

400 A25670 - Åpen

Rapport

Sildeomega3 - Produksjon av høykvalitets sildeolje

Forfatter(e)

Ana Karina Carvajal
Revilija Mozuraityte



Rapport

Sildeomega3 - Produksjon av høykvalitets sildeolje

EMNEORD:

Sild, restråstoff, olje, oljeproduksjon, oksidasjonsstatus, stabilitet, kvalitet, fosfolipider

VERSJON

1

DATO

2014-01-30

FORFATTER(E)

Ana Karina Carvajal
Revilija Mozuraityte

OPPDRAGSGIVER(E)

EPAX

OPPDRAGSGIVERS REF.

Iren Stoknes

PROSJEKTNR

6020285

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

26

SAMMENDRAG

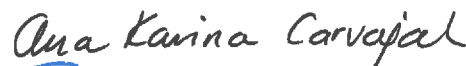
Målet med prosjektet var å se på mulighetene for å utnytte silderestråstoff til produksjon av produkter til helsekostmarkedet. Prosjektet ble ledet av EPAX og arbeidspakken som omhandlet produksjon av oljen ble ledet av SFH.

Resultatene fra prosjektet viser at restråstoff fra sild kan benyttes til å produsere en olje av god kvalitet som kan benyttes i produkter til humant konsum. Oljen hadde lav oksidasjonsstatus (PV = 2,6 meq/kg lipid, AV = 1,3), verdier som ligger langt under verdiene som er rapportert for kommersielle råoljer på markedet. I tillegg så tilfredsstilte oljene kravene for raffinerte fiskeoljer selv om oljen ikke hadde gjennomgått en renseprosess.

Antioksidanter blir tilsatt til råoljen etter produksjon for å øke stabiliteten. I midlertid så kan oksidasjon forekomme under produksjon av oljen. Tilsetning av antioksidanter til råstoffet før prosessering kan være en strategi for å redusere oksidasjon under prosessering og lage en olje med lav oksidasjonsstatus og høy stabilitet. Tilsats av antioksidanter (BHT, propyl gallat eller sitronsyre) til råstoffet før produksjon resulterte i en olje med redusert oksidasjonsstatus (opptil 70 % reduksjon i total oksidasjon). Tilsats av antioksidanter før produksjon førte også til økt oljestabilitet.

UTARBEIDET AV

Ana Karina Carvajal

SIGNATUR**KONTROLLERT AV**

Robert Wolff

SIGNATUR**GODKJENT AV**

Marit Aursand

SIGNATUR**RAPPORTNR**

A25670

ISBN

978-82-14-05649-5

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn.....	3
2	Prosjektets målsetning	3
3	Materialer og metoder	4
3.1	Råstoffsammensetning	4
3.2	Metode for screening av antioksidanter.....	4
3.3	Lagring av restråstoff og produksjon av sildeolje i lab skala	5
3.4	Produksjon av sildeolje i pilotskala	6
4	Resultater og diskusjon.....	8
4.1	Effekt av lagring på oljekvalitet.....	8
4.2	Produksjon av sildeolje	11
4.2.1	Fettsyresammensetning	11
4.2.2	Oljekvalitet.....	13
4.3	Bruk av antioksidanter i produksjon av sildeolje	14
4.3.1	Screening av antioksidanter	14
4.3.2	Produksjon av olje fra restråstoff tilsatt antioksidanter – pilotskala	15
4.3.3	Produksjon av sildeolje fra restråstoff tilsatt antioksidanter – lab skala	17
4.3.3.1	Bruk av lavere antioksidantkonsentrasjoner	20
4.4	Utnyttelse av fosfolipider fra grakse.....	22
4.4.1	Ekstraksjon av fosfolipider fra grakse.....	22
4.4.2	Oksidasjonsstatus på fosfolipider ekstrahert fra grakse	22
5	Konklusjon	24
6	Referanser.....	25

BILAG/VEDLEGG

[Skriv inn ønsket bilag/vedlegg]

1 Bakgrunn

Høsten 2008 startet EPAX arbeidet med å vurdere sildeolje som mulig råstoff for spesialprodukter innen helse og ernæring. Med støtte fra stiftelsen RUBIN ble det gjennomført en forstudie. Det ble konkludert med at EPAX ønsket å arbeide videre med dette og med ulike produktvarianter som mål. Høsten 2009 ga RUBIN videre støtte til et hovedprosjekt med tittel: Sildeavskjær som råstoff til spesialprodukter for helse og ernæring. Prosjektet ble ledet av Iren Stoknes hos EPAX og koordinert av Harald Breivik (Neperdo Biomarine). Svært positive resultater har kommet fram i prosjektet og legger grunnlaget for det videre arbeidet i SildeOmega3 (2011 – 2013).

2 Prosjektets målsetning

Overordnet idé i prosjektet var å utnytte det unike silderestråstoffet til spesialprodukter innen helsekostbransjen. EPAX er en ledende aktør i omega-3 bransjen og har mulighet for å kommersialisere en slik innovasjon på forholdsvis kort sikt. Prosjektet vil kunne bidra til å øke verdien av sildefangstene og skape nye arbeidsplasser langs kysten.

Prosjektet hadde følgende hovedmål og delmål:

Hovedmål: Utvikle omega3-helsekostprodukter fra silderåstoff

Delmål:

1. Utvikle prosess for utvinning, stabilisering og raffinering av sildeolje for humant konsum
2. Utvikle prosess for oppkonsentrering av EPA og DHA i sildeolje
3. Utvikle prosess for oppkonsentrering av langkjedete monoumettede fettsyrer (LC-MUFA) i sildeolje
4. Undersøke om proteinfraksjonen fra prosessering av råstoffet kan egne seg for å utvinne fosfolipider samt videreutvikle ekstraksjonsprosess og analysemetoder

Prosjektet var delt opp i tre arbeidspakker: AP1 – Produksjon av høykvalitets sildeolje, ledet av Inger Beate Standal ved SFH, AP2 – Prosesser for oppkonsentrering av omega-3 fettsyrer og monoumettede fettsyrer, ledet av Harald Breivik ved EPAX/Neperdo Biomarine, og AP3 – Utvinning av fosfolipider, ledet av Harald Svendsen ved EPAX.

