

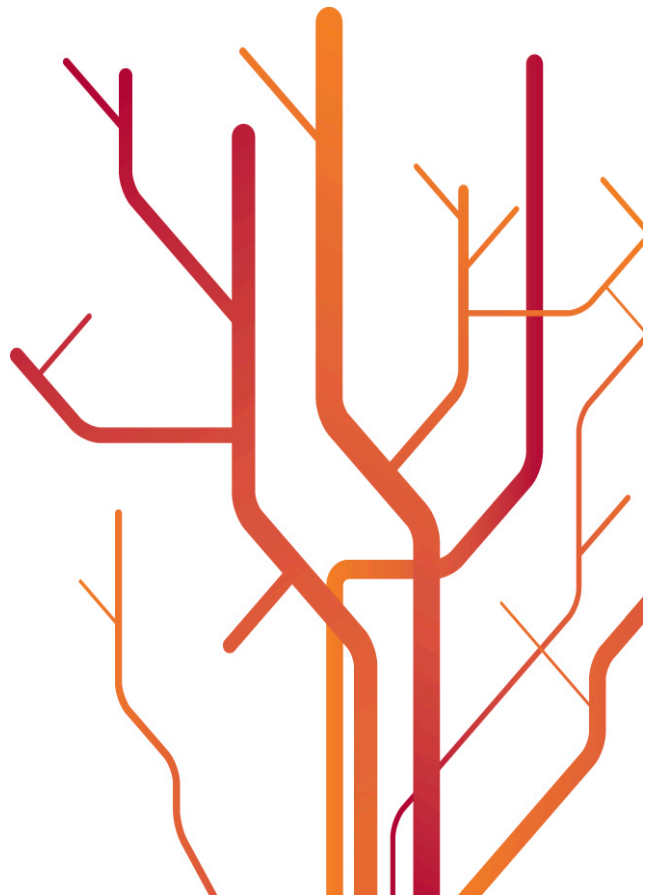
Oksidativ stabilitet til kommersielle fiskeoljeprodukter



Alf Thorstein Brun

Masteroppgave i marin bioteknologi

November 2012



Forord

Denne oppgaven er skrevet i samarbeid med Concordix Pharma AS, et datterselskap av Ayanda Group AS (Tromsø). Laboratoriearbeidet ble utført fra januar til september 2012 ved Norges fiskerihøgskole, Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Universitetet i Tromsø.

Høsten 2007 startet syv jenter og jeg på studiet marin bioteknologi. En etter en byttet alle jentene til andre studier. Derfor er det med stolthet jeg leverer den beste oppgaven på mitt kull.

De to siste årene har jeg blitt godt kjent med bedriften Ayanda og de som jobber der. En stor takk til veileder Tore Seternes for mange interessante samtaler og for entusiasmen du har vist for oppgaven min. Jeg vil også takke Jan-Erik Olsen og gjengen på Holt for to år med spennende sommerjobb.

Takk til Guro Kristine Edvinsen for hjelp på laboratoriet og resten av damene i sjømatgruppen for et veldig hyggelig arbeidsmiljø. Takk til Heming for oppmuntrende kaffepauser og hjelp med EndNote. Og selvfølgelig mamma og pappa for støtte gjennom studietiden.

Sist men ikke minst vil jeg rette en stor takk til, sannsynligvis den mest rutinerte veilederen på fiskerihøgskolen, Ragnar L. Olsen. Ditt gode humør og veiledning har gjort skrivingen mye lettere.

Tromsø, 15. november 2012

Alf Thorstein Brun

Summary

The market for polyunsaturated omega-3 fatty acids have recent years experienced a continuous growth. This is a result from the well-documented positive health effects particularly in prevention of cardiovascular diseases. Oils rich in polyunsaturated omega-3 are mainly being produced from fatty fish species caught in waters around South-America and Norway produces about 40 % of total refined fish oil products. Omega-3 products are often sold in food supplements with other ingredients that are believed to give additional health effects. Determination of oxidation products in many of these products are however difficult to quantify with the standard analytical methods; peroxide- and anisidine value.

The Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) recently released a report evaluating risks regarding consumption of fish oils containing oxidation products. The report has received much attention and concludes that little is known about possible negative health effects of oxidation products. It was also expressed a need for new standardized analytical methods which can determine oxidative status of marine oils. In this thesis oxidative stability of commercial fish oil products have been studied by accelerating the oxidation process. Accelerated oxidation studies were also used to examine how the trace metal Zinc affected formation of oxidation products, measured by standard analytical methods.

Oil products were incubated for 48 hours under oxidative accelerating conditions with shaking (150 rpm) and increased temperature (45-60 °C). Natural fish oils showed the highest oxidative stability of the products examined. Oils with increasing amount of LC-PUFA displayed decreasing oxidative stability. Within similar concentrated fish oils a correlation between production date and stability was found with reduced stability in older products. One highly concentrated fish oil containing more than 90 % LC-PUFA showed an increase in peroxide value when incubated in a refrigerator (4 °C) for 48 hours.

Concentrated fish oil added Zinc showed considerably reduced development of fatty acid peroxides. It is unknown if the effect comes from degradation of peroxides to more stable secondary oxidation products because Zinc interfered with the analysis of anisidine value. It may also be that Zinc affects the determination of peroxides. The same results were found even when Zinc contained as much as 1000 ppm of the transition metal Iron. Surprisingly fish oil added 500 ppm (FeCl₃) had less peroxide- and anisidine values than the control.

Accelerated stability studies with specified incubation conditions can be used to determine oxidative stability of fish oil products including natural fish oils and oils containing concentrated amounts of EPA and DHA. Effect of added Zinc interfered with both the analytical methods stressing the need for new analytical methods that can determine the amount of oxidation species in products containing omega-3 fatty acids in combination with other components.

Sammendrag

Markedet for produkter med langkjedede omega-3 fettsyrer har de siste årene vært i stadig vekst. Dette kommer av godt dokumenterte positive helseeffekter spesielt ved forebygging av hjerte- og karsykdommer. Hoveddelen av disse omega-3 oljene produseres i dag av fete fiskesorter fra farvannene rundt Sør-Amerika og mesteparten (40 %) raffineres i Norge. Omega-3 produkter har gjerne et konsentrert innhold av EPA og DHA. I tillegg inkluderes ofte andre ingredienser som man mener også har helsefremmende virkning. Mengden oksidasjonsprodukter i mange av disse kosttilskuddene lar seg ikke kvantifisere med standardmetodene for måling av oksidasjonsnivå; peroksid- og anisidinverdi.

Den norske vitenskapskomiteen kom nylig ut med en rapport som omhandler mulige negative helseeffekter av oksidasjonsprodukter. Rapporten har fått mye oppmerksomhet og konkluderer med at det er mye man ikke vet om helseeffekter av oksidasjonsprodukter. Det påpekes også at det er behov for nye standardiserte analyser av oksidasjon og oksidasjonsprodukter i marine oljer. I denne oppgaven har oksidativ stabilitet til kommersielle oljeprodukter blitt studert ved å måle dannelsen av oksidasjonsprodukter ved inkubasjon under oksidativt akselererende betingelser. Akselerert oksidasjon ble også brukt for å undersøke effekten spormetallet sink hadde på dannelsen av oksidasjonsprodukter målt med standardanalyser.

Oljeprodukter ble inkubert i to døgn ved oksidativt akselererende betingelser som risting (150 rpm) og forhøyet temperatur (45–60 °C). Av oljeproduktene viste naturlige fiskeoljer klart høyest oksidativ stabilitet. Generelt ga økende konsentrasjon av LC-PUFA lavere oksidativ stabilitet. Blant oljekonsentratene med omtrent likt innhold LC-PUFA var det en tydelig sammenheng mellom produksjonsdato og utvikling av oksidasjonsprodukter når nye og eldre produksjoner av samme oljeprodukt ble sammenlignet. Et høykonsentrert produkt som inneholdt over 90 % LC-PUFA viste også at inkubasjon i kjøleskap (4 °C) i to døgn førte til økt mengde peroksider.

Effekten av sink tilsatt fiskeoljekonsentrat viste tydelig reduksjon i utvikling av fettsyreperoksider. Hvorvidt dette kommer av at peroksider brytes ned til mer stabile sekundære oksidasjonsprodukter vites ikke da sink påvirket anisidinverdi-analysen. Det er også mulig at tilsatt sink påvirker selve peroksidanalysen. Resultatet ble det samme selv når sink inneholdt 1000 ppm av transisjonsmetallet jern. Oljekonsentrat tilsatt 500 ppm jern (FeCl_3) fikk overraskende nok lavere peroksid- og anisidinverdier enn kontroll.

Resultatene viste at akselererte stabilitetsstudier ved riktige betingelser kan brukes til å undersøke oksidativ stabilitet av fiskeoljer, både for naturlige fiskeoljer og konsentrerte EPA og DHA produkter. Effekten av sink påvirket begge analysemetodene og viser derved behovet for nye analysemetoder som kan bestemme oksidasjonsnivået i kombinasjonsprodukter med omega-3 fettsyrer.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Summary	II
Sammendrag	III
Innholdsfortegnelse	IV
Forkortelser	V
1. Innledning	1
2. Bakgrunn	3
2.1. Produksjon av raffinerte fiskeoljer	6
2.2. Oppkonsentrering av n-3 fettsyrer	8
2.3. Lipid oksidasjon	10
2.4. Måling av oksidasjon	11
2.5. Antioksidanter	12
3. Materialer og metoder	13
3.1. Oljeprodusenter med produkter	13
3.2. Kjemikalier	14
3.3. Fettsyresammensetning	15
3.4. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon	17
3.5. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjon	17
3.6. Peroksidverdi	18
3.7. Anisidinverdi	18
4. Resultater	19
4.1. Fettsyresammensetning	19
4.2. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon	22
4.2.1. Oksidativ stabilitet av naturlige fiskeoljer	22
4.2.2. Oksidativ stabilitet av oppkonsentrerte oljeprodukter	25
4.2.3. Oksidativ stabilitet av høykonsentrerte oljeprodukter	32
4.3. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjon	35
4.3.1. Effekt av sink	35
4.3.2. Effekt av jern	39
5. Diskusjon	41
5.1. Fettsyresammensetning	41
5.2. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon	42
5.3. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjonsmåling	44
6. Konklusjon	46
7. Referanser:	47

Forkortelser

ALA	α -Linolensyre (18:3n-3)
AOCS	American Oil Chemist' Society
ARA	Arakidonsyre (20:4n-6)
AV	Anisidinverdi
DHA	Dokosaheksaensyre (22:6n-3)
DPA	Dokosapentaensyre (22:5n-3)
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Eikosapentaensyre (20:5n-3)
FFA	Frie fettsyrer
GC	Gasskromatografi
GOED	Global Organization for EPA og DHA omega-3s
LA	Linolensyre (18:2n-6)
LC-PUFA	Langkjedede flerumettede fettsyrer
LDL	Low-density lipoprotein
Meq	Milliekvivalenter
p.a.	Pro analysis
PUFA	Flerumettede fettsyrer
PV	Peroksidverdi
TAG	Triacylglyserol
Zn/ZnO	Sink/Sinkoksid

1. Innledning

Linolensyre (LA) og α -Linolensyre (ALA) er essensielle fettsyrer for dyr og mennesker. Kun planter og fytoplankton har enzymer til å syntetisere disse. ALA er en omega-3 (n-3) fettsyre som er forløper til de langkjedede flerumettede fettsyrene eikosapentaensyre (EPA), dokosapentaensyre (DPA) og dokosaheksaensyre (DHA). LA er forløper til arakidonsyre (ARA), begge omega-6 (n-6) fettsyrer. I kosten kommer ALA fra blant annet raps- og linfrøolje. LA finnes det mye av i soya, solsikke- og maisolje.

Forholdet mellom n-6 og n-3 fettsyrer i kosten har vist å ha en stor innvirkning på helse og høyt inntak av LA kan være med på å bidra til fedme (Alvheim *et al.* 2012). I USA har forholdet n-6/n-3 endret seg det siste århundret fra omlag 1:1 til nær 30:1 (Blasbalg *et al.* 2011). Kombinasjonen av lavt aktivitetsnivå og høyt n-6/n-3 forhold i en energirik diett har bidratt betydelig til at fedme med tilhørende livsstilssykdommer er et økende problem og at hjerte-karsykdommer er hovedårsaken til dødsfall globalt (WHO 2012).

Det er derfor viktig å få i seg rikelig med langkjedede n-3 fettsyrer gjennom kosten. Dette oppnås enten ved å spise fet fisk et par ganger i uken eller gjennom kosttilskudd. EFSA (European Food Safety Authority) anbefaler voksne et daglig inntak på 0,25 g EPA og DHA (EFSA 2009). Omega-3 har dokumenterte effekter mot hjerte- og karsykdommer, spesielt ved sekundær forebygging av koronarsykdom (De Caterina 2011, Joensen *et al.* 2011). I tillegg kan langkjedede n-3 fettsyrer ha andre positive effekter som riktig utvikling av hjerne og øyne hos spedbarn (SanGiovanni *et al.* 2000) og mental helse (Martins 2009). Dette har ført til økt etterspørsel av marine omega-3 oljer i et stadig voksende marked. Tilsammen produseres det omtrent 1 million tonn fiskeolje årlig og mesteparten (88 %) brukes til fiskefôr (Tacon and Metian 2008). Total etterspørsel av raffinerte fiskeoljer utgjorde i 2009 cirka 90 000 tonn hvorav 58 % gikk til kosttilskudd (Steine *et al.* 2011).

Hoveddelen av marine oljer produseres i dag av fete fiskesorter fra farvannene rundt Sør-Amerika. Mesteparten kommer fra de pelagiske artene ansjoveta (*Engraulis ringens*), sardin (*Sardinops sagax*) og chilensk hestemakrell også kalt jack mackerel (*Trachurus murphyi*) (Miller *et al.* 2008, Schwartzlose *et al.* 1999). I Norden produseres det fiskeolje fra kolmule (*Micromesistius poutassou*), lodde (*Mallotus villosus*) og tobis (*Ammodytes marinus*) (Hasan and Halwart 2009). Det produseres også olje fra torskelever samt avskjær av sild og oppdrettslaks. Etersom behovet for marine flerumettede fettsyrer har økt, produseres det også mer olje fra alternative kilder som alger og virvelløse dyr, eksempelvis antarktisk krill (*Euphausia superba*) og raudåte (*Calanus finmarchicus*).

Den tradisjonelle prosessen for å produsere fiskeolje involverer to trinn; ekstraksjon av olje fra råstoff og raffinering. Naturlig vil fiskeolje etter raffinering inneholde omtrent 10-30 % EPA og DHA i form av triacylglyseroler (VKM 2011). Innholdet omega-3 fettsyrer i en fiskeolje er avhengig av råstoffet. Generelt inneholder fiskeoljene fra Sør-Amerika et høyere naturlig innhold omega-3 enn andre kilder (Olsen 2007). Konsentrert fiskeolje produseres av raffinerte eller halvraffinerte oljer og disse produktene inneholder fra 60-90 % langkjedede omega-3 fettsyrer. Omega-3 fettsyrer har lett for å oksidere, ettersom de inneholder mange dobbeltbindinger. Oksidasjon fører til nedsatt næringsverdi og vond smak/lukt noen oksidasjonsprodukter kan også være giftig (Guillén and Ruiz 2005). Hastigheten av oksidasjonsprosessen i en fiskeolje er avhengig av flere faktorer: Kvalitet på råstoff, mengde flerumettede fettsyrer (PUFA), fysiske forhold og innhold av pro- og antioksidanter.

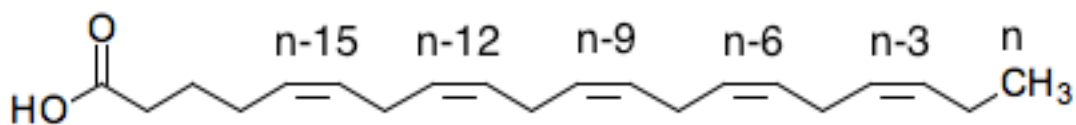
Økt fokus er rettet mot hvilke mulige negative helseeffekter oksidasjon av fiskeoljer har både ved oksidasjon *in vivo*, og ved inntak av oksiderte marine omega-3 produkter. En undersøkelse utført av Nofima på oksidasjonsnivåer i Norske omega-3 produkter, fant at bare 4 av 56 produkter hadde godkjente oksidative nivåer i henhold til standarder satt av GOED (Global Organization for EPA and DHA Omega-3) (RUBIN 2010). GOED har gitt ut en monografi med anbefalte grenseverdier for oksidasjonsprodukter i omega-3 oljer til maks PV 5 meq kg⁻¹ og maks AV 20. Disse verdiene skal ikke overskrives i salgsperioden til produktet (GOED 2012).

Formålet med denne oppgaven har vært å studere oksidativ stabilitet av forskjellige marine omega-3 oljer og hvordan mengden omega-3 fettsyrer påvirker oksidasjon. I oppgaven er det etablert en akselerert metode som kan bestemme oksidativ kvalitet av en olje. Denne kan også brukes for å bestemme hvordan spormetallet sink vil påvirke stabiliteten. Innledningsvis ble fettsyresammensetningen i ulike oljeprodukter undersøkt.

2. Bakgrunn

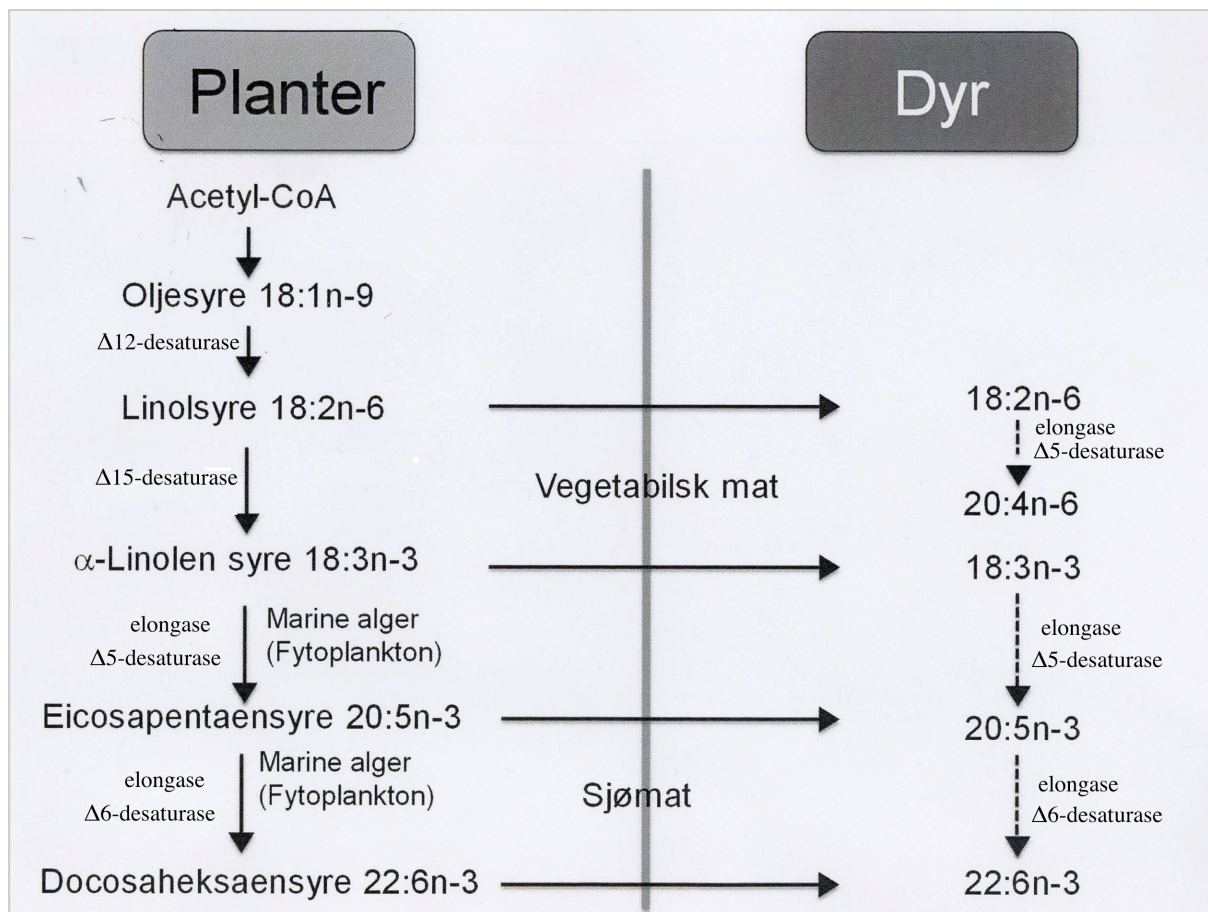
Fettsyrer består av en hydrokarbonkjede ($-\text{CH}_2-$) med vanligvis mellom 12 og 22 karbonatomer. Karbonkjeden har en metylgruppe ($-\text{CH}_3$) i den ene enden og en karboksylgruppe ($-\text{COOH}$) i den andre. Fettsyrer deles inn i forskjellige grupper etter kjemisk oppbygning; lengden på karbonkjeden, antall dobbeltbindinger og konfigurasjonen av dobbeltbindingene. Mettede fettsyrer har ingen dobbeltbindinger mens umettede fettsyrer har en eller flere dobbeltbindinger. Umettede fettsyrer kan ha dobbeltbindinger både i cis- og trans-konfigurasjon. Cis-konfigurasjoner, hvor hydrogenatomene til dobbeltbindingene ligger på samme side, er mest vanlig. Når hydrogenatomene er på hver sin (trans) side kalles det trans-konfigurasjon, såkalt trans-fettsyre.

Flerumettede fettsyrer har fra 2 til 6 dobbeltbindinger og 18-22 C-atomer i hydrokarbonkjeden. De klassifiseres etter plassering av den første dobbeltbindingen fra metylenden (n- eller ω -enden), karbon-atomer og antall dobbeltbindinger. EPA, 20:5n-3 har 20 karbonatomer og fem dobbeltbindinger der den første sitter på det tredje karbonet fra metylenden (Figur 1). ARA, 20:4n-6 har fire dobbeltbindinger der den første sitter på karbon nummer seks fra metylenden.



Figur 1: Eikosapentaensyre (EPA), 20:5n-3.

Fettsyrer blir syntetisert ved hjelp av desaturaser og elongaser. Desaturaser er enzymer som kan fjerne to hydrogenatomer og dermed danne en dobbeltbinding mens elongaser er enzymer som kan forlenge hydrokarbonkjeden. Dyr og mennesker kan syntetisere alle fettsyrer utenom linolensyre ($18:2n-6$) og α -linolensyre ($18:3n-3$). Disse er derfor essensielle og må komme gjennom kost. Planter og marine alger har Δ -12 og Δ -15 desaturaser og kan derfor syntetisere LA og ALA. Mennesker kan i teorien syntetisere EPA og DHA selv, men de samme enzymene danner også arakidonsyre som ofte favoriseres. Bare marint planteplankton kan omdanne LA og ALA til EPA og DHA, ikke landplanter. Derfor bør langkjedede n-3 fettsyrer komme via kost, hvor sjømat og spesielt fet fisk er gode kilder. Figur 2 viser forenklet syntesevei og kilder til flerumettede fettsyrer.



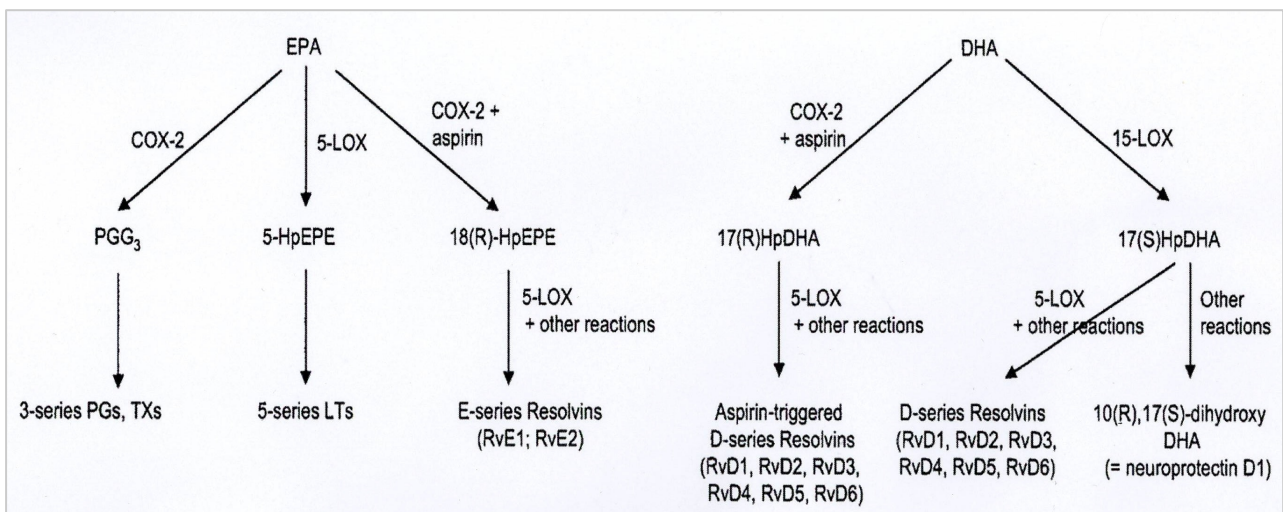
Figur 2: Forenklet syntesevei av omega-3 og omega-6 fettsyrer i planter og dyr (Olsen 2007).

Positive effekter ved økt inntak av langkjedede n-3 fettsyrer kan deles inn i fire generelle virkemekanismer (Calder 2012):

1. Regulere konsentrasjoner av metabolitter og hormoner som fører til endret atferd av celler og vev.
2. Påvirke prosesser som oksidasjon av LDL (oksidativt stress) en viktig faktor i utvikling av aterosklerose.
3. Direkte påvirkning av vev og celler via overflate eller intracellulære fettsyrereseptorer.
4. Påvirke celleatferd ved å endre sammensetning av cellemembranen (fosfolipider).

ARA og EPA blir frigjort til cytosol fra fosfolipidmembranen av fosfolipaser, og omdannes til oksygenerte produkter kalt eikosanoider. Eikosanoider består av 20 karbonatomer og deles inn i prostaglandiner, tromboksaner, leukotriener og lipoksiner (Stables and Gilroy 2011). Eikosanoidene som dannes har forskjellige egenskaper avhengig

av om de stammer fra ARA eller EPA. Overproduksjon av eikosanoider fra ARA har vist å være med på utvikling av sykdom, ved å virke proinflammatorisk og stimulere blodkoagulasjon (Calder 2012). Økt inntak av omega-3 fettsyrer vil gjøre ARA mindre tilgjengelig i cellemembranen og vil i tillegg hemme enzymer som er med å danne n-6 eikosanoider. Eikosanoidene produsert fra marine n-3 fettsyrer er vist å virke stort sett positivt (Calder 2012). EPA og DHA er også vist å danne forskjellige typer resolviner og mindre potente prostaglandiner (3-serien) og leukotriener (5-serien) (Figur 3), som virker betennelsesdempende (Calder 2009).

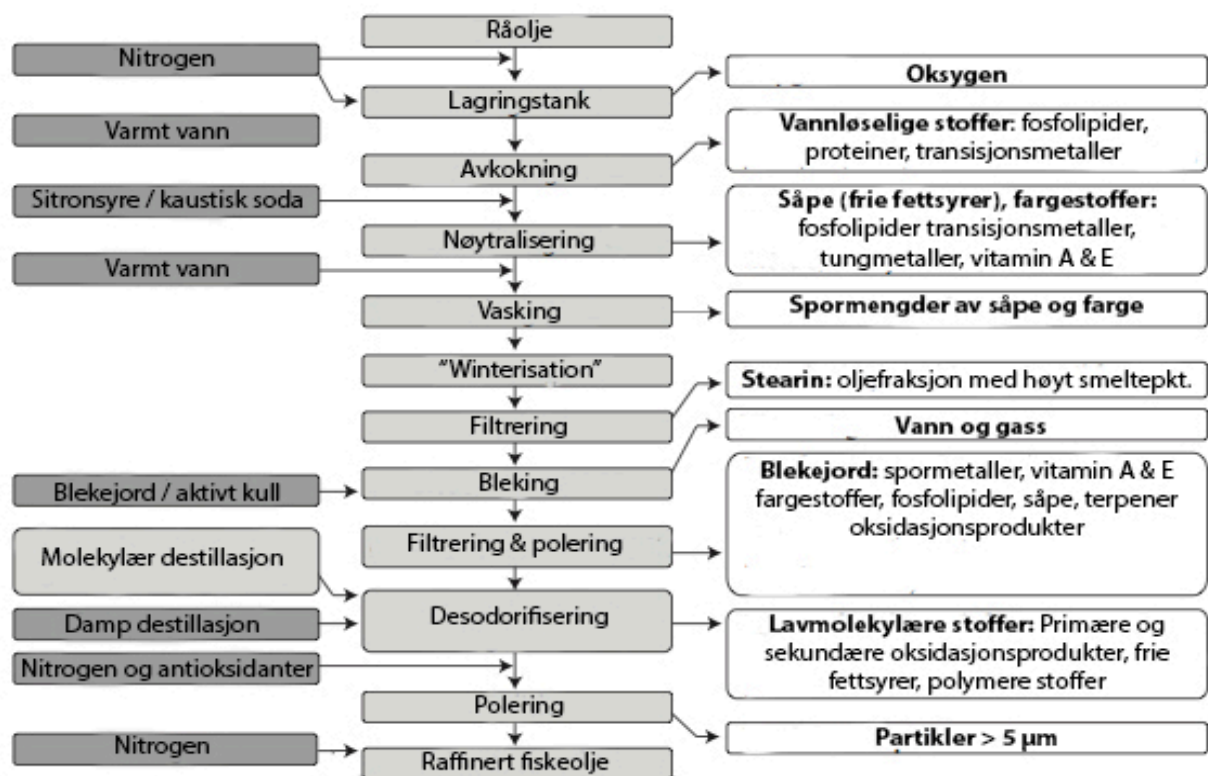


Figur 3: Oversikt over E og D resolviner som dannes fra EPA og DHA. COX, syklooksygenase; HpDHA hydroperoksydokosaheksaen-syre; HpEPE, hydroperoksyekosapentaen-syre; LOX, lipoksygenase; LT, leukotrien; PG, prostaglandin; Rv, resolvin; TX; tromboksan (Calder 2009).

EPA og DHA aktiverer også forskjellige PPAR reseptorer (Peroksisom proliferator-aktivererte reseptorer). PPAR er transkripsjonsfaktorer som regulerer genuttrykk. PPAR α og PPAR γ er de to best kjente (Calder 2012). PPAR α uttrykkes i lever og virker som å ha en viktig rolle ved metabolismen av fettsyrer. PPAR γ regulerer differensiering og metabolsk respons av fettceller, inkludert promotering av insulinsensitivitet (Calder 2012). EPA- og DHA-aktivering av PPAR kan derfor være med på å regulere metabolisme og andre celleresponser, for eksempel inflammasjon. NF κ B er en transkripsjonsfaktor som uttrykker gener involvert i inflammatorisk oppregulering. EPA og DHA nedregulerer NF κ B gjennom blant annet PPAR aktivering (Wahli and Michalik 2012).

- Bleking: Fjerner pigmenter, frie fettsyrer og oksidasjonsprodukter som dannes under nøytraliserings.
- Desodorifisering: Hovedmålet med dette trinnet er å fjerne så mye som mulig av de flyktige forbindelsene, f. eks sekundære oksidasjonsprodukter.
- Molekylær destillasjon: Brukes for å fjerne organiske forurensninger som dioksiner og furaner, i tillegg fjernes oksidasjonsprodukter og polymere stoffer som dannes i de tidligere raffineringstrinnene. Molekylær destillasjon, også kalt "short path distillation" brukes for å oppkonsentrere mengden EPA og DHA i oljen.

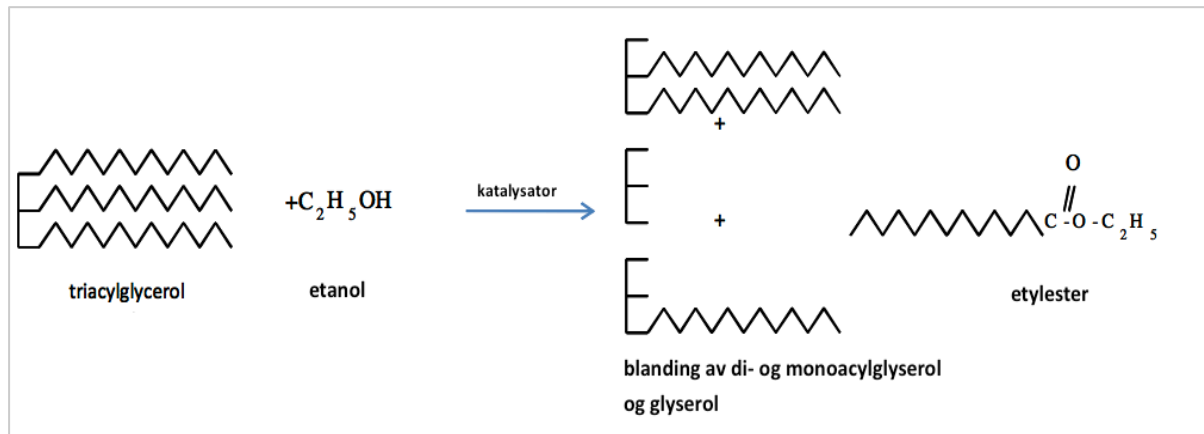
Raffineringsprosessen fjerner eller minsker innhold av uønskede stoffer som finnes naturlig eller oppstår under prosessering av oljen. Effektiviteten av raffineringen avhenger av kombinasjon av prosesseringstrinn og prosessparametere som utstyr, temperatur, tid og trykk (VKM 2011).



Figur 5: Prosesseringstrinn ved raffinering av råolje til fiskeolje. Modifisert etter (Jacobsen *et al.* 2009).

2.2. Oppkonsentrering av n-3 fettsyrer

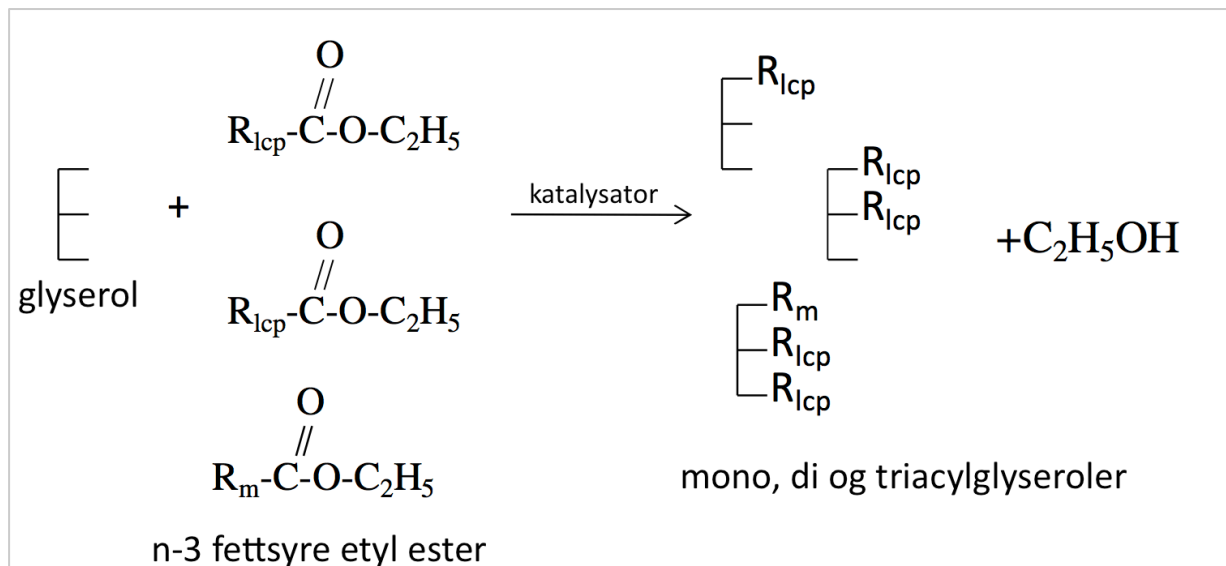
Oljer med oppkonsentrerte mengder langkjedede omega-3 fettsyrer vil etter forskjellige prosesseringstrinn inneholde fettsyrer som enten etylestere eller en blanding av acylglyseroler (mono, di og triacylglyseroler). I produksjonen av etylestere blir raffinert olje blandet med etanol og en katalysator ved 80 °C grader, under vakuum. Oljen vil da inneholde glyserol, etylestere og noe mono og diacylglyseroler, slik Figur 6 viser (VKM 2011).



Figur 6: Prosessering av raffinert olje med etanol, katalysator og varme til etylestere, glyserol og di- og monoacylglyserol (VKM 2011).

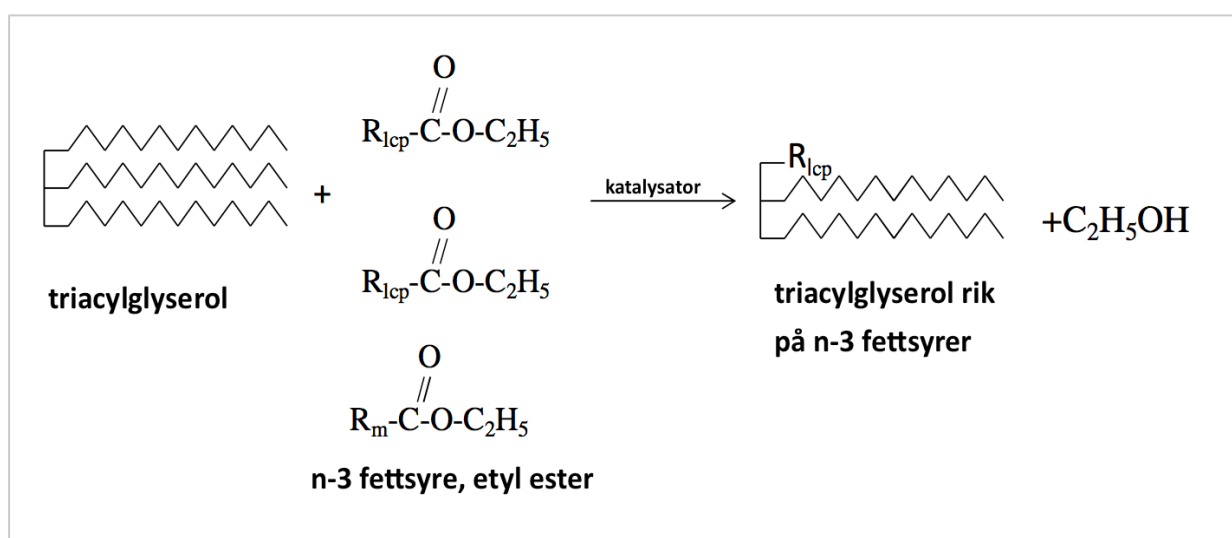
Molekylær destillasjon kan deretter brukes for å konsentrere fettsyrene i form av etylestere. Metoden utnytter forskjellig molekylstørrelse og kokepunkt for å anrike mengden EPA og DHA i oljen. Denne metoden er en av de vanligste ved produksjon av oppkonsentrerte n-3 oljeprodukter som normalt inneholder rundt 30 % EPA og 20 % DHA etter to destillasjoner (Shahidi and Wanasundara 1998, VKM 2011).

Produksjon av acylglyseroler gjøres enten ved trans-esterifikasjon eller re-esterifikasjon. Triacylglyseroler (TAG) sees på av markedet som mer naturlig enn etylestere. Dette kommer av at fettsyrene naturlig forekommer som TAG i råoljen. Det er også vist at TAG med n-3 fettsyrer, spesielt i sn-2 posisjon har høyere oksidativ stabilitet. (Martín *et al.* 2012, Wijesundera *et al.* 2008). Re-esterifisering av konsentrerte etylestere gjøres i en reaksjon med glyserol i nærvær av etanol og en katalysator (Figur 7). Fortløpende superkritisk væskefraksjonering brukes så for å fjerne flyktige og tunge biprodukter som dannes under re-esterifikasjonen (VKM 2011).



Figur 7: Re-esterifisering av fettsyrer oppkonsentrert i form av etylestere til mono, di og triacylglyceroler. R_{lcp} er LC-PUFA og R_m en enumettet fettsyre (VKM 2011).

Trans-esterifisering av olje ved reaksjon med; fettsyrer, alkoholer eller estere, er vist i Figur 8. Reaksjonen mellom to estere kalles inter-esterifikasjon. Denne metoden brukes for å forbedre struktur og sammensetning i oljen, både fysisk og ernæringsmessig. Enzymkatalysert trans-esterifisering kan også brukes for å oppkonsentrere EPA og DHA som triacylglyceroler (Breivik *et al.* 1997, Haraldsson *et al.* 1997, Haraldsson *et al.* 1993). Tilsvarende for produksjon av andre typer glyserider (Myrnes *et al.* 1995). Ved trans-esterifisering som re-esterifisering vil produktet inneholde en blanding av mono, di og triacylglyceroler (VKM 2011).

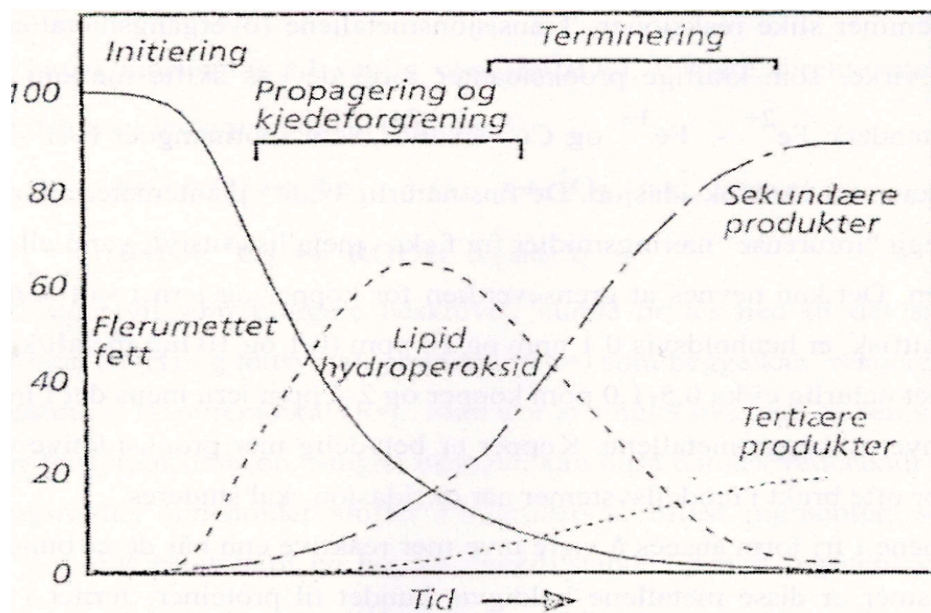


Figur 8: Trans-esterifisering av fettsyrer til triacylglyceroler rike på EPA og DHA. R_{lcp} er LC-PUFA og R_m en enumettet fettsyre (VKM 2011).

2.3. Lipid oksidasjon

Oksidasjon av fettsyrer er den primære årsaken til forringelse av konsentrerte oljer og næringsmidler med høyt innhold av flerumettede fettsyrer. Fettsyrer er i større grad utsatt for oksidasjon med økende innhold av dobbeltbindinger (Cosgrove *et al.* 1987). Oksidasjonsmekanismen involverer tre faser og kalles autooksidasjon.

1. **Initiering:** Dannelse av frie radikaler. Hydrogenatom fjernes fra fettsyren som danner reaktivt fettsyreradikal : $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
2. **Propagering:** Kjedereaksjon av frie radikaler, radikalet reagerer med oksygen og danner peroksider (primære oksidasjonsprodukter):
 - I. $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$
 - II. $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
3. **Terminering:** Dannelse av ikke-radikale oksidasjonsprodukter. Peroksider er ustabile og kan brytes ned til nye radikaler som alkyl- og hydroksylradikaler ($RO\cdot$) og ($\cdot OH$). Disse kan igjen reagere med fettsyrer og danne hydroksylerte fettsyrer (III), alternativt kan alkylradikalet brytes ned til sekundære oksidasjonsprodukter (ketoner, aldehyder, alkoholer). Etter hvert vil tertiære oksidasjonsprodukter dannes (V og VI).
 - III. $RO\cdot + RH \rightarrow ROH + R\cdot$
 - IV. $RH + \cdot OH \rightarrow R\cdot + H_2O$
 - V. $R\cdot + \cdot R \rightarrow RR$
 - VI. $ROO\cdot + \cdot R \rightarrow ROOR$



Figur 9: Tenkt oksidasjonsforløp av flerumettede fettsyrer (Olsen 2007).

Oksidasjonshastighet er avhengig av flere faktorer som oksygentilgang, lys (spesielt UV-lys) og varme. Transisjonsmetaller fører også til raskere oksidasjon, de er såkalte prooksidanter. Transisjonsmetallenes prooksidative egenskap kommer av at de kan forekomme i to valenser (Cu^+ - Cu^{2+}), kopper og jern er de mest prooksidative. Disse kan påvirke initieringsfasen ved å reagere med en fettsyre og danne et fettsyreradikal, eller reagere med oksygen og danne superoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Superoksid omgjøres til singlet oksygen, som er svært reaktivt og vil reagere med en fettsyre og danne fettsyreperoksid (Olsen 2007). Oksidasjonsprosessen kan ikke stoppes, men det er mulig å senke den. Dette blir gjort i oljeprodukter ved flere preventive tiltak:

- Fjerne oksygen, ved bruk av modifisert atmosfære og/eller vakuum.
- Redusere prooksidanter (transisjonsmetaller). Mesteparten av spormetaller og andre prooksidanter fjernes under raffinering av oljen.
- Redusere energi (lys og varme). Olje tappes på beholdere som ikke slipper gjennom lys.
- Tilsette antioksidanter.

2.4. Måling av oksidasjon

Måling av oksidasjon bestemmer oljens oksidative status ved tidspunktet målingen utføres. Det finnes mange forskjellige målemetoder og de mest brukte er alle enkle kjemiske analyser. Analysene påviser enten primære eller sekundære oksidasjonsprodukter. Peroksidverdi og anisidinverdi er de som offisielt er godkjent og brukt ved omsetting og salg av oljer og oljeprodukter. Peroksidverdi angir mengden primære oksidasjonsprodukter og anisidinverdi angir mengden sekundære. En annen metode måler mengden konjugerte diener (rearrangering av dobbeltbindinger i fettsyren) ved UV absorpsjon. Måling av såkalt thiobarbitursyre reaktive stoffer (TBARs) kan også brukes. Her måler man mengden malondialdehyd, et sekundært oksidasjonsprodukt, ved å bruke thiobarbitursyre. Det er også mulig å analysere sekundære oksidasjonsprodukter ved å bruke gaskromatografi, men dette krever dyrt utstyr og har så langt bare blitt brukt i forskningssammenheng.

Stabilitet av en olje kan undersøkes ved å måle mengden oksidasjonsprodukter, under oksidative akselererende betingelser. Disse betingelsene kan være temperatur (60-140 °C), oksygentilførsel, tilsetning av prooksidanter (5-100 ppm), risting og trykk (Frankel 1998). Akselererte stresstester kan være med på å bestemme kvaliteten til oljen, men ikke

holdbarhetstiden. Det er utviklet flere forskjellige tester som akselererer oksidasjon, blant annet Rancimat, Oxipress og Schaal oven test. Mange av disse måler oksygenforbruk ved høye temperaturer. Bruk av for høye temperaturer kan gi andre oksidasjonsforløp enn under normale betingelser (Méndez *et al.* 1996).

2.5. Antioksidanter

Alle stoffer som hemmer oksidasjon kalles antioksidanter. I næringsmidler er det lavmolekylære, naturlige vannløselige og fettløselige stoffer som brukes. Det finnes også en rekke syntetiske antioksidanter og mange av disse har gode antioksidative egenskaper. Naturlige antioksidanter er ikke nødvendigvis bedre enn de syntetiske, men brukes fordi syntetiske stoffer stort sett ikke ønskes i helsekostprodukter. Naturlige antioksidanter kan i tillegg ha andre helsemessige positive effekter. Et eksempel er polyfenoler som kan ha anti-inflammatoriske, antimikrobielle og karutvidende egenskaper (Landete 2011).

I marine omega-3 oljer er tokoferoler (vitamin E) mest brukt (Yanishlieva and Marinova 2001). Tokoferolers sterke antioksidative egenskap kommer av evnen til å avgi et hydrogen atom, og dermed redusere reaktive radikaler. (Kamal-Eldin and Appelqvist 1996). Vitamin C tilsettes næringsmidler både som vannløselig (askorbinsyre) og fettløselig (askorbylpalmitat). Begge disse formene av vitamin C kan binde opp transisjonsmetaller (Cort 1974). Både tokoferoler og vitamin C har evne til å nøytralisere singlet oksygen. Antioksidanter hemmer oksidasjon ved tre hovedmekanismer:

- Radikalfangere (scavenging), reduserer frie radikaler (vit. E og C, fenoler).
- Nøytralisere (quenching) singlet oksygen (vit. E og C, karotenoider).
- Binde opp (kjelatere) transisjonsmetaller (laktat, eplesyre, sitronsyre).

I tillegg til tokoferoler og vitamin C, brukes ingredienser fra urter, frukt og grønnsaker som antioksidanter: Flavonoider, fenoler og polyfenoler. I næringsmidler er det vanlig å tilsette flere antioksidanter sammen, dette er vist å gi en bedre synergisk effekt (Hamilton *et al.* 1998, Sherwin 1978). Synergisk effekt kan oppnås ved for eksempel å tilsette både tokoferol og vitamin C. Da vil vitamin C kunne tilbakedanne oksidert tokoferol, og gi en høyere antioksidativ effekt som varer lengre. Antioksidanter kan ved feil bruk også være prooksidative, det er derfor viktig at doseringen er riktig. Optimal mengde antioksidanter kan undersøkes ved bruk av akselererende oksidative tester.

3. Materialer og metoder

Oljene brukt i oppgaven ble enten anskaffet gjennom Tromsøfirmaet Ayanda eller mottatt direkte fra produsent. Totalt er ti produkter fra fem forskjellige leverandører undersøkt (Produsent A-E). Åtte av produktene (nr. 1-6, 9 og 10) er produkter hvor innholdet av EPA og DHA er blitt oppkonsentrert. To produkter (nr. 7 og 8) har antakelig ikke oppkonsentrert mengde EPA og DHA i forhold til utgangspunktet i fiskeoljen. Av enkelte oljeprodukter i oppgaven ble oksidativ stabilitet av nye og eldre produksjoner undersøkt.

3.1. Oljeprodusenter med produkter

I oppgaven er det valgt ikke å spesifisere navn på produsentene av oljeproduktene. For å skille oljene er produkttype og produksjonsdato oppgitt, samt at oljene ble tildelt et nummer. Produksjonsdato er datoen oljen/konsentratet var ferdig produsert hos produsenten.

Produsent A

- **Produkt 1:** TG3322 (33 % EPA og 22 % DHA). Konsentratet produsert mars 2010, lagringsbetingelser er uvisst. Mottatt NFH 4. november 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 11.01.2011.
- **Produkt 2:** TG3322 (33 % EPA og 22 % DHA). Konsentratet produsert oktober 2010 og lagret kjølig (4 °C grader) til februar 2012. Mottatt NFH februar 2012 og lagret ved -53 °C grader. Stabilitetsanalyse 09.02.2012.
- **Produkt 3:** TG3322 (33 % EPA og 22 % DHA). Konsentratet produsert 27.02.2012. Mottatt NFH mai 2012 og lagret ved -53 °C grader. Stabilitetsanalyse 17.05.2012.

Produsent B

- **Produkt 4:** TG3322 (33 % EPA og 22 % DHA). Konsentratet produsert 04.01.2012. Mottatt NFH februar 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 23.02.2012.
- **Produkt 5:** TG3322 (33 % EPA og 22 % DHA). Konsentratet produsert 07.07.2011, lagringsbetingelser er uvisst. Mottatt NFH i mai 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 17.05.2012.
- **Produkt 6:** TG75 (75 % DHA). Konsentratet produsert 26.01.2012. Mottatt NFH i midten av februar 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 23.02.2012.

Produsent C

- **Produkt 7:** Fiskeolje, TG1812 (18 % EPA og 22 % DHA, fiskeolje basert på råolje fra Sør-Amerika). Produsert 10.02.2011, lagringsbetingelser er uvisst. Mottatt NFH januar 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 11.01.2012.

Produsent D

- **Produkt 8:** Lakseolje (produsert direkte fra ferskt lakseslo høsten 2011). Mottatt NFH januar 2012 og lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 12.01.2012.

Produsent E

Oljene fra produsent E blir raffinert direkte fra råstoff i Chile, liknende oljeprodukter fra Produsent A og B blir oppkonsentrert i Norge.

- **Produkt 9:** TG3426 (34 % EPA og 26 % DHA). Produsert 07.07.2012 Mottatt NFH starten av september 2012, lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 07.09.2012.
- **Produkt 10:** TG4020 (40 % EPA og 20 % DHA). Produsert 13.07.2012. Mottatt NFH starten av september 2012, lagret ved -53 °C. Stabilitetsanalyse 02.11.2012.

Oljene ble tint ved romtemperatur på laboratoriebank samme dag som stabilitetsforsøk og andre undersøkelser ble gjennomført.

3.2. Kjemikalier

Kjemikalier var om ikke annet nevnt fra Sigma-Aldrich Inc., St. Luis, Missouri, USA

Eddiksyre, kvalitet: $\geq 99,8$ %, puriss p.a.

Kloroform, kvalitet: puriss p.a.

Isooktan (2,2,4-Trimethyl-pentane), kvalitet: ACS reagens, $\geq 99,0$ %.

Potetstivelse

Kaliumjodid, kvalitet: puriss p.a.

p-Anisidine, kvalitet: ≥ 99 %

Svovelsyre, kvalitet: 95-97 %, puriss p.a

Metanol, kvalitet: puriss p.a

Diklormetan, kvalitet: puriss p.a

Heptan, kvalitet: ≥ 99 %, puriss p.a

Natriumklorid, kvalitet: purum p.a

Natriumtiosulfat – pentahydrat, kvalitet: min 99,5 %, p.a. (AppliChem, Darmstadt, Tyskland)

Zinc Oxide CF Extra High Purity. (Geelawson, London)

Jern(III)klorid – hexahydrat, kvalitet: p.a. (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Fettsyrestandarder:

PUFA1, PUFA2 og PUFA3. (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA)

GLC 68D og GLC 411. (Nu-Chek Prep, Inc. Elysan, MN, USA)

3.3. Fettsyresammensetning

Relativ fettsyresammensetning i oljene ble undersøkt ved metylering og gasskromatografi etter en modifisert metode (Stoffel *et al.* 1959). Oljene ble løst i 2:1 diklormetan:metanol til en konsentrasjon på ca 10 mg/ml før 100 µl av denne løsningen ble overført til glassrør. Deretter ble det tilsatt 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2 % H₂SO₄ i metanol, før koking én time på varmeblokk ved 100 °C. Etter koking ble 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCL tilsatt prøvene og ristet, to faser dannet seg der den øverste bestod av heptan og lipider. Denne ble pipettert over i nye rør og satt til damping med nitrogengass til prøven var tørr. Tørre prøver ble løst med 100 µl heptan og overført til GC-rør. Prøvene ble analysert med gasskromatografi (Agilent 6890N, Agilent Technologies, California, USA) Kolonnen var en Varian CP7419 kapillærkolonne og helium ble brukt som bæregass. Programmet som ble brukt var:

- 50 °C i to minutter
- Økning med 10 °C i minuttet til 150 °C
- Økning med 1 °C i minuttet til 205 °C
- Økning med 15 °C i minuttet til 255 °C, holdt i 10 minutter

For å kunne identifisere de ukjente fettsyrene i oljene ble det også analysert prøver med kjente fettsyresammensetninger. Det var tre PUFA prøver som hadde sin opprinnelse fra uspesifisert marin kilde (PUFA1), menhaden olje (PUFA3) og animalsk kilde (PUFA2). To syntetiske standarder ble også brukt; GLC 68D og GLC 411. I Tabell 1 er fettsyrene i standardene satt opp og påvist retensjonstid av disse. Tabellen ble brukt for å identifisere hvilke fettsyrer de forskjellige oljeproduktene inneholdt.

Tabell 1: Oppgitt fettsyresammensetning i de ulike kommersielle fettsyrestandardene og funnet retensjonstid etter analyse på GC

Retensjonstid					
Fettsyre	GLC 68D	GLC 411	PUFA-1	PUFA-2	PUFA-3
10:0		12,186			
12:0		14.554			
12:1		15.422			
14:0	17.573	17.551	17.548	17.596	17.544
14:1n-5	18.589	18.602			
16:0	21.983	21.817	21.836	21.850	21.817
16:1n-7	23.064	23.006	23.019	22.988	23.009
18:0	28.035	27.865	27.780	27.883	26.821
18:1n-12		29.045			
18:1n-9	29.323	29.150	29.176	29.196	29.110
18:1n-7	29.542	29.443	29.393	29.378	29.360
18:2n-6	31.628	31.620	31.564	31.615	31.527
18:3n-6				33.356	
18:3n-3	34.839	34.838	34.754	34.773	34.747
18:4n3			36.736		36.748
20:0	35.523	35.567			
20:1n-15		36.418			
20:1n-12		36.766			
20:1n-9	37.234	37.076	36.994	36.915	36.894
20:2n-6	40.006	40.022			
20:4n-6	43.471			43.395	
20:4n-3					45.697
20:5n-3	47.532		47.317	47.248	47.353
22:1n-11			45.532		
22:1n-9	46.043		45.707		
24:0	53.376	53.314			
24:1n9	55.197	55.306			
22:4n-6				53.167	
22:5n-3			57.262		57.249
22:6n-3	58.964	58.750	58.270	58.637	58.715

3.4. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon

Den oksidative stabiliteten til de ulike oljeproduktene ble undersøkt ved å etablere en stresstest, dvs. inkubasjonsbetingelser som akselerer oksidasjon. Variablene var temperatur, tid og risting. Oljeprodukter ble utsatt for temperaturer fra fire til 60 grader, med eller uten risting (150 rpm). Prøvene, ca. 80 gram olje ble tilsatt engangs plastglass (disposable cup 100 ml, PP Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) og inkubert i en temperaturkontrollert rystemaskin (Innova 4300, New Brunswick Scientific, Enfield, USA). Lufttilgang var lik resterende volum i plastglassene etter olje var tilsatt, glassene hadde skrulokk. Prøver ble tatt under inkubasjonsforløpet ved at 18-20 ml ble overført til 50 ml prøverør (blåkork) og frosset ved -53 °C. Analysing av alle prøvene ble gjort samtidig etter endt inkubasjonsforløp.

3.5. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjon

Effekten av hvordan olje tilsatt sink påvirket dannelsen av oksidasjonsprodukter ble undersøkt. Produkt 2 (TG3322) fra Produsent A ble tilsatt forskjellige mengder sink (0,32-43,4 mg/g olje). Sink ble tilsatt i form av sinkoksid.

I følge analysesertifikatet til sinkoksidet kan pulveret inneholde opp til 200 ppm jern. Pulveret som ble levert hadde 1 ppm jern. Det ble derfor testet hvordan en større mengde jern ville påvirke stabiliteten til oljen. Mengden sink tilsatt oljene var lik (8,68 mg/g olje), mens jerninnholdet varierte. Jerninnholdet ble tilsatt og regnet ut fra mengden sinkoksid. Jern ble tilsatt oljen i form av jern(III)klorid.

Effekten av tilsatt FeCl_3 ble også undersøkt direkte i oljen, dvs. konsentrasjonen av jern (ppm) var basert på oljemengden. Følgende konsentrasjoner av jern ble benyttet: 10, 100 og 500 ppm jern.

3.6. Peroksidverdi

Mengden primære oksidasjonsprodukter ble bestemt ved å måle peroksidverdi (PV) og ble utført etter AOCS offisielle metoder (AOCS 1990b), med visse endringer. Fem gram olje (+/- 0,5 g) ble veid ut og løst i 30 ml kloroform:eddiksyre (2:3) i 250 ml erlenmeyerkolber. Mettet kaliumjodid ble tilsatt og stod i presis ett minutt før 30 ml dH₂O ble tilsatt. Prøven ble titrert med (0,1 N) natriumtiosulfat til fargen forble hvitaktig. Indikator var 5 ml potetstivelse (1 g/250 ml dH₂O). Av alle målinger ble det analysert tre paralleller.

Formel 1: Beregning av peroksidverdi, svaret gir meq/kg olje

$$\text{Peroksidverdi} = \left(N \left(\frac{\text{meq}}{\text{ml}} \right) * 1000 \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) \right) * \frac{\text{titreringsvolum}(\text{ml})}{\text{prøvemengde}(\text{g})}$$

Hvor:

N= Molar løsning av natriumthiosulfat

3.7. Anisidinverdi

Måling av aldehyder, sekundære oksidasjonsprodukter ble gjort etter AOCS offisielle metoder (AOCS 1990a) med noen modifikasjoner. Olje 0,5 g (+/- 0,05g) ble løst med 25 ml isooktan i en 50 ml erlenmeyerkolbe. Absorbans av 2,5 ml prøve ble målt i engangskyvetter (Macro PWWA, VWR, West Chester, Pennsylvania, USA) med spektrofotometer (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ved 350 nm, 2.5 ml isooktan ble brukt som nullprøve. Til kyvettene ble det tilsatt 0,5 ml 2.5 % *p*-Anisidin i eddiksyre, etterfulgt av absorbansmåling etter nøyaktig 10 minutter, isooktan og *p*-Anisidin ble brukt som nullprøve. Av alle målinger ble det analysert tre paralleller.

Formel 2: Beregning av anisidinverdi

$$p - \text{Anisidin verdi} = \frac{25x(1,2xAs - AB)}{m}$$

Hvor:

As = Absorbans av oljeløsning etter reaksjon med *p*-Anisidin

Ab = Absorbans av oljeløsning med isooktan

m = vekt av oljeprøve

4. Resultater

4.1. Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen av oljeproduktene ble analysert for å undersøke om de oppgitte verdiene var i overensstemmelse med våre funn. Resultatene for to vanlige oljer (Produkt 7 og 8) og i oljeprodukt med svært høyt innhold av langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer (Produkt 6 og 10) er vist i Tabell 2. Totalt ble mellom 96,5 % og 100 % av alle fettsyrer i de fire produktene identifisert.

Produkt 7 (Fiskeolje, TG1812) inneholdt 27,6 % mettede, 28 % enumettede og 41,4 % flerumettede fettsyrer. Palmitinsyre (16:0) utgjorde hoveddelen (63 %) av de mettede fettsyrene. Av de enumettede fettsyrene utgjorde palmitolensyre (16:1n-7) og oljesyre (18:1n-9) 69,3 %. Fiskeoljen inneholdt totalt 34,4 % langkjedede omega-3 fettsyrer hvorav 19,5 % EPA og 12,6 % DHA.

Produkt 8 (Lakseolje) inneholdt 11,6 % mettede, 50,6 % enumettede og 34,3 % flerumettede fettsyrer. Av de mettede fettsyrene utgjorde palmitinsyre 79%. Oljesyre utgjorde hoveddelen av de enumettede fettsyrene (80 %). Lakseoljen inneholdt 34,3 % flerumettede fettsyrer, men kun 8 % langkjedede omega-3 fettsyrer. Av de flerumettede fettsyrene utgjorde linolensyre (18:2n-6) hoveddelen (40 %), dvs. 14 % av de totale fettsyrene.

Produkt 10 (TG4020) inneholdt 5,5 % mettede, 15,6 % enumettede og 78 % flerumettede fettsyrer. Stearinsyre (18:0) utgjorde hoveddelen (75 %) av de mettede fettsyrene og oljesyre hoveddelen (55 %) av de enumettede. Oljeproduktet inneholdt 69,2 % langkjedede omega-3 fettsyrer hvorav 41,9 % EPA og 23,9 % DHA.

Produkt 6 (TG75) inneholdt 2,8 % mettede, 2,5 % enumettede og 94,8 % flerumettede fettsyrer. Tetrakosanoid syre (24:0) utgjorde hoveddelen (57,5 %) av de mettede fettsyrene. Oljeproduktet inneholdt 92,4 % langkjedede omega-3 fettsyrer hvorav 12,3 % EPA og 77 % DHA.

Tabell 2: Fettsyresammensetning (%) i produktene 6, 7, 8 og 10. Fettsyrer ikke påvist og de < 0,5 % er merket med - .

Produkt	Produkt 7	Produkt 8	Produkt 10	Produkt 6
Fettsyre	Fiskeolje	Lakseolje	TG4020	TG75
14:0	6,59	2,50	-	-
16:0	17,48	9,15	0,79	0,62
18:0	3,51	2,40	4,11	0,53
20:0	-	-	-	-
24:0	-	-	0,55	1,58
Sum mettede	27,58	11,55	5,45	2,73
16:1n-9	0,65	0,56	-	-
16:1n-7	8,43	3,15	-	-
18:1n-9	11,39	40,77	8,56	1,11
18:1n-7	3,34	3,42	2,80	-
20:1n-9	3,18	1,05	2,03	0,52
22:1n-11	1,05	1,64	2,20	0,81
Sum enumettede	28,04	50,60	15,58	2,45
16:2n-4	0,65	-	-	-
16:3n-4	1,27	-	-	-
18:2n-6	1,31	14,00	0,89	-
18:3n-3	1,04	5,47	0,70	-
18:4n-3	0,86	4,30	2,28	0,58
20:4n-6	1,08	-	2,53	0,76
20:4n-3	-	2,60	0,86	-
20:5n-3	19,53	3,13	41,91	12,27
22:4n-6	0,79	-	1,55	1,12
22:5n-3	2,22	1,35	3,41	3,05
22:6n-3	12,61	3,49	23,86	77,03
Sum flerumettede	41,36	34,33	78,00	94,82
Sum n-6	3,18	14,00	4,98	1,88
Sum n-3	36,26	16,85	73,02	92,93
n-6/n-3	0,09	0,83	0,07	0,02
Sum lc n-3	34,36	7,97	69,18	92,36
Sum fettsyrer	96,99	96,48	99,03	100,00

Fettsyresammensetning av fem lignende oljeprodukter fra tre forskjellige produsenter ble analysert. Resultatene i Tabell 3 viser fettsyresammensetning for fire TG3322 oljer (Produkt 2-5) og en TG3426 olje (Produkt 9). Totalt ble mellom 99,2 % og 100 % av alle fettsyrer i de fem produktene identifisert.

Tabell 3: Fettsyresammensetning (%) i produktene 2-5 og 9. Mettede og enumettede fettsyrer er kun vist summert. Fettsyrer < 0,5 % eller ikke påvist er merket – .

Produkt	Produkt 2 TG3322	Produkt 3 TG3322	Produkt 4 TG3322	Produkt 5 TG3322	Produkt 9 TG3426
Fettsyre					
Sum mettede	8,43	8,60	7,41	6,92	6,63
Sum enumettede	18,22	17,95	19,66	17,19	18,36
18:2n-6	1,05	1,05	1,37	1,15	0,97
18:3n-3	0,65	0,62	0,88	0,64	0,68
18:4n-3	1,00	1,94	2,30	2,13	1,98
20:4n-6	1,99	2,06	2,17	2,35	2,16
20:4n-3	-	0,59	1,20	1,01	1,16
20:5n-3	36,67	35,72	35,05	37,37	35,57
22:4n-6	1,76	1,71	1,48	1,46	1,56
22:5n-3	4,63	4,41	4,30	4,40	4,19
22:6n-3	25,61	24,88	23,43	24,68	26,33
Sum flerumettede	73,34	72,98	72,18	75,18	74,60
Sum n-6	4,79	4,82	5,02	4,95	4,69
Sum n-3	68,55	68,15	67,16	70,23	69,91
n-6/n-3	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Sum lc n-3	66,90	65,00	62,78	66,46	66,09
Sum fettsyrer	100,00	99,52	99,25	99,29	99,60

Produkt 2 (TG3322) fra Produsent A inneholdt 8,4 % mettede, 18,2 % enumettede og 73,3 % flerumettede fettsyrer. Totalt inneholdt oljen 66,9 % langkjedede omega-3 fettsyrer hvorav 36,7 % EPA og 25,6 % DHA. Produkt 3 (TG3322) som også var fra Produsent A, inneholdt 8,6 % mettede, 18 % enumettede og 73 % flerumettede fettsyrer. Oljen inneholdt totalt 65 % langkjedede omega-3 fettsyrer hvorav 35,7 % EPA og 24,9 % DHA.

Produkt 4 (TG3322) fra Produsent B inneholdt 7,4 % mettede, 19,7 % flerumettede og 72,2 % flerumettede fettsyrer. Totalt inneholdt oljen 62,8 % langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer hvorav 35 % EPA og 23,4 % DHA. Produkt 5 (TG3322) også fra Produsent B,

inneholdt 6,9 % mettede, 17,2 % enumettede og 75,2 % flerumettede fettsyrer. Langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer utgjorde 66,5 % hvorav 37,4 % EPA og 24,7 % DHA.

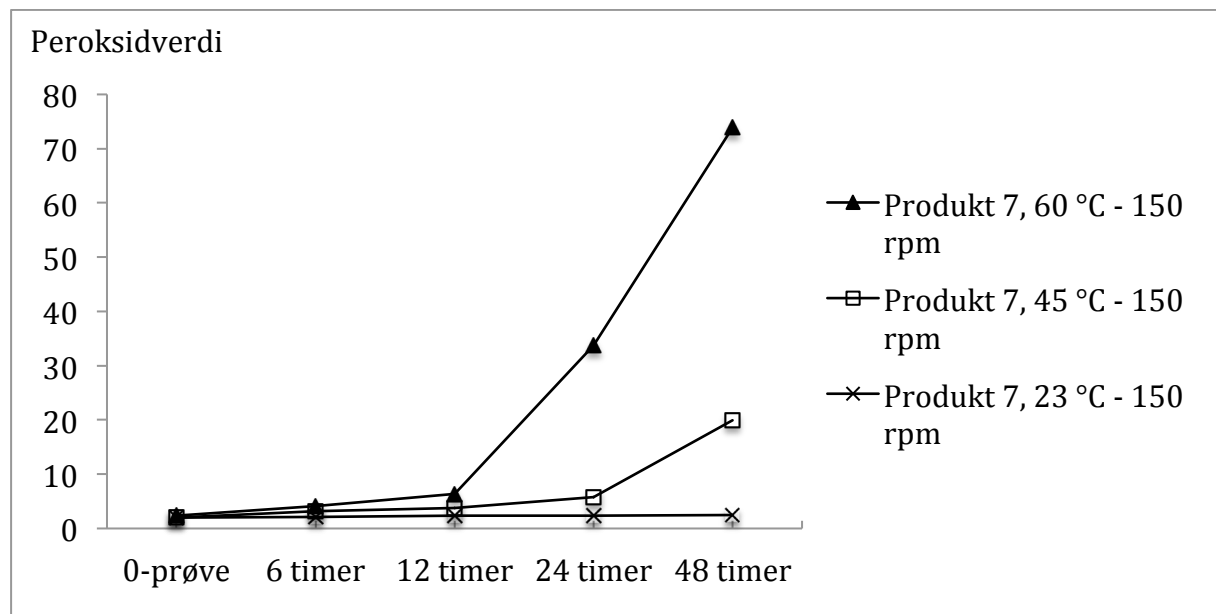
Produkt 9 (TG3426) fra Produsent E inneholdt 6,6 % mettede, 18,4 % enumettede og 74,6 % flerumettede fettsyrer. Totalt inneholdt oljen 66,1 % langkjedede omega-3 fettsyrer, hvorav 35,6 % EPA og 26,3 % DHA.

4.2. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon

For å undersøke oksidativ stabilitet av de forskjellige oljeproduktene ble prøver inkubert ved romtemperatur (23 °C), 45 og 60 °C med risting (150 rpm). Prøveuttak ble gjort etter 6, 12, 24 og 48 timer. Noen ganger ble stabiliteten også undersøkt ved 4 °C, eventuelt også uten risting.

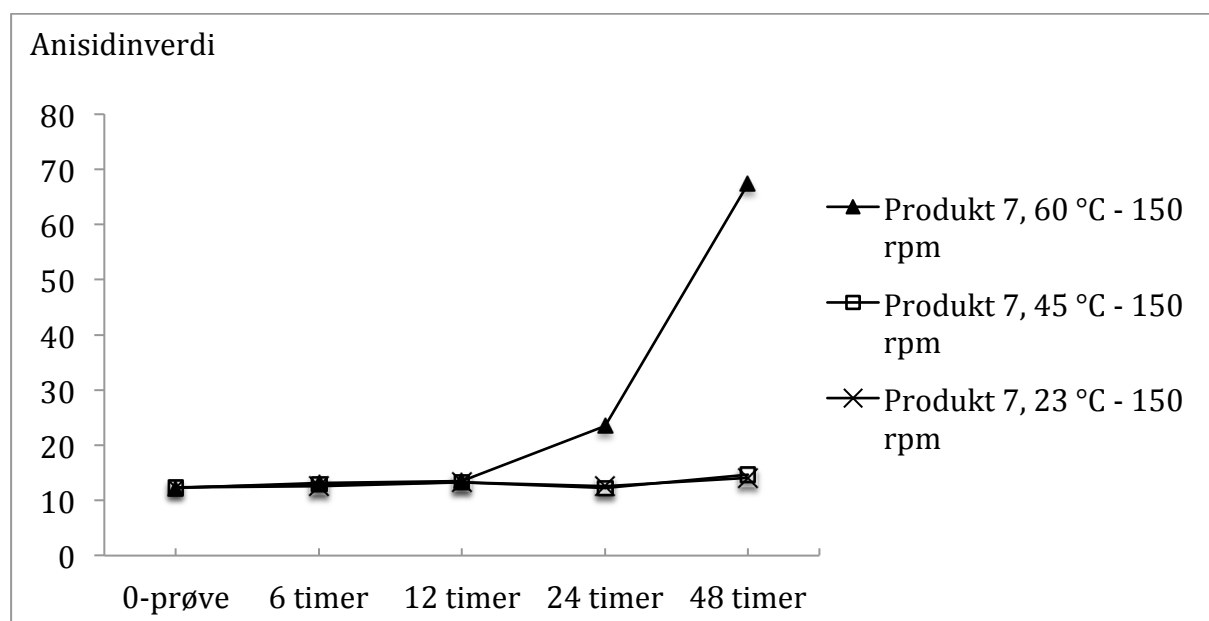
4.2.1. Oksidativ stabilitet av naturlige fiskeoljer

Av de ti forskjellige oljeproduktene var to av produktene naturlige fiskeoljer, dvs. uten oppkonsentrerte mengder EPA og DHA. En TG1812 olje (18 % EPA og 12 % DHA) laget fra råolje av Søramerikanske fiskesorter. Den andre en fiskeolje laget av norsk oppdrettslaks. Figur 10 og 11 viser peroksid- og anisidinverdier av Produkt 7 (TG1812, fiskeolje).



Figur 10: Peroxidverdi av Produkt 7, fiskeolje (TG1812) fra Produsent C inkubert ved 23, 45 og 60 °C, 150 rpm.

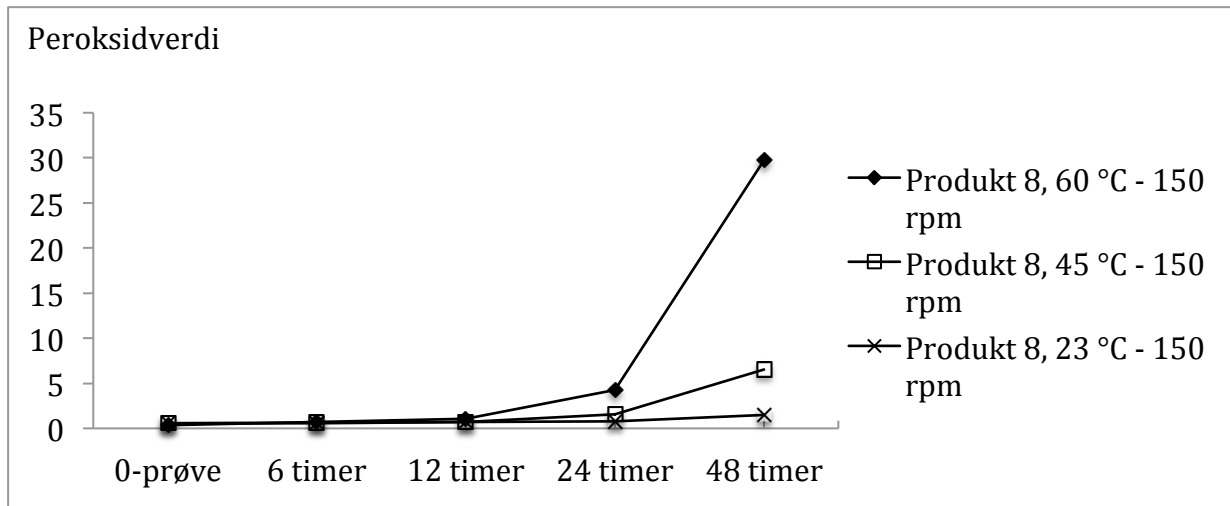
Produkt 7 hadde et utgangspunkt (referanseverdi) på peroksidverdi (PV) 2 meq kg⁻¹. Etter endt inkubasjonstid ved 23 °C hadde PV økt til 2,5 meq kg⁻¹. Ved 45 °C grader økte PV ti ganger til 20 meq kg⁻¹, mesteparten av økningen skjedde etter 24 timer. Størst utslag var ved 60 °C der PV i oljen økte fra 6,3 meq kg⁻¹ etter 12 timer til 73,8 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp.



Figur 11: Anisidinverdi av Produkt 7, fiskeolje (TG1812) fra Produsent C inkubert ved 23, 45 og 60 °C, ved 150 rpm.

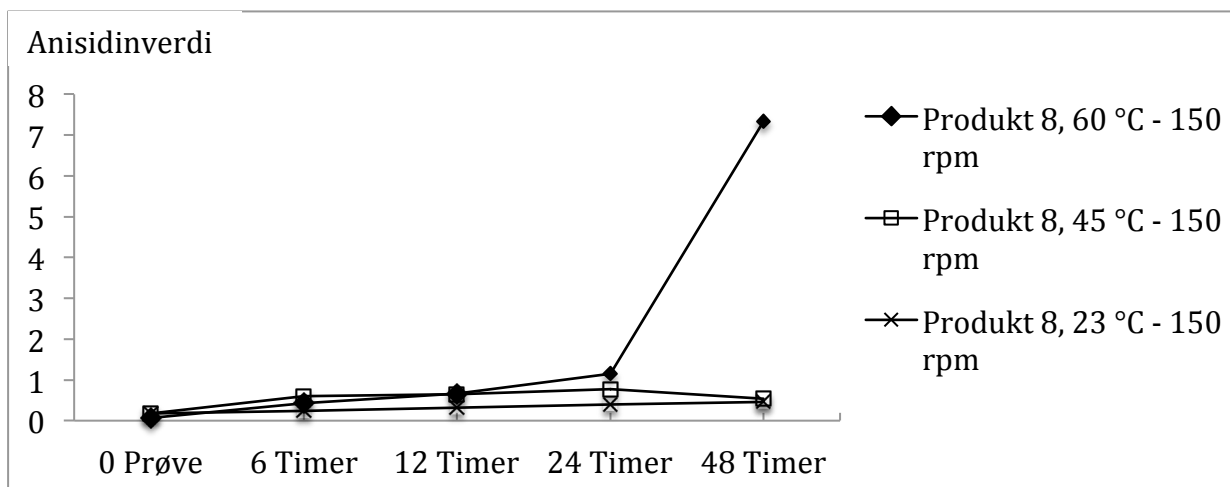
Fiskeoljen fra Produsent C hadde referanse anisidinverdi (AV) på 12,3. Etter endt inkubasjon ved både 23 og 45 °C endte AV på 14,1. Størst økning i AV var ved 60 °C, hvor AV økte mest etter 24 timer. AV økte fra 13,5 etter 12 timer til 23,4 etter 24 timer. Oljen endte på AV lik 67,4 etter 48 timers inkubasjon.

Produkt 8 (lakseolje) ble også undersøkt med hensyn på oksidasjonsutvikling ved 23, 45 og 60 °C i to døgn. Oljen hadde referanse PV på 0,5 meq kg⁻¹ (Figur 12) som etter 48 timers inkubasjon ved 23 °C økte til 1,5 meq kg⁻¹. Ved 45 °C grader økte PV mest etter 24 timer fra 1,6 meq kg⁻¹ til 6,6 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp. Størst utslag i PV var ved 60 °C grader der oljen endte med PV 29,7 meq kg⁻¹ etter 48 timers inkubasjon.



Figur 12: Peroxidverdi av Produkt 8 (lakseolje) fra Produsent D inkubert ved 23, 45 og 60 °C og 150 rpm.

Produkt 8 hadde referanse AV på 0,2 (Figur 13). Ved 23 og 45 °C økte AV lite og etter endt inkubasjon hadde oljen AV lik 0,5. Lakseoljen endte på AV 7,3 etter 48 timers inkubasjonsforløp ved 60 °C grader.



Figur 13: Anisidinverdi av Produkt 8 (lakseolje) fra Produsent D inkubert ved 23, 45 og 60 °C og 150 rpm.

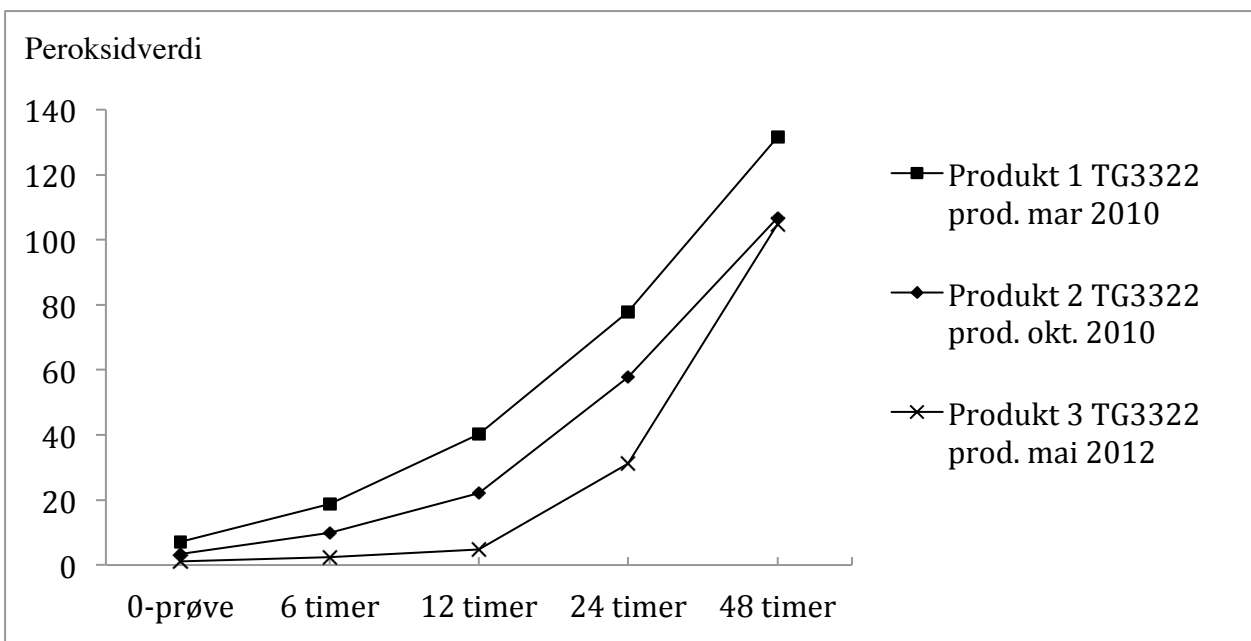
4.2.2. Oksidativ stabilitet av oppkonsentrerte oljeprodukter

Totalt var 8 av 10 oljeprodukter oppkonsentrert på EPA og DHA. Denne delen av oppgaven tar for seg oksidativ stabilitet av disse oljeproduktene. Oljene var fra tre forskjellige produsenter og av enkelte oljeprodukter ble flere produksjoner undersøkt.

TG3322 oljeprodukter

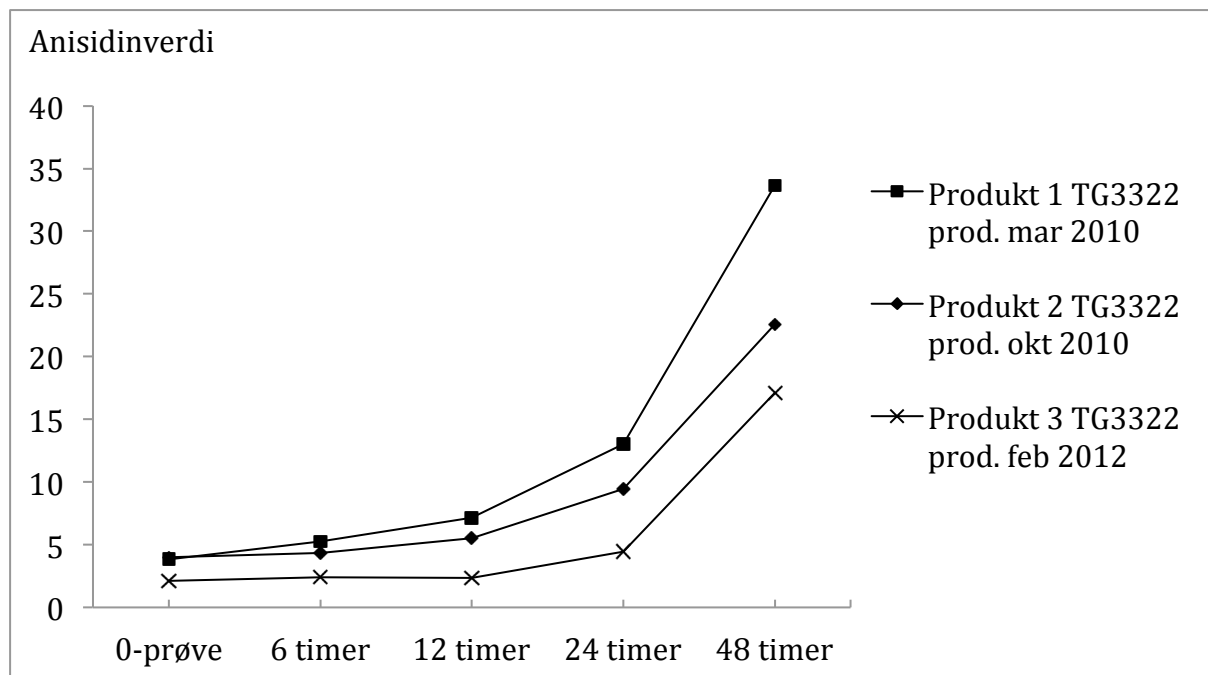
TG3322 oljeprodukter inneholder i følge deklarasjonen minimum 33 % EPA og 22 % DHA i form av triacylglyserider i henhold til oljens totale fettsyreinnhold. Ett TG3426 og fem TG3322 oljeprodukter fra tre forskjellige produsenter ble undersøkt.

Tre TG3322 produksjoner (Produktene 1, 2 og 3) fra Produsent A ble undersøkt. Figur 14 og 15 viser PV og AV resultater for de 3 produksjonene. Oljene ble utsatt for samme inkubasjonsbetingelser (45 °C og 150 rpm). To av produktene var produsert i 2010, et i 2012.



Figur 14: Peroxidverdi av tre TG3322 oljeproduksjoner (Produkt 1-3) fra Produsent A. Inkubert ved 45 °C, 150 rpm. Oljene er listet etter produksjonsdato, fra eldst til nyest.

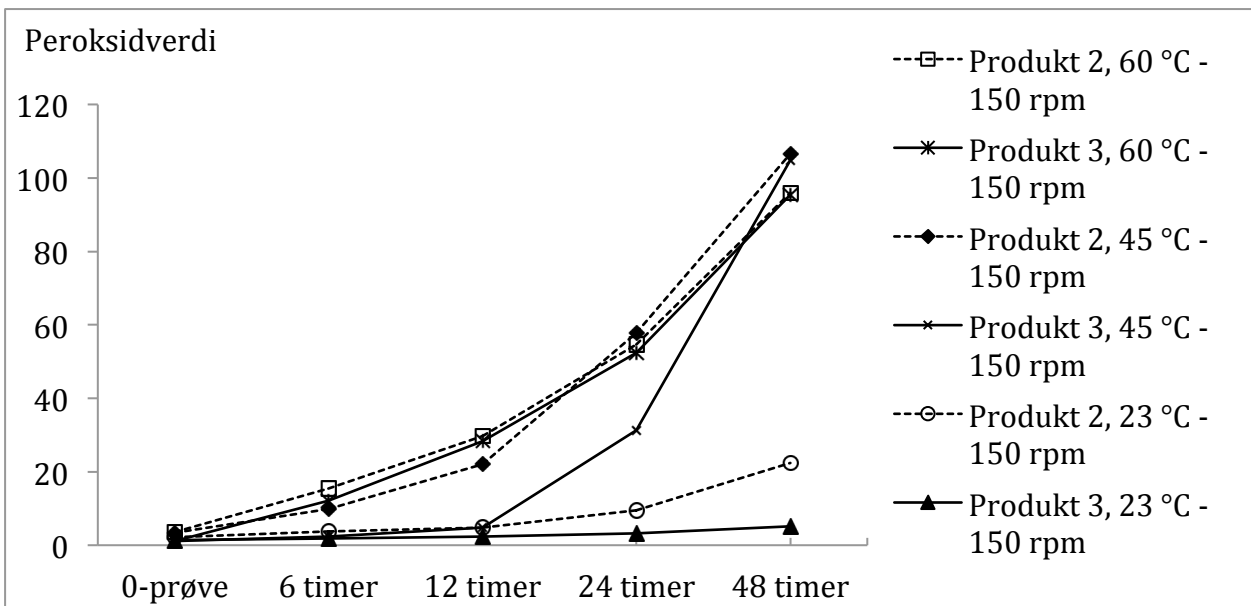
Produkt 1 hadde referanse PV på 7 meq kg⁻¹ som etter 48 timers inkubasjon økte til 131,4 meq kg⁻¹. Produkt 2 og 3 hadde etter endt inkubasjonsforløp PV lik 105 og 107 meq kg⁻¹, med referanseverdier i utgangspunktet på 3,4 og 1,1 meq kg⁻¹. Etter 12 timers inkubasjon var det størst forskjell i de tre produktene, der Produkt 3 hadde den laveste peroksidverdien på 4,7 meq kg⁻¹ mot 40,1 og 22,1 meq kg⁻¹ i Produkt 1 og 2.



Figur 15: Anisidinverdi av tre TG3322 oljeproduksjoner (Produkt 1-3) fra Produsent A. Inkubert ved 45 °C, 150 rpm. Oljene er listet etter produksjonsdato, fra eldst til nyest.

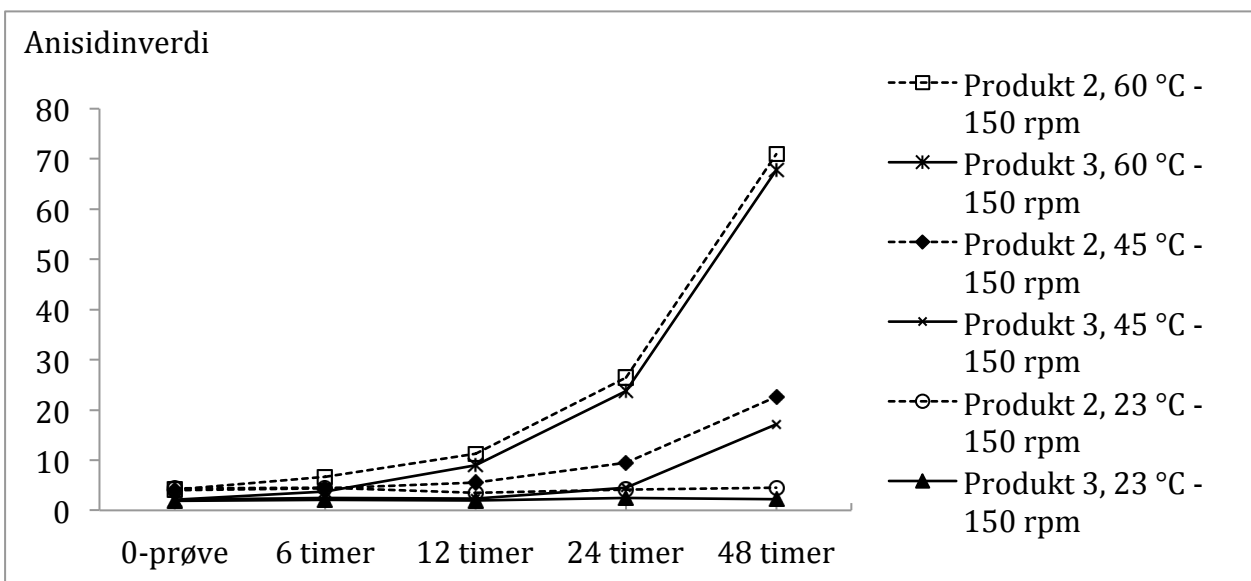
Produkt 1 og 2 hadde referanse AV 4 som etter endt inkubasjonsforløp var økt til henholdsvis 33,6 og 22,6. Produkt 3 økte etter 48 timers inkubasjon fra referanseverdi på 2,1 til AV 17,1. Størst forskjell i oljeproduksjonene var etter 48 timer der Produkt 3 hadde AV på 17,1 mot 33,6 og 22,6 i Produkt 1 og 2.

Stabiliteten til Produkt 2 og 3 ble også undersøkt med temperatur som variabel. Figur 16 viser utvikling av peroksider i løpet av 48 timer. Peroksidverdiene til oljene fulgte hverandre ved 60 °C grader, fra referanseverdi på 3,4 meq kg⁻¹ (Produkt 2) og 1,1 meq kg⁻¹ (Produkt 3) til 95 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp. Ved 23 °C grader var det størst forskjell i oljene etter 48 timer, hvor Produkt 3 hadde PV på 5,1 meq kg⁻¹ mot 22,4 meq kg⁻¹ i Produkt 2. Den største differansen i utvikling av peroksider var ved 45 °C grader. Etter 12 timer hadde Produkt 3 PV på 4,7 meq kg⁻¹ og Produkt 2 en PV lik 22,1 meq kg⁻¹. Størst forskjell var det etter 24 timer inkubasjon, der Produkt 2 hadde PV lik 57,8 meq kg⁻¹ mot 31,2 meq kg⁻¹ i Produkt 3. Etter 48 timer hadde begge produktene en omtrentlig lik PV på cirka 100 meq kg⁻¹ både ved 45 og 60 °C inkubasjon.



Figur 16: Peroksidverdi av to oljeproduksjoner TG3322 (Produkt 2 og 3) fra Produsent A, produsert oktober 2010 og februar 2012. Inkubert ved 23, 45 og 60 °C, 150 rpm. Stiplet linje er den eldste oljen.

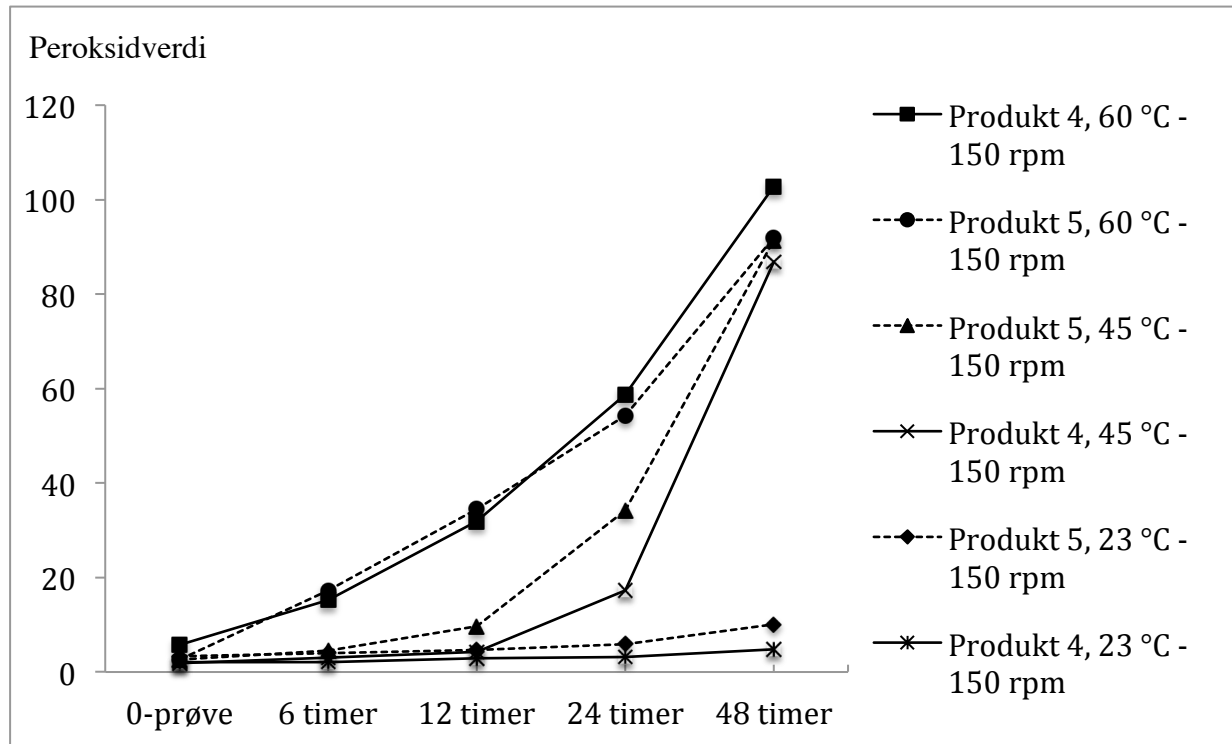
Anisidinverdiene i oljeproduksjonene holdt seg konstant ved 23 °C grader. Produkt 2 og 3 hadde referanse AV på 4,4 og 1,9 som etter endt inkubasjonsforløp endte på 4,5 og 2,2. Ved 45 °C grader økte AV mest fra 24 til 48 timer, hvor det også var størst forskjell mellom oljeproduksjonene. Produkt 2 økte fra referanse AV til 22,6 etter 48 timer, mot AV 17,1 i Produkt 3. Ved 60 °C grader fulgte utviklingen i AV hverandre og Produkt 2 endte på 70,9 mot 67,8 for Produkt 3.



Figur 17: Anisidinverdi av to oljeproduksjoner TG3322 (Produkt 2 og 3) fra Produsent A, produsert oktober 2010 og februar 2012. Inkubert ved 23, 45 og 60 °C, 150 rpm. Stiplet linje er den eldste oljen.

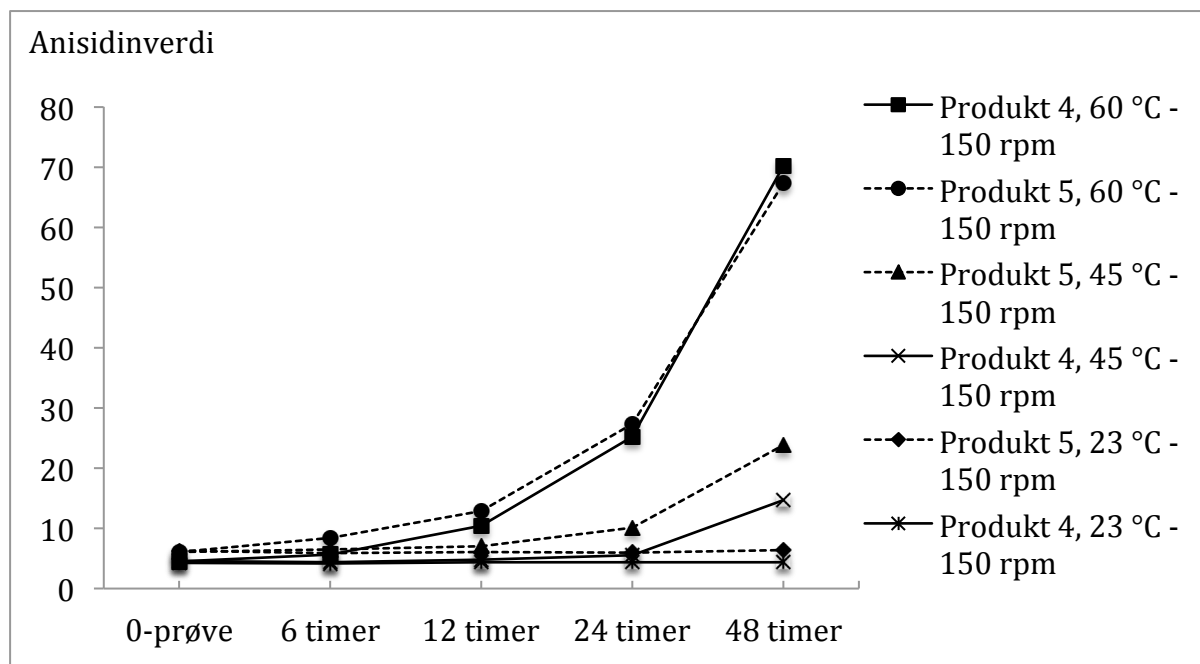
Oksidativ stabilitet av TG3322 oljer fra Produsent B

Stabiliteten av to produksjoner (Produkt 4 og 5) TG3322 olje fra Produsent B ble undersøkt. Produkt 4 var produsert i januar 2012 mens Produkt 5 var produsert juli 2011. PV og AV resultater er vist i Figur 18 og 19 der inkubasjonsbetingelser var 150 rpm risting ved 23, 45 og 60 °C grader i 48 timer.



Figur 18: Peroxidverdi av to oljeproduksjoner TG3322 (Produkt 4 og 5) fra Produsent B produsert 2012 og 2011. Inkubert ved 23, 45 og 60 °C, 150 rpm. Den ferskeste oljen er merket med hel linje.

Ved 23 °C grader viste oljeproduktene fra Produsent B liten økning i PV etter endt inkubasjonsforløp. Produkt 5 økte mest av de to produksjonene, fra referanseverdi på 2,1 meq kg⁻¹ til 4,8 meq kg⁻¹. Ved 45 °C grader var det størst forskjell i produktene etter 24 timer, der Produkt 5 hadde PV på 34,2 meq kg⁻¹ mot 19 meq kg⁻¹ i Produkt 4. Etter 48 timer var PV for produktene inkubert ved 45 °C cirka like høye som produktene inkubert ved 60 °C grader. Ved 60 °C grader fulgte kurvene hverandre frem til 24 timer, hvor de skilte seg og Produkt 5 endte etter 48 timer på 102,7 meq kg⁻¹ mot 91,3 for Produkt 4.

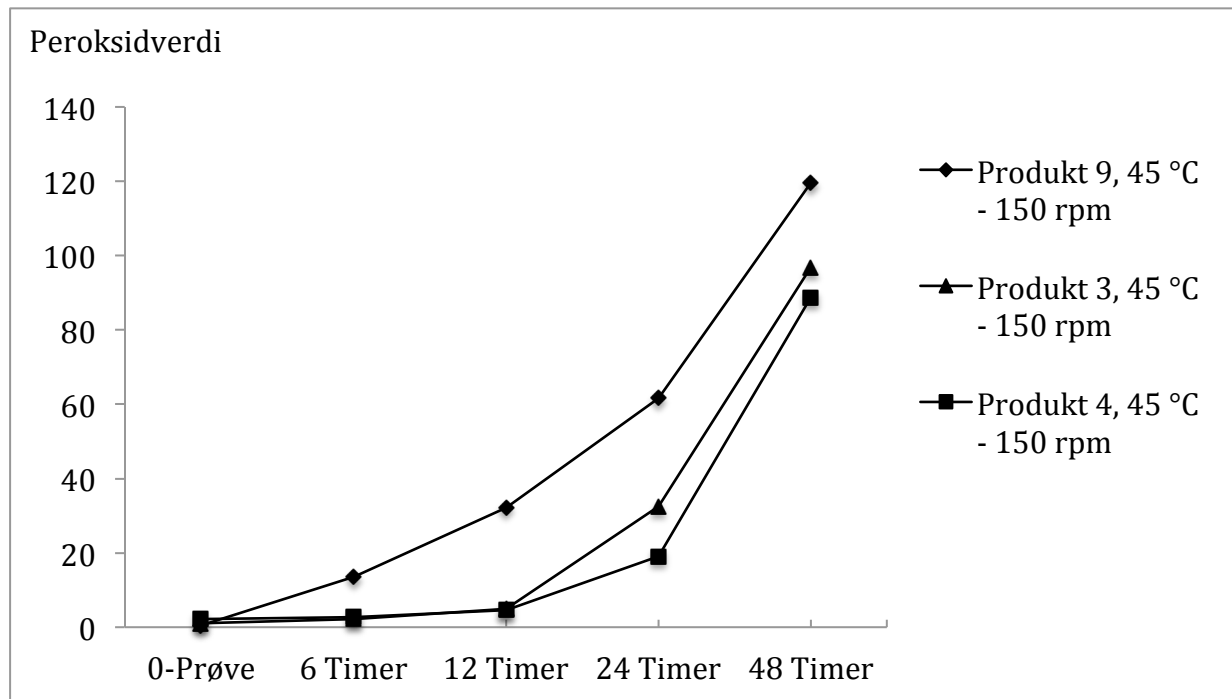


Figur 19: Anisidinverdi av to oljeproduksjoner TG3322 (Produkt 4 og 5) fra Produsent B produsert 2012 og 2011. Inkubert ved 23, 45 og 60 °C, 150 rpm. Den ferskeste oljen er merket med hel linje.

Produkt 4 og 5 hadde referanse AV på 4,2 og 6,3 som etter 48 timers inkubasjon ved 23 °C endte på AV lik 4,4 og 6,4. Ved 45 °C grader økte AV mest etter 24 timer. Produkt 5 hadde da AV på 10,1 som økte til 23,8 etter endt inkubasjonsforløp, Produkt 4 økte fra henholdsvis 4,4 til 14,7. Ved 60 °C grader ligger kurvene tett opp mot hverandre, og viste ingen forskjell i de to produktene som endte cirka med AV 70.

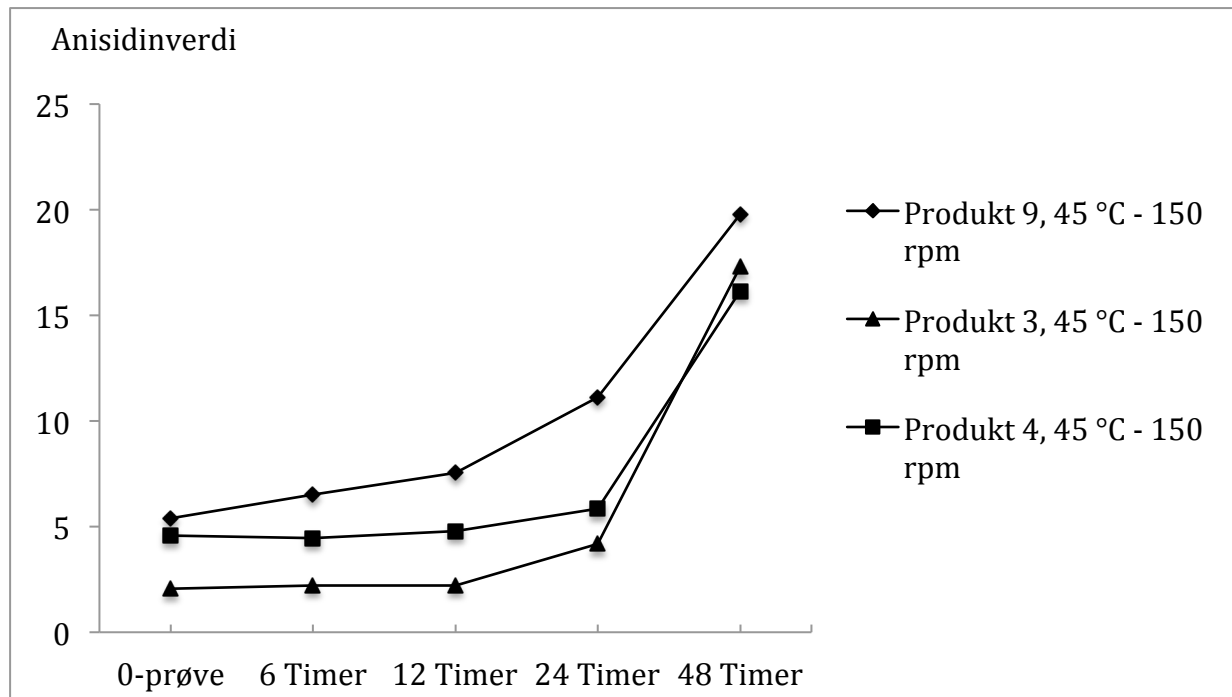
Oksidativ stabilitet av tre lignende oljeprodukter fra Produsent A, B og E

Sammenligning av to TG3322 oljer (Produkt 3, 4) og en TG3426 olje (Produkt 9). Oljene ble inkubert i 48 timer ved 45 °C og 150 rpm. Oljene var produsert i 2012. Stabilitetsanalysene ble utført på forskjellige tidspunkt.



Figur 20: Peroxidverdi av Produkt 3, 4 og 9 fra Produsent A, B og E. Inkubert ved 45 °C, 150 rpm i 48 timer.

Produkt 9 fra Produsent E hadde referanse PV på 0,4 meq kg⁻¹ som etter 12 timer økte til 32,2 meq kg⁻¹ (Figur 20). Produkt 3 og 4 hadde referanse PV på 1,1 og 2,1 meq kg⁻¹ som etter 12 timer hadde økt til henholdsvis 4,9 og 4,6 meq kg⁻¹. Etter 24 timer hadde Produkt 3 og 4 PV på 32,6 og 19,2 meq kg⁻¹ som etter endt inkubasjonsforløp økte til 96,7 og 88,6 meq kg⁻¹, mot en økning fra 61,6 til 119,6 meq kg⁻¹ i Produkt 9.

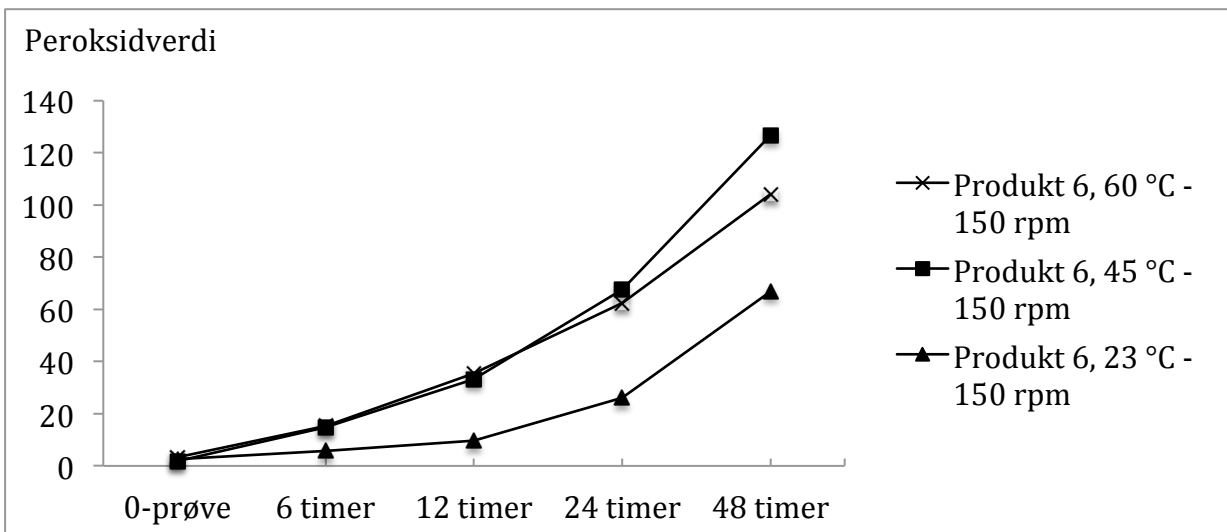


Figur 21: Anisidinverdi av Produkt 3, 4 og 9 fra Produsent A, B og E. Inkubert ved 45 °C, 150 rpm i 48 timer.

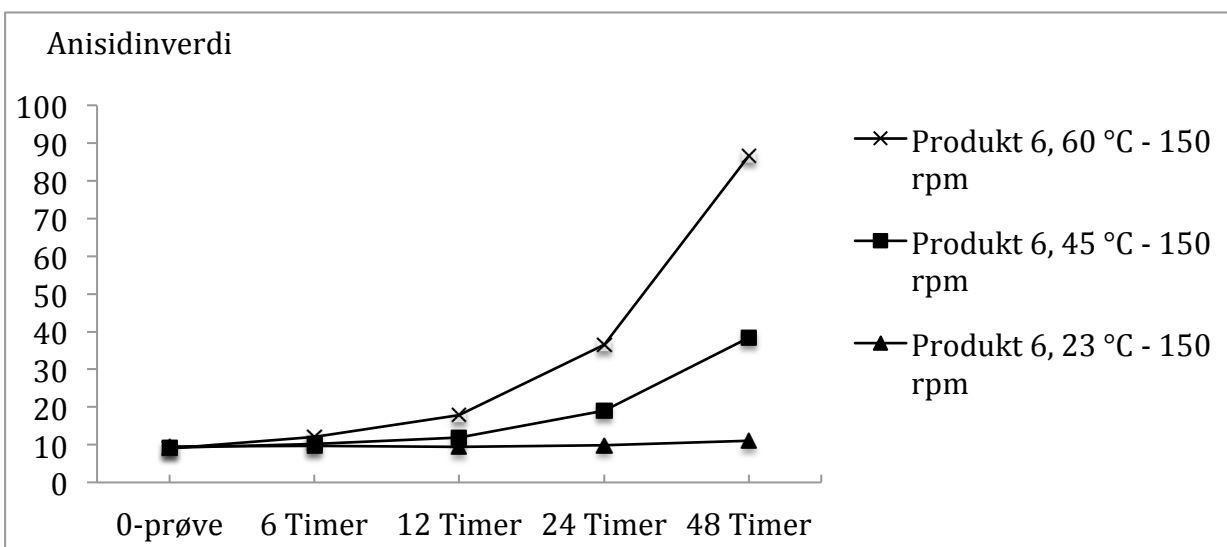
Produkt 4 hadde referanse AV 2,1 som etter 24 timer økte til 4,2 (Figur 21). Referanse AV til Produkt 3 var 4,6 som etter 24 timer økte til 5,9. Referansen til Produkt 9 var 5,4 og denne steg til 11,1 etter 24 timer, omtrent dobbelt så høyt som i Produkt 3 og 4. Etter 48 timer inkubasjonsforløp hadde produktene 3, 4 og 9 nesten lik AV på henholdsvis 17,3, 16,2 og 19,8.

4.2.3. Oksidativ stabilitet av høykonsentrerte oljeprodukter

Produkt 6 fra Produsent B er et høykonsentrert DHA produkt (75 % DHA). Peroksidannelsen ved ulike temperaturer er vist i Figur 22. I utgangspunktet hadde produktet en PV på 2,6 meq kg⁻¹, som ved 23 °C økte til 9,7 og 26 meq kg⁻¹ etter henholdsvis 12 og 24 timer. Etter 48 timer var PV lik 66,9 meq kg⁻¹. Ved 45 og 60 °C var PV-nivå etter 12 timer på henholdsvis 33,3 og 35,5 meq kg⁻¹ og etter 24 timer 67,6 og 62,3 meq kg⁻¹. Etter endt inkubasjonsforløp var PV lik 126,7 og 104,1 meq kg⁻¹ ved 45 og 60 °C.



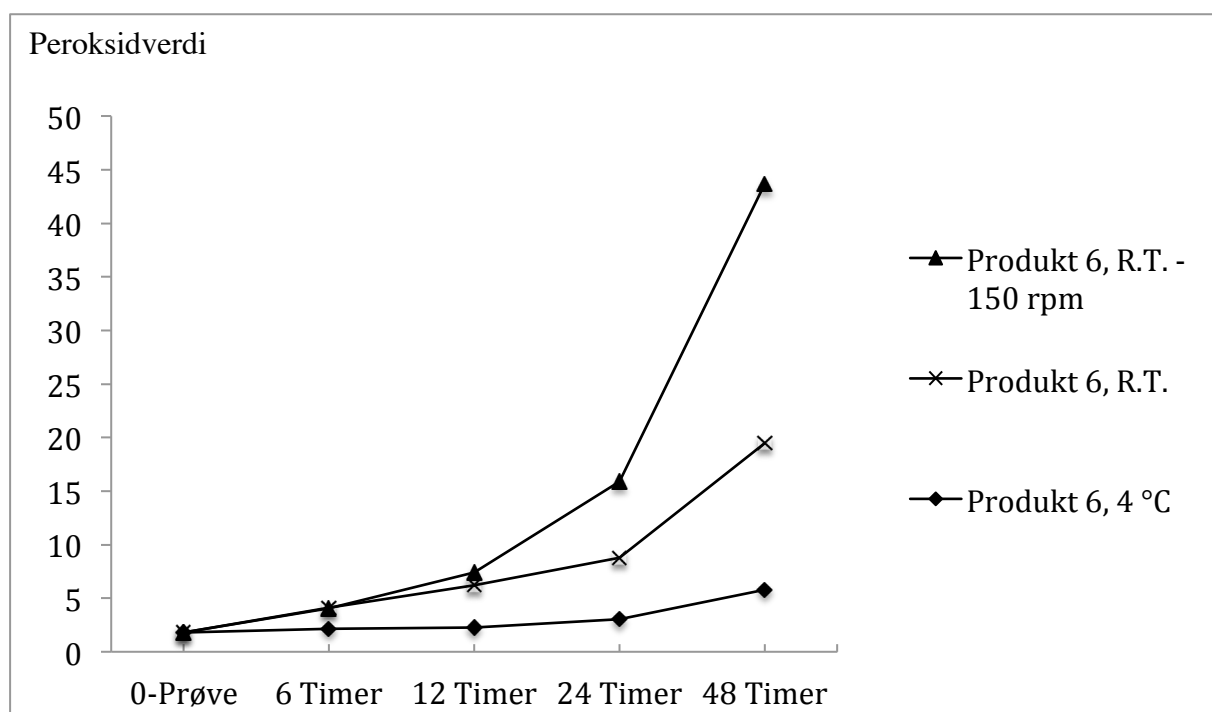
Figur 22: Peroksidverdi av Produkt 6 (TG75) fra Produsent B inkubert ved 23, 45 og 60 °C, ved 150 rpm.



Figur 23: Anisidinverdi av Produkt 6 (TG75) fra Produsent B inkubert ved 23, 45 og 60 °C, ved 150 rpm.

Produkt 6 hadde referanse AV på 9,5 som etter 48 timer ved 23 °C økte til 11,1 (Figur 23). Etter 12 timer ved 45 °C var AV blitt 12 og ved endt inkubasjon var den 38,5. Oljen fikk høyest AV ved 60 °C hvor den økte til 17,9 og 36,5 etter 12 og 24 timer. Etter 48 timers inkubasjon hadde oljen en AV lik 89,7.

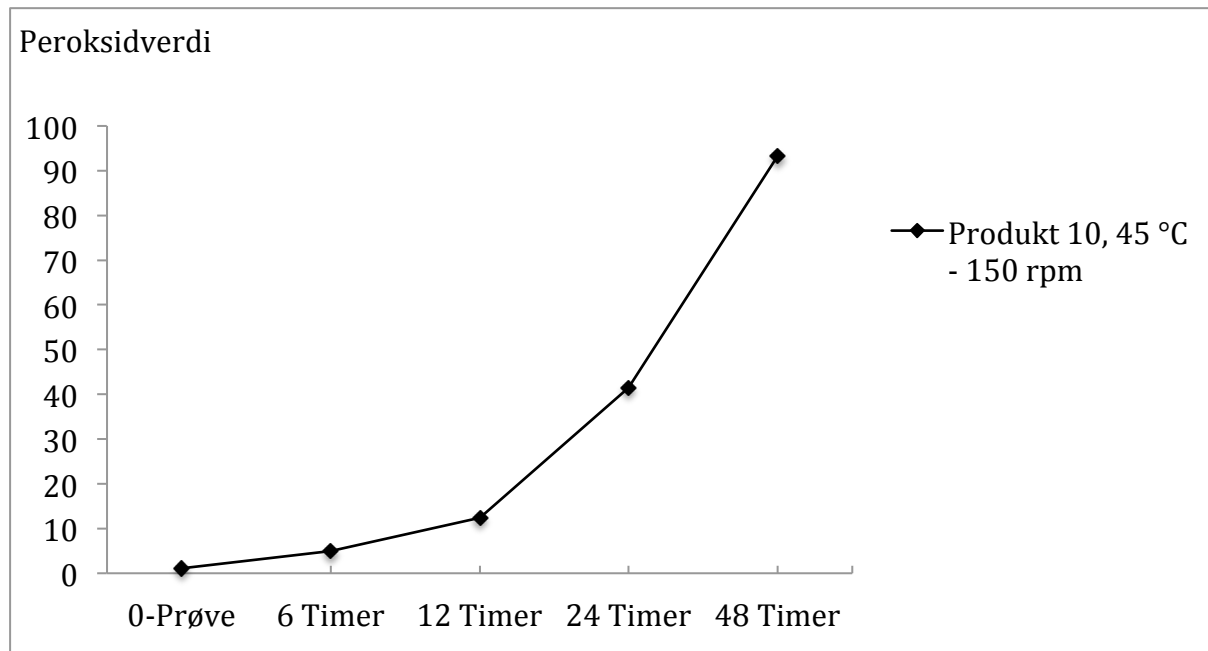
Med bakgrunn i resultatene fra figur 22 og 23 ble oksidativ stabilitet av den høykonsentrerte oljen undersøkt ved lavere temperaturer. Produkt 6 ble inkubert 48 timer i kjøleskap og ved romtemperatur (med og uten risting ved 150 rpm). Resultater er vist i Figur 24, kun peroksidverdier ble analysert.



Figur 24: Peroxidverdi av Produkt 6 (TG75) fra produsent B, inkubert ved 4 °C (kjøleskap) og i romtemperatur (R.T. Cirka 23 °C) med og uten risting ved 150 rpm.

Lagring i kjøleskap ga lite økning i peroksidverdi, fra referanseverdi på 1,8 meq kg⁻¹ til 5,8 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjon. Ved lagring i romtemperatur (uten risting) økte PV raskest etter 24 timer, der oljen gikk fra 8,8 meq kg⁻¹ til 19,5 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp. Romtemperatur med risting på 150 rpm ga størst utslag i PV og oljen hadde 43,7 meq kg⁻¹ etter 48 timers inkubasjon.

Produkt 10 (TG4020) fra Produsent E er en høykonsentrert fiskeolje med 40 % EPA og 20 % DHA. Oksidativ stabilitet av oljen ble undersøkt ved 45 °C og 150 rpm inkubert i to døgn. Oljen hadde referanse PV lik 1,1 meq kg⁻¹ (Figur 25). Etter 12 timer inkubasjon hadde PV i oljen økt til 12,4 meq kg⁻¹. Oljen ender etter inkubasjonsforløpet med PV lik 93,2 meq kg⁻¹.



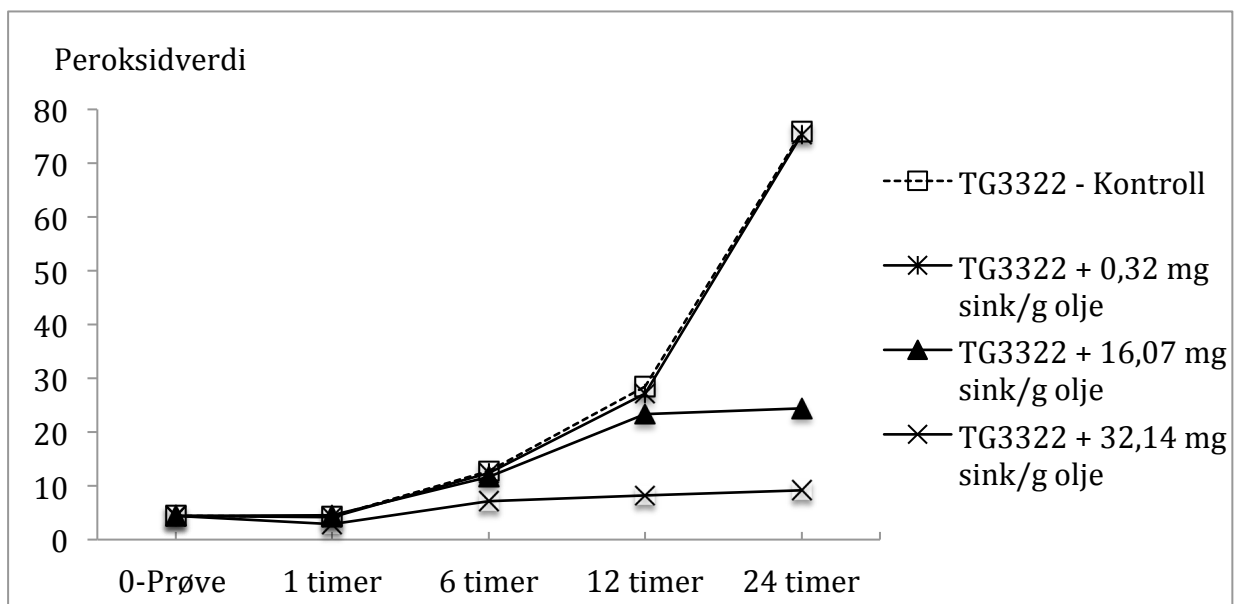
Figur 25: Peroxidverdi av Produkt 10 (TG4020) fra Produsent E inkubert ved 45 °C ved 150 rpm.

4.3. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjon

Sink og jern ble i alle forsøkene tilsatt olje fra Produsent A (Produkt 2, TG3322) og inkubert ved oksidativt akselererende betingelser. I forsøk med sink ble hovedsakelig PV analysert, mens både PV og AV ble analysert i forsøket med jern.

4.3.1. Effekt av sink

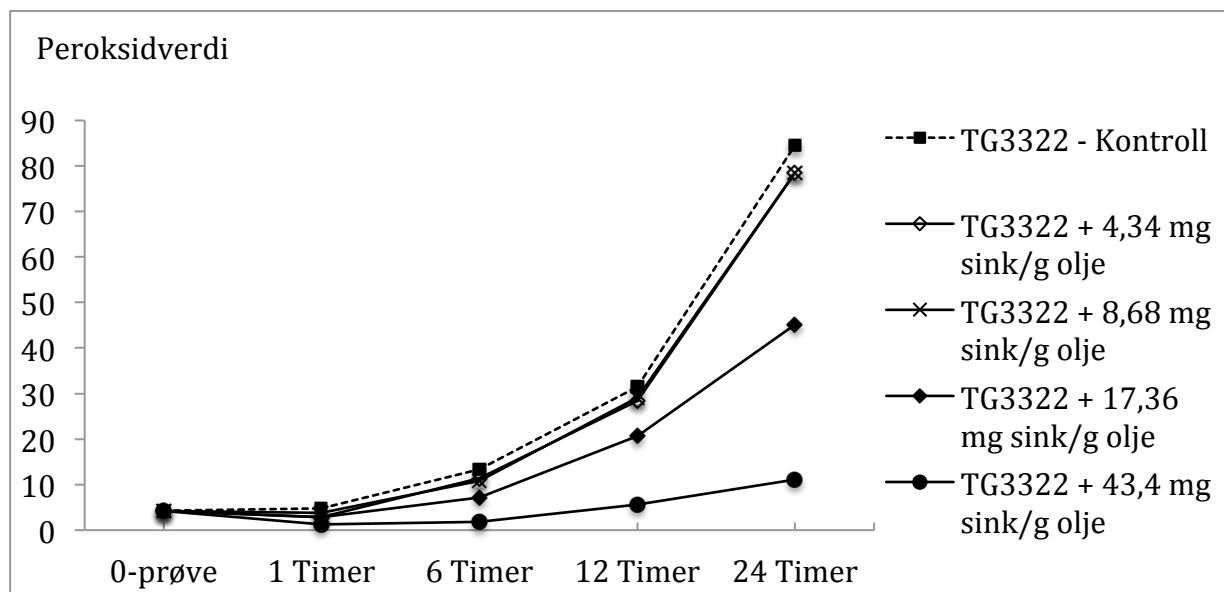
Effekt av sink tilsatt olje med hensyn til oksidasjon ble undersøkt. Olje ble tilsatt sink og inkubert i 24 timer ved 45 °C og 150 rpm risting. Figur 26 viser peroksidverdier av Produkt 2 tilsatt sinkoksid i tre konsentrasjoner; 0,32, 16,07 og 32,14 mg Zn²⁺/g olje.



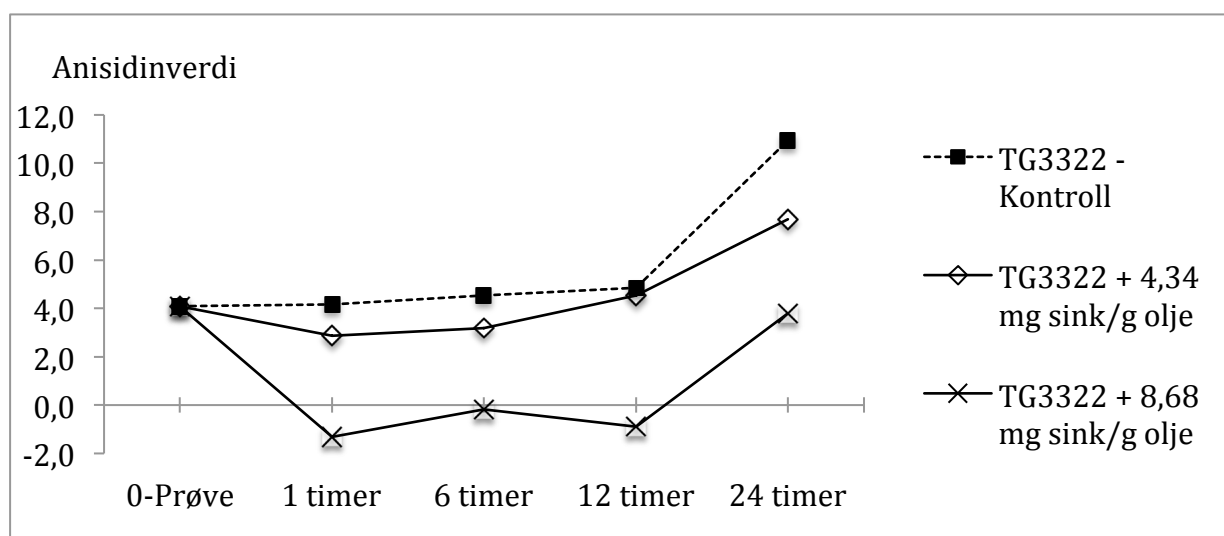
Figur 26: Peroxidverdi av TG3322 fra Produsent A tilsatt sink i tre forskjellige konsentrasjoner (0,32, 16,07 og 32,14 mg sink/g olje) inkubert ved 45 °C, 150 rpm.

Resultatene viste at kontrollen og oljen med lavest mengde sink (0,32 mg Zn²⁺/g olje) fulgte hverandre og endte med en PV lik 75 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp. Oljen hadde referanse PV lik 4,4 og der sink var tilsatt til 16,07 mg Zn²⁺/g olje endte PV på 24,4 meq kg⁻¹ etter 24 timers inkubasjonsforløp. I oljen med høyest sinkinnhold (32,14 mg Zn²⁺/g olje) økte PV til 9,2 meq kg⁻¹ etter 24 timers inkubasjon.

Figur 27 viser peroksidverdi av olje tilsatt sinkkoksidd tilsvarende 4,34, 8,68, 17,36 og 43,4 mg Zn²⁺/gram olje etter inkubasjon ved 45 °C og 150 rpm i 24 timer. De to laveste konsentrasjonene med sink (4,34 og 8,68 mg Zn²⁺/g olje) endte like under kontrollen (84 meq kg⁻¹) på 78 meq kg⁻¹ etter 24 timer. I prøvene med høyest innhold sink (17,36 og 43,4 mg Zn²⁺/g olje) økte PV fra 4,3 i referanseverdi til henholdsvis 45,1 meq kg⁻¹ og 11,2 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp.



Figur 27: Peroxidverdi av TG3322 fra Produsent A tilsatt sink i fire forskjellige konsentrasjoner; 4,34, 8,68, 17,36 og 43,4 mg zink/gram olje inkubert ved 45 °C, 150 rpm.

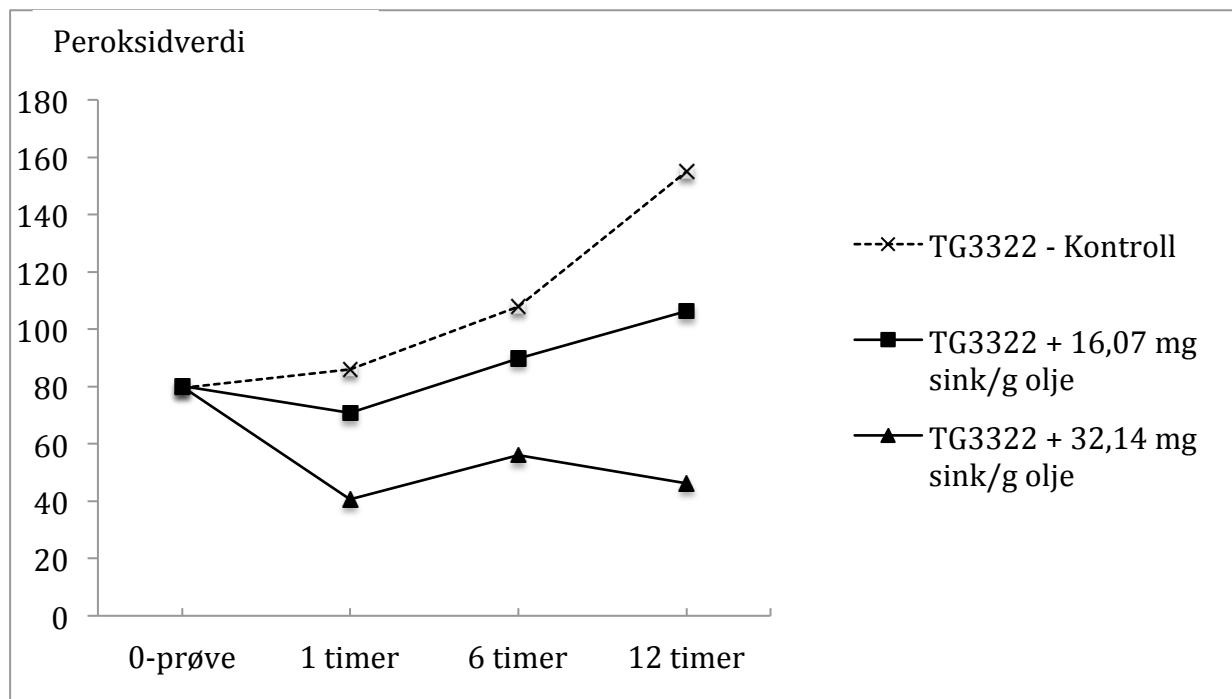


Figur 28: Anisidinverdi av TG3322 fra Produsent A tilsatt sink i to forskjellige konsentrasjoner; 4,34 og 8,68 mg zink/gram olje inkubert ved 45 °C, 150 rpm.

Oljen hadde i utgangspunktet 4,1 i referanse AV (Figur 28). Kontrollen økte til 4,2 etter 1 time og endte etter 24 timers inkubasjon på AV lik 11. I prøvene med sink (4,34 og 8,68 mg Zn²⁺/g olje) endret AV seg til henholdsvis 2,9 og -1,3 etter 1 time inkubasjon. Etter 24 timer hadde AV i oljene økt til 7,7 og 3,8.

Effekt av sink på PV-analysen

For å undersøke hvordan sink påvirket PV-analysen ble TG3322 olje (Produkt 2) fra Produsent A inkubert ved 45 °C i 24 timer (luftet etter 6 og 12 timer), og målt for peroksidverdier (0-prøve). Deretter ble sink tilsatt (16,07 og 32,14 mg Zn²⁺/g olje) og inkubert i 12 timer ved samme betingelser. Figur 29 viser peroksidverdiene målt i forsøket.

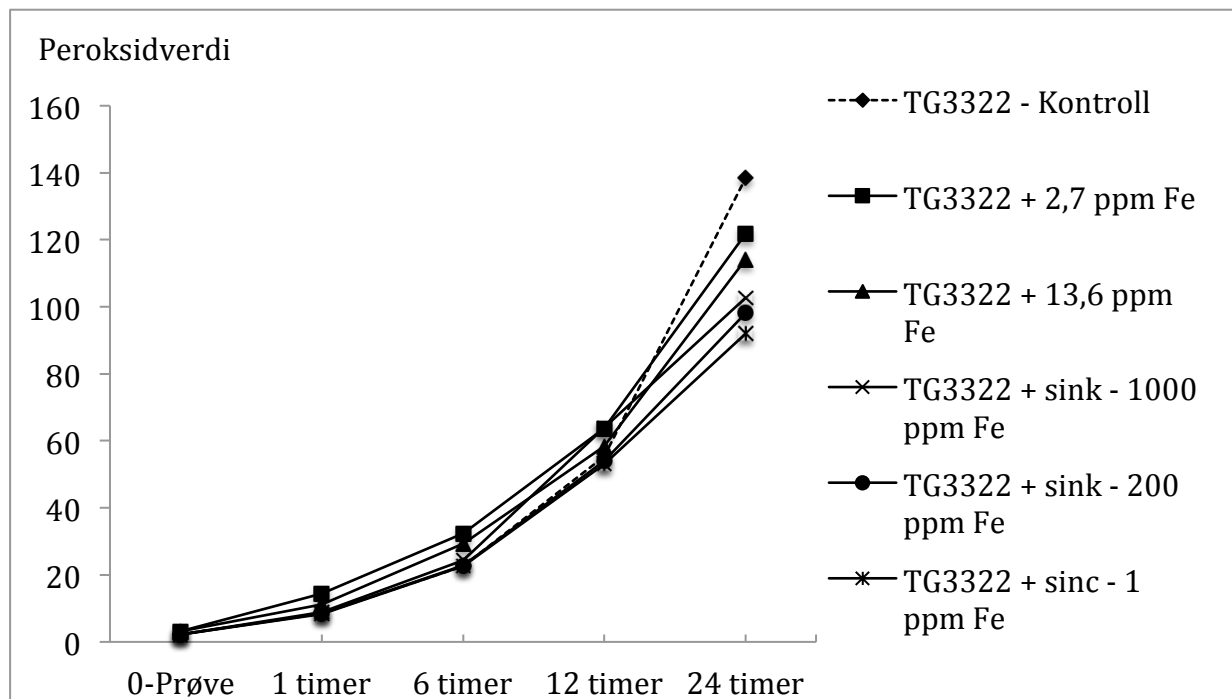


Figur 29: Peroxidverdi av en oksidert TG3322 olje fra Produsent A tilsatt to konsentrasjoner med sink (16,07 og 32,14 mg sink/g olje) inkubert ved 45C, 150 rpm i 12 timer.

Oljen hadde referanse PV på 80 meq kg⁻¹ etter 24 timers inkubasjon ved 45 °C, 150 rpm. Kontrollen økte fra referanseverdi til 155 meq kg⁻¹ etter endt inkubasjonsforløp, 12 timer senere. Oljen med 16,07 mg Zn²⁺/gram økte fra PV 80 til 106,4 meq kg⁻¹ etter 12 timers inkubasjon. Den høyeste mengden sink (32,14 mg Zn²⁺/g olje) reduserte PV med 50 % én time etter innblanding (40 meq kg⁻¹), og dette nivået holdt seg videre i inkubasjonen.

Effekt av tilsatt sink med økt jerninnhold

Produktspesifikasjonen til sinkoksid oppgir at jerninnhold kan variere fra 1 – 200 ppm. Det ble derfor undersøkt hvordan økt mengde jern i sinkoksidet påvirket oksidasjon av oljen. Figur 30 viser hvordan ZnO med opptil 1000 ppm jern påvirket oljen. Samme mengde jern som var i sinkoksid-prøvene ble tilsatt olje uten sink. Jern tilsatt sinkoksid (200 og 1000 ppm) tilsvarer 2,7 og 13,6 ppm jern på oljebasis.

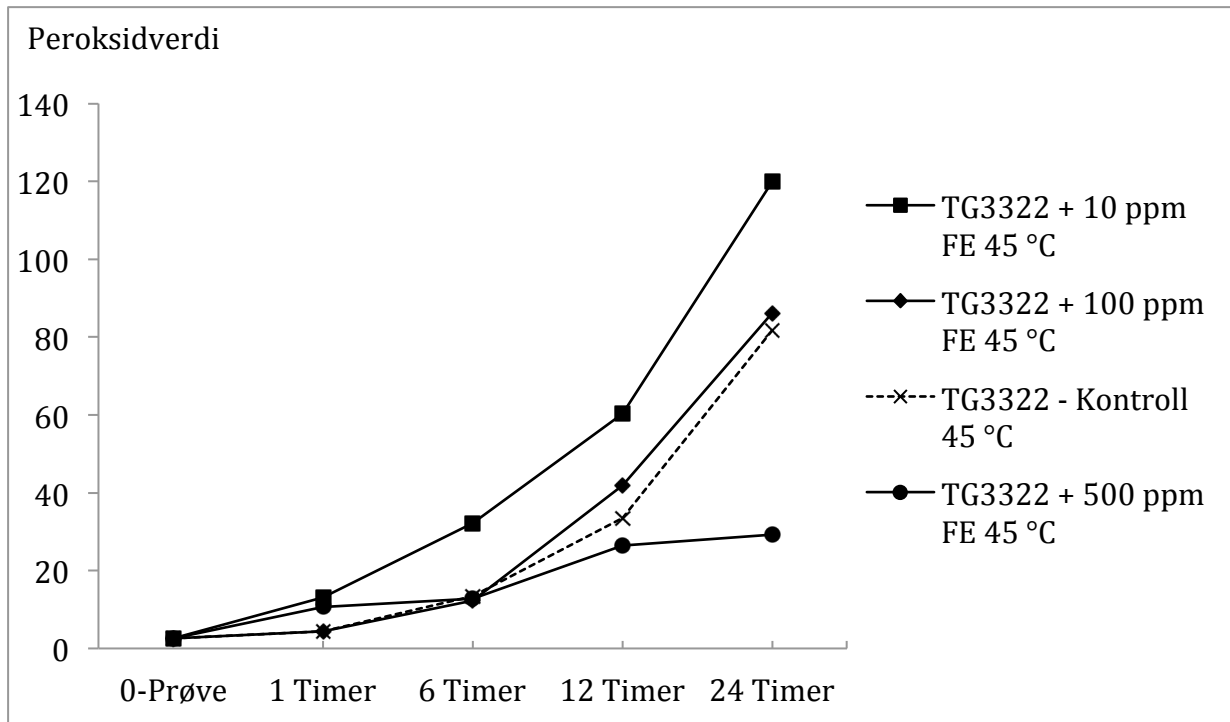


Figur 30: Peroxidverdi av TG3322 fra Produsent A med tre forskjellige jernkonsentrasjoner i sinkoksidet; 1, 200 og 1000 ppm jern, sinkmengden i oljene var 8,68 mg zink/g olje. Jern ble også tilsatt olje uten sink, i samme mengde og dette tilsvarte en jernmengde på 2,6 og 13,6 ppm i oljen.

Referanse PV var $2,2 \text{ meq kg}^{-1}$ som i kontrollen økte til $138,5 \text{ meq kg}^{-1}$ etter endt inkubasjonsforløp. I prøvene med jern og olje (2,7 og 13,6 ppm jern), økte PV fra $2,2 \text{ meq kg}^{-1}$ til henholdsvis $121,8$ og $114,2 \text{ meq kg}^{-1}$ etter 24 timers inkubasjon. Sink med 1 ppm jern ga lavest PV og endte på $91,9 \text{ meq kg}^{-1}$. Prøvene med 200 og 1000 ppm jern tilsatt sinkoksidet økte fra $2,2 \text{ meq kg}^{-1}$ til $98,2$ og $102,7 \text{ meq kg}^{-1}$ etter endt inkubasjonsforløp.

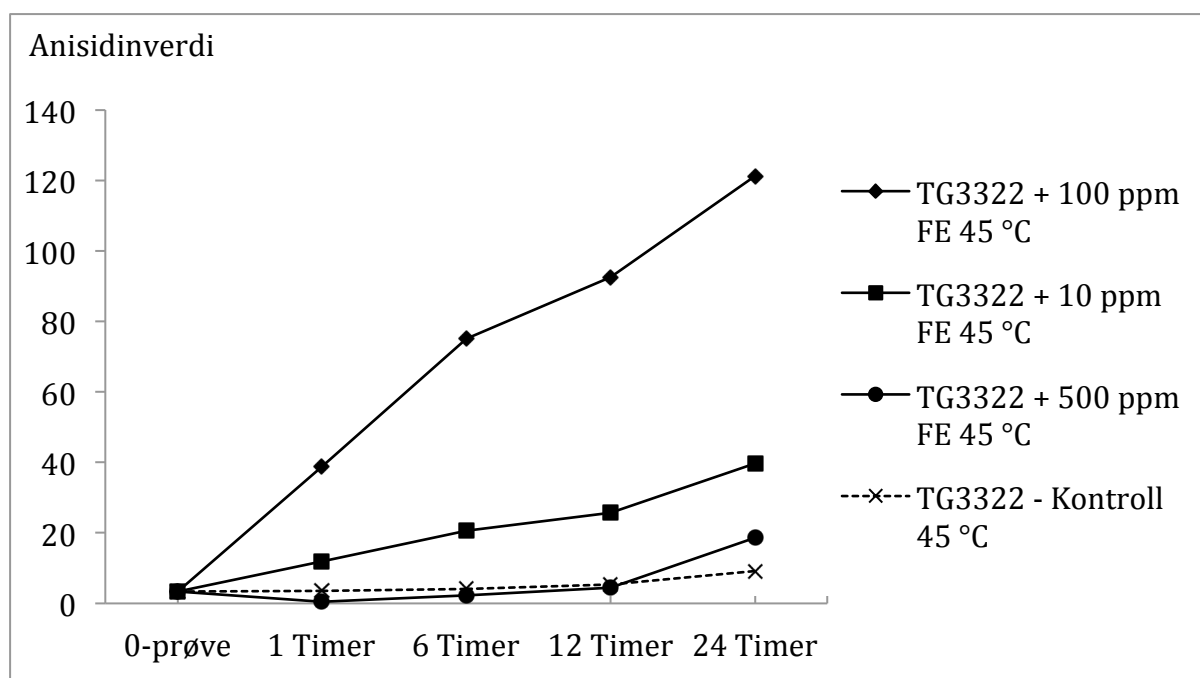
4.3.2. Effekt av jern.

For å undersøke kjent prooksidativ effekt av jern ble jern(III)klorid tilsatt Produkt 2 (TG3322) fra Produsent A. Tre forskjellige jernkonsentrasjoner (10, 100 og 500 ppm jern) ble tilsatt og inkubert i 24 timer ved 45 °C, 150 rpm risting.



Figur 31: Peroxidverdi av TG3322 fra Produsent A med 3 forskjellige konsentrasjoner av jern (10, 100 og 500 ppm), inkubert ved 45 °C, 150 rpm.

Produkt 2 (TG3322) fra Produsent A hadde referanse PV 2,6 meq kg⁻¹, som etter endt inkubasjonsforløp (24 timer) økte til PV 81,2 meq kg⁻¹. Den laveste konsentrasjonen av jern (10 ppm) fikk høyest utslag i PV, 119,9 meq kg⁻¹ etter 24 timers inkubasjon. Prøven med 100 ppm jern hadde etter 24 timers inkubasjon en PV like over kontroll (86,2 meq kg⁻¹). Oljen med 500 ppm jern endte med PV 29,16 meq kg⁻¹ etter 24 endt inkubasjonsforløp.



Figur 32: Anisidinverdi av TG3322 fra Produsent A med 3 forskjellige konsentrasjoner av jern (10, 100 og 500 ppm), inkubert ved 45 C, 150 rpm.

Kontrollen fikk lite utslag i AV fra referanseverdi på 3,3 til 9,2 etter endt inkubasjonsforløp. Størst utslag i AV var i oljen med 100 ppm jern som etter 24 timers inkubasjon hadde AV lik 121,3. Olje med 10 og 500 ppm økte fra 3,3 til henholdsvis 39,8 og 18,6 etter 24 timers inkubasjon.

5. Diskusjon

Langkjedede omega-3 fettsyrer har mange potensielle positive helseeffekter beskrevet i litteratur (Joensen *et al.* 2011, Riediger *et al.* 2009, Ruxton *et al.* 2004). Dette har ført til at markedet for langkjedede omega-3 produkter er i stadig vekst og i 2010 ble det i Norge solgt fiskeoljeprodukter som kosttilskudd for nesten 600 millioner norske kroner (Bransjerådet for Naturmidler 2012). Innholdet omega-3 fettsyrer varierer fra 10–90 % i kommersielle oljeprodukter og økt innhold PUFA gjør oljene mer følsomme for oksidasjon. I en rapport hvor mengden oksidasjonsprodukter i norske omega-3 produkter ble undersøkt var det kun 4 av 56 produkter som inneholdt så lave nivåer at de tilfredstilte standardene gitt av GOED (RUBIN 2010). I samme studie lot kun halvparten av produktene seg analysere grunnet diverse tilsetningsstoffer som smaks- og fargestoffer. Et annet studie analyserte peroksidverdier av 33 omega-3 produkter i det norske marked. Her hadde fire av produktene en PV høyere enn standardene gitt av GOED (Halvorsen and Blomhoff 2011). Den norske vitenskapskomiteen for mattrygghet har nylig gitt ut en risikovurdering av mulige helseskadelige effekter av nedbrytnings- og oksidasjonsprodukter i fiskeoljer (VKM 2011). I rapporten konkluderes det blant annet med at det er et stort behov for nye standardiserte metoder for analyse av oksidasjonsprodukter og metoder for å kunne bestemme holdbarheten til oljeprodukter. I tillegg viste gjennomgangen av den vitenskapelige litteraturen mangelfull kunnskap om hvordan nedbrytnings- og oksidasjonsprodukter i fiskeoljer eventuelt kan påvirke helsen negativt.

I denne oppgaven har hovedmålet vært å undersøke stabilitet til kommersielle fiskeoljeprodukter ved akselerert oksidasjon og hvordan tilsetning av spormetallet sink påvirker måling av oksidasjonsnivå. Innledningsvis ble fettsyresammensetning i ulike oljeprodukter undersøkt. Både vanlige fiskeoljer og produkter med oppkonsentrerte mengder av EPA og DHA ble studert i oppgaven.

5.1. Fettsyresammensetning

Analyse av fettsyresammensetning viste stor forskjell i innholdet av langkjedede omega-3 fettsyrer i de to naturlige fiskeoljene. Lakseoljen (Produkt 8) inneholdt bare 8 % EPA, DPA og DHA mens fiskeoljen (Produkt 7) inneholdt til sammen 34 % av disse tre fettsyrene. Det lave innholdet av LC-PUFA i lakseoljen kommer av at laksefôret inneholder mye vegetabiliske produkter, både planteoljer og planteprotein. Linolsyre som det fins mye av i

planteoljer, utgjør hele 14 % av fettsyrene i lakseoljen mot bare 1,3 % i den andre fiskeoljen (Produkt 7). Jensen *et al.* (2012) fant at filet fra oppdrettslaks, slaktet i juli 2010, inneholdt 16,7 % LC-PUFA og 9,1 % linolsyre. Dette tyder på at lakseoljen som ble undersøkt i min oppgave kom fra laks som hadde vært føret med mere planteprodukter. Denne laksen var slaktet høsten 2011. Lakseoljen er produsert fra lakseslo (innvoller) og dette kan også bidra til et lavere innhold av LC-PUFA. Fett i muskel inneholder en betydelig andel fosfolipider og denne fettklassen har et høyere innhold av LC-PUFA enn triacylglyserol (Polvi and Ackman 1992). I lakseoljen er fosfolipidene blitt fjernet under raffineringen (Gunstone 2004). Det høye innholdet av LC-PUFA i Produkt 7 indikerer at oljen kommer fra Sør-Amerika (McGill and Moffat 1992). Ansjoveta, den arten det produseres mest fiskeolje fra, kan inneholde så mye som 36 % LC-PUFA (McGill and Moffat 1992).

Konsentrerte fiskeoljer har ofte et produktnavn som oppgir hvor mye EPA og DHA det er av de totale fettsyrene i oljen. Fiskeoljer med produktnavnet TG3322 skal inneholde 33 % EPA og 22 % DHA. Alle de konsentrerte fiskeoljene undersøkt i oppgaven inneholdt gjennomsnittlig 2,5 % mer av både EPA og DHA enn oppgitt i deklarasjon. Mengden mettede og enumettede fettsyrer varierte lite i oljeproduktene 2-5, 9 og 10. Disse oljeproduktene inneholdt fra 62,8 til 69,2 % LC-PUFA. Produkt 6 har produktnavnet TG75 og inneholdt 77 % DHA. Oljen inneholdt i tillegg 12,3 % EPA og totalt 92,4 % LC-PUFA, det vil si en høykonsentrert olje.

Fettsyresammensetningen i oljeproduktene baserer seg på arealprosenten i GC-kromatogrammet. Resultatene gir et riktig bilde av den relative fettsyresammensetningen, men kan ikke brukes til å fastsette det absolutte innholdet av de enkelte fettsyrene i mg/gram olje. Oljene inneholder andre komponenter enn fettsyrer som f.eks. glyserol i TAG og etylgruppa i etylestere. En etylester av EPA har molekylvekt på ca. 330 og av dette utgjør etylenden cirka 13 %. For å få et riktig kvantitativt mål burde en fettsyre som ikke finnes i oljen, eksempelvis en C17 fettsyre, blitt tilsatt oljen i kjent mengde før metylering.

5.2. Oksidativ stabilitet og akselerert oksidasjon

Oljeproduktene ble inkubert i to døgn ved oksidativt akselererende betingelser (risting og forhøyet temperatur) for å undersøke oksidativ stabilitet. Fiskeoljene (Produkt 7 og 8) var de mest stabile oljeproduktene. Romtemperatur og 150 rpm risting påvirket ikke mengden oksidasjonsprodukter, mens temperaturøkning til 45 og 60 °C ga en markant oppgang i PV.

Av de to oljene var det lakseoljen (Produkt 8) som viste høyest oksidativ stabilitet. Hovedgrunnen er at lakseoljen inneholder betydelig mindre LC-PUFA enn den andre fiskeoljen (Produkt 7). Selv om innholdet av flerumettede fettsyrer ikke er så forskjellig inneholder Produkt 7 mye mer av fettsyrene med 5-6 dobbeltbindinger. En annen mulig forklaring som kan bidra er ferskheten på råstoffet eller råoljen. Råoljen til Produkt 7 transporteres fra Sør-Amerika til produsentens raffineri i Norge og denne råoljen kan være av variabel kvalitet, i tillegg vet man ikke noe om kvaliteten på fisken råoljen produseres fra. Lakseoljen produseres av ferskt slo fra oppdrettslaks. I utgangspunktet hadde lakseoljen en anisidinverdi på 0,2 mens AV for den andre fiskeoljen var 12,3. Dette tyder på at kvaliteten av råstoffet/råoljen spiller en viktig rolle for utvikling av mengden oksidasjonsprodukter i oljen.

Innholdet av LC-PUFA i oljekonsentratene er 2-3 ganger høyere enn i fiskeoljene og som forventet ga dette utslag i lavere oksidativ stabilitet. Av enkelte oljeprodukter ble både nye og eldre produksjoner undersøkt. Tre ulike produksjoner TG3322 olje fra Produsent A og to ulike produksjoner TG3322 olje fra Produsent B viste at de eldre oljene fikk raskere utvikling av oksidasjonsprodukter (Figur 14 & 15). Årsaken kan være ulik kvalitet av råstoffet som oljene var laget av. Den sannsynlige forklaringen er antakelig at det skjer en viss oksidasjon i oljene under lagringen før undersøkelsen av oksidativ stabilitet.

Produsent E lager oljeprodukter raffinert fra råolje i Chile. Liknende produkter fra Produsent A og B raffineres i Norge fra råolje importert fra Sør-Amerika. Dette skulle tyde på at oljeproduktene fra Produsent E skulle ha en høyere oksidativ stabilitet enn samme oljetyper fra Produsent A og B. Figur 20 og 21 viser motsatt resultat, PV-mengden i Produkt 9 skiller seg fra Produkt 3 og 4 allerede etter 6 timer og produktet ender både med høyere PV og AV enn de to andre produktene. Man kan bare spekulere hva årsaken til at Produkt 9 som produseres og raffineres med basis i ferskt råstoff, har dårligere stabilitet enn produktene 3 og 4. Selv om produktspesifikasjonen tyder på at Produkt 9 hadde et høyere innhold av LC-PUFA enn 3 og 4 så kom dette ikke fram i analysen av fettsyresammensetningen.

Oksidativ stabilitet av Produkt 6 fikk samme utvikling av peroksidverdier ved både 45 og 60 °C grader (Figur 22 & 23). Oljen inneholder over 90 % LC-PUFA og det er mulig at disse temperaturene var for høye. Ved lagring i kjøleskap (4 °C) fikk oljen etter to døgn økt peroksidverdi som kan by på utfordringer når det kommer til holdbarheten av oljeproduktet (Figur 24).

I oppgaven ble oljer utsatt for oksidativt akselererende betingelser ved risting (150 rpm) og temperaturer fra 23 til 60 °C grader. Opparbeidet erfaring tilsier at temperatur bør velges etter innhold av LC-PUFA i oljeproduktet. I oljeprodukter med 60 % LC-PUFA ble størst forskjell i oljeproduktene påvist ved 45 °C hvor oljeprodukter kunne skilles på peroksidverdier allerede etter 12 timers inkubasjon. Valg av temperaturbetingelser er tydelig viktig for å kunne skille mellom produkter som har noenlunde lik fettsyresammensetning. I tillegg er det viktig i følge Frankel (1998) å benytte lavest mulig temperatur i akselererte tester. I oljeprodukt med 90 % flerumettede fettsyrer holdt det å gjøre stabilitetsanalyse ved romtemperatur (23 °C), der Produkt 6 fikk en markant oppgang i PV etter 1 døgn inkubasjon (Figur 24). Oksidativ stabilitet av oljeprodukter med 10-30 % LC-PUFA kan enten undersøkes ved 45 eller 60 °C, markant oppgang i peroksider kan da forventes etter henholdsvis 48 og 24 timer.

5.3. Effekt av tilsatt sink og jern på oksidasjonsmåling

Det blir mer og mer vanlig at kosttilskudd inneholder flere enn en type ingredienser. I vårt tilfelle var det ønskelig å undersøke hvordan tilsetning av sink i form av sinkoksid påvirket oksidasjonsmålingen i oljen. Omega-3 produktet skulle gi 10 mg Zn²⁺ pr dagsdose. Hvorfor sink skulle være i produktet er uvisst. Noen av helse-påstandene såkalte "health claims" ved bruk av sink omtaler: sunn hud, opprettholdelse av optimalt hormonnivå for muskelvekst samt normal vekst, sistnevnte gjelder for barn (EFSA 2010).

Effekt av tilsatt sink ble undersøkt i Produkt 2 (TG3322) fra Produsent A inkubert ved 45 °C og 150 rpm i et døgn. Ved disse betingelsene kunne endringer i oksidativ stabilitet påvises etter 24 timers inkubasjon. Sink viste liten eller ingen endring i peroksidverdi i henhold til kontroll med konsentrasjoner fra 0,3-8,7 mg sink/g olje. Høyere konsentrasjoner sink (16,07-43,4 mg/g olje) viste imidlertid kraftig reduksjon i utvikling av peroksidverdi (Figur 26 & 27). Sink har vist å være antioksidativ ved å hemme transisjonsmetall mediert oksidasjon i biologiske systemer (Powell 2000). Sink kan også fungere som radikalfanger *in vitro*, men dette er påvist i andre former av sink enn sinkoksid (Bagchi *et al.* 1997). Sinkoksidet inneholdt kun 1 ppm jern og reduksjonen i peroksidverdier kommer derfor trolig av andre årsaker enn kjelatering av transisjonsmetaller. Man kunne tenke seg at peroksider som dannes straks blir brutt ned til sekundære oksidasjonsprodukter av for eksempel forurensende transisjonsmetaller i sinkoksidet. Et forsøk på å analysere AV i oljene med sink

ble gjort (Figur 28). Måling av absorpsjon ble påvirket av sinkinnholdet i oljen som med 8,68 mg sink/g fikk negativ AV etter 1 time inkubasjon. Måling av absorbansen ble unøyaktig og det ble observert at tiden før tallet i spektrometret stabiliserte seg tok lengre tid enn i kontrollen.

For å undersøke om sink også påvirket peroksidverdi-analysen ble sink tilsatt en oksidert olje (PV 80 meq kg⁻¹). PV i oljen med høyest sinkinnhold (32,14 mg sink/g olje) ble halvert etter 1 timers inkubasjon. Denne verdien holdt seg stabilt ved videre inkubasjon. Det virker som om sink etter mengde-forhold kamuflerer peroksidverdiene. Mekanismen bak dette er ikke kjent, men det kan være at sink påvirker selve analysemetoden. Disse resultatene illustrerer et tydelig behov etter alternative metoder for måling av oksidasjonsutvikling i mer sammensatte oljeprodukter.

Sinkoksidet kan ifølge leverandøren inneholde opptil 200 ppm jern. Derfor ble forskjellige jernkonsentrasjoner tilsatt sinkoksidet og testet for peroksiddannelse (Figur 30). Kontrollen i forsøket endte etter 24 timers inkubasjon på en PV lik 138,5 meq kg⁻¹. I alle andre forsøk med denne oljen har PV etter 24 timers inkubasjonsforløp vært på cirka 80 meq kg⁻¹, dvs. at det antagelig er gjort en feil med kontrollen i dette forsøket. Det kan være at skrukorken på engangsglassene ikke har blitt skrudd ordentlig på etter prøveuttak slik at oksygentilgangen har økt. Det kan også være at oljen (ikke bare til kontroll) har stått for lenge på laboratoriebenken før forsøket ble startet, både lys og temperatur kan ha ført til at peroksider i oljen har økt så kraftig. I dette forsøket ble 2,7 og 13,6 ppm jern tilsatt olje med og uten sink (8,68 mg sink/g olje). Denne jernmengden tilsvarte 200 og 1000 ppm jern i sinkoksidet. Olje med sinkoksid som inneholdt 1 ppm jern fikk lavest PV etter endt inkubasjon, tett etterfulgt av sinkoksid med 200 og 100 ppm jern. Olje med 2,7 ppm jern fikk en høyere PV (121,8 meq kg⁻¹) enn oljen med 13,6 ppm jern (114,2 meq kg⁻¹). Forsøket tyder på at jernforurensing (opptil 1000 ppm) i sinkoksidet ikke påvirker oksidativ stabilitet av oljen. Dette er overraskende siden transisjonsmetallet jern har velkjente prooksidative egenskaper. Man kunne tenke seg at peroksidene brytes raskt ned til sekundære produkter, men dette kunne ikke undersøkes da AV-analyse ikke var mulig å gjennomføre pga. sinkinnholdet.

Effekten av jern (FeCl₃) på oksidasjonsforløpet ble undersøkt ved å tilsette betydelige konsentrasjoner til oljen (Figur 31 & 32). Lavest PV ble funnet i oljen med 500 ppm jern og høyest i oljen med 10 ppm jern. Olje med 100 ppm jern fikk en peroksidverdi cirka lik kontrollen. Også ved måling av anisidinverdi gir 500 ppm jern lite utslag i oljen og havner

like over kontroll på AV 18,6 etter endt inkubasjonsforløp. Oljen med 100 ppm hadde tydelig høyest utvikling i AV og endte på over 100 (Figur 32). Dette tyder på at 500 ppm jern er så prooksidativt at det ikke lar seg måle med hverken PV eller AV. Det er kjent at for høye konsentrasjoner prooksidanter eller temperaturer kan føre til endret oksidasjonsforløp i oljer (Frankel 1998). Med 100 ppm jern i oljen ser det ut som om at dekomposisjonen av peroksid til sekundære oksidasjonsprodukter går raskere enn dannelsen.

6. Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven kan oppsummeres i tre hovedpunkter:

- Fettsyresammensetning av oljeproduktene stemte med mindre avvik godt overens med fettsyreinholdet i leverandørens produktspesifikasjoner. Oljeproduktene undersøkt i oppgaven kan deles inn i tre produkttyper etter LC-PUFA innhold; naturlige fiskeoljer (8 – 34 %), konsentrater (cirka 60 %) og høykonsentrat (90%).
- Akselererte stabilitetsstudier kan ved riktige betingelser brukes til å undersøke stabilitet av lignende oljeprodukter. I oppgaven ble forskjellig oksidativ stabilitet av oljekonsentrater funnet ved forhøyet temperatur og risting.
- Effekt av sink tilsatt oljekonsentrat bekrefter behovet for nye analysemetoder for å kunne bestemme oksidasjonen i omega-3 kombinasjonsprodukter. Resultatene kan ikke brukes for å si noe om pro- eller antioksidativ effekt av sinkoksid.

7. Referanser:

- Alvheim, A. R., Malde, M. K., Osei-Hyiaman, D., Hong Lin, Y., Pawlosky, R. J., Madsen, L., Kristiansen, K., Froyland, L. & Hibbeln, J. R. (2012) Dietary Linoleic Acid Elevates Endogenous 2-AG and Anandamide and Induces Obesity. *Obesity*, **20**: 1984-94.
- AOCS (1990a) Anisidin value, American Oil and Chemists` Society official method cd 18-90. *AOCS press, Champaign, Illinois*.
- AOCS (1990b) Peroxide Value, American Oil and Chemists` Society official method cd 8-53. *AOCS press, Champaign, Illinois*.
- Bagchi, D., Bagchi, M. & Stohs, S. J. (1997) Comparative in vitro oxygen radical scavenging ability of zinc methionine and selected zinc salts and antioxidants. *General Pharmacology*, **28**: 85-91.
- Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F. & Rawlings, R. R. (2011) Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **93**: 950-962.
- Bransjerådet for naturmidler (2012) <http://www.brn.no/> [06.11 2012].
- Breivik, H., Haraldsson, G. & Kristinsson, B. (1997) Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**: 1425-1429.
- Calder, P. C. (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **91**: 791-795.
- Calder, P. C. (2012) Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *The Journal of Nutrition*, **142**: 592S-599S.
- Cort, W. M. (1974) Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **51**: 321-325.
- Cosgrove, J. P., Church, D. F. & Pryor, W. A. (1987) The Kinetics of the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty-Acids. *Lipids*, **22**: 299-304.
- De Caterina, R. (2011) n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, **364**: 2439-2450.
- EFSA (2009) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to EPA, DHA, DPA and maintenance of normal blood pressure (ID 502), maintenance of normal HDL-cholesterol concentrations (ID 515), maintenance of normal (fasting) blood

- concentrations of triglycerides (ID 517), maintenance of normal LDL-cholesterol concentrations (ID 528, 698) and maintenance of joints (ID 503, 505, 507, 511, 518, 524, 526, 535, 537) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, **7**: 1-26.
- EFSA (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to zinc and maintenance of normal skin (ID 293), DNA synthesis and cell division (ID 293), contribution to normal protein synthesis (ID 293, 4293), maintenance of normal serum testosterone concentrations (ID 301), “normal growth” (ID 303), reduction of tiredness and fatigue (ID 304), contribution to normal carbohydrate metabolism (ID 382), maintenance of normal hair (ID 412), maintenance of normal nails (ID 412) and contribution to normal macronutrient metabolism (ID 2890) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 *EFSA Journal*, **8**: 1-25.
- Frankel, E. N. (1998) *Lipid oxidation*, Dundee, Scotland, The Oily Press Ltd.
- Global Organization for EPA and DHA omega-3, (2012) GOED Voluntary Monograph.
- Guillén, M. D. & Ruiz, A. (2005) Monitoring the oxidation of unsaturated oils and formation of oxygenated aldehydes by proton NMR. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**: 36-47.
- Gunstone, F. D. 2004. Extraction, refining and processing. *The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses*. Oxford, United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Halvorsen, B. L. & Blomhoff, R. (2011) Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research*, **55**: 5792 - DOI: 10.3402/fnr.v55i0.5792.
- Hamilton, R. J., Kalu, C., McNeill, G. P., Padley, F. B. & Pierce, J. H. (1998) Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**: 813-822.
- Haraldsson, G., Kristinsson, B., Sigurdardottir, R., Gudmundsson, G. & Breivik, H. (1997) The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**: 1419-1424.
- Haraldsson, G. G., Gudmundsson, B. Ö. & Almarsson, Ö. (1993) The preparation of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron Letters*, **34**: 5791-5794.

- Hasan, M. R. & Halwart, M. (2009) Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*.
- Jacobsen, C., Rustad, T., Nielsen, N. S., Falch, E., Jansson, S. & Storrø, I. 2009. Processing of marine lipids and factors affecting their quality when used for functional foods. *In: Luten, J. B. (ed.) Marine functional food*. Wageningen, Wageningen Academic Publishers.
- Jensen, I. J., Mæhre, H. K., Tømmerås, S., Eilertsen, K. E., Olsen, R. L. & Elvevoll, E. O. (2012) Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Bulletin*, **37**: 25-29.
- Joensen, A. M., Overvad, K., Dethlefsen, C., Johnsen, S. P., Tjønneland, A., Rasmussen, L. H. & Schmidt, E. B. (2011) Marine n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Adipose Tissue and the Risk of Acute Coronary Syndrome / Clinical Perspective. *Circulation*, **124**: 1232-1238.
- Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L.-Å. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**: 671-701.
- Landete, J. M. (2011) Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**: 936-948.
- Martín, D., Terrón, A., Fornari, T., Reglero, G. & Torres, C. F. (2012) Oxidative stabilization of ultra-high omega-3 concentrates as ethyl esters or triacylglycerols. *Food Research International*, **45**: 336-341.
- Martins, J. G. (2009) EPA but Not DHA Appears To Be Responsible for the Efficacy of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Depression: Evidence from a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of the American College of Nutrition*, **28**: 525-542.
- McGill, A. & Moffat, C. (1992) A study of the composition of fish liver and body oil triglycerides. *Lipids*, **27**: 360-370.
- Méndez, E., Sanhueza, J., Speisky, H. & Valenzuela, A. (1996) Validation of the rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**: 1033-1037.
- Miller, M. R., Nichols, P. D. & Carter, C. G. (2008) n-3 Oil sources for use in aquaculture – alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutrition Research Reviews*, **21**: 85-96.

- Myrnes, B., Barstad, H., Olsen, R. & Elvevoll, E. (1995) Solvent-free enzymatic glycerolysis of marine oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **72**: 1339-1344.
- Olsen, R. L. (2007) Lipidkjemi med vekt på fisk. *Norges fiskerihøgskole*.
- Polvi, S. M. & Ackman, R. G. (1992) Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative dietary fatty acid sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 1001-1007.
- Powell, S. R. (2000) The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, **130**: 1447S-1454S.
- Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M. & Moghadasian, M. H. (2009) A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *Journal of the American Dietetic Association*, **109**: 668-679.
- RUBIN (2007) *Marine biprodukter: Råvarer med muligheter*, Trondheim.
- RUBIN Rapport nr. 196. Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler. Trondheim, 2010
- 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.
- SanGiovanni, J. P., Berkey, C. S., Dwyer, J. T. & Colditz, G. A. (2000) Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Human Development*, **57**: 165-188.
- Schwartzlose, R. A., Alheit, J., Bakun, A., Baumgartner, T. R., Cloete, R., Crawford, R. J. M., Fletcher, W. J., Green-Ruiz, Y., Hagen, E., Kawasaki, T., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, S. E., MacCall, A. D., Matsuura, Y., Nevarez-Martinez, M. O., Parrish, R. H., Roy, C., Serra, R., Shust, K. V., Ward, M. N. & Zuzunaga, J. Z. (1999) Worldwide large-scale fluctuations of sardine and anchovy populations. *South African Journal of Marine Science*, **21**: 289-347.
- Shahidi, F. & Wanasundara, U. N. (1998) Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, **9**: 230-240.
- Sherwin, E. R. (1978) Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**: 809-814.
- Stables, M. J. & Gilroy, D. W. (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, **50**: 35-51.

- Steine, G., Tveterås, R. & Pettersen, I. (2011) "Føre var" i laksenæringen: Tid for kollektiv håndtering av underdekning av fiskeolje. *Notat, Norsk institutt for landbruksøkonomisk forskning*.
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H. (1959) Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **31**: 307-308.
- Tacon, A. G. J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**: 146-158.
- VKM (2011) Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils.
- Wahli, W. & Michalik, L. (2012) PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **23**: 351-363.
- WHO (2012) Cardiovascular diseases (CVDs).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [01.11 2012].
- Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., Fraser, B., Thienthong, N. & Perlmutter, P. (2008) Docosahexaenoic Acid is More Stable to Oxidation when Located at the sn-2 Position of Triacylglycerol Compared to sn-1(3). *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**: 543-548.
- Yanishlieva, N. V. & Marinova, E. M. (2001) Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**: 752-767.