i fosfolipidene (Addison *et al.*, 1969). Dette betyr antakelig at det er fosfolipaser som viser spesielt høy aktivitet i raudåte under og etter fangst. Fosfolipider isolert fra raudåteoljen

ble derfor forsøkt metylert for fettsyreanalyser, uten å lykkes. Dette hadde sannsynligvis årsak i fosfolipidets struktur som ikke lot seg metylere uten først å ha blitt forsåpet.

Det er kjent at både mengde og sammensetning av fett ekstrahert fra et råstoff avhenger av ekstraksjonsmetoden som benyttes (Hamilton & Hamilton, 1992). Ved å ekstrahere olje med ulike løsemidler fra samme parti raudåteråstoff og sammenligne med en kommersiell raudåteolje kunne man se forskjeller mellom de ulike ekstraksjonsmetodene. Polare løsemidler ga størst utbytte i forhold til innhold av langkjedede n-3 fettsyrer, men et varierende innhold med hensyn på fettklassefordeling. Olje ble også ekstrahert fra raudåtepulver, tørrstoffraksjonen fra kommersiell produksjon av olje. Denne oljen hadde et relativt høyt innhold av n-3 fettsyrer (40 %), men få fettklasser var synlig ved tynnsjiktsanalyser.

Raudåteoljen har et spesielt høyt innhold av karotenoider, hvor astaxanthin er det dominerende pigmentet (Juhl *et al.*, 1996). Tynnsjiktsanalyser av raudåteolje med hensyn på karotenoidprofil viste flere røde bånd med ulik retensjon. Det kunne ikke påvises bånd med samme retensjon som astaxanthinstandard (fritt astaxanthin). Pigmentbåndene ble knuttet veldig fort etter eluering og dersom det var små mengder av andre pigmentbånd tilstede i prøvene ble de ikke registrert. Det har tidligere blitt vist at astaxanthin i raudåte foreligger som 46 % diestere, 43 % monoestere og 11 % fritt astaxanthin. R_f -verdier for astaxanthin og astaxanthinestere i TLC-system ble angitt; diestere > monoestere > fritt astaxanthin (Foss *et al.*, 1987). Det er derfor mulig å anta at pigmentbåndene som var synlige ved tynnsjiktskromatografi var mono- og diestere av astaxanthin fordi alle båndene hadde høyere R_f enn standard (fritt astaxanthin). To fraksjoner av raudåteolje separert med SPE-systemet viste seg å inneholde røde pigmenter, fraksjon G og H. Tynnsjiktsanalyser av disse fraksjonene viste pigmentbånd med samme retensjon som pigmentbåndene analysert fra hel raudåteolje. Heller ikke i SPE-fraksjonene ble det funnet pigmentbånd med samme retensjon som fritt astaxanthin. Pigmentbåndene fra fraksjon G kan sannsynligvis tilskrives astaxanthindiestere. Disse båndene hadde en R_f som var høyere enn båndene fra fraksjon H som da kan tolkes som monoestere av astaxanthin. Det antas at astaxanthin foresteret med én fettsyre vil opptre mer polart enn astaxanthin foresteret til to fettsyrer og at polariteten til de ulike elueringsmidlene ville være avgjørende for hvilken fraksjon de ulike pigmentgruppene ble eluert via. Elueringsmiddelet benyttet for fraksjon H i SPE-systemet var mer polart enn elueringsmiddelet benyttet for fraksjon G. Det kunne ha vært spennende å analysere fettsyresammensetningen i de to fraksjonene, men det ble det dessverre ikke tid til.

I tillegg til tynnsjiktsanalyser av karotenoidprofilen fra raudåteolje ble det også benyttet to HPLC-metoder for å undersøke karotenoidene. Ved bruk av både normalfase og

reversfase HPLC ble en enkelt topp identifisert som fritt astaxanthin basert på sammenligning med astaxanthinstandard. Flere andre topper ble også funnet med samme absorpsjonsspekter karakteristisk for astaxanthin, men med ulik retensjonstid. Sannsynligvis var dette astaxanthinestere, og absorbans for disse toppene var adskillig høyere enn for fritt astaxanthin. Ved å utsette raudåteoljen for en mild forsåpningsprosess kunne man tydelig se en gradvis nedgang i absorbans for toppene antatt å være mono- og diestere samtidig som absorbans for fritt astaxanthin økte. Dette kunne indikere en hydrolyse av fettsyrer i esterbindingene til astaxanthin. Absorbans av fritt astaxanthin økte likevel ikke i samme grad som redusert absorbans av astaxanthinestere. Kontrollforsøk utført på astaxanthinstandard viste at fritt astaxanthin ble påvirket av forsåpningsprosessen som førte til nedgang i absorbans. En slik frigjøring av astaxanthin ved alkalisk hydrolyse av astaxanthinestere har blitt vist i flere publikasjoner med lignende resultater (Yuan & Chen, 1999; Kang & Sim, 2007).

Konklusjoner av masteroppgaven kan oppsummeres med følgende; Raudåteolje produsert fra frosset råstoff inneholdt ganske mye frie fettsyrer (ca. 4 %) som antageligvis blir dannet av fosfolipaser aktive under fangst og eventuelt under fryselagring. Både karotenoidinnhold og antagelig også fettsyresammensetning er stabile under langtidslagring ved lav temperatur under nitrogenfase. Langtidslagring med luft viser en klar nedgang (opptil 50 %) i innholdet langkjedede n-3 fettsyrer. Både kommersiell raudåteolje og raudåteolje ekstrahert med ulike løsemidler hadde et høyt innhold av EPA, 20:5 n-3 (8,6 %), DHA, 22:6 n-3 (7,5 %) og SDA, 18:4 n-3 (15,7 %). Voksester var den dominerende fettklassen uavhengig av ekstraksjonsmetode benyttet for å få ut oljen. Kjentegn for voksesterfraksjonen var et høyt innhold av SDA (18,9 %). Fettsyresammensetningen i fraksjonen med frie fettsyrer har likhetstrekk med sammensetningen som er kjent for membranlipider. Dette støtter antagelsen om aktiv fosfolipase i raudåteråstoff. Raudåteolje har et spesielt høyt innhold (ca. 1500 ppm) av karotenoider sammenlignet med andre naturlige krepsdyrkilder. Det kan også sammenlignes med noen av de nivåene som er funnet i enkelte mikroorganismer (Christiansen, 2001). Analysene viste at astaxanthin mono- og diestere er mulige hovedgrupper karotenoider i raudåteoljen.

6 Referanser

- Addison, R. F., Ackman, R. G. & Hingley, J. (1969) Free fatty acids of herring oils - possible derivation from both phospholipids and triglycerides in fresh herring. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **26**, 1577-1583.
- Albers, C. S., Kattner, G. & Hagen, W. (1996) The compositions of wax esters, triacylglycerols and phospholipids in Arctic and Antarctic copepods: evidence of energetic adaptations. *Marine Chemistry*, **55**, 347-358.
- Andersson, M., Van Nieuwerburgh, L. & Snoeijs, P. (2003) Pigment transfer from phytoplankton to zooplankton with emphasis on astaxanthin production in the Baltic Sea food web. *Marine Ecology-Progress Series*, **254**, 213-224.
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., Smullen, R. P. & Sargent, J. R. (2002) Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, **132**, 222-230.
- Bernasconi, R., Bolzacchini, E., Galliani, G., Gugliersi, F., Rindone, B., Rindone, M., Tacconi, M. T. & Terraneo, A. (2007) Determination of the content of wax esters in some sea foods and their molecular composition. A comparison with omega-3 enriched wax esters. *Lwt-Food Science and Technology*, **40**, 569-573.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, **9**, 1551-1558.
- Christiansen, R. (2001) *Fargestoff, Fiskeernæring*. Waagbø, R., Espe, M. & Lie, Ø. (Eds.) Kystnæringen Forlag & bokklubb AS.
- Christiansen, R., Lie, Ø. & Torrissen, O. J. (1995) Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. *Aquaculture Nutrition*, **1**, 189-198.
- Constable, A. J., de la Mare, W. K., Agnew, D. J., Everson, I. & Miller, D. (2000) Managing fisheries to conserve the Antarctic marine ecosystem: practical implementation of the Convention on the Conservation of Antarctic Marine Living Resources (CCAMLR). *ICES - Journal of Marine Science*, **57**, 778-791.
- Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A. & Scaife, J. R. (2005) Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *Lwt-Food Science and Technology*, **38**, 821-828.

- 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**, 233-245.
- European Pharmacopoeia (2005) *European Pharmacopoeia*, Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. ISBN: 978-92-871-5843-6
- Evjemo, J. O., Reitan, K. I. & Olsen, Y. (2003) Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, **227**, 191-210.
- Falk-Petersen, S., Hagen, W., Kattner, G., Clarke, A. & Sargent, J. R. (2000) Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 178-191.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J. R. & Tande, K. S. (1987) Lipid composition of zooplankton in relation to the sub-arctic food web. *Polar Biology*, **8**, 115-120.
- FAO (2006) The state of world fisheries and aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN: 978-92-5-105568-7
- Fernández-Reiriz, M. J., Pastoriza, L., Sampedro, G. & Herrera, J. J. (1995) Changes in lipids of whole and minced rayfish (*Raja clavata*) muscle during frozen storage. *Lwt-Food Science and Technology*, **200**, 420-424.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.
- Foss, P., Renstrøm, B. & Liaaen-Jensen, S. (1987) Natural occurrence of enantiomeric and meso astaxanthin in 7 crustaceans including zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **86**, 313-314.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. & Streiff, K. (1984) Carotenoids in diets for salmonids .1. Pigmentation of Rainbow-trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, **41**, 213-226.
- Funk, V. A. & Hobson, L. A. (1991) Temporal variations in the carotenoid composition and content of *Euphausia pacifica* Hansen in Saanich Inlet, British-Columbia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **148**, 93-104.
- Gibney, M. J. (1997) Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into processed foods. *British Journal of Nutrition*, **78**, 193-195.
- Gorreta, F., Bernasconi, R., Galliani, G., Salmons, M., Tacconi, M. T. & Bianchi, R. (2002) Wax esters of n-3 polyunsaturated fatty acids: A new stable formulation as a potential

- food supplement. 1 - Digestion and absorption in rats. *Lwt-Food Science and Technology*, **35**, 458-465.
- Graeve, M., Hagen, W. & Kattner, G. (1994) Herbivorous or omnivorous? On the significance of lipid compositions as trophic markers in antarctic copepods. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, **41**, 915-924.
- Gunstone, F. D. (2004) *The chemistry of oils and fats. Sources, composition, properties and uses*. Blackwell Publishing Ltd.
- Hagen, W., Van Vleet, E. S. & Kattner, G. (1996) Seasonal lipid storage as overwintering strategy of Antarctic krill. *Marine Ecology-Progress Series*, **134**, 85-89.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hamilton, J. R. & Hamilton, S. (Eds.) (1992) *Lipid Analysis, A practical approach, The practical approach series*. Oxford University Press
- Hargrove, J. L., Greenspan, P. & Hartle, D. K. (2004) Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Experimental Biology and Medicine*, **229**, 215-226
- Hirche, H. J. & Kattner, G. (1993) Egg production and lipid content of *Calanus glacialis* in spring: indication of a food-dependent and food-independent reproductive mode. *Marine Biology*, **117**, 615-622.
- Jensen, C. L. (2006) Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, **83**, 1452-1457.
- Jonasdottir, S. H. (1999) Lipid content of *Calanus finmarchicus* during overwintering in the Faroe-Shetland Channel. *Fisheries Oceanography*, **8**, 61-72.
- Juhl, A. R., Ohman, M. D. & Goericke, R. (1996) Astaxanthin in *Calanus pacificus*: Assessment of pigment-based measures of omnivory. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1198-1207.
- Kang, C. D. & Sim, S. J. (2007) Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. *Biotechnology Progress*, **23**, 866-871.
- Kattner, G. & Graeve, M. (1991) Wax ester composition of the dominant calanoid copepods of the Greenland Sea/Fram Strait region. *Polar Research*, **10**, 479-485.
- Kattner, G., Graeve, M. & Hagen, W. (1994) Ontogenetic and seasonal changes in lipid and fatty acid/alcohol compositions of the dominant Antarctic copepods *Calanus propinquus*, *Calanoides acutus* and *Rhincalanus gigas*. *Marine Biology*, **118**, 637-644.

- Kattner, G. & Hagen, W. (1995) Polar herbivorous copepods - different pathways in lipid biosynthesis. *International Council for the Exploration of the Sea - Journal of Marine Science*, **52**, 329-335.
- Kawamura, Y., Nishimura, K., Igarashi, S., Doi, E. & Yonezawa, D. (1981) Characteristics of autolysis of Antarctic Krill. *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**, 93-100.
- Ke, P. J., Woyeboda, A. D., Regier, L. W. & Ackman, R. G. (1976) An improved titrimetric method for determination of free fatty acids in fish oils. *Environment Canada, Fisheries and Marine Service, Techn. Branch, Halifax, Nova Scotia*, **61**, 1-4.
- Krinsky, N. I. (1994) The Biological Properties of Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, **66**, 1003-1010.
- Lee, R. F., Hagen, W. & Kattner, G. (2006) Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology-Progress Series*, **307**, 273-306.
- Lekang, O.-I. & Guiterrez, M. (2007) *Råvarekilder for omega-3 oljer. Potensialer, ernæring/helse, bærekraftighet og miljøstatus. Sammenligning norske og utenlandske råvarekilder*. RUBIN, Rapport nr. 144.
- Lin, C.-C., Lin, S.-Y. & Hwang, L. S. (1995) Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *Journal of Food Science*, **60**, 36-39.
- Lotocka, M. & Styczynska-Jurewicz, E. (2001) Astaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin esters in the copepod *Acartia bifilosa* (Copepoda, Calanoida) during ontogenic development. *Oceanologia*, **43**, 487-497.
- Lunn, J. & Theobald, H. E. (2006) The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, **31**, 178-224.
- Marker, T., Andreassen, P., Arashkewich, E. & Hansen, B. (2003) Lipid deposition and sexual maturation in cohorts of *Calanus finmarchicus* (Gunnerus) originating from Bergen (60 degrees N) and Tromsø (69 degrees N) reared in Tromsø, Norway. *Marine Biology*, **143**, 283-296.
- Matsuno, T. (2001) Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*, **67**, 771-783.
- Mundheim, H., Aksnes, A. & Hope, B. (2004) Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture*, **237**, 315-331.
- Nordøy, E. S. (1995) Do minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) digest wax esters? *British Journal of Nutrition*, **74**, 717-722.