SFH var hovedsakelig involvert i AP1 og resultater fra arbeidspakken er presentert i denne rapporten.

3 Materialer og metoder

3.1 Råstoffsammensetning

Restråstoff fra Norsk vårgytende sild (NVG) ble benyttet som råstoff i prosjektet. Restråstoffet var avskjær fra filetproduksjonen og besto av hoder, haler, buklist, ryggbein og innvoller.

Sammensetningen er gitt i Tabell 3-1.

Tabell 3-1: Sammensetning av restråstoffet benyttet i screening, labforsøk og pilotforsøk

Restråstoff	Lipider (g/100 g)	Proteiner (Nx5.82) (g/100 g)	Aske (g/100 g)	Vanninnhold (g/100g)
Screening og labforsøk	19.3 ± 0.2	13.6 ± 0.3	3.3 ± 0.3	63.1 ± 0.7
Pilotforsøk	12.2 ± 0.4	15.1 ± 0.6	2.5 ± 0.2	70.0 ± 0.4

Fettsyresammensetningen er gitt i kapittel 4.2.1.

3.2 Metode for screening av antioksidanter

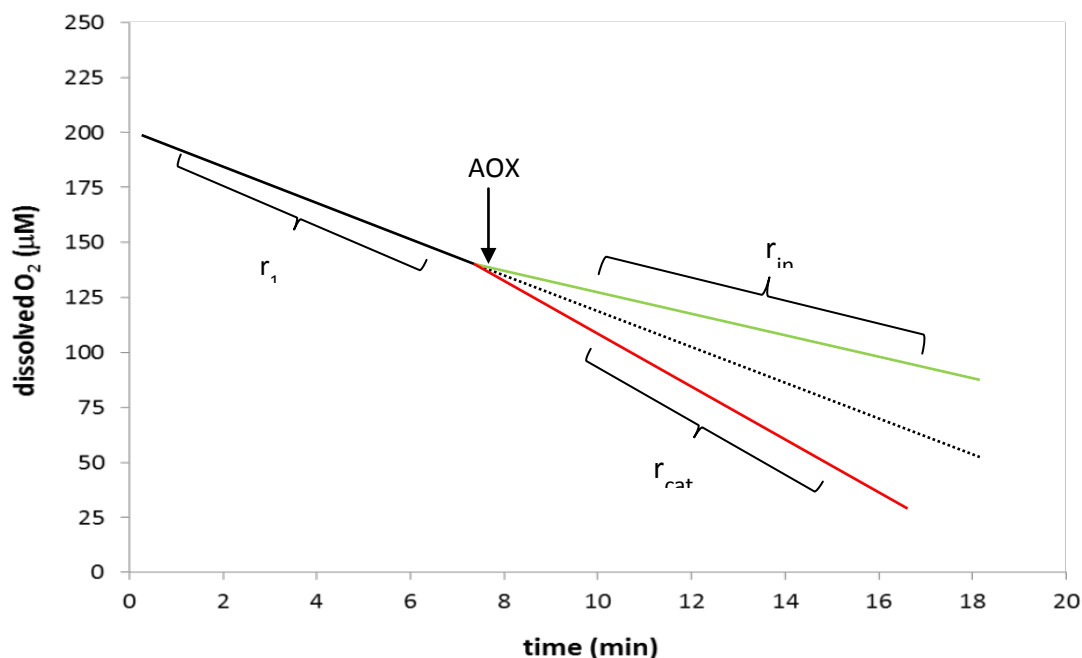
En screening-metode ble utviklet for å kunne velge ut antioksidantene som er mest effektive når det gjelder å hindre oksidasjon i silderestråstoff. Oksidasjonshastigheten i restråstoffet ble studert ved å måle forbruket av oppløst oksygen i en lukket reaksjonscelle ved bruk av Oksygraf, en polarografisk elektrode (**Figur 3-1**). Ved lipidoksidasjon reagerer fettsyrer med oksygen og gir oppgav til hydroperoksider. Forbruket (opptaket) av oksygen anslår mengde hydroperoksider som blir dannet til en viss tid.



Figur 3-1: Oksygraf - måling av nedgang i oppløst oksygen ved bruk av en polarografisk elektrode

En blanding av restråstoff og vann (1:1, oppvarmet til 90 °C) ble tilsatt til reaksjonscellen og hastigheten for oppløst oksygen før tilsats av antioksidant (background OUR, r_1) ble målt (**Figur 3-2**). Etter tilsats av antioksidant kunne enten r_{in} (inhiberingshastighet) eller r_{cat} (katalysert hastighet) måles avhengig om antioksidanten fungerte som en antioksidant eller en prooksidant. Inhiberingseffekten til antioksidanten ble beregnet ved bruk av følgende formel:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(r_1 - r_{in}) \times 100}{r_1}$$



Figur 3-2: Hastigheten for forbruk av oppløst oksygen i silderrestråstoff før (r_1) og etter tilsats av antioksidant (r_{in} eller r_{cat}).

3.3 Lagring av restråstoff og produksjon av sildeolje i lab skala

Lagring av restråstoff kan påvirke kvaliteten og oksidasjonsstatusen på oljen. Et lagringsforsøk ble gjennomført for å studere hvordan lagringstid og temperatur påvirket dannelsen av frie fettsyrer (% FFA) og primære og sekundære oksidasjonsprodukter (konjugerte diener og anisidin verdi) i oljen.

Restråstoff (mindre enn tre timer etter produksjon) ble fordelt i lukkede plastikkposer, pakket inn i aluminiumsfolie og lagret ved 0, 6 og 10 °C (lagret ukvernet). Plastposene ble tatt ut etter 0, 24, 48 og 72 timer og råstoffet ble kvernet ved bruk av en Kenwood kicthen aid kvern (hullstørrelse 9,5 mm).

Produksjon av oljen i labskala ble gjort som følgende: kvernet restråstoff (40 g) ble fordelt i sentrifugerør (50 mL) og varmet i mikrobølgeovn (850 W) for å oppnå en rask temperaturøkning i råstoffet. Prøvene ble så inkubert i 15 min i et vannbad ved 95 °C og deretter sentrifugert ved 5000 rpm i 10 min. Etter sentrifugering ble rørene satt stående i fryseren (- 24 °C) til innholdet var fryst og kunne separeres ved å kutte mellom de ulike fraksjonene (olje, limvann og grakse).

I forsøkene hvor inhiberingseffekten til ulike antioksidanter skulle testes ble antioksidanten tilsatt til restråstoffet før kverning. Samme metode som i lagringsforsøket ble benyttet til produksjon av oljen.

3.4 Produksjon av sildeolje i pilotskala

Mobile SeaLab er et mobilt pilotanlegg for produksjon av olje- og proteinhydrolysat (**Figur 3-3**). Anlegget er fleksibelt og kan ved hjelp av enkle grep settes opp for ulike prosesser og prøveproduksjoner. For å ivareta potensialet til råstoffet er det viktig at det er ”blodfersk” når det skal prosesseres. Dette er bakgrunnen for at prosesscontaineren er mobil. Containeren kan sendes ut til de anleggene som ikke har mulighet for videreforedling, slik at de kan teste ut om deres råstoff egner seg til formålet.

Det mobile prosessanlegget ble benyttet til å produsere sildeolje. Containeren ble sendt til Uthaug og montert opp i umiddelbar nærhet til Grøntvedt Pelagic sine lokaler på Uthaug.

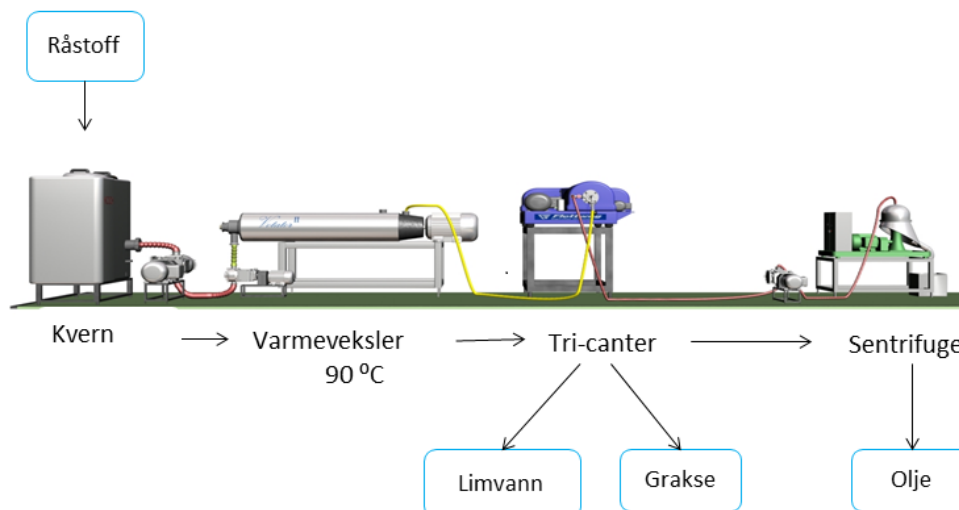


Figur 3-3: Mobile SeaLab utenfor Grøntvedt Pelagic sine lokaler på Uthaug

Restråstoff fra Grøntvedt Pelagic ble benyttet som råstoffet og hovedproduksjonen ble utført den 17. januar 2012. Oppkvernet råstoff (hoder, rygger, buklist, lever, gonader og slo) fra Grøntvedt Pelagic (før ensilasje) ble overført direkte fra kvernen i fabrikk til kvernen i Mobile SeaLab prosessanlegget.

Råstoffet ble etterkvernet og pumpet over i en skrapevarmeveksler hvor råstoffet ble varmet opp til 90 °C. Den oppvarmede massen ble overført til en tricanter hvor råoljefraksjon, vannfraksjon (limvann) og tørrstoff (grakse) ble separert (**Figur 3-4**). Prøver fra limvannet og tørrstoffet ble tatt og overført til aluminiumskanner som ble lagret kaldt. Oljen ble samlet i en beholder og pumpet kontinuerlig over i en poleringssentrifuge hvor rester av vann og uønskede komponenter ble fjernet. Beholderen hvor oljen ble samlet etter separasjon hadde nitrogentilførsel slik at oljen kom i kontakt med minst mulig oksygen. Oljen ble samlet i aluminiumskanner og flushet med nitrogen. Oljen ble oppbevart kaldt før det sammen med limvannet og tørrstoffet ble transportert til SINTEF SeaLab i Trondheim og lagret ved – 25 °C.

I forsøkene hvor effekten av antioksidantene skulle testes ble antioksidantene (500 ppm BHT, 500 ppm PG eller 1000 ppm sitronsyre) tilsatt til restråstoffet i kvernen i prosessanlegget (Mobile SeaLab).

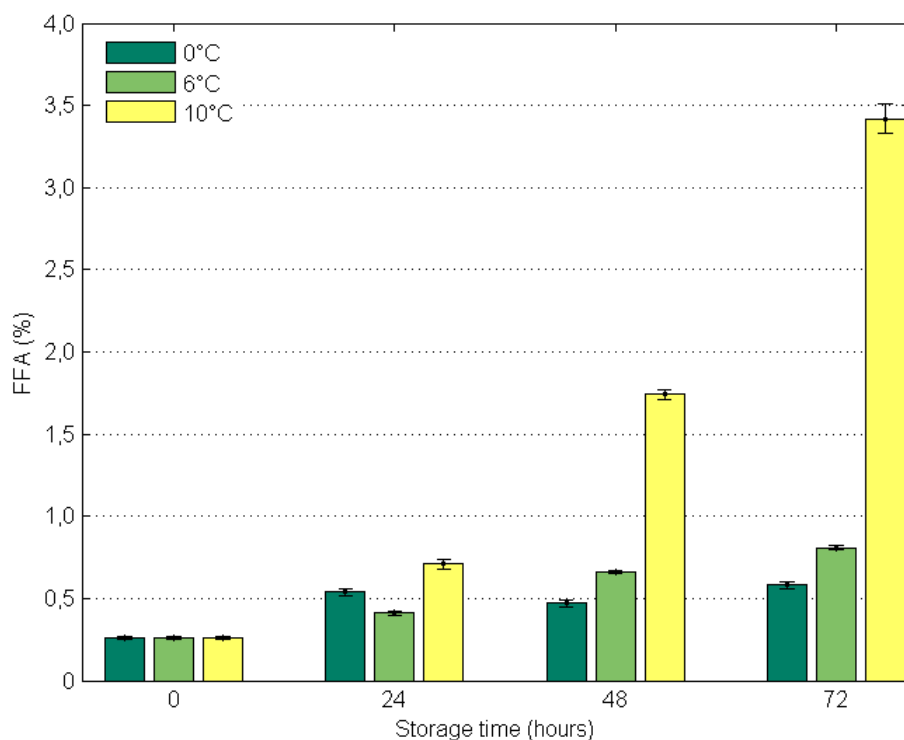


Figur 3-4: Produksjon av olje fra restråstoff ved varmebehandling

4 Resultater og diskusjon

4.1 Effekt av lagring på oljekvalitet

Hovedfokuset i prosjektet har vært å produsere olje fra ultraferskt råstoff (under 1 time etter produksjon) da kvalitet og ferskhet på råstoffet vil påvirke kvaliteten på oljen. Å videreforedle restråstoffet innen kort tid etter produksjon vil ikke alltid være en mulig løsning, og det vil i større grad være behov for å transportere råstoffet fra fileteringsanlegg til produksjonsanlegg. Det er derfor nyttig å undersøke hvordan kvaliteten på oljen påvirkes av lagringstid og temperatur på restråstoffet. Andel frie fettsyrer (%FFA), anisidin verdi (AV) og konjugerte diener (CD) ble målt i oljen produsert fra restråstoff lagret ved 0, 6 og 10 °C i 24, 48 og 72 timer. Resultatene er vist i **Figur 4-1**, **Figur 4-2** og **Figur 4-3**.

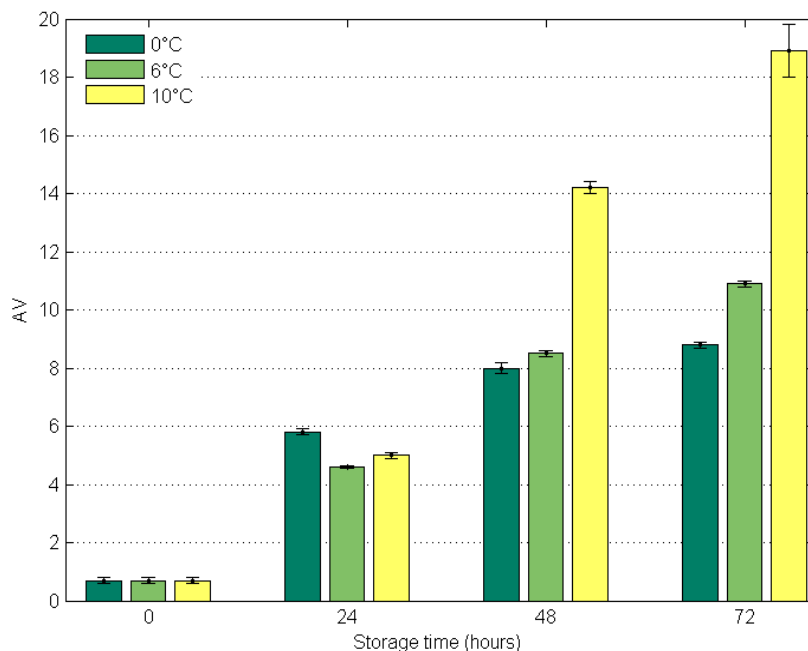


Figur 4-1: Andel frie fettsyrer (% FFA, uttrykt som oljesyre) i oljer produsert fra sildereastråstoff lagret ved 0, 6 og 10 °C i 24, 48 og 72 timer

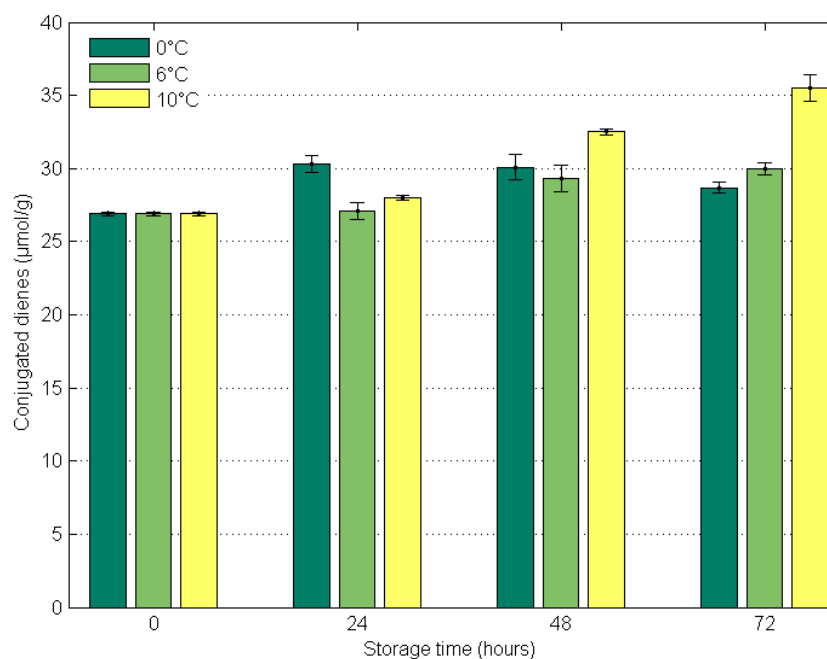
Forlenget lagringstid førte til økt andel frie fettsyrer i oljene som ble produsert fra restråstoff lagret ved 0, 6 og 10 °C. Lagring av restråstoffet ved 0 og 6 °C førte kun til en økning i % FFA fra 0,3 % (0 timer) til henholdsvis 0,6 og 0,8 % (72 timer). Selv etter lagring av råstoffet i 72 timer, så er FFA-verdiene i sildeoljene langt under verdiene rapportert for kommersielle råoljer til humant konsum (Bimbo, 2007). Tidligere lagringsstudier på sildereastråstoff (Nordsjøsild) ga en økning i FFA på 0,6 til 3,0 % ved lagring på 2 °C i 72 timer (Aidos et al., 2003). Lagring ved 10 °C førte til en økning i FFA fra 0,3 % til 3,4 %.

Anisidin verdien (AV) i oljene ble også påvirket av lagringstid og temperatur på restråstoffet (Error! Reference source not found.). AV i oljen produsert fra ferskt restråstoff (innen tre timer etter filletering) var 0,7. Lagring av restråstoffet i 24 timer førte til en AV > 4,5, hvor den høyeste verdien var for oljen produsert fra restråstoff lagret ved 0 °C. Restråstoff lagret i 72 timer ved 0, 6 og 10 C førte til AV på henholdsvis 9, 11 og 19. Oljene produsert i pilotskala fra ultraferskt

restråstoff hadde en AV > 1 (Carvajal et al., accepted), noe som viser at oksidasjonsstatusen til oljen påvirkes av lagringstiden og kvaliteten på restråstoffet.



Figur 4-2: Anisidin verdi (AV) i oljer produsert fra silderestråstoff lagret ved 0, 6 og 10 °C i 24, 48 og 72 timer



Figur 4-3: Konjugerte diener (CD) i oljer produsert fra silderestråstoff lagret ved 0, 6 og 10 °C i 24, 48 og 72 timer

Nivået av konjugerte diener (CD) i olje produsert direkte fra ferskt råstoff var 27 mmol/kg lipid. I dette forsøket er det ikke registrert særlig økning i nivået av CD fra restråstoff lagret ved 0 og 6 °C. Olje produsert fra restråstoffet lagret i 72 timer ved 10 °C førte derimot til en økning i CD fra 27 til 36 mmol/kg lipid.

4.2 Produksjon av sildeolje

4.2.1 Fettsyresammensetning

Sammensetningen til NVG-silda varierer gjennom fangstsesongen, noe som er forårsaket av sildas naturlige syklus, grad av kjønnsmodenhet og geografiske område (Slotte, 1999). NVG silda overvintre i perioden september til januar, mens gytevandringen er i perioden januar til april (Slotte and Fiksen, 2000). Silda beiter ikke i denne perioden, noe som påvirker sammensetningen til silda. Endringene i sildas sammensetning er hovedsakelig forårsaket av endring i fettinnholdet i silda gjennom fangstsesongen. Dette reflekteres også på sammensetningen av restråstoffet (Carvajal, 2013). En nedgang i fettinnhold fra 24 til 13 g fett/100 g restråstoff ble observert i perioden oktober til februar. Endringer i fettsyresammensetningen har også blitt observert. Innholdet av de langkjedede omega-3 fettsyrene sank fra 143 mg/g lipid (17 % av totale fettsyrer) til 94 mg/g lipid (11 % av totale fettsyrer).

Sildeolje fra ultraferskt restråstoff har blitt produsert ved bruk av det mobile produksjonsanlegget ved flere anledninger, også i samarbeid med EPAX (februar 2010, november 2010 og januar 2012). Forsøket som inngår i dette prosjektet ble gjennomført i januar 2012, det vil si i slutten av fangstsesongen til silda.

Fettsyresammensetningen i restråstoffet og oljen er gitt i **Tabell 4-1**.

Tabell 4-1: Fettsyresammensetning i silderestråstoff og sildeolje

	Restråstoff	Olje
Fettsyre	mg/g	mg/g
C14:0	68,9	75,5
C14:1	0,9	0,9
C16:0	122,6	116,1
C16:1 n 9	46,6	48,0
C16:1 n 7	2,8	2,6
C18:0	10,8	9,9
C18:1n9	100,8	104,1
C18:1n7	17,5	14,7
C18:2n6	12,0	12,7
C18:3n6	1,3	1,4
C18:3n3	8,8	9,1
c18:4n3	23,7	25,9
C20:0	1,6	1,8
C20:1n11	119,1	134,9
C20:1n9	3,1	2,7
C20:2n6	2,0	2,1
c20:3n6	0,6	0,6
C20:4n6	1,2	1,0
C20:3n3	1,3	1,0
c20:4n3	5,0	5,1
C20:5n3	65,4	59,6
C22:0	0,2	0,1
c22:1n11	176,8	192,3
C22:1n9	8,4	8,9
c22:5n3	6,1	5,9
C24:0	0,0	0,0
C22:6n3	79,1	52,7
C24:1n9	6,1	7,0
sum	892,9	896,5

Sum mettede fettsyrer	204	203
Sum monometede fettsyrer	481	515
Sum polyumettede fettsyrer	207	177
Sum Omega3 fettsyrer	189	159
Sum EPA/DHA/DPA	151	118

De monomettede fettsyrene er hovedgruppen av fettsyrer i silda og utgjør 54 og 57 % av totale fettsyrer i henholdsvis restråstoffet og oljen. Den høye andelen monomettede er karakteristisk for silda siden den beiter på zooplankton som er rik på voksester med de respektive fettsyrealkoholer.

Mengde langkjedede omega-3 fettsyrer (EPA, DHA og DPA) i restråstoffet og oljen var på 151 mg/g olje og 118 mg/g olje. Dette tilsvarer henholdsvis 17 og 13 %.

4.2.2 Oljekvalitet

Kvaliteten på råstoffet, samt prosessbetingelsene vil påvirke kvaliteten (oksidasjonsstatus) og stabiliteten til råoljen. Lav innhold av frie fettsyrer (%FFA), lav oksidasjonsstatus og høy stabilitet er egenskaper som er nødvendige for oljer som skal benyttes i kosttilskudd eller som ingrediens i næringsmidler. Kvaliteten på råoljen vil gi føringer for hvilke rensesregime som er nødvendig før oljen kan benyttes til humant konsum.

Kvaliteten på sildeoljen har blitt evaluert ved måling av følgende parametere: frie fettsyrer (% FFA), peroksidverdi (PV, primære oksidasjonsprodukter), anisidin verdi (AV, sekundære oksidasjonsprodukter), TOTOX – total oksidasjonsverdi (2PV + AV) og OSI-tid (Oxidative Stability Index). Resultatene er gitt i

Tabell 4-2.

Tabell 4-2: Evaluerte kvalitetsparametere for sildeoljen

Kvalitetsparametere	
Frie fettsyrer (% FFA, uttrykt som andel oljesyre)	0,23 %
Peroksidverdi (PV) (meq peroksid/kg olje)	2,6 ± 0,3 meq/kg
Anisidin verdi (AV)	1,3 ± 0,1
TOTOX (2PV + AV)	6,6
OSI (70 °C)	21,1 ± 0,1 timer

Andel frie fettsyrer i oljen var 0,23 % og er mye lavere enn verdier rapportert for kommersielle råoljer (2 – 5 %) (Bimbo, 2007). Dette er en indikasjon på at restråstoffet benyttet i produksjonen var av høy kvalitet.

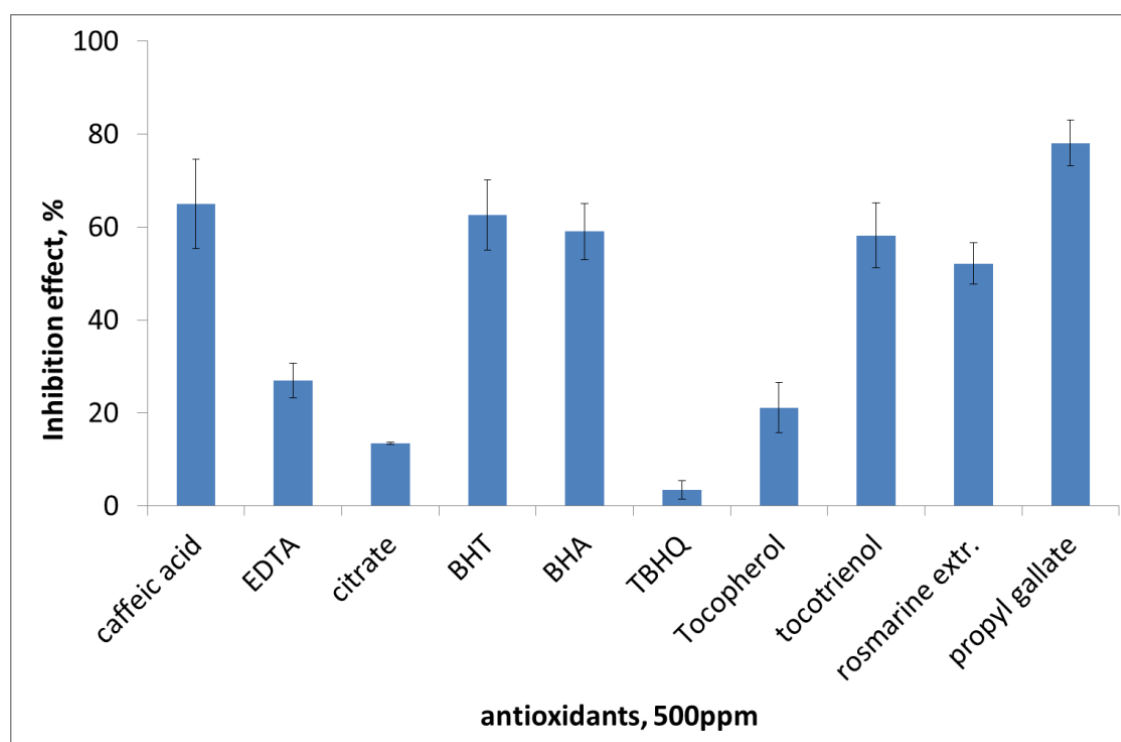
Råoljer benyttet til humant konsum har vanligvis en PV mellom 3 og 20 meq peroksider/kg lipid, mens AV ligger mellom 4 og 60 (Hamm, 2009). GOED (Global Organization for EPA and DHA omega-3s) krever at oljer (raffinerte) som skal benyttes til humant konsum ikke overstiger en PV på 5 meq peroksider/kg lipid (analysert ved bruk av AOAS Official Method Cd 8b-90) og en AV på 20 (analysert ved bruk av AOAS Official Method Cd 18-90). Sildeoljen produsert fra ferskt restråstoff

tilfredsstillere kravene for raffinerte fiskeoljer selv om oljen ikke har gjennomgått en renseprosess. Samtidig ligger oksidasjonsstatusen langt under de verdiene som er rapportert for kommersielle råoljer på markedet.

4.3 Bruk av antioksidanter i produksjon av sildeolje

4.3.1 Screening av antioksidanter

Evnen til å inhibere lipidoksidasjon i silderestråstoff (inhiberingseffekt) ble studert for ti ulike antioksidanter: koffeinsyre (caffeic acid), EDTA, sitrat, BHT, BHA, TBHQ, tocoferol, tocotrienol, rosmarin ekstrakt og propylgallat (PG). Inhiberingseffekten til antioksidantene er vist i **Figur 4-4**.



Figur 4-4: Inhiberingseffekten til ulike antioksidanter på oksidasjon av silderestråstoff

De testede antioksidantene hadde ulik evne til å inhibere oksidasjon i restråstoffet. Metallbinderne (chelatorne) EDTA og sitronsyre var mindre effektiv sammenlignet med fenolene som for eksempel BHT og BHA. Koffeinsyre har i tidligere studier av enkle modellsystemer (liposomer) vist seg å fungere som en prooksidant hvis jern er tilstede i testsystemet (Kristinová et al., 2009). Koffeinsyre var derimot en effektiv antioksidant i silderestråstoff og inhiberte oksidasjon med 65 %. Effekten av

koffeinsyre tyder på at metaller ikke er de fremste prooksidantene i restråstoffet, men at det er hemoglobin som katalyserer reaksjonen.

THBQ var den minst effektive antioksidanten blant fenolene som ble testet. TBHQ er hydrofilt og var ikke en effektiv scavenger når det kommer til å binde hydrofobe lipidradikaler. Dette er i samsvar med "polar paradoksen" som sier at hydrofobe antioksidanter er mer effektive i olje/vann systemer. Antioksidantene har ulik grad av hydrofobisitet, med BHT som den mest hydrofobe < BHA < TBHQ < PG. Både BHT, BHA, THBQ og PG er radikal scavengers, de reagerer med lipidradikaler og danner stabile komplekser. I tillegg så har PG evnen til å binde metaller. Selv om PG er hydrofil, var det den mest effektive antioksidanten og hadde en inhiberingseffekt på 78 ± 5 %. I tidligere studier med PG har det blitt observert at noe av PG fordelte seg oljen i en olje/vannsystem (Jacobsen et al., 1999; Medina et al., 2010). Dette kan forklare hvorfor PG likevel hindrer oksidasjon i restråstoff selv om antioksidanten er hydrofil.

Basert på resultatene fra screeningforsøket, antioksidantkostnader og tidligere erfaring gjort av bedriften, ble tre antioksidanter valgt ut for videre testing i pilotskala: BHT, PG og sitronsyre.

4.3.2 Produksjon av olje fra restråstoff tilsatt antioksidanter – pilotskala

Tre antioksidanter ble plukket ut for videre testing i pilotskala ut i fra resultatene fra screening-testen: butylated hydroksytoluen (BHT), propyl gallate (PG) og sitronsyre. BHT og PG var de to mest effektive antioksidanter for å hindre oksidasjon i silderrestråstoff. Sitronsyre som antioksidant har i tidligere studier blitt benyttet på råstoff fra laks, noe som har gitt positive resultater. EPAX var av den grunn interessert i å studere effekten av denne også på silderåstoff.

Peroksidverdi (PV) og anisidinverdi (AV) har blitt analysert for å evaluere oksidasjonsstatusen i oljen. Dette er benyttet til å bestemme den totale oksidasjonsverdien, TOTOX ($2PV + AV$).

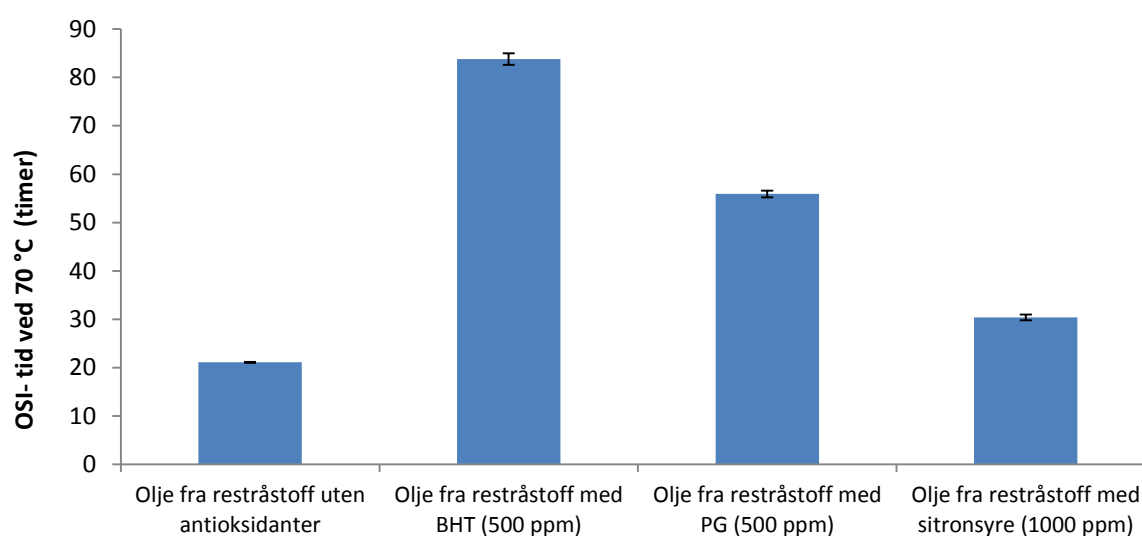
Resultatene er vist i **Tabell 4-3**. OSI (Oxidative Stability Index) har blitt benyttet som parameter for å evaluere oljestabiliteten, og disse resultatene er presentert i **Figur 4-5**.

Tabell 4-3: Oksidasjonsstatus på oljene produsert fra silderåstoff tilsatt antioksidanter (500 ppm BHT, 500 ppm PG eller 1000 ppm sitronsyre)

Oljer fra restråstoff	PV		AV		TOTOX (2PV + AV)	
		% I		% I		% I
Uten tilsatt antioksidant	2,6 ± 0,3		1,3 ± 0,1		6,6	
Tilsatt 500 ppm BHT	1,4 ± 0,3	47 %	1,1 ± 0,1	15 %	3,9	41 %
Tilsatt 500 ppm PG	0,7 ± 0,3	73 %	0,6 ± 0,1	57 %	1,9	71 %
Tilsatt 1000 ppm sitronsyre	2,1 ± 0,3	20 %	2,1 ± 0,1	- 64 %	6,4	3 %

Oksidasjonsstatusen til oljene produsert fra restråstoff med og uten antioksidant viser at tilsetning av antioksidanter tidlig i prosessen gir en olje med lavere oksidasjonsstatus. Alle de tre testede antioksidantene ga en olje med lavere TOTOX sammenlignet med oljen fra restråstoff uten tilsatt antioksidanter. Tilsetning av PG ga oljen med lavest oksidasjonsstatus og en inhiberingseffekt på 71 % på TOTOX. Bruk av BHT resulterte i en inhiberingseffekt på 41 %.

Tilsetning av antioksidanter til restråstoffet resulterte i oljer med høyere stabilitet sammenlignet med oljen produsert fra restråstoff uten tilsatt antioksidant. Oljen produsert fra restråstoff tilsatt BHT hadde den høyeste OSI-tiden, 84 timer. Restråstoff tilsatt PG ga en olje med OSI tid på 56 timer, mens sitronsyre resulterte i en olje med OSI tid på 30 timer.



Figur 4-5: Stabilitet (målt som OSI-tid ved 70 °C) til oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidanter (500 ppm BHT, 500 ppm PG eller 1000 ppm sitronsyre)

Stabiliteten på oljen vil påvirkes av mengde antioksidant i oljefraksjonen. Mengde BHT og PG i de ulike oljene, samt i de respektive graksene ble analysert og er gitt i **Tabell 4-4**.

Tabell 4-4: Antioksidantinnhold i oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidant (500 ppm BHT, 500 ppm PG eller 1000 ppm sitronsyre)

Oljer fra restråstoff	Konsentrasjon av antioksidanter i oljen (ppm)		Konsentrasjon av antioksidanter i graksen (ppm)	
	BHT	PG	BHT	PG
Uten tilsatt antioksidant	< 15	< 10	< 15	< 10
Tilsatt 500 ppm BHT	1560	< 10	1190	< 10
Tilsatt 500 ppm PG	260	45	45	2147
Tilsatt 1000 ppm sitronsyre	< 15	< 10	< 15	< 10

Oljen produsert fra restråstoff tilsatt BHT (500 ppm) inneholdte 1560 ppm BHT, mens oljen produsert fra restråstoff med PG (500 ppm) hadde 45 ppm PG og 260 ppm BHT. BHT ble ikke tilsatt sammen med PG, så rester av BHT var igjen i prosessutstyret under forsøkskjøringen med PG og endte opp i oljen.

Tilsetning av PG til restråstoffet førte til en inhiberingseffekt på 71 % på den totale oksidasjonen, men rester av BHT ble funnet i oljen (260 ppm). Det er derfor vanskelig å si om inhiberingseffekten er forårsaket av tilsetningen av PG eller om det er en synergieffekt mellom PG og BHT. Mengde antioksidanter i oljen vil også påvirke stabiliteten. Tilsats av BHT ga oljen med høyest stabilitet, men konsentrasjonen av antioksidanten i oljen var 1560 ppm og mye høyere enn de tillatte verdier for BHT i fiskeoljer til humant konsum (100 ppm) (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL DIRECTIVE No 95/2/EC, 1995).

4.3.3 Produksjon av sildeolje fra restråstoff tilsatt antioksidanter – labskala

Resultatene i kapittel 4.3.2 viste at rester av BHT ble funnet i oljen som ble produsert fra restråstoff tilsatt PG. Dette påvirket resultatet og det var ikke mulig å konkludere om det var PG som var årsaken til høy inhiberingseffekt, om det var en kombinasjonseffekt (synergieffekt) eller om det var på grunn av BHT som var tilstede i prosessutstyret.

For å få mer informasjon om hvordan antioksidantene fordelte seg i de ulike fraksjonene (olje, grakse og limvann), samt hvordan de påvirket oksidasjonsstatusen til oljen, ble det gjennomført et laboratorieforsøk. Resultatene er gitt i **Tabell 4-5**.

Tabell 4-5: Oksidasjonsstatus i oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidanter (200 ppm BHT, 500 ppm BHT, 200 ppm PG eller 500 ppm PG)

Oljer fra restråstoff	PV (meq peroksider/kg lipid)		AV		TOTOX	
		% I		% I		% I
Uten tilsatt antioksidant	6,7 ± 0,1		2,9 ± 0,1		16,2	
Tilsatt 200 ppm BHT	1,9 ± 0,1	71 %	1,9 ± 0,1	35 %	5,7	65 %
Tilsatