



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

**Lipider i silderogn:
Ekstraksjon med «grønn teknologi».**

Rikke Stabell

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Mai 2021



Lipider i silderogn: Ekstraksjon med «grønn teknologi».

Rikke Stabell

Mastergrad i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Norges Fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
UiT, Norges arktiske universitet

Tromsø
mai 2021



Foto forside: Lill Haugen/ NTB scanpix

Forord

Tenk, allerede fem år har gått siden jeg gikk spent opp trappa på Norges fiskerihøgskole for første gang, og nå er det min tur til å ringe i bjella. 300 studiepoeng og utallige timer på lesesalen har ikke bare gitt meg verdifull kunnskap, men også fine opplevelser og gode venner som jeg tar med meg videre i livet. Engasjerte forelesere og diskusjoner med medstudenter gjør at jeg føler meg klar for å gjøre en god jobb i det jeg ser på som en fantastisk næring.

Takk til mine veiledere for at døren deres alltid har vært åpen, ingen spørsmål har vært for dumme, for uvurderlig veiledning og ikke minst for at dere har delt deres kunnskap med meg. Edel O. Elvevoll som alltid er raus med tilbakemeldinger og Ragnar L. Olsen som har blitt vårt lille leksikon – tusen takk! Og takk til Mari Johannesen Walquist for gode råd og tilbakemelding på oppgaven.

En stor takk til Guro K. Edvinsen og Tone Friis Aune for deres tålmodighet, hjelp til å tenke klart og for ellers all god hjelp på laboratoriet. Takk til Einar Jensen og Terje Vasskog for opplæring og veiledning med GC-MS.

Takk til mamma og pappa, familie, venner og kjæreste for at dere alltid heier på meg. Også en stor takk til Maren Lootz Aarthun og Camilla Johnsen som har gjort studietiden både trygg og morsom, det hadde ikke vært det samme uten dere!

Rikke Stabell

Tromsø, mai 2021

Sammendrag

Omega-3 fettsyrer er i større grad bundet til fosfolipider (PL) enn triacylglyserol (TAG) i umoden silderogn. Fettsyrene EPA (C20:5 n-3) og DHA (C22:6 n-3) er i hovedsak bare å finne i sjømat og disse fettsyrene har flere positive helseeffekter, som kan bidra til å redusere hjerte- og karsykdommer. Umoden silderogn har et høyt innhold av celler og inneholder relativt sett lite depotfett og derav høy andel PL. Til tross for kunnskap om verdifullt næringsinnhold er umoden silderogn et lite utnyttet reårstoff. Formålet med denne studien var å ekstrahere lipider fra umoden silderogn med «grønn teknologi», samt analysere fettklasse- og fettsyresammensetningen.

«Grønn teknologi» betyr i denne sammenhengen bruk av ikke-klorerte organiske løsemidler. Fettutbyttet i ubehandlet silderogn ekstrahert med Folchs, heptan:isopropanol (2:1, v/v) og etanol var henholdsvis 6,6; 5,1 og 7,1. Fra frysetørket silderogn ble det ekstrahert 15,3% fett med etanol. Den best egnede «grønne» metoden i denne studien var etanolekstraksjon og av kostnadsgrunner bør våt silderogn brukes.

Produktet Romega® ble analysert for sammenligning grunnet et angitt 35 % innhold av silderognekstrakt. Fett fra silderogn hadde et høyt innhold av PL (69,4%), sammenlignet med Romega® hvor det ble påvist overraskende lite PL til tross for at det var deklart 34% fosfolipidinnhold på pakningen. Høyt innhold av frie fettsyrer (FFA) i Romega® kan tyde på at det har skjedd en nedbrytning av eventuelle PL i produktene. Innholdet av TAG var derimot høyt i Romega® sammenlignet med fett fra silderogn. Med bakgrunn i resultatene fra denne studien er det usikkert hvorvidt produktet inneholder deklart silderognekstrakt.

Det ble påvist et høyt innhold av langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer, særlig eikosapentaensyre (12,7%) og dokosaheksaensyre (29,7%), i lipider fra umoden silderogn. Nøytrale lipider (NL) og PL i fettekstrakt fra etanolekstraksjon ble effektivt separert med fast fase ekstraksjon. Fettsyreanalyser av fettklassene viste at PL hadde betydelig høyere mengde EPA og DHA sammenlignet med NL. Basert på anbefalinger fra europeisk myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA) vil inntak av 14-36 gram silderogn være nok for å dekke dagsbehovet for EPA og DHA. I tillegg til et høyt innhold av lipider, hadde silderogn en stor mengde essensielle aminosyrer. Umoden silderogn er altså næringsrikt, og lipidene ble effektivt ekstrahert med «grønn teknologi».

Summary

In immature herring roe omega 3 fatty acids are mainly bound to phospholipids (PL) than triacylglycerols (TAG). The fatty acids EPA (C20:5 n-3) and DHA (C22:6 n-3) are mainly found in seafood and have several positive health effects, which can reduce cardiovascular disease. Immature herring roe has a high content of cells, hence a high proportion of PL and a relatively low content of depot fat. Despite knowledge of valuable nutrient content, immature herring roe is an underutilized material. The purpose of this study was to extract lipids from immature herring roe using “green technology”, as well as to analyze lipid classes and fatty acids composition.

“Green technology” in this context means no use of chlorinated organic solvents. The fat yield of untreated herring roe extracted with Folchs method, heptane:isopropanol (2:1, v/v) and ethanol were respectively 6.6, 5.1 and 7.1%. From freeze-dried herring roe 15.3% fat was extracted with ethanol. The most suitable “green” method in this study was ethanol extraction and for cost reasons wet herring roe should be used.

The product Romega® was analyzed for comparison due to a stated 35% content of herring roe extract. Lipids in herring roe had a high content of PL (69.4%), compared to Romega® where surprisingly little PL was detected even though 34% PL content was declared on the package. High content of free fatty acids (FFA) in Romega® may indicate that PL has been decomposed. On the other hand, the content of TAG was high in Romega® compared to lipids from herring roe. Based on the results of this study, it is uncertain whether the product contained declared herring roe extract.

High levels of long-chain polyunsaturated omega 3 fatty acids, especially EPA (12.7%) and DHA (29.7%), was detected in lipids from immature herring roe. Neutral lipids (NL) and PL in lipid extract from ethanol extraction were effectively separated with solid phase extraction. PL had higher levels of EPA and DHA than neutral lipids. Based on recommendations from the European Food Safety Authority (EFSA) an intake of 14-36 grams herring roe is enough to cover the daily needs of EPA and DHA. In addition to nutrient-rich content of lipids, herring roe had a large amount of essential amino acids. Immature herring roe is nutritious, and lipids were efficiently extracted by “green technology”.

Innhold

1	Innledning.....	1
2	Materialer og metoder	5
2.1	Materialer.....	5
2.1.1	Produkter	5
2.1.2	Kjemikalier.....	6
2.2	Metoder.....	7
2.2.1	Vanninnhold	7
2.2.2	Askeinnhold	7
2.2.3	Fettekstraksjon	7
2.2.4	Frysetørket materiale ekstrahert med etanol	8
2.2.5	Fettsyresammensetning	8
2.2.6	Fettklassesammensetning	10
2.2.7	Separasjon av fettklasser med fast fase ekstraksjon.....	12
2.2.8	Aminosyresammensetning	12
3	Resultater.....	14
3.1	Vann-, aske-, fett- og proteininnhold.....	14
3.2	Fettsyresammensetning	14
3.2.1	GC-FID.....	14
3.2.2	GC-MS	17
3.3	Fettklassesammensetning	21
3.3.1	HPLC.....	21
3.3.2	TLC	22
3.4	Grønn teknologi.....	23
3.4.1	Ekstraksjon av lipider i silderogn med heptan:isopropanol og etanol	24
3.4.2	Frysetørket materiale ekstrahert med etanol	25

3.5	SPE – separasjon av fettklasser	27
3.5.1	Fettsyresammensetning av utvalgte fettklasser etter SPE	29
3.6	Aminosyresammensetning	30
4	Diskusjon	32
5	Konklusjoner	37
	Referanseliste	38

Forkortelser

AA	Aminosyre
DAG	Diacylglyserol
DCM	Diklormetan
DGTS	Diacylglyceryltrimethylhomo-Ser
DHA	Dokosaheksaensyre (C22:6 n-3)
EFSA	Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet
EPA	Eikosapentaensyre (C20:5 n-3)
FA	Fettsyre
FAlc	Fettalkoholer
FAME	Fettsyremetylestere
FAO	FNs organisasjon for ernæring og landbruk
FFA	Frie fettsyrer
FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatografi
HPLC	Høytrykks væskkromatografi
HP-TLC	Høyoppløselig tynnsjikt-kromatografi
IS	Internstandard
LC-PUFA n-3	Langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer
MAG	Monoacylglyserol
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometri
MUFA	Monoumettede fettsyrer
ND	Ikke påvist
NL	Nøytrale lipider
NVG	Norsk vårgytende
PC, PE, PG	Fosfatidylkolin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylglyserol
PL	Fosfolipider
PUFA	Flerumettede fettsyrer
SFA	Mettede fettsyrer
SPE	Fast fase ekstraksjon
TAG	Triacylglyserol
TLC	Tynnsjikts kromatografi
WE	Voksester

1 Innledning

De langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrene (LC-PUFA n-3) eikosapentaensyre (EPA; 20:5 n-3) og dokosaheksaensyre (DHA; 22:6 n-3) finnes i hovedsak bare i sjømat. De positive helsemessige effektene av disse fettsyrene kom i fokus for 40-50 år siden etter at to danske forskere oppdaget at inuitter på Grønland hadde lavere forekomster av hjerte- og karsykdommer sammenlignet med dansker og inuitter i Danmark (Dyerberg *et al.*, 1978; Bang & Dyerberg, 1980). Dette ble satt i sammenheng med deres høye inntak av sjømat, særlig sel og hval, med høyt innhold av EPA og DHA. I ettertid har det blitt publisert utallige vitenskapelige artikler om temaet LC-PUFA n-3 og (potensielle) helseeffekter. Innholdet av EPA og DHA er hovedgrunnen eller -årsak til at helsemyndigheter i mange land anbefaler et høyt konsum av sjømat (Kris-Etherton *et al.*, 2009). Som alternativ til sjømat er helsekostprodukter med høyt innhold av disse fettsyrene populært. Helsekostprodukter inneholder ofte konsentrert LC-PUFA n-3, fra fiskeolje som har gjennomgått prosesser hvor fettsyrer uten omega-3 har blitt fjernet. Ofte brukes pelagisk fiskeolje til slike prosesser, hvor TAG av såkalt 18:12 kvalitet (18% EPA og 12% DHA), transesertifiseres fra TAG til etylester (EE), og tilbake til opprinnelig form hvor konsentratet består av for eksempel TAG 30:20 (30% EPA og 20% DHA). Fiskeolje som har gått gjennom slike prosesser benevnes som rTAG (re-esterified TAG).

LC-PUFA n-3 er vist å ha blant annet anti-inflammatorisk virkning (Calder, 2001; Cleland *et al.*, 2006) og dette kan bidra til å redusere risikoen for hjerte- og karsykdommer. EPA og DHA er i stand til å hemme en rekke aspekter ved inflammasjon, blant annet ved å endre sammensetningen av PL i cellemembranen og fettsammensetningen blir i større grad sammensatt av n-3 som gir opphav til mindre inflammasjon (Calder, 2015). Inflammasjon, på folkemunne mer kjent som betennelsessykdom, er en forsvarsmekanisme i kroppen ved infeksjon eller andre skader, som initierer drap på patogene organismer og reparasjon av skadet vev. Kroppslige reaksjoner kan være feber, hevelse og dannelsen av cytokiner for å nevne noen. EPA og DHA kan hemme produksjonen av proinflammatoriske cytokiner (Wang *et al.*, 2010). Det er ikke kjent hvilken mengde marine LC-PUFA n-3 som må brukes for å oppnå anti-inflammatorisk effekt, men daglig dose bør være minst 2 gram (Calder, 2015). Høyt inntak av fiskeolje antas å ha gunstig effekt på revmatoid artritt, noen typer psoriasis (guttat, pustuløse), mot tilbakefall av Chrohns sykdom og mot progresjon av kronisk nyrebetennelse (Cleland *et al.*, 2003; Calder, 2015; Grimminger *et al.*, 1993; Mayser *et al.*, 1998; Mayser *et al.*, 2002;

Belluzzi *et al.*, 1996; Donadio *et al.*, 1994). Nyere forskning viser at LC-PUFA n-3 reduserer triacylglyserolrike lipoproteiner, noe som kan gi kardiovaskulære fordeler (Weinberg *et al.*, 2021). Omega-3 kan endre produksjonen av inflammatoriske, vasodilaterende og antiaggregerende signalmolekyler, og på den måten redusere inflammasjon, forhindre dannelselse av blodpropp og stabilisere åreforkalkning (Weinberg *et al.*, 2021).

Langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer kommer i all vesentlighet i to former: TAG og PL. TAG består av tre fettsyrer forestret på et glyserolmolekyl, og er nøytralt eller upolart. Hos mennesker lagres TAG som depotfett, og brukes som energilager. PL består av to fettsyrer og en fosfatgruppe bundet til glyserol. En gruppe er koblet til fosfatgruppen og dette kan eksempelvis være kolin, etanolamin og serin som danner henholdsvis fosfolipidene fosfatidylkolin (PC) og fosfatidyletanolamin (PE). PL består altså av både en polar og en upolar del, noe som gir fettklassen spesielle egenskaper. PL er viktige komponenter i oppbygningen av cellemembraner og kan fungere som signalmolekyler. Cellemembraner består av et dobbelt fosfolipidlag hvor de upolare fettsyrene er vendt inn mot hverandre, og fosfatgruppene danner yttersiden av membranen. Dermed skilles vann innen- og utenfor cellemembranen fra hverandre.

Hvorvidt TAG eller PL er den beste kilden til LC-PUFA n-3 er et omdiskutert tema. For å få et overblikk over hvilken fettklasse som egner seg best som kilde til EPA og DHA undersøkes ofte biotilgjengeligheten. Biotilgjengelighet brukes for å beskrive hvor mye av et næringsmiddel som faktisk blir gjenværende i kroppen etter fordøyelse og absorpsjon (Ghasemifard *et al.*, 2014). Det er flere rapporter som hevder at PL har bedre biotilgjengelighet enn TAG (Schuchardt *et al.*, 2011; Ulven *et al.*, 2011; Maki *et al.*, 2009). I disse studiene ble det i hovedsak undersøkt krillolje og fiskeolje da LC-PUFA n-3 i større grad er bundet til PL i krillolje og bare til TAG i fiskeolje. Det ble funnet overraskende store mengder EPA og DHA i FFA, som utgjør henholdsvis 22 og 21% av det totale innholdet av EPA og DHA i krillolje (Schuchardt *et al.*, 2011). Dette kan påvirke resultatene i studier hvor krillolje brukes, da det er dokumentert høy biotilgjengelighet for FFA (Lawson & Hughes, 1988). Med utgangspunkt i dette, kan det ha en signifikant forskjell på biotilgjengeligheten dersom krillolje blir benyttet som kilde til PL. En gjengående utfordring i disse studiene er ulikt inntak mengde av EPA og DHA. PL har høyere innhold av omega-3 fettsyrene (Gigliotti *et al.*, 2011), og det må derfor inntas ulik dose, i dette tilfellet, krillolje og fiskeolje for å få samme mengde EPA og DHA. Det er gjort forsøk med høyere inntak av krillolje enn fiskeolje, men samme innhold av EPA

og DHA, men det ble ikke dokumentert signifikant forskjell i biotilgjengeligheten hos mennesker av PL og TAG (Ghasemifard *et al.*, 2014; Salem & Kuratko, 2014; Yurko-Mauro *et al.*, 2015). I dyrestudier ble det derimot dokumentert en signifikant større forskjell i opptak fra PL enn fra TAG målt i vev (Ghasemifard *et al.*, 2014). Ulikt inntak av fettsyrene påvirker resultatene i stor grad og gjør det vanskelig å trekke konklusjoner om hvorvidt den ene fettklassen er mer biotilgjengelig enn den andre. Nevnte fordeler med LC-PUFA n-3 er basert på kronisk inntak, derfor bør også biotilgjengeligheten ses på etter en periode på over 3 måneder (Yurko-Mauro *et al.*, 2015). Begge fettklassene er nyttige og komplementære, og for å si noe om biotilgjengeligheten til hver av fettklassene bør både PL og TAG tilføres kroppen samtidig (Ghasemifard *et al.*, 2014).

I denne studien skal lipider fra umoden silderogn ekstraheres, samt fettinnhold og sammensetning skal analyseres. Umoden silderogn er et restråstoff som går tapt i produksjonen eller selges som lavkostprodukt, til tross for kjent innhold av LC-PUFA n-3 av høy kvalitet (Olsen *et al.*, 2014). Utnyttelse av rogn vil kunne gi økt inntjening på restråstoffet og dermed økt lønnsomhet for pelagisk industri (Carvajal *et al.*, 2013). Rogn er et sesongbasert råstoff og vektutbyttet øker gjennom sesongen mot gyting. Carvajal med flere (2013) fra SINTEF har publisert rapporten: «Gonadeutvikling hos Norsk vårgytende (NVG) sild», hvor blant annet gonadeutviklingen gjennom sesongen for mellomstor og stor sild dokumenteres. I rapporten ble det dokumentert størst utbytte av rogn med 19,0% for mellomstor sild og 21,3% for stor sild i begynnelsen av februar. Dette betyr i praksis at innvollene nesten bare består av rogn. Rogn har et høyt innhold av celler med relativt sett lite depotfett og derav høy andel PL. Som normalt inneholder PL en høyere andel LC-PUFA n-3 i rogn. Til tross kunnskap om verdifullt næringsinnhold er umoden silderogn en lite utnyttet ressurs.

Umoden silderogn skal ekstraheres med «grønn teknologi» som i denne sammenhengen betyr at klorerte organiske løsemidler ikke benyttes siden fettekstraktet skal til human bruk. Formålet med ekstraksjon er å frigjøre fett, noe som nødvendigvis gjør å ødelegge vev, og dette kan gjøres mekanisk, enzymatisk eller kjemisk. Metoden som benyttes bør være effektiv men samtidig skånsom for å hindre ødeleggelse av lipider eller fettsyrer gjennom hydrolyse eller oksidasjon (Medina *et al.*, 1998). Eksempler på mekanisk denaturering/ødeleggelse kan være bruk av for eksempel termisk denaturering eller kverning og pressing av materialet. Enzymatisk ekstrahering gjøres ved bruk av proteaser, som spalter proteiner for å gjøre lipidene lettere tilgjengelige. Blant kjemisk ekstraksjon finnes det flere metoder og valget av metode avhenger

av råstoffets fettinnhold. Ettersom «likt løser likt» vil upolare løsemidler ekstrahere NL, mens polare løsemidler ekstraherer polare lipider (Medina *et al.*, 1998). NL har van der Waals krefter, mens polare lipider har hydrogenbindinger mellom molekylene. De mest kjente fett ekstraksjonsmetodene er Blich- & Dyer (1959) og Folch *et al.* (1957), som begge er effektive metoder. Metodene benytter blandinger av polare og upolare løsemidler slik som kloroform, metanol og diklormetan, og kan ekstrahere både nøytrale- og polare lipider. Metodene kan ikke benyttes ved produksjon av kosttilskudd, grunnet bruk av klorerte organiske løsemidler, og mulige rester i produktet som har negativ helseeffekt hos dyr og mennesker. Dersom løsemidlene erstattes av mindre skadelige eller mer flyktige løsemidler som eksempelvis 3-octanol, diethylene glycol monoethyl ether eller etanol kan ekstraktene benyttes. For ekstraksjon av polare lipider er etanol godt egnet som løsemiddel (Medina *et al.*, 1998). Etanol er et løsemiddel som er relativt billig, har lav toksisitet og kan dermed benyttes til ekstraksjon for humant konsum, i tillegg til at det kan destilleres av og gjenbrukes.

Formålet med denne studien var å ekstrahere lipider fra umoden silderogn med «grønn teknologi», samt analysere fettklasse- og fettsyresammensetningen. Målet er at kvaliteten på fett ekstraktet, spesielt innholdet av omega-3, skal øke under ekstraksjon og at det kan brukes til humant bruk.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Produkter

Umoden silderogn fra Norsk vårgytende (NVG) sild (*Clupea harengus* L.) ble levert i frossen tilstand av selskapet Nergaard AS på Senja, Norge. To batcher (16770, 17435) Romega® ble kjøpt på Life AS. Romega® er et ekstrakt fra norsk silderogn og produseres av Arctic Nutrition AS. Produkt og innholdsdeklarasjon er vist i figur 1.



Ingredienser: Silderognekstrakt (35%), fiskeoljekonsentrat (33%), gelatin, glyserol, antioksidant (tokoferoler), aroma (vanilje).		
Næringsinnhold pr. anbefalt døgndose:	2 kapsler	6 kapsler
Fiskeolje med Omega-3 fosfolipider	1000 mg	3000 mg
Hvorav:		
Omega-3 fosfolipider	340 mg	1020 mg
Total omega-3	470 mg	1410 mg
-DHA	320 mg	960 mg
-EPA	100 mg	300 mg
Kolin	42 mg	126 mg
Vitamin D	1 µl (20%*)	3 µl (60%*)
*av referanseverdi		

Figur 1. Romega® kapsler fra Arctic Nutrition AS.

Kapsler av Krillolje ble kjøpt på Life AS. Krillolje er et ekstrakt fra krill (*Euphausia superba*) fanget i Antarktis og produsert av Life AS Norge. Produkt og innholdsdeklarasjon er vist i figur 2.



Ingredienser: Killolje (<i>Euphausia superba</i>), kapsel (gelatin fra storfe, fuktighetsbevarende middel (sorbitol, glyserol)), aroma (vanilje).		
Næringsinnhold pr. anbefalt døgndose:	1 kaps.	2 kaps.
Krillolje	500 mg	1000 mg
Marine fosfolipider (70 % omega-3 fosfolipider)	200 mg	400 mg
Omega-3 fettsyrer	110 mg	220 mg
Hvorav:	EPA	60 mg
	DHA	27,5 mg
	Øvrige	25 mg
Astaxanthin	50 ul	100 ul

Figur 2. Krillolje fra Life AS Norge.

2.1.2 Kjemikalier

Alle kjemikalier som ble brukt er av analytisk kvalitet (puriss p.a.).

Diklormetan; DCM ($\geq 99,9\%$), Metanol, Saltsyre (37%), Kloroform (99,0-99,4%), Dietyleter ($\geq 99,8\%$), Svovelsyre (95-97%), Natriumklorid, Heptan, Norleucine (N-Leu) og A9906 fysiologisk aminosyrestandard var fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC-MS kvalitets metanol; MeOH var fra Fisher Scientific (Loughborough, UK). Eddiksyre ($\geq 99,8\%$) og saltsyre (37%) var fra Honeywell Fluka (Muskegon, MI, USA). Etylacetat (LC-grade), aceton (LC-grade) og isopropanol (LC-grade) var fra Merck (Darmstadt, Germany). Lithium loading buffer (pH 2,2) og Ultra Ninhydrin Reagent Kit var fra Biochrom Co. (Cambridge, UK).

Internstandard (IS) C17:0; Heptadecanoic Acid, og FAME-standard til GC: PUFA 1, PUFA 2, PUFA 3 var produsert av Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA). 16-0A, 18-5A (TLC-standarder) og GLC 411 (FAME-standard til GC) var fra Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN, USA). Fosfatidylkolin produksjonsnummer 37-1700; PC, og FAME-standarder til GC-MS: FAME mix 1300 var fra Larodan AB (Solna, Sverige).

Nitrogen-gass var fra Linde Gas AS (Oslo, Norge).

2.2 Metoder

2.2.1 Vanninnhold

Vanninnhold for silderogn ble bestemt på følgende måte: Ubehandlet silderogn (2 g) ble veid ut i en forhåndsveid aluminiumskål. Prøven ble satt i varmeskap av typen Heratherm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ved 105°C i 48 timer. Vanninnhold (%) ble beregnet ved bruk av formel 1:

Formel 1:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{våttvekt (g)} - \text{tørrvekt (g)}}{\text{våttvekt (g)}} * 100 \%$$

2.2.2 Askeinnhold

Askeinnhold for silderogn ble bestemt på følgende måte: Ubehandlet silderogn (2 g) ble veid ut i en forhåndsveid aluminiumskål. Prøven ble satt i en forbrenningsovn av typen Program Controller S27 (Nabertherm GmbH, Lilienthal, Tyskland) ved 540°C i 16 timer. Askeinnhold (%) ble beregnet ved bruk av formel 2:

Formel 2:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{vekt etter tørking og forbrenning (g)}}{\text{våttvekt (g)}} * 100 \%$$

2.2.3 Fettekstraksjon

Fettekstraksjonen ble utført med en modifisert metode opprinnelig beskrevet av Folch *et al.* (1957). Frossen silderogn ble tint i kjøleskap og kvernet med stavmikser til en jevn farse. Silderognfarsen (0,5 g) og 9,5 ml løsemiddel diklormetan:metanol (DCM:MeOH) (2:1, v/v) ble tilsatt 15 ml Falcon-rør. Rør med kork ble ristet godt og plassert i en Multi Reax ristemaskin (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland) i avtrekksskap i 30 minutter. Rørene ble så sentrifugert i en Heraeus Multifuge sentrifuge maskin 1 S_R (Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) i 10 minutter ved 4000 x g. Væsken ble overført til nye 15 ml Falcon-rør og tilsatt 2 ml 0,9% natriumklorid. Rørene ble ristet godt i 10 sekunder, deretter sentrifugert ved 2000 x g i 10 minutter. Vann/metanol-fasen ble fjernet. Lipidfasen ble overført til forhåndsveide 8 ml glassrør og dampet tørr med nitrogengass i en Sample Concentrator

SBHCONC/1 (Stuart Scientific, Staffordshire, England). Glassrør med lipider ble veid og fettinnhold ble beregnet ved bruk av formel 3.

Olje fra Romega® kapslene ble trukket ut med en kanyle og fettinnholdet ble bestemt med Folchs metode.

Fett fra silderogn ble også ekstrahert på nøyaktig samme måte med å bruke heptan:isopropanol (2:1, v/v) istedenfor DCM:MeOH (2:1, v/v).

Fett fra silderogn ble også ekstrahert på samme måte med bruk av etanol istedenfor DCM:MeOH (2:1, v/v). Prøven ble dampet inn etter at væsken ble skilt fra den faste fasen, da det ikke ble dannet to faser.

Formel 3:

$$\text{Fettinnhold (\%)} = \frac{\text{glassrør med innhold (g)} - \text{glassrør tom (g)}}{\text{innveid mengde prøve (g)}} * 100 \%$$

2.2.4 Frysetørket materiale ekstrahert med etanol

Umoden silderogn ble tørket med en frysetørker Vir-Tis Genesis 35EL (SP Industries, Gardiner, NY, USA) i 48 timer.

Frysetørket og pulverisert silderogn (10 g) ble tilsatt 90 ml etanol i et 250-ml begerglass, løsningen ble blandet ved bruk av magnetrører i 90 minutter ved 50°C. Lipid- og etanolløsningen ble tilsatt to 50 ml Falcon-rør, og rørene ble sentrifugert med en Eppendorf Centrifuge 5804 (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) ved 7800 x g i 10 minutter. Væsken ble tilsatt til nye Falcon-rør, sentrifugert ved 7800 x g i 10 nye minutter og helt over i nye Falcon-rør. En rundkolbe ble tilsatt løsningen og tørket med en rotavapor RV 10 control IKA-Werke GmbH & Co. (KG, Staufen, Tyskland) ved 50 mBar, 25 rpm og vannbad på 35 grader.

2.2.5 Fettsyresammensetning

2.2.5.1 Metylering

Fett ekstrahert fra umoden silderogn med Folchs og olje fra Romega® kapsler ble metylert som beskrevet av Stoffel *et al.* (1959). Fett ble løst til 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1, v/v). Lipidløsning (100 µl 10 mg/ml), internstandard (100 µl 1 mg/ml) (C17:0, Heptadecanoic Acid), diklormetan (900 µl) og 2% H₂SO₄ i metanol (2 ml) ble tilsatt Duran GL18 Kimaxrør (Fisher Scientific, USA). Prøven ble inkubert i en Drybath Stdrd varmeblokk (Thermo Scientific,

Osterorde, Tyskland) på 100°C i en time. Heptan (3,5 ml) og 5% NaCl (3,5 ml) ble tilsatt løsningen og blandet godt. Heptan/lipid-fasen ble dampet tørr med nitrogengass i en Sample Concentrator SBHCONC/1. Inndampede prøver ble tilsatt 100 µl heptan og overført til GC-vial for analyse av fettsyresammensetningen bestemt med en gasskromatograf.

Isolerte fettklasser (NL og PL) isolert med fast fase ekstraksjon (SPE) fra fett ekstrahert med etanol ble metylert med Stoffels metode. Det ble tilsatt 200 µl DCM:MeOH (2:1, v/v) til 30 µl av hver fraksjon, deretter ble fettklassene metylert etter standard prosedyre. Etter tilsetning av 1,5 ml 5% NaCl og 1,5 ml heptan og risting, ble 1 ml heptan overført til GC-MS rør for analyse av fettsyresammensetning bestemt med en gasskromatograf.

2.2.5.2 GC-FID

Metylerte fettsyrer ble separert med en Agilent 6890N gasskromatograf flammeionisasjonsdetektor (GC-FID) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En GC-kolonne: CP7419 Kapillærkolonne (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med helium (AGA, Oslo) som bæregass ble benyttet. Injektoren hadde en temperatur på 240°C og detektoren 250°C. Følgende temperaturprogram ble benyttet: GC-ovnen ble holdt ved 60°C i ett minutt, for så å øke til 130°C (30°C/min), videre opp til 195°C (1,3°C/min) og til slutt opp til 240°C (30°C/min) i 10 minutter.

Kjente fettsyrestandarder (PUFA 1, PUFA 2, PUFA 3 OG GLC 411) ble benyttet for identifikasjon av fettsyrer i de ulike prøvene. Fettsyrer med arealprosent under 0,5% ble ekskludert fra kromatogrammet. Andelen av de enkelte fettsyrene ble bestemt av arealprosent og mengde fettsyrer pr. 100 g prøve, til disse utregningene ble formel 4 og 5 benyttet.

Formel 4:

$$\text{Arealprosent} = \frac{\text{arealet av den enkelte fettsyretoppen i kromatogrammet}}{\text{totalt areal av alle fettsyretoppene}} * 100 \%$$

Formel 5:

$$\text{Mengde fettsyre (g) pr. 100g prøve} = \frac{\text{areal topp FA}}{\text{areal topp IS}} * \frac{\text{tilsatt IS (g)}}{\text{vektprøve (g)}} * 100\text{g}$$

2.2.5.3 GC-MS

Metylerte fettsyrer ble analysert ved bruk av en gasskromatograf (GC) (Agilent Technologies 7890 GC) sammen med en Waters Micromass Quattro micro GC massespektrometer (MS).

Maskinen var utstyrt med en Aglient Technologies 7693 Autosampler og Aglient G4513A serie injektor. Kolonnen som ble brukt for kromatografisk separasjon var en «wall-coated open tubular (WCOT) kapillærkollone med lengde 30 m, 0,25 mm i indre diameter og filmtykkelse på 0,25 µm (Restek Famewax). Helium (6.0) ble brukt som bæregass. Separasjonen av de ulike komponentene ble målt ved å bruke temperaturprogram på GC-kolonne ovnen. Starttemperaturen var på 40°C i 2 minutter. Temperaturen steg med 5 grader i minuttet til 250°C og ble holdt på denne temperaturen i 16 minutter. Den totale tiden er 60 minutter.

Kjente fettsyrestandarder (FAME mix 1300) ble analysert og en standardkurve for hver fettsyre ble laget. Standardkurven ble benyttet for å identifisere fettsyrer i prøvene. Andelen av de enkelte fettsyrene ble bestemt som arealprosent og mengde fettsyrer pr. 100 g prøve, til disse utregningene ble formel 4 og 5 benyttet.

2.2.6 Fettklassesammensetning

2.2.6.1 Høytrykk væskekromatografi, HPLC

Fettklassesammensetningen ble analysert ved bruk av en High-performance liquid chromatography-metode basert på Abreu & Solgadi (2017). Fettklasser i ekstrahert fett fra umoden silderogn og Romega® ble separert med høytrykks væskekromatografi (HPLC). Ekstrahert fett ble løst til 1 mg/ml og 0,1 mg/ml med Mobilfase A/Chloroform (2:1, v/v) i glassvialer. Lipidprøvene ble identifisert på en Waters e2795 separasjonsmodul (Waters, Milford, MA, USA) ved bruk av en Supelcosil LC-SI 5 mm (25 cm x 4,6 mm) kolonne (Supelco HPLC produkter, Bellefonte, PA, USA), ved en temperatur på 40°C og 40 ml injeksjonsvolum. Standardblandingen 16-0 A (MAG, DAG, TAG, Metylester) (1) og 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) (2) ble benyttet for å identifisere fettklasser i lipider ved bruk av Waters 2424 ELS-detektor (Waters, Milford, MA, USA) med følgende innstillinger: forsterkning 100, nebulizer 30% oppvarmingseffekt, drivrør 40°C og trykk lik 40 PSI. Kjøretiden var omtrent 40 minutter og gradientprofilen er framstilt i tabell 1.

Tabell 1. Gradientprofil for HPLC-programmet. Mobilfase A = Isooktan/etylacetat (99,8:0,2; v/v), Mobilfase B = Aceton/etylacetat (2:1, v/v) 0,15% eddiksyre, Mobilfase C = Isopropanol/H₂O (85:15, v/v).

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfase C (%)	Flow (ml/min)
0,0	100	0	0	1,5
1,5	100	0	0	1,5
1,6	97	3	0	1,5
6,0	94	6	0	1,5
8,0	50	50	0	1,5
8,1	46	39	15	1,5
14,0	43	30	27	1,5
14,1	43	30	27	1,5
18,0	40	0	60	1,5
23,0	40	0	60	1,5
24,0	0	100	0	1,5
25,0	0	100	0	2,0
27,0	0	100	0	2,0
27,1	100	0	0	2,0
36,0	100	0	0	2,0
36,1	100	0	0	1,5

2.2.6.2 Tynnsjikt kromatografi, TLC

Fettklasser i oljeprøvene ble separert via tynnsjikt kromatografi (TLC). Olje fra Romega® kapsler og ekstrahert olje fra umoden silderogn ble løst i diklormetan til en konsentrasjon på 10 mg/ml og 1 eller 2 µl av hver prøve ble avsatt på høyoppløselig tynnsjiktskromatografi (HP-TLC) silica 10x10 cm plater med en konsentrasjonssone på 2,5 cm (Merck, Darmstadt, Germany). Elueringskaret ble tilsatt løpemiddel (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:1, v/v/v) og platen ble satt oppreist i karet. Platen ble tatt ut når løpemiddeelfronten var ca. 1 cm fra toppen av platen, og sprayet med 10% kopparsulfat og 8% fosforsyre som beskrevet av Vaghela & Kilara (1995). Platen lufttørket stående, ble deretter satt i et avkjølt varmeskap og fremkalt med oppvarming til 180°C. Standardblandingen 16-0 A (MAG, DAG, TAG, Metylester) og 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) ble benyttet for å identifisere de separerte fettklassene.

Forsøket ble gjentatt med et mer polart løpemiddel i karet (DCM:MeOH:H₂O, 25:10:1, v/v/v). Fosfatidylkolin ble brukt som internstandard for å identifisere PL.

2.2.7 Separasjon av fettklasser med fast fase ekstraksjon

Fettklasser i fetttekstraksjon av umoden silderogn ble isolert med SPE basert på en modifisert versjon av Vaghela og Kilara (1995). Mega bond Elut – NH₂ (5 g) aminopropyl SPE disposable kolonne (Aglient Technologies, Inc. Folsom, CA, USA) ble satt på en manifoldvakuum (Aglient Technologies, CA, USA). Kolonnen ble tilsatt 20 µl heptan. Fettekstrakt fra umoden silderogn (200 mg) ble løst i 4,5 ml kloroform, og tilsatt kolonnen. Det ble tilsatt 10 ml elueringsløsning (tabell 2) til kolonnen for å separere ut henholdsvis NL, FFA og PL, dette ble gjort totalt fem ganger. Prøven ble dampet tørr med nitrogen, og ble deretter tilsatt 1 ml kloroform.

Tabell 2. Elueringsløsninger brukt for separasjon av fettklassene nøytrale lipider, fosfolipider og frie fettsyrer i SPE-kolonner. Hentet og tilpasset fra Vang *et al.*, 2013.

Fettklasser	Elueringsløsning	Volum forhold	Volum (ml)
Nøytrale lipider	Kloroform:isopropanol	2:1	20
Frie fettsyrer	Dietyleter:eddiksyre	98:2	20
Fosfolipider	Metanol	ren	20

2.2.8 Aminosyresammensetning

Aminosyrer i silderogn ble analysert med en metode beskrevet av Mæhre *et al.* (2013). Ubehandlet silderogn (200 mg) ble blandet med 500 µl 20 mM norleucine (N-leu) (internstandard) og 700 µl milli-Q H₂O. Det ble tilsatt 1,2 ml konsentrert saltsyre (37%) og prøven ble flushet med nitrogen i 10-15 sekunder. Prøvene ble satt i varmeskap ved 110°C i 24 timer (Moore & Stein, 1963).

Prøvene ble avkjølt og 1,5 ml eppendorfrør ble tilsatt 1000 µl prøve og sentrifugert med en Eppendorf Centrifuge 5424 R (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) på 14.000 rpm i 5 minutter. Lipidløsning (100 µl) ble overført til analyserør og dampet tørr med nitrogengass. Inndampet prøve ble tilsatt 1 ml loading buffer (Lithium loading buffer, pH 2,2).

Prøvene ble analysert ved bruk av Biochrom 30 aminosyreanalysator (Biochrom Co. Cambridge, UK) med litiumcitrat likevekts kolonne og post-kolonne derivert med ninhydrin. Signalene ble analysert med Chromeleon Software (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) og aminosyrer ble identifisert med A9906 fysiologisk aminosyrestandard.

Proteininnholdet ble bestemt som summen av det totale antallet aminosyrer der molekylvektene til de individuelle aminosyrer ble redusert med molekylvekta til vann (18) som anbefalt av FAO (2003) (formel 6).

Formel 6:

$$\text{Proteininnhold (\%)} = \frac{\text{mg AA}}{\text{g prøve}} * \frac{\text{molekylvekt AA} - \text{molekylvekt vann}}{\text{molekylvent AA}} * 100 \%$$

3 Resultater

3.1 Vann-, aske-, fett- og proteininnhold

Vann-, aske-, fett- og proteininnhold i ubehandlet silderogn, samt fettinnhold i frysetørket silderogn, i restmaterialet etter etanolekstraksjon av frysetørket silderogn og Romega® (batch nr. 16770) er oppgitt i prosentandel basert på vekt (tabell 3).

Tabell 3. Vann- (n=3), aske- (n=4), fett- (n=3) og proteininnhold (n=3) i ubehandlet silderogn (vektprosent). Fett fra ubehandlet silderogn ble ekstrahert med modifisert Folchs metode mens proteininnhold ble bestemt ut fra aminosyresammensetning. Fett fra frysetørket silderogn ble ekstrahert med etanol (n=3). Fett fra restmaterialet (n=3) etter etanolekstraksjon og i Romega®-produktet (n=3) ble ekstrahert med modifisert Folchs metode. Strek (-): ikke analysert.

	Silderogn, våtvekt	Silderogn, frysetørket	Restmaterialet, etanolekstraksjon	Romega®, batch nr. 16770
<i>Vanninnhold %</i>	64,4 ± 0,0	-	-	-
<i>Askeinnhold %</i>	1,5 ± 0,0	-	-	-
<i>Fettinnhold %</i>	6,6 ± 1,2	15,3 ± 1,0	1,9 ± 0,2	85,6 ± 2,4
<i>Proteininnhold %</i>	22,7 ± 0,8	-	-	-

Vann-, aske- og proteininnhold i ubehandlet silderogn ble funnet å være henholdsvis 64,4; 1,5 og 22,7%. På våtvektsbasis ble fettinnholdet i silderogn bestemt med modifisert Folchs metode til 6,6%. Tas det hensyn til vanninnholdet kan fettinnholdet kalkuleres til 18,5% på tørrvektbasis. Ved å ekstrahere med etanol ble frysetørket silderogn funnet å inneholde 15,3% fett. I restmaterialet etter etanolekstraksjon og i Romega®-produktet ble det med modifisert Folchs metode funnet et innhold på henholdsvis 1,9 og 85,6% fett.

3.2 Fettsyresammensetning

3.2.1 GC-FID

Gjennomsnittlig fettsyresammensetningen (arealprosent) i fett ekstrakt fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs og olje fra Romega® ble analysert med GC-FID (tabell 4).

Tabell 4. Gjennomsnittlig fettsyreinnhold (arealprosent) i ubehandlet silderogn (n=3), Romega® batch nr. 16770 (n=3) og batch nr. 17435 (n=3). Internstandard C17:0. ND = ikke påvist. SFA = mettede fettsyrer, MUFA = enumettede fettsyrer, PUFA = flerumettede fettsyrer, FA = fettsyrer, LC-PUFA n-3 = langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer.

Fettsyrer	Silderogn	Romega® batch nr. 16770	Romega® batch nr. 17435
C14:0	3,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1
C16:0	20,5 ± 0,7	10,8 ± 0,7	5,5 ± 1,0
C18:0	2,2 ± 0,1	6,9 ± 0,6	2,5 ± 0,3
∑ SFA	26,5 ± 1,0	19,6 ± 1,4	9,6 ± 1,4
C16:1 n-7	3,8 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0
C18:1 n-9	9,5 ± 0,4	4,5 ± 0,1	5,3 ± 0,1
C18:1 n-7	4,0 ± 0,8	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,1
C20:1 n-9	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0
C24:1 n-9	ND	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,1
∑ MUFA	20,2 ± 1,4	10,5 ± 0,1	12,2 ± 0,3
C16:3 n-4	ND	1,7 ± 0,2	ND
C18:2 n-6	1,3 ± 0,0	ND	0,8 ± 0,0
C18:3 n-3	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,4	0,7 ± 0,0
C18:4 n-3	1,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0
C20:4 n-6	ND	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0
C20:4 n-3	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,1
C20:5 n-3 (EPA)	12,7 ± 0,4	11,7 ± 0,3	13,8 ± 0,1
C22:4 n-6	ND	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0
C22:5 n-3	1,2 ± 0,0	4,1 ± 0,1	4,7 ± 0,1
C22:6 n-3 (DHA)	29,7 ± 1,4	44,5 ± 1,1	52,8 ± 1,0
∑ PUFA	49,9 ± 1,9	68,2 ± 2,2	78,0 ± 1,3
∑ FA	100,4 ± 4,4	100,1 ± 3,8	99,8 ± 3,0
∑ LC-PUFA n-3	45,7 ± 1,9	62,2 ± 1,5	73,3 ± 1,3
<i>Uidentifiserte fettsyrer</i>	3,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	ND

Silderogn inneholdt 26,5% mettede fettsyrer (SFA), 20,2% enumettede fettsyrer (MUFA) og 49,9% flerumettede fettsyrer (PUFA). Romega® batch nr. 16770 inneholdt 19,6% SFA; 8,5% MUFA og 64,6% PUFA. Romega® batch nr. 17435 inneholdt 9,6% SFA; 12,2% MUFA og 78,0% PUFA. Palmitinsyre (C16:0) dominerte blant SFA med en arealprosent på 20,5% for silderogn, 10,8% for batch nr. 16770 og 5,5% for batch nr. 17435. Oljesyre (C18:1 n-9) dominerte blant MUFA med en arealprosent lik 9,5 for silderogn, 4,5 for batch nr. 16770

og 5,3 for batch nr. 17435. DHA utgjorde det høyeste mengden blant PUFA, med en arealprosent lik 29,7 for silderogn, 44,5 for batch nr. 16770 og 52,8 for batch nr. 17435.

LC-PUFA n-3 utgjorde 45,7% av fettsyrene i silderogn, 62,2% i Romega batch nr. 16770 og 73,3% i batch nr. 17435. Både silderogn og Romega® hadde et høyt innhold av de langkjedede flerumettede fettsyrene EPA og DHA med en arealprosent på henholdsvis 12,7 og 29,7% for silderogn, 11,7 og 44,5% for batch nr. 16770, og 13,8 og 52,8% for batch nr. 17435.

Internstandard C17:0 ble benyttet for å beregne gjennomsnittlig fettsyreinhold i gram/100 gram for ubehandlet silderogn og Romega® (batch nr. 16770 og 17435) (tabell 5).

Tabell 5. Gjennomsnittlig fettsyreinhold i g/100 g ubehandlet silderogn (n=3) og Romega® (batch nr. 16770 (n=3) og 17435 (n=3)). Internstandard C17:0. ND = ikke påvist. Forkortelsene er som i tabell 4.

Fettsyrer	Silderogn	Romega® batch nr. 16770	Romega® batch nr. 17435
C14:0	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2
C16:0	0,6 ± 0,1	28,0 ± 2,5	5,2 ± 0,8
C18:0	0,1 ± 0,0	17,1 ± 1,7	2,3 ± 0,3
∑ SFA	0,8 ± 0,1	46,3 ± 4,3	9,0 ± 1,3
C16:1 n-7	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2
C18:1 n-9	0,3 ± 0,0	3,2 ± 0,2	5,1 ± 0,6
C18:1 n-7	0,1 ± 0,0	ND	1,0 ± 0,1
C20:1 n-9	0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,3
C24:1 n-9	ND	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2
∑ MUFA	0,6 ± 0,0	6,8 ± 0,5	11,6 ± 1,4
C18:2 n-6	ND	ND	0,7 ± 0,1
C18:3 n-3	ND	ND	0,7 ± 0,1
C18:4 n-3	0,1 ± 0,0	ND	1,1 ± 0,1
C20:4 n-6	ND	ND	1,0 ± 0,1
C20:4 n-3	0,1 ± 0,0	ND	2,0 ± 0,3
C20:5 n-3 (EPA)	0,4 ± 0,1	8,4 ± 0,3	13,2 ± 1,4
C22:4 n-6	ND	ND	1,1 ± 0,1
C22:5 n-3	ND	3,0 ± 0,3	4,5 ± 0,6
C22:6 n-3 (DHA)	1,0 ± 0,1	31,3 ± 1,2	50,4 ± 6,1
∑ PUFA	1,6 ± 0,2	42,7 ± 1,8	74,7 ± 8,9
∑ FA	3,1 ± 0,3	102,6 ± 9,4	95,3 ± 11,6
∑ LC-PUFA-n-3	1,5 ± 0,2	42,7 ± 1,8	70,1 ± 8,4
<i>Uidentifiserte fettsyrer</i>	0,1 ± 0,0	6,8 ± 2,8	ND

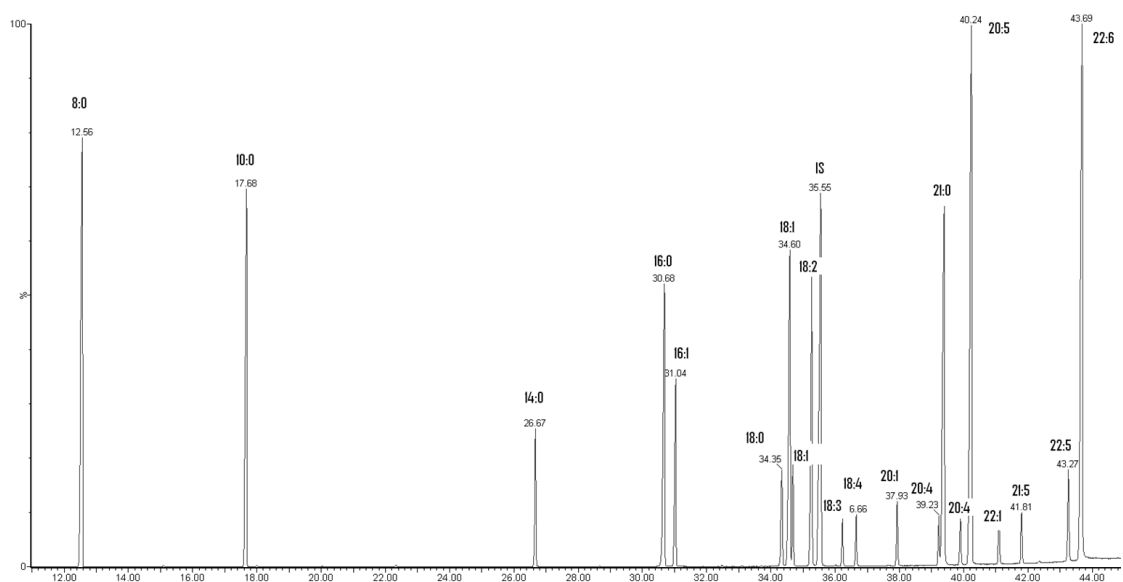
Silderogn inneholdt 0,8 g SFA, 0,6 g MUFA og 1,6 g PUFA/100 g silderogn. Romega® batch nr. 16770 inneholdt 46,3 g SFA, 6,8 g MUFA og 42,7 g PUFA/100 g Romega®. Batch nr. inneholdt 9,0 g SFA, 11,6 g MUFA og 74,7 g PUFA/100 g Romega®.

For både silderogn og Romega® (batch nr. 16770, 17435) utgjorde palmitinsyre den største mengden blant SFA med henholdsvis 0,6; 28,0 og 5,2 g/100 g. MUFA hadde høyest innhold av oljesyre med henholdsvis 0,3; 3,2 og 5,1 g/100 g. PUFA hadde høyest innhold av DHA med 1,0; 31,3 og 50,4 g/100 g.

Silderogn og Romega® (batch nr. 16770, 17435) hadde et høyt innhold av LC-PUFA n-3 hvor innholdet av fettsyrene EPA og DHA var henholdsvis 1,4; 39,7 og 70,1 g/100 g.

3.2.2 GC-MS

Fettsyresammensetningen i fett ekstrakt fra ubehandlet silderogn og frysetørket silderogn ekstrahert med henholdsvis modifisert Folchs metode og etanol, samt olje fra Romega® (batch nr. 16770), ble analysert med GC-MS (tabell 6). Arealprosenten gjelder bare de identifiserte fettsyrene og ikke det totale innholdet, antakelig er det små mengder andre fettsyrer til stede samt andre ting som ikke er fettsyrer. FAME mix 1300 (figur 3) ble benyttet som internstandarder i dette forsøket. Det skiller seg fra IS C17:0 som ble benyttet i GC-FID med at konsentrasjonen på IS er ulik for hver fettsyre. Fettsyrer som ikke inngår i denne internstandarder, ble ikke analysert.



Figur 3. Internblanding: FAME mix 1300. Oversikt over fettsyrer som inngår i internblandingen og dets retensjonstid.

Tabell 6. Gjennomsnittlig fettsyreinnhold (arealprosent) analysert med GC-MS i fett ekstrakt fra silderogn ekstrahert med Folchs (n=3) og etanol (n=3), og olje fra Romega® batch nr. 16770 (n=3). Internstandard: FAME mix 1300. Forkortelsene er som i tabell 4.

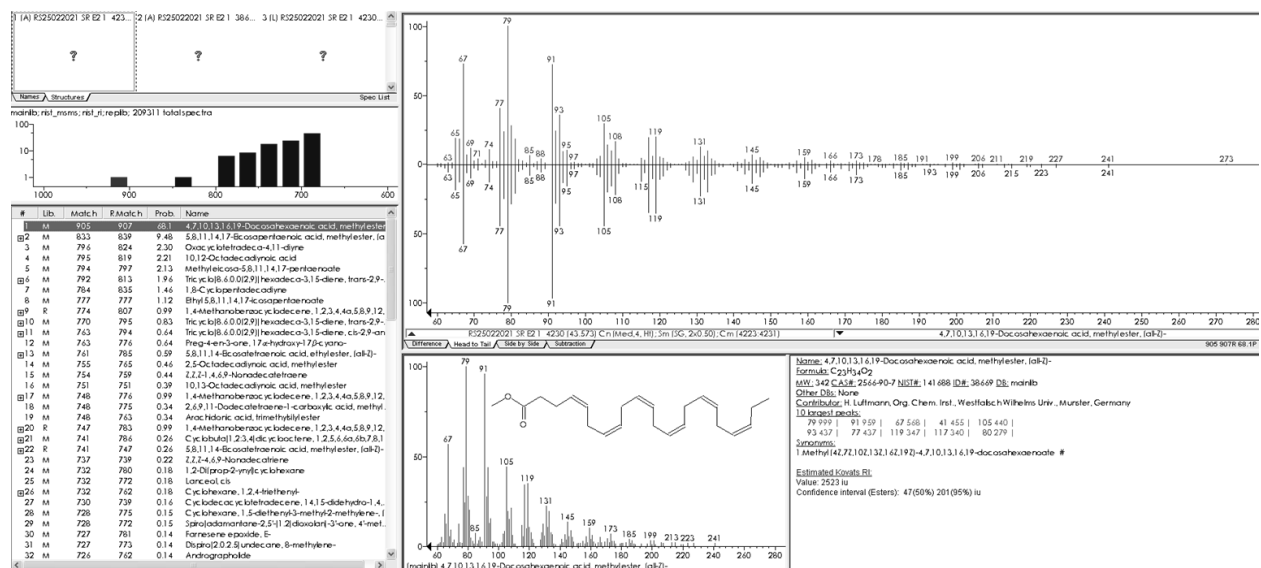
Fettsyrer	Fettekstrakt, Silderogn (våtvekt) Folchs	Fettekstrakt, Frysetørket silderogn Etanol	Romega® batch nr. 16770
C14:0	4,5 ± 0,6	2,8 ± 0,6	3,3 ± 0,4
C16:0	30,5 ± 4,1	19,3 ± 2,4	12,7 ± 0,1
C18:0	3,0 ± 0,4	1,4 ± 0,2	3,3 ± 0,0
C21:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
∑ SFA	38,3 ± 5,1	23,9 ± 3,2	19,8 ± 0,5
C16:1 n-7	3,3 ± 0,0	2,9 ± 0,2	1,6 ± 0,0
C18:1 n-9	10,1 ± 0,1	8,7 ± 0,0	4,2 ± 0,0
C18:1 n-7	ND	2,7 ± 0,1	ND
C20:1 n-9	2,7 ± 0,3	1,6 ± 0,0	3,0 ± 0,0
C22:1 n-9	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
∑ MUFA	17,1 ± 0,5	16,5 ± 0,3	10,0 ± 0,0
C18:2 n-6	3,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0
C18:3 n-3	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C18:4 n-3	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,3 ± 0,0
C20:4n-3	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	ND
C20:5 n-3 (EPA)	8,1 ± 1,3	9,9 ± 0,6	8,3 ± 0,0
C22:5 n-3	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,6 ± 0,0
C22:6 n-3 (DHA)	21,3 ± 3,0	24,3 ± 1,4	42,6 ± 0,2
∑ PUFA	35,3 ± 4,8	37,5 ± 2,1	55,7 ± 0,2
∑ FA	100,2 ± 11,8	87,3 ± 7,9	100,0 ± 0,7
∑ LC-PUFA n-3	30,3 ± 4,5	35,3 ± 2,1	53,5 ± 0,2
<i>Uidentifiserte fettsyrer</i>	9,5 ± 1,4	9,4 ± 2,3	14,5 ± 0,0

Fett ekstrahert fra silderogn med Folchs modifiserte metode inneholdt 38,3% SFA, 17,1% MUFA og 35,3% PUFA. Fett ekstrahert fra frysetørket silderogn med etanol inneholdt 23,9% SFA, 16,5% MUFA og 37,5% PUFA. Romega® inneholdt 19,8% SFA, 10,0% MUFA og 55,7% PUFA. Fett ekstrahert fra silderogn med Folchs metode og etanol hadde et høyt innhold av palmitinsyre blant SFA sammenlignet med Romega®, med henholdsvis 30,5; 19,3 og 12,7%. For MUFA var innholdet av oljesyre høyest med 10,1; 8,7 og 4,2% for henholdsvis fett fra silderogn ekstrahert med Folchs, etanolekstraksjon og Romega®.

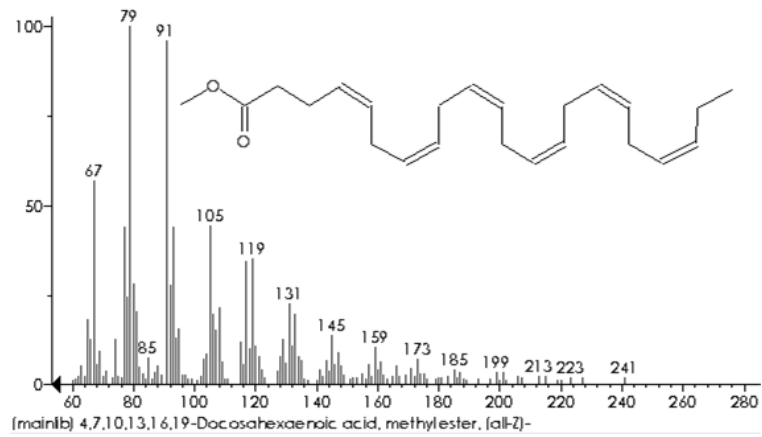
LC-PUFA n-3 utgjorde 30,3% for fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs, 35,3% for fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol og 53,5% for Romega®. Både fett ekstrakt fra silderogn og Romega® hadde et høyt innhold av EPA og DHA. Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs inneholdt 8,1% EPA og 21,3% DHA, fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol inneholdt 9,9% EPA og 24,3% DHA, og Romega® inneholdt 8,3% EPA og 42,6% DHA.

Den totale arealprosenten i fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol var ikke lik 100% av ukjent årsak.

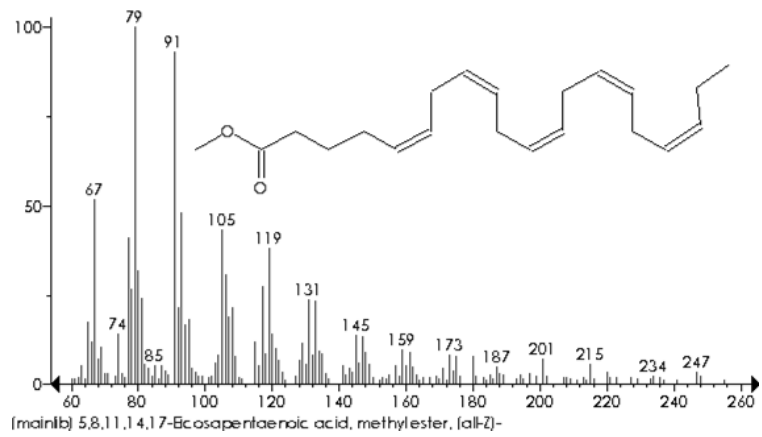
I tillegg til retensjonstid ble fettsyrene identifisert ved å analysere molekylets struktur og vekt. Det ble tatt stikkprøver av henholdsvis DHA (figur 4 og 5), EPA (figur 6) og palmitinsyre (figur 7). Strukturformel og molekylvekt til fettsyrene som ble undersøkt bekreftet at retensjonstiden for de enkelte fettsyrene stemte.



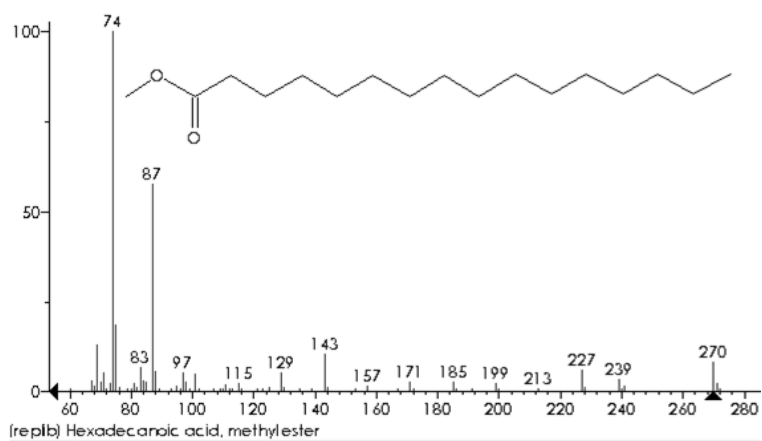
Figur 4. Bekreftelse på at C22:6 n-3, DHA, har retensjonstid lik 43,69. Internstandard: FAME mix 1300.



Figur 5. Struktur for fettsyren C22:6 n-3, DHA. Internstandard: FAME mix 1300.



Figur 6. Struktur for fettsyren C20:5 n-3, EPA. Internstandard: FAME mix 1300.



Figur 7. Struktur for fettsyren C16:0, palmitinsyre. Internstandard: FAME mix 1300.

3.3 Fettklassesammensetning

3.3.1 HPLC

Fettklassesammensetningen (arealprosent) i fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs og olje fra Romega® (batch nr. 16770 og 17435) ble bestemt som andel av areal ved bruk av HPLC (tabell 7).

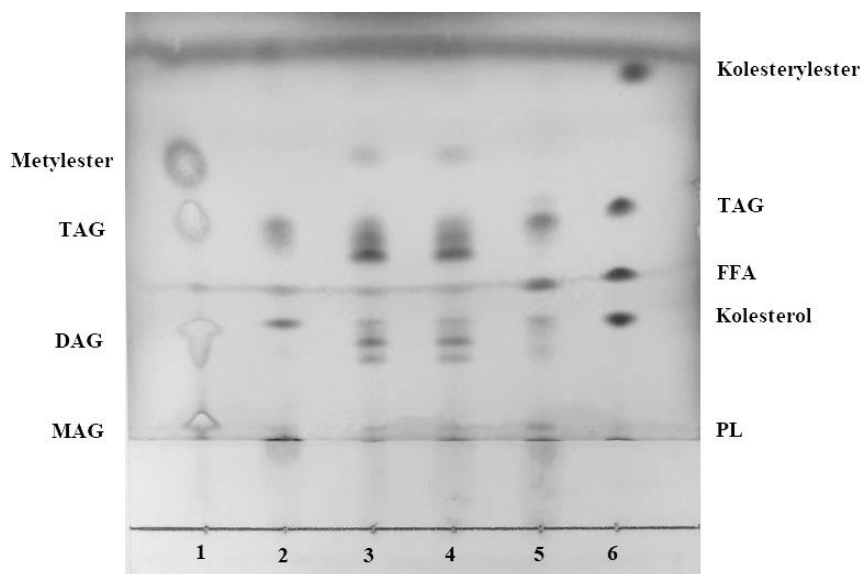
Tabell 7. Fettklasser (arealprosent) i fett ekstrahert fra silderogn med Folchs modifiserte metode (n=3) og Romega® batch nr. 16770 (n=3) og 17435 (n=3). Internstandard: FAME mix 1300. ND = ikke påvist. WE: voksester, TAG: triacylglyserol, FAlc: fettalkoholer, DAG: diacylglyserol, FFA: frie fettsyrer, PG: fosfatidylglyserol, DGTS: diacylglyceryltrimethylhomo-Ser, PC: fosfatidylkolin.

Fettklasser	Silderogn	Romega® batch nr. 16770	Romega® batch nr. 17435
WE	0,5 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,4 ± 2,2
TAG	20,0 ± 1,8	56,5 ± 2,4	75,8 ± 11,1
FAlc	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
DAG/Sterol	6,5 ± 0,2	10,1 ± 0,8	14,2 ± 2,1
FFA	0,4 ± 0,1	22,4 ± 3,5	7,3 ± 9,3
PG	10,7 ± 0,6	ND	ND
DGTS	3,3 ± 0,2	ND	ND
PC	58,7 ± 0,8	7,7 ± 1,2	ND

Silderogn hadde høyest innhold av TAG og PL med henholdsvis 20,0 og 69,4% (PG: 10,7%; PC: 58,7%). Romega batch nr. 16770 og 17435 inneholdt mest NL og FFA. For batch nr. 16770 og 17435 var innholdet av TAG henholdsvis 56,5 og 75,8%, DAG/sterol: 10,1 og 14,2%, og FFA: 22,4 og 7,3%. Det ble ikke påvist PL i batch nr. 17435, men batch nr. 16770 inneholdt 7,7% (PC: 7,7%).

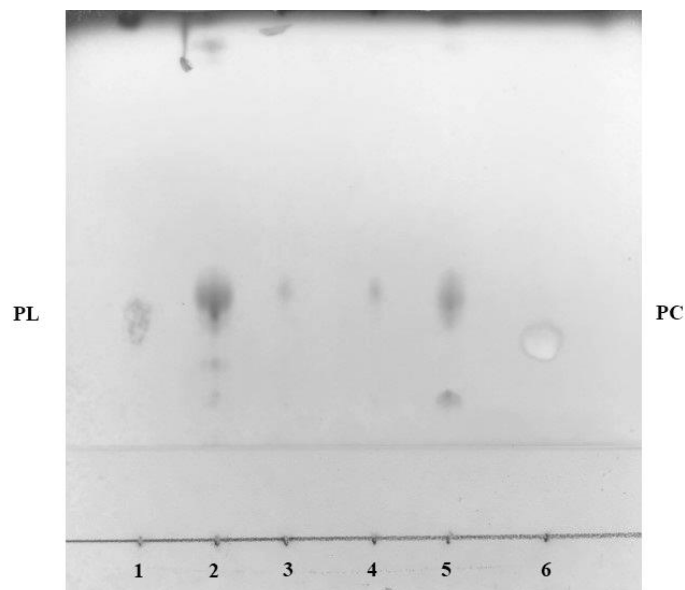
3.3.2 TLC

Med bakgrunn i manglende påvisning av PL i Romega® som ikke var forventet ble fettklassene i fett ekstrakt fra ubehandlet silderogn, olje fra Romega® og krillolje også bestemt kvalitativt ved bruk av TLC (figur 8). Krillolje ble analysert grunnet antatt høyt innhold av PL. Fett ekstrakt fra ubehandlet silderogn (spor 2) hadde høyt innhold av PL/MAG og kolesterol, andre fettklasser som ble dokumentert var: FFA, TAG og kolesterylester. Romega® (batch nr. 16779 (spor 3) og 17435 (spor 4) hadde høyt innhold av TAG og DAG/kolesterol, andre fettklasser som ble dokumentert var: PL, FFA og metylester. Krillolje (spor 5) inneholdt høye mengder PL og FFA, andre fettklasser som ble dokumentert var: DAG, kolesterol og TAG.



Figur 8. TLC av nøytrale og polare lipider. 1: Standardblanding 16-0 A (MAG, DAG, TAG, Metylester) 20 mg/ml, 2: Fett fra silderogn 10 mg/ml, 3: Romega® batch nr.: 16770 10 mg/ml, 4: Romega® batch nr.: 17435 10 mg/ml, 5: Krillolje 10 mg/ml, 6: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml. Det ble påsatt 1 µl av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: heptan:dietyler:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

Løpemedelløsning for polare lipider og standardblandingene 18-5 A (spor 1) og fosfatidylkolin (spor 6) ble benyttet for å identifisere PL i silderogn (spor 2), Romega® (batch nr. 16770 (spor 3) og 17435 (spor 4) og krillolje (spor 5) (figur 9). Silderogn (spor 2) og krillolje (spor 5) hadde høyt innhold av PL, mens begge batchene av Romega® (sporene 3, 4) inneholdt lite.



Figur 9. TLC for polare lipider. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml, 2: Umoden silderogn 10 mg/ml, 3: Romega® batch nr. 16770 10 mg/ml, 4: Romega® batch nr. 17435 10 mg/ml, 5: Krillolje 10 mg/ml, 6: Standardblanding Fosfatidylkolin 20 mg/ml. Det ble påsatt 2 µl av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: DCM:MeOH:H₂O (25:10:1, v/v/v).

3.4 Grønn teknologi

En justert versjon av Folchs modifiserte metode der DCM:MeOH (2:1, v/v) ble erstattet med ikke klorerte løsemidler, heptan:isopropanol (2:1, v/v) og ren etanol, ble benyttet som «grønn teknologi» sammen med ekstraksjon av frysetørket silderogn med etanol. Fettinnholdet (vektprosent) i ubehandlet silderogn ekstrahert med nevnte løsemidler, i frysetørket silderogn ble ekstrahert med etanol, samt i restmateriale etter etanolekstraksjon av frysetørket materiale ekstrahert med Folchs modifiserte metode er vist i tabell 8.

Tabell 8. Fettinnhold (vektprosent) i ubehandlet silderogn ekstrahert med DCM:MeOH (2:1, v/v) (n=3), heptan:isopropanol (2:1, v/v) (n=2) og etanol (n=3), frysetørket silderogn ekstrahert med etanol (n=3), og restmateriale etter etanolekstraksjon av frysetørket silderogn ekstrahert med Folchs (n=3).

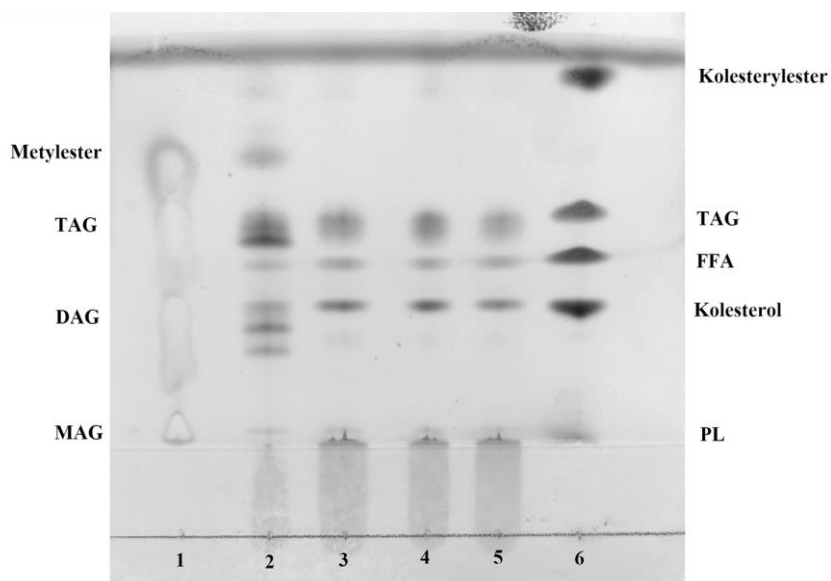
	Silderogn (våttvekt)			Frysetørket silderogn	Restmateriale
	ekstrahert med DCM:MeOH (2:1, v/v)*	ekstrahert med heptan:isopropanol (2:1, v/v)	ekstrahert med etanol	ekstrahert med etanol*	ekstrahert med Folchs*
<i>Fettinnhold %</i>	6,6 ± 1,2	5,1 ± 0,3	7,1 ± 0,2	15,3 ± 1,0	1,9 ± 0,2

* hentet fra tabell 3

Fettinnholdet i ubehandlet silderogn ekstrahert med heptan:isopropanol (2:1, v/v) og etanol var henholdsvis 5,1 og 7,1%. Dersom man går ut fra at vanninnholdet i silderogn er 64,4% vil fettmengden på tørrvektsbasis bli henholdsvis 14,3 og 19,9% i disse to prøvene. For frysetørket silderogn ekstrahert med etanol var fettinnholdet 15,3%. Restmaterialet etter etanolekstraksjon av frysetørket silderogn ble ekstrahert med Folchs modifiserte metode og fettinnholdet ble målt til 1,9%.

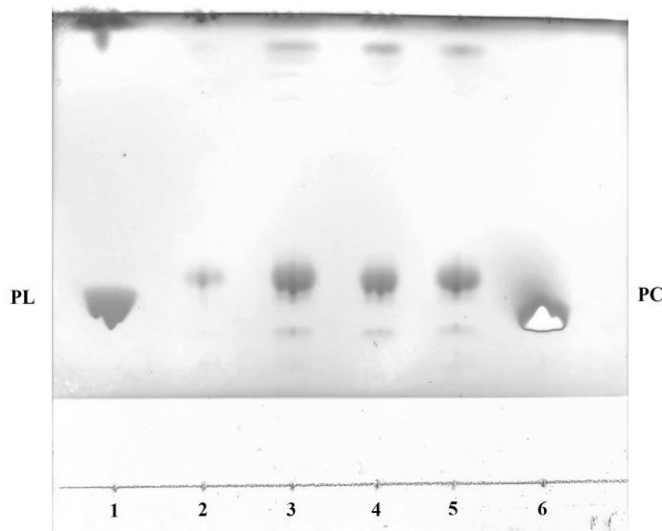
3.4.1 Ekstraksjon av lipider i silderogn med heptan:isopropanol og etanol

Fettekstrakt fra ubehandlet silderogn ekstrahert med heptan:isopropanol (2:1, v/v) (spor 4) og etanol (spor 5) ble kvalitativt analysert med TLC (figur 10). Olje fra Romega® (batch nr. 16770 spor 2) og fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs metode (spor 3) ble i tillegg analysert for sammenligning. Romega® (spor 2) hadde høyt innhold av TAG, andre fettklasser som ble dokumentert var: MAG, DAG, kolesterol, FFA og metylester. PL var det lite av. Fettekstrakt fra silderogn (sporene 3, 4, 5) hadde et relativt høyt innhold av PL og kolesterol, andre fettklasser som ble dokumentert var: FFA og TAG.



Figur 10. TLC for nøytrale og polare lipider. 1: Standardblanding 16-0 A (MAG, DAG, TAG, Metylester) 20 mg/ml, 2: Olje fra Romega® batch nr. 16770 10 mg/ml, 3: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med DCM:MeOH (2:1, v/v) 10 mg/ml, 4: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med heptan:isopropanol (2:1, v/v) 10 mg/ml, 5: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med etanol 10 mg/ml, 6: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml. Det ble påsatt 2 µl av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: heptan:dietyler:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

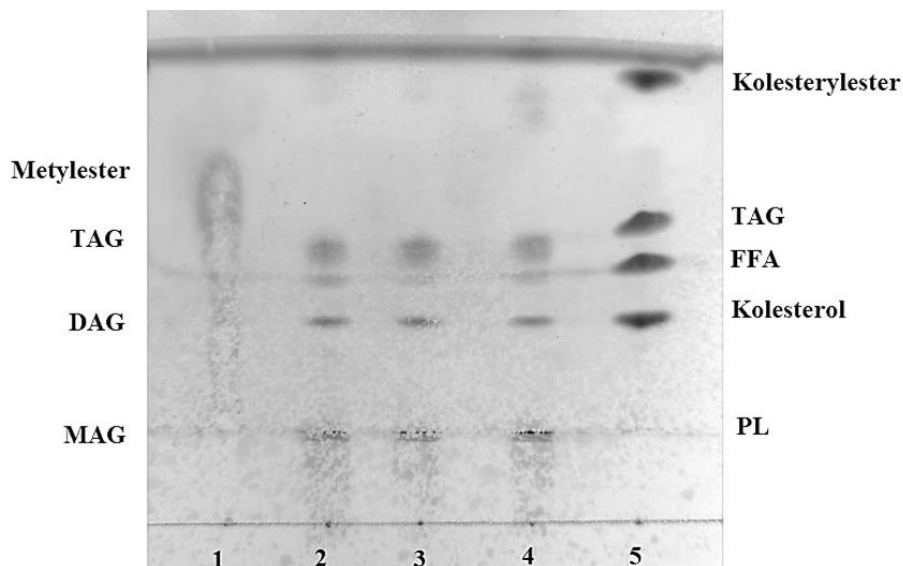
MAG og PL separeres dårlig fra hverandre på platen i figur 10, og derfor ble en ny løpemiddelløsning for polare lipider benyttet (figur 11). Romega® (spor 2) hadde et lavt innhold av PL, i motsetning til fett ekstrakt fra ubehandlet silderogn som hadde et høyt innhold.



Figur 11. TLC for polare lipider. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml, 2: Olje fra Romega® batch nr. 16770 10 mg/ml, 3: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med Folchs 10 mg/ml, 4: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med heptan:isopropanol (2:1, v/v) 10 mg/ml, 5: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med etanol 10 mg/ml, 6: Standardblanding fosfatidylkolin 20 mg/ml. Det ble påsatt 2 µl av hver prøve på platen. Løpemiddelløsning: DCM:MeOH:H₂O (25:10:1, v/v/v).

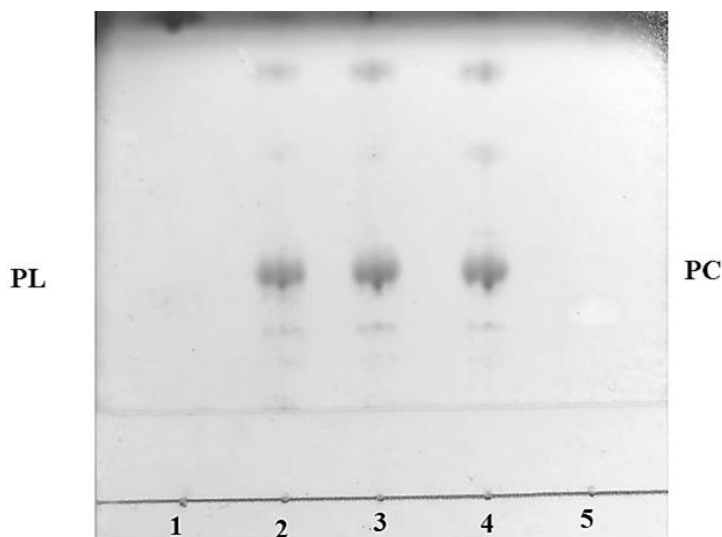
3.4.2 Frysetørket materiale ekstrahert med etanol

Fettklassesammensetningen i fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med modifisert Folchs metode (spor 2), fett ekstrakt fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol (spor 3) og fett ekstrakt fra restmaterialet etter etanolekstraksjon ekstrahert med Folchs (spor 4), ble analysert ved bruk av TLC (figur 12). Alle fett ekstraktene (sporene 2, 3, 4) hadde et høyt innhold av MAG/PL og kolesterol, andre fettklasser som ble dokumentert var: FFA og TAG. Et svært lavt innhold av kolesterylester ble i tillegg dokumentert for spor 4.



Figur 12. TLC. 1: Standardblanding 16-0 A (MAG, DAG, TAG, Metylester) 20 mg/ml, 2: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med Folchs 10 mg/ml, 3: Fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol 10 mg/ml, 4: Fett fra restmateriale etter etanolekstraksjon ekstrahert med Folchs 10 mg/ml, 5: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml. Det ble påsatt 2 μ l av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

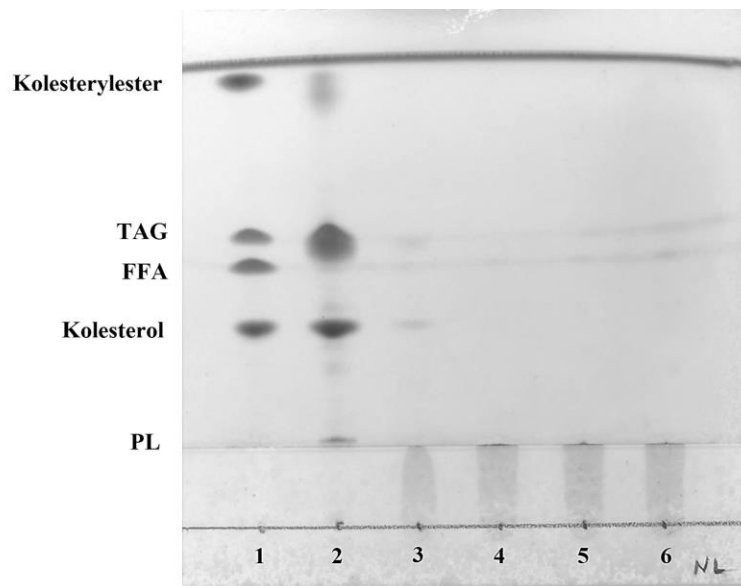
Polare lipider i fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med Folchs (spor 2), fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol (spor 3) og fett fra restmateriale etter etanolekstraksjon av frysetørket silderogn ekstrahert med modifisert Folchs (spor 4) ble analysert (figur 13). Alle sporene (2, 3, 4) hadde høyt innhold av PL.



Figur 13. TLC. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, Kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml, 2: Fett fra ubehandlet silderogn ekstrahert med Folchs 10 mg/ml, 3: Fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol 10 mg/ml, 4: Fett fra restmateriale etter etanolekstraksjon ekstrahert med Folchs 10 mg/ml, 5: Standardblanding Fosfatidylkolin 20 mg/ml. Det ble påsatt 2 μ l av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: DCM:MeOH:H₂O (25:10:1, v/v/v).

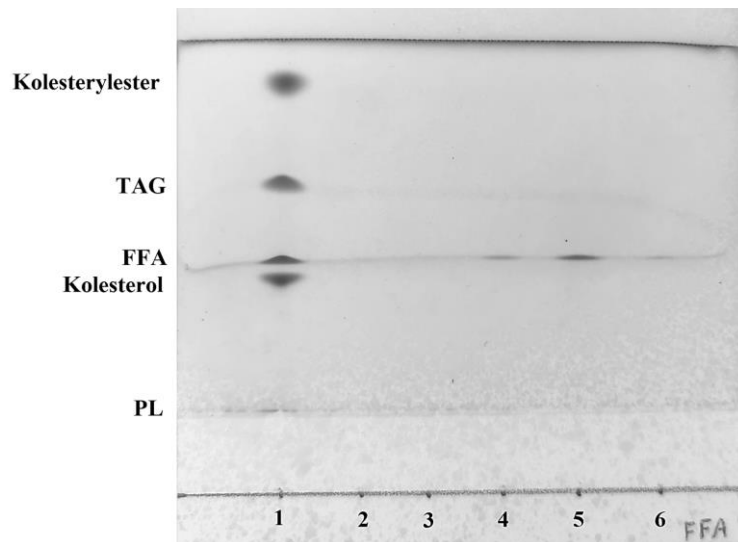
3.5 SPE – separasjon av fettklasser

Fettklasser i fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol ble separert ved bruk av SPE. Eluerte NL ble analysert kvalitativt med TLC (figur 14). Fraksjoner fra SPE ble samlet opp etter eluering med kloroform:isopropanol (2:1, v/v) (tabell 2) etter henholdsvis 10 ml (spor 2), 20 ml (spor 3), 30 ml (spor 4), 40 ml (spor 5) og 50 ml (spor 6). TAG og kolesterol kom sammen med spormengder av PL og kolesterylester allerede ut i de første 10 ml. I tidligere TLC-analyser med 16-0 A og 18-5 A som standardblanding har MAG og PL kommet ut på samme punkt.



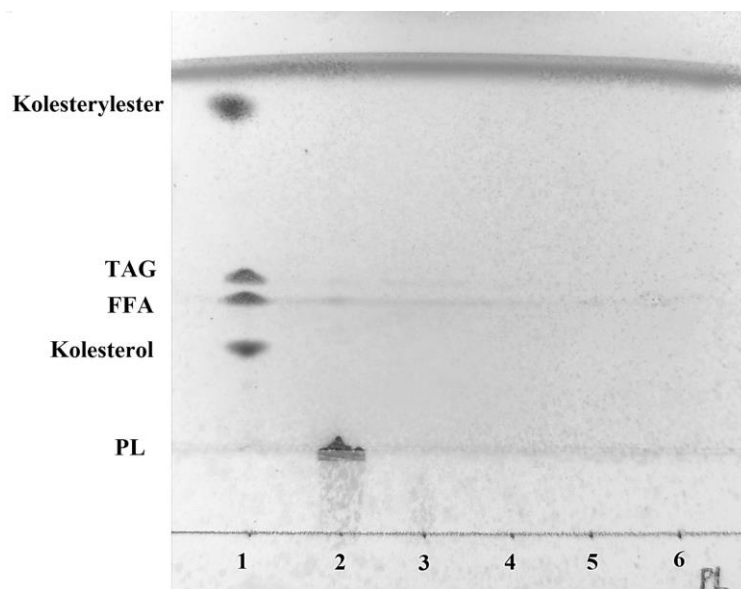
Figur 14. TLC av nøytrale lipider eluert med kloroform:isopropanol (2:1, v/v), fra SPE kolonnen. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml, 2: separert med SPE elueringsløsning kloroform:isopropanol (2:1, v/v) henholdsvis 10 ml, 3: 20 ml, 4: 30 ml, 5: 40 ml, 6: 50 ml. Det ble påsatt 1 ul av hver prøve på platen. Løpemiddelløsning: heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

FFA eluert fra SPE kolonnen med dietyleter:eddiksyre (98:2, v/v) (tabell 2) ble også analysert med TLC (figur 15). Silderogn hadde et lavt innhold av FFA, og de ble eluert i hovedsak først etter 30 ml (spor 4) og 40 ml (spor 5).



Figur 15. TLC av frie fettsyrer eluert med dietyleter:eddiksyre (98:2, v/v), fra SPE kolonnen. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) 20 mg/ml, 2: separert med SPE elueringsløsning dietyleter:eddiksyre (98:2, v/v) henholdsvis 10 ml, 3: 20 ml, 4: 30 ml, 5: 40 ml, 6: 50 ml. Det ble påsatt 1 ul av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

PL ble eluert fra SPE kolonnen med metanol (tabell 2) og analysert med TLC (figur 16). PL ble også eluert fra SPE med henholdsvis 10 ml (spor 2), 20 ml (spor 3), 30 ml (spor 4), 40 ml (spor 5) og 50 ml (spor 6). Silderogn hadde et høyt innhold av PL, og disse ble eluert allerede etter 10 ml (spor 2, figur 16).



Figur 16. TLC av fosfolipider eluert med metanol, fra SPE kolonnen. 1: Standardblanding 18-5 A (PL, Kolesterol, FFA, TAG, Kolesterylester) 20 mg/ml, 2: separert med SPE elueringsløsning metanol henholdsvis 10 ml, 3: 20 ml, 4: 30 ml, 5: 40 ml, 6: 50 ml. Det ble påsatt 1 ul av hver prøve på platen. Løpemedelløsning: heptan:dietyleter:eddiksyre (70:30:1, v/v/v).

3.5.1 Fettsyresammensetning av utvalgte fettklasser etter SPE

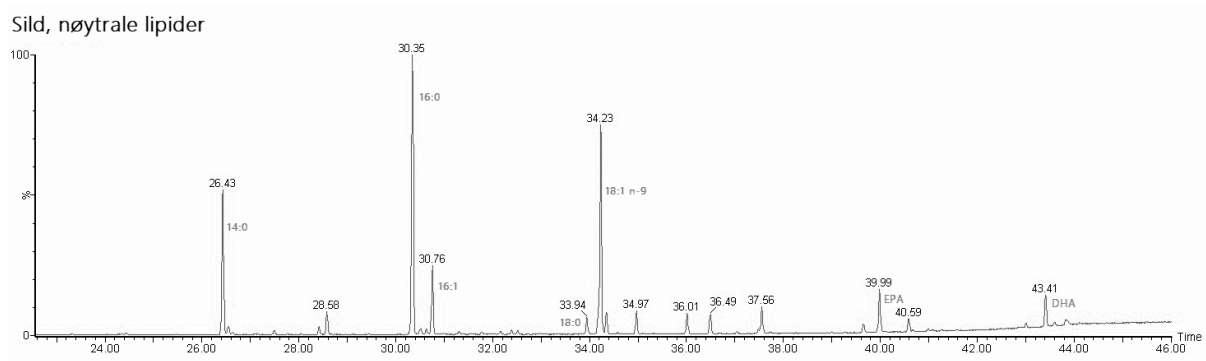
Fettsyresammensetningen i fettklasser isolert med SPE ble analysert med GC-MS og identifisert ved bruk av internstandard FAME mix 1300 (tabell 9). Arealprosenten baseres på total mengde identifiserte fettsyrer, antakeligvis er noen fettsyrer ikke identifisert.

Tabell 9. Gjennomsnittlig fettsyreinhold (arealprosent) i nøytrale lipider og fosfolipider isolert fra fettekstrakt av umoden silderogn med SPE. Internstandard: FAME mix 1300. Forkortelsene er som i tabell 4.

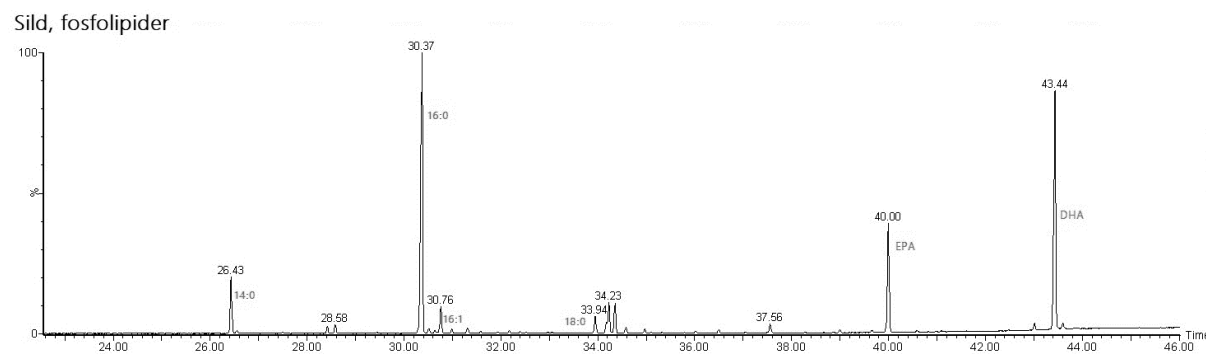
Fettsyrer	Nøytrale lipider	Fosfolipider
C14:0	11,4	5,2
C16:0	19,6	29,5
C18:0	2,7	2,3
∑ SFA	33,7	37,0
C16:1 n-7	6,0	3,8
C18:1 n-9	19,0	6,2
C18:1 n-7	2,8	3,6
C20:1 n-9	3,4	1,8
∑ MUFA	31,2	15,4
C18:2 n-6	4,8	2,2
C18:3 n-3	2,1	0,6
C18:4 n-3	2,1	0,8
C20:5 n-3 (EPA)	11,9	14,6
C22:6 n-3 (DHA)	14,1	29,3
∑ PUFA	35,0	47,5
∑ FA	99,9	99,9
∑ LC-PUFA n-3	26,0	43,9

NL inneholdt 33,7% SFA, 31,2% MUFA og 35,0% PUFA. PL inneholdt 37,0% SFA, 15,4 % MUFA og 47,5 % PUFA. Fettsyrene palmitinsyre, oljesyre, EPA og DHA utgjorde en høy andel av begge fettklassene. Både NL og PL hadde høyt innhold langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer på henholdsvis 26,0 og 43,9%. Innholdet av EPA og DHA var høyest for PL med henholdsvis 14,6 og 29,3%, mens NL inneholdt henholdsvis 11,9 og 14,1%.

Figur 17 og 18 viser fettsyresammensetningen i NL og PL analysert med GC-MS. NL hadde et høyere innhold av C14:0 og C18:0, og et lavere innhold av EPA og DHA enn PL. Innholdet av resterende fettsyrer var ganske like.



Figur 17. Kromatogramanalyse av NL-fraksjon. Toppene illustrerer innholdet av fettsyrene. Internstandard: FAME mix 1300.



Figur 18. Kromatogramanalyse av PL-fraksjon. Toppene illustrerer innholdet av fettsyrene. Internstandard: FAME mix 1300.

3.6 Aminosyresammensetning

Aminosyresammensetningen i umoden silderogn ble funnet med syrehydrolyse. Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamat- og asparaginsyre. Tryptofan ødelegges under syrehydrolyse og ble ikke detektert. For sammenligning er mg/g protein i fiskemuskel (Damodaran, 1996) oppgitt i tabell 10.

Tabell 10. Innhold av essensielle og ikke-essensielle aminosyrer i g/100g ubehandlet silderogn (n=3), mg/g protein i silderogn (n=3) (FAO, 2003) og fiskemuskel. a: Damodaran, 1996. Internstandard: N-leu. ND = ikke bestemt. AA = aminosyrer.

	g/100 g silderogn	mg/g protein, silderogn	mg/g protein, fiskemuskel ^a
Essensielle AA			
Fenylalanin + Tyrosin	2,1 ± 0,4	83,7 ± 1,6	76
Histidin	0,6 ± 0,2	22,8 ± 0,7	35
Isoleucin	1,3 ± 0,2	50,7 ± 0,5	48
Leucin	2,9 ± 0,2	109,0 ± 0,6	77
Lysin	2,1 ± 0,2	81,6 ± 0,6	91
Metionin + Cystein	1,0 ± 0,2	39,1 ± 0,7	40
Treonin	1,5 ± 0,2	57,2 ± 0,5	46
Tryptofan	ND	ND	11
Valin	1,6 ± 0,3	57,6 ± 0,9	61
∑ Essensielle AA	13,1 ± 1,9	501,7 ± 6,1	485
Ikke-essensielle AA			
Alanin	2,6 ± 0,2		
Arginin	1,5 ± 0,9		
Asparaginsyre*	1,8 ± 0,1		
Glutaminsyre*	3,4 ± 0,4		
Glycin	1,0 ± 0,0		
Prolin	1,6 ± 0,3		
Serin	1,6 ± 0,1		
∑ Ikke essensielle AA	13,4 ± 2,0		

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

** *Tryptofan ødelegges under syrehydrolyse og ble ikke detektert.*

Silderogn inneholdt totalt 13,1 g essensielle aminosyrer pr. 100 gram silderogn og 13,4 g ikke essensielle aminosyrer pr. 100 gram silderogn. Blant de essensielle aminosyrene var det høyest innhold av leucin, fenylalanin + tyrosin og lysin med henholdsvis 2,9; 2,1 og 2,1 g/100g silderogn. Blant de ikke-essensielle aminosyrene er det høyest innhold av glutaminsyre, alanin og asparaginsyre med henholdsvis 3,4; 2,6 og 1,8 g/100g silderogn. Proteininnholdet ble bestemt på basis av aminosyresammensetningen som beskrevet i metodekapitlet.

Totalt var innholdet av essensielle aminosyrer 501,7 mg/g protein i silderogn (minus tryptofan) og 485,0 mg/g protein i fiskemuskel. Innholdet av lysin, leucin og fenylalanin + tyrosin var høyest med henholdsvis 91, 77 og 76 mg/g protein i fiskemuskel.

4 Diskusjon

Formålet med studien var å ekstrahere lipider fra umoden silderogn med «grønn teknologi», klassifisere fettklassene og analysere fettsyreinnholdet.

Umoden silderogn er et interessant råstoff på grunn av et rikt innhold av næringsstoffer med 64,4% vann, 22,7% protein, 6,6% fett og 1,5% aske (tabell 3). Næringsinnholdet i NVG silderogn avhenger blant annet av når på sesongen fisken fanges, sesongvariasjonene er størst fra oktober fram mot gyting i februar (Larssen *et al.*, 2014). Protein- og fettinnholdet er stabilt på henholdsvis 26 og 6-7% fram til januar deretter reduseres innholdet til henholdsvis 20 og 5%, innholdet av aske (mineraler) er relativt stabilt med 1-2% gjennom hele sesongen. Silderogn som ble undersøkt i denne studien hadde et lavt innhold av aske, noe som kan sees i sammenheng med fravær av bein og brusk, og at rogn kun er beskyttet av en cellevegg og rognsekk. Vanninnholdet stiger fra om lag 65 til 72% i februar, noe som kan forklares med at rogn sveller og tar opp mer vann fram mot gyting (Larssen *et al.*, 2014). Nøyaktig fangstdato for sild som er brukt i denne studien er uvisst, men den er fanget utenfor gytetid og er dermed umoden. Fettinnholdet for oljen i Romega® kapslene var som forventet høyt med 85,6%. Kapslene besto i tillegg til olje av gelatin og glyserol, og noe av disse ikke-fettløselige stoffene kunne ha kommet med når oljen ble trukket ut av kapslene. Dette kan muligens forklare hvorfor det ikke ble funnet 100% fett.

Silderogn er særlig interessant med bakgrunn i et høyt innhold av fettsyrene EPA og DHA (tabell 4), som har vist anti-inflammatoriske effekt på blant annet hjerte- og karsykdommer (Dyerberg *et al.*, 1978; Bang & Dyerberg, 1980; Cleland *et al.*, 2006; Weinberg *et al.*, 2021). Omega-3 fettsyrer er hovedsakelig representert av EPA og DHA i marine arter, og rogn har høyere innhold av disse fettsyrene enn fiskekjøtt på grunn av høyt innhold av PL i rogn (Shirai *et al.*, 2006). Resultatene i denne studien viste et høyt innhold av EPA og DHA i ubehandlet umoden silderogn med henholdsvis 12,7 og 29,7% av det totale lipidinnholdet, noe som er i god overenstemmelse med litteraturen (Shirai *et al.*, 2006). Sammenlignet med Romega® var innholdet av SFA og MUFA i ubehandlet umoden silderogn høyere og PUFA lavere. Det svært høye innholdet av marine langkjedede omega-3 fettsyrer i Romega®, er ikke overraskende da produktet inneholder 33% konsentrert fiskeolje, dvs. et produkt som har et forhøyet innhold omega-3 fettsyrer uten at innholdet er spesifisert i varedeklarasjonen. To batcher Romega® ble analysert i denne studien og resultatene viser et ulikt innhold av fettsyrer i batchene. Batch nr. 17435 hadde betydelig høyere innhold av flerumettede fettsyrer enn batch

nr. 16770. Tabell 5 viser store forskjeller i mengde fettsyrer g/100 g ubehandlet silderogn og Romega®. Dette skyldes ulikhet i fettinnholdet for produktene. I praksis får man i seg omtrent lik mengde EPA og DHA ved inntak av produktene fordi Romega® tas som kosttilskudd i form av små kapsler og silderogn inntas som et måltid hvor en porsjon gjerne er 100-200 gram rogn. Helsedirektoratet har ikke gitt norske tallfestede anbefalinger om inntak av EPA og DHA, men EFSA anser 200-500 mg EPA og DHA som dekkende for dagsbehovet for friske voksne. Basert på disse anbefalingene og resultatene fra denne studien vil dagsbehovet dekkes ved inntak av 14-36 gram silderogn daglig. Basert på oppgitt innhold i Romega® vil 1-2 kapsler daglig vil være nok for å dekke dagsbehovet. Blant mettede og enumettede fettsyrer var det høyest innhold av fettsyrene palmitinsyre (C16:0) og oljesyre (C18:1 n-3) for både silderogn og Romega®. Disse fettsyrene har en viktig rolle som energikilde for mange arter fiskelarver (van der Meeren *et al.*, 1993).

Fettsyreinnholdet i fett fra umoden silderogn og Romega® ble i tillegg til GC-FID, analysert med GC-MS (tabell 6). Fordelen med GC-MS er at molekylvekt og molekylets struktur analyseres for å identifisere fettsyrene i tillegg til retensjonstid. En annen fordel er at en internstandard med ulik konsentrasjon for hver fettsyre benyttes og dermed øker nøyaktigheten på analysen. Fettsyreinholdet analysert med GC-MS er kun oppgitt i arealprosent i denne studien grunnet manglende verdier for arealet av internstandard for hver fettsyre. To ulike fettekstrakt fra umoden silderogn ble analysert: Ubehandlet silderogn ekstrahert med en modifisert Folchs metode og frysetørket silderogn ekstrahert med etanol, for å kartlegge forskjeller i fettsyresammensetningen (tabell 6). Fett fra frysetørket silderogn ekstrahert med etanol inneholdt noe mer LC-PUFA n-3 (35,3%) sammenlignet med fett ekstrahert med Folchs modifiserte metode (30,3%), og mindre SFA og MUFA. Med utgangspunkt i prinsippet for likt-løser-liket vil etanol i større grad ekstrahere PL enn NL. Resultatet er derfor som forventet sett i sammenheng med tidligere studier som er gjort hvor det ble dokumentert at 68-74% av det totale lipidinnholdet fra rogn er bundet i PL (Tocher *et al.*, 1985; Østvik *et al.*, 2009; Bjørndal *et al.*, 2014). I likhet med resultatene fra GC-FID analysen hadde Romega® et høyt innhold av LC-PUFA n-3.

Rogn har et høyt innhold av PL (Tocher *et al.*, 1985; Østvik *et al.*, 2009; Bjørndal *et al.*, 2014). PL er amfipatiske og noen mener at fettsyrer forestret til PL forbedrer biotilgjengeligheten sammenlignet med når fettsyrene er forestret i TAG (Schuhardt *et al.*, 2011; Ulven *et al.*, 2011; Maki *et al.*, 2009). Resultatene fra HPLC-analysen viste at fett fra

silderogn inneholdt 69,4% PL og 20,0% TAG (tabell 7). Dette er i tråd med litteraturen (Østvik *et al.*, 2009). Innholdet av FFA i silderogn ble målt til bare 0,4% av de totale lipidene, mens Romega® batch nr. 16770 og 17435 inneholdt henholdsvis 22,4 og 7,3%. FFA dannes oftest på grunn av enzymatisk aktivitet, noe som tyder på nedbryting og forringelse av disse batchene med Romega®. Grenseverdien av FFA for oljer til humant konsum er satt til 2% (European Pharmacopeia, 2005). Det var forventet lavt innhold av TAG da rogn inneholder lite depotfett. Derfor var det overaskende at Romega® inneholdt svært lite/ingen PL og 75% TAG. Det høye innholdet av TAG kommer også av at såkalt konsentrert fiskeolje, dvs. TAG med forhøyet innhold av EPA og DHA er tilsatt produktet. Disse uventede resultatene resulterte i at en ny batch ble analysert. HPLC-analysene ble i tillegg gjentatt flere ganger. Det høye innholdet av FFA kan tyde på at det har skjedd en nedbrytning av eventuelle PL i produktene. I produktspesifikasjonen står det at Romega® kapslene skal inneholde 34% omega-3 PL. Våre analyser tyder på at det langt fra er tilfelle.

På grunn av de uventede resultatene fra HPLC-analysen med hensyn på PL innhold ble også TLC benyttet for på en semikvantitativ måte analysere innholdet av fettklasser i Romega®, i tillegg til umoden silderogn. Krillolje ble også inkludert i analysen da de forventet å inneha et høyt innhold av PL (48,9%) (Castro-Gómez *et al.*, 2015). TLC-analysene viste også svært lavt innhold av PL i Romega® sammenlignet med fett spesielt fra umoden silderogn og krillolje (figur 8 og 9). Resultatene fra HPLC-analysen ble bekreftet med TLC. Innholdet av PL i Romega® stemmer ikke overens med mengden som var deklarerert på pakningen. Ut ifra resultatene som ble funnet i denne studien kan det stilles spørsmålsteget ved hvorvidt produktet inneholder de påståtte mengder olje fra silderogn eller har den nødvendige kvaliteten som bør forventes.

Formålet med studien var også å ekstrahere lipider fra umoden silderogn med «grønn teknologi». Verken heptan eller isopropanol i seg selv er «grønne» løsemidler som vi ønsker å få i kroppen vår på grunn av dets toksiske effekt, men sammenlignet med diklormetan og metanol betraktes de som «grønnere». Etanol, som en kjent ingrediens i alkoholholdig drikke, er mindre toksisk og anses som det mest «grønne» løsemidlet i denne sammenhengen. Blant løsemidlene som ble testet ekstraherte etanol størst mengde fett fra våt silderogn, 7,1% (tabell 8). Utbytte var litt mer enn med Folchs metode (6,6%) og heptan:isopropanol (2:1, v/v) (5,1%). Tas det utgangspunkt i vanninnholdet i våt silderogn blir det 18,5% med Folchs metode på tørrstoffbasis. Dette er noe høyere enn hva etanol ga med utgangspunkt i frysetørket silderogn

(tabell 8). Forsøkene med etanolekstraksjon ble kun gjennomført én gang, og dette er en svakhet med denne studien. Med utgangspunkt i at etanol ekstraherer PL i størst grad ble restmaterialet av frysetørket silderogn ekstrahert med Folchs modifiserte metode. Det resterende fettinnholdet ble målt til 1,9%, med antagelig høyt innhold av NL. Dette tilsier at omtrent 80% av fettinnholdet i frysetørket silderogn ble ekstrahert med etanol, og anses derfor som et effektivt ekstraksjonsløsemiddel i denne studien.

Fettekstraktene ble analysert med TLC (figur 10 og 11). Analysene viste at «grønne» løsemidler var vel så effektive for ekstraksjon av fett fra ubehandlet silderogn som Folchs modifiserte metode. Fett ekstrahert med etanol inneholdt som forventet en mindre mengde TAG. Analysene av det resterende fett i frysetørket silderogn etter etanolekstraksjon inneholdt både NL og PL (figur 12 og 13). De «grønne» metodene som ble testet ekstraherte særlig PL effektivt sammenlignet med modifisert Folchs metode.

Fettklassene ekstrahert med etanol fra frysetørket silderogn ble separert med SPE og fettklasseinnholdet ble analysert med TLC (figur 14, 15 og 16). Fettklassene NL, FFA og PL ble effektivt separert med SPE. I figur 14 kan det se ut som NL også inneholdt noe PL, men det er kjent at MAG og PL kommer fram svært nær hverandre på TLC-platen. Det antas derfor at NL inneholdt MAG og ikke PL.

Videre ble fettsyresammensetningen i NL og PL analysert med GC-MS (tabell 9). I likhet med andre GC-MS-analyser i denne studien ble FAME mix 1300 brukt som internstandard, og på grunn av manglende tilgang på data for areal på internstandarder kunne ikke mengden av hver enkelt fettsyre beregnes og de mer kvalitative arealene er brukt for diskusjon. Innholdet av EPA og DHA var høyere i PL enn NL i silderogn, i likhet med krillolje (Gigliotti *et al.*, 2011). Forskjellene på innholdet av de nevnte fettsyrene i NL og PL vises godt i kromatogrammene (figur 17 og 18). Kromatogrammene viser at innholdet av C14:0, C16:1 n7 og C18:1 n-9 var betydelig høyere i NL enn PL.

I tillegg til å undersøke fettinnhold, fettklasser og fettsyresammensetningen i silderogn ble det totale innholdet av aminosyrer analysert (tabell 10). Silderogn inneholdt alle essensielle aminosyrer og faktisk litt mer enn i fiskemuskel. Dette kan komme av at det er mer bindevev i muskel og kollagen har relativt lite innhold av essensielle aminosyrer på grunn av høyt innhold av glycin og prolin. Det høye innholdet av essensielle aminosyrer kan sees i sammenheng med at sildeyngelen skal leve kun på næringen som er i rognposen og som senere utvikler seg til å bli en plommesekk.

Forslag til framtidig arbeid

I denne studien ble kun kjemiske ekstraksjonsmetoder testet. Ved kommersiell ekstraksjon av torskelever for tran eller pelagisk fisk for fiskeolje benyttes en mekanisk metode med vanndamp og sentrifugering. Det kunne vært interessant å sammenligne slike prosessers betydning for innhold og sammensetning av lipider med ekstraksjon av sliderogn med etanol som i denne studien viste seg å være den best egnede.

Det ble kun benyttet en batch med silderogn i denne studien. Men kunnskap om sesongvariasjoner av næringsinnholdet i rogn, hadde det vært interessant å analysere fettsyre- og fettklasseinnholdet gjennom sesongen for å se når lipidinnholdet er av best kvalitet med tanke på innhold av PL og omega-3 fettsyrene EPA og DHA.

5 Konklusjoner

Formålet med denne studien var å ekstrahere lipider fra umoden silderogn med «grønn teknologi», samt analysere fettklasse- og fettsyresammensetningen. Fettmengden ekstrahert med etanol, heptan:isopropanol og DCM:MeOH (Folchs metode) fra våt silderogn var henholdsvis på 7,1; 5,1 og 6,6%. Fettinnholdet i ubehandlet umoden silderogn ekstrahert med Folchs metode var 18,5% på tørrvektsbasis, mens fettinnholdet i frysetørket silderogn ekstrahert med etanol var 15,3% noe som utgjør ca. 80% av det totale fettinnholdet. Fettklasseanalysene viste et høyt innhold av PL (69,4%) i silderogn, mens Romega® hadde et overraskende lavt innhold av PL. Basert på resultatene er det klart at produktet ikke inneholder de mengder PL som er deklart på pakningen. Et høyt innhold av FFA kan tyde på at PL i produktene til en viss grad var hydrolysert.

Fettsyreanalysen viste et høyt innhold av LC-PUFA n-3, særlig av EPA og DHA med henholdsvis 12,7 og 29,7% av det totale fettsyreinholdet i umoden ubehandlet silderogn. Romega® hadde som forventet et høyt innhold av LC-PUFA n-3, særlig DHA, grunnet innhold av fiskeoljekonsentrat. Fettklasser i fettekstrakt fra frysetørket silderogn ble separert effektivt med SPE og analysene av fettsyreinholdet viste et økt innhold av LC-PUFA for PL (43,9%) enn NL (26,0%) og at produktet slikt sett er mer egnet for humant konsum.

Silderogn hadde også som forventet et høyt innhold av essensielle aminosyrer, og er på den måten en fullverdig kilde til essensielle aminosyrer.

Referanseliste

- Abreu, S., Solgadi, A., Chaminade, P. (2017). Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *Journal of Chromatography A*, **1514**:54-71.
- Bang, H.O., Dyerberg, J. (1980). Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. In: *Advances in nutritional research*. (pp. 1-22). Springer, Boston, MA.
- Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S., Miglioli, M. (1996). Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Chron's disease. *New England Journal of Medicine*, **334**(24):1557-1560.
- Bjørndal, B., Strand, E., Gjerde, J., Bohov, P., Svardal, A., Diehl, B.W., Innis, S.M., Berger, A., Berge, R.K. (2014). Phospholipids from herring roe improve plasma lipids and glucose tolerance in healthy, young adults. *Lipids in health and disease*. **13**(1):1-12.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. **37**(8):911-917.
- Calder, P.C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory process: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1851**(4):469-484.
- Calder, P.C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, **36**(9):1007-1024.
- Carvajal, A.K., Toldnes, B., Richardsen, R. (2013). Gonadeutvikling hos Norsk vårgytende (NVG) sild. Bestemmelse av gonadeutvikling, innhold av slo og filetutbytte gjennom sesongen. *SINTEF rapport A24342*.
- Castro-Gómez, M.P., Holgado, F., Rodríguez-Alcalá, L.M., Montero, O., Fontecha, J. (2015). Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation and identification of triacylglycerols, diacylglycerols, and phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS. *Food Analytical Methods*, **8**(10):2568-2580.
- Cleland L.G., James, M.J., Proudman, S.M. (2003). The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs*, **63**(9):845-853.
- Cleland, L.G., James, M.J., Proudman, S.M. (2006). Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis Research & Therapy*, **8**(1):1-9.
- Damodaran, S. (1996) Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Food Chemistry, Fennema, O.R., (ed). Kapittel 6, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Donadio Jr, J.V., Bergstralh, E.J., Offord, K.P., Spencer, D.C., Holley, K.E. (1994). A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine*, **331**(18): 1194-1199.
- Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S., Vane, J.R. (1978). Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *The Lancet*, **312**(8081):117-119.
- European Pharmacopoeia. (2005). European Pharmacopoeia, Directorate for Quality of Medicines of the Council of Europe. ISBN: 978-92-871-5843-6.
- FAO (2003). Food energy – methods of analysis and conversion factors. *Food and agriculture organization of the United Nations*. Roma, Italia.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1):497-509.
- Ghasemifard, S., Turchini, G.M., Sinclair, A.J. (2014). Omega-3 long chain fatty acid “bioavailability”: A review of evidence and methodological considerations. *Progress in Lipid Research*, **15**:98-108.

- Gigliotti, J.C., Davenport, M.P., Beamer, S.K., Tou, J.C., Jaczynski, J. (2011). Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry*, **125**(3):1028-1036.
- Grimminger, F., Mayser, P., Papavassilis, C., Thomas, M., Schlotzer, E., Heuer, K.U., Führer, D., Hinsch, K.D., Walmrath, D., Schill, W.B., Seeger, W. (1993). A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 fatty acid based lipid infusion in acute, extended guttate psoriasis. *The Clinical Investigator*, **71**(8):634-643.
- Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., Etherton, T.D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**(2-3):99-104.
- Larsen, W.E., Fylling, T.S., Kvangarsnes, K., Barnung, T. (2014). Råstoffanalyse av rogn fra norsk vårgytende sild og nordsjøisild. *Møreforskning rapport*, **14:20**.
- Lawson, L.D., Hughes, B.G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **152**(1):328-335.
- Maki, K.C., Reeves, M.S., Farmer, M., Griinari, M., Berge, K., Vik, H., Hubacher, R., Rains, T.M. (2009). Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutrition Research*, **29**(9):609-615.
- Mayser, P., Grimm, H., Grimminger, F. (2002). n-3 fatty acids in psoriasis. *British Journal of Nutrition*, **87**(1):77-82.
- Mayser, P., Mrowietz, U., Arenberger, P., Bartak, P., Buchvald, J., Christophers, E., Jablonska, S., Salmhofer, W., Schill, W.B., Kramer, H.J. (1998). ω -3 Fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **38**(4):539-547.
- Medina, A.R., Grima, E.M., Giménez, A.G., González, M.I. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, **16**(3):517-580.
- Moore, S., Stein, W.H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, **6**:819-831.
- Mæhre, H.K., Hamre, K., Elvevoll, E.O. (2013). Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, **19**(3):301-311.
- Olsen, R.L., Toppe, J., Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, **36**(2):144-151.
- Salem, N., Kuratko, C.N. (2014). A reexamination of krill oil bioavailability studies. *Lipids in Health and Disease*, **13**(1):1-6.
- Schuchardt, J.P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., von Schacky C., Hahn, A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations – a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids in Health and Disease*, **10**(1):1-7.
- Shirai, N., Higuchi, T., Suzuki, H. (2006). Analysis of lipid classes and the fatty acid composition of the salted fish roe food products, Ikura, Tarako, Tobiko and Kazunoko. *Food Chemistry*, **94**(1):61-67.
- Stoffel, W., Chu, F., Ahrens, E.H. (1959). Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **31**(2):307-308.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R., Gamble, J.C. (1985). Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*, **20**(2):84-89.

- Ulven, S.M., Kirkhus, B., Lamglait, A., Basu, S., Elind, E., Haider, T., Berge, K., Vik, H., Pedersen, J.I. (2011). Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers. *Lipids*, **46**(1):37-46.
- 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**(10):1117-1121.
- van der Meeren, T., Wilhelmsen, S., Klungsoyr, J., Kvenseth, P.G. (1993). Fatty acid composition of unfed cod larvae *Gadus Morhua* L. and cod larvae feeding on natural plankton in large enclosures. *Journal of the World Aquaculture Society*, **24**(2):167-185.
- Vang, B., Pedersen, A.M., Olsen, R.L. (2013). Oil extraction from the copepod calanus finmarchicus using proteolytic enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **22**(6):619-628.
- Wang, H., Khor, T.O., Saw, C.L.L., Lin, W., Wu, T., Huang, Y., Kong, A.N.T. (2010). Role of Nrf2 in suppressing LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages by polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *Molecular Pharmaceutics*, **7**(6):2185-2193.
- Weinberg, R.L., Brook, R.D., Rubenfire, M., Eagle, K.A. (2021). Cardiovascular impact of nutritional supplementation with omega-3 fatty acids: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, **77**(5):593-608.
- Yurko-Mauro, K., Kralovec, J., Bailey-Hall, E., Smeberg, V., Stark, J.G., Salem, N. (2015). Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids in Health and Disease*, **14**(1):1-9.
- Østvik, S.O., Grimsmo, L., Jansson, S., Dauksas, E., Bondø, M. (2009). Biråstoff fra filetering av sild. Kartlegging og analyse av råstoff og utnyttelsesmuligheter. *Rubin rapport* **164**.