- 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**, 433-449.
- Olsen, R. E., Suontama, J., Langmyhr, E., Mundheim, H., Ringø, E., Melle, W., Malde, M. K. & Hemre, G.-I. (2006) The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, **12**, 280-290.
- Olsen, R. L. (2007) *Lipidkjemi med vekt på fisk*. Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Olsen, R. L. & Jakobsen, T. (1995) Characterization of flash-dried shrimp processing waste. *Journal of Marine Biotechnology*, **3**, 208-209.
- Pond, D., Watkins, J., Priddle, J. & Sargent, J. R. (1995) Variation in the lipid content and composition of Antarctic krill *Euphausia superba* at South Georgia. *Marine Ecology-Progress Series*, **117**, 49-57.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K. & Kris-Etherton, P. (2006) Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *American Journal of Cardiology*, **98**, 31-18I.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A. & Millington, K. J. (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, **17**, 449-459.
- Saito, H. & Kotani, Y. (2000) Lipids of four boreal species of calanoid copepods: origin of monoene fats of marine animals at higher trophic levels in the grazing food chain in the subarctic ocean ecosystem. *Marine Chemistry*, **71**, 69-82.
- Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D. & Ravishankar, G. A. (2006) An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 7585-7588.
- Sargent, J. R. & Falk-Petersen, S. (1981) Ecological investigations on the zooplankton community in Balsfjorden, northern Norway: Lipids and fatty acids in *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa raschi* and *T. inermis* during mid-winter. *Marine Biology*, **62**, 131-137.
- Sikorski, Z. E. & Kolakowska, A. (1990) *Freezing of marine food, Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. Sikorski, Z. E. (Ed) CRC Press Inc.
- Sommer, F., Agurto, C., Henriksen, P. & Kiørboe, T. (2006) Astaxanthin in the calanoid copepod *Calanus helgolandicus*: dynamics of esterification and vertical distribution in the German Bight, North Sea. *Marine Ecology-Progress Series*, **319**, 167-173.

- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H. (1959) Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography - micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry*, **31**, 307-308.
- Suontama, J., Kiessling, A., Melle, W., Waagbø, R. & Olsen, R. E. (2007) Protein from Northern krill (*Thysanoessa inermis*), Antarctic krill (*Euphausia superba*) and the Arctic amphipod (*Themisto libellula*) can partially replace fish meal in diets to Atlantic salmon (*Salmo salar*) without affecting product quality. *Aquaculture Nutrition*, **13**, 50-58.
- Torrissen, O. J. (1989) Pigmentation of salmonids - Interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture*, **79**, 363-374.
- Vaghela, M. N. & Kilara, A. (1995) A rapid method for extraction of total lipids from whey-protein concentrates and separation of lipid classes with solid-phase extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **72**, 1117-1121.
- Virtue, P., Johannes, R. E., Nichols, P. D. & Young, J. W. (1995) Biochemical composition of *Nyctiphanes australis* and its possible use as an aquaculture feed source: lipids, pigments and fluoride content. *Marine Biology*, **122**, 121-128.
- Visser, A. & Jonasdottir, S. (1999) Lipids, buoyancy and the seasonal vertical migration of *Calanus finmarchicus*. *Fisheries Oceanography*, **8**, 100-106.
- Ward, P., Shreeve, R. S. & Cripps, G. C. (1996) *Rhincalanus gigas* and *Calanus simillimus*: Lipid storage patterns of two species of copepod in the seasonally ice-free zone of the Southern Ocean. *Journal of Plankton Research*, **18**, 1439-1454.
- Webster, L., Walsham, P., Ahmed, Y., Richards, S., Hay, S., Heath, M. & Moffat, C. F. (2006) Development and application of an analytical method for the determination of storage lipids, fatty acids and fatty alcohols in *Calanus finmarchicus*. *Journal of Separation Science*, **29**, 1205-1216.
- Woodall, A. A., Britton, G. & Jackson, M. J. (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, **1336**, 575-586.
- Waagbø, R., Austreng, E. & Torrissen, O. (2001) *Fôr og fôrmidler - den største utfordringen for vekst i norsk havbruk*. Norges Forskningsråd.
- Yohannes, K., Dalton, C. B., Halliday, L., Unicomb, L. E. & Kirk, M. (2002) An outbreak of gastrointestinal illness associated with the consumption of escolar fish. *Communicable Diseases Intelligence*, **26**, 441-448.

- Yuan, J. & Chen, F. (1998) Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3371-3375.
- Yuan, J. & Chen, F. (1999) Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 31-35.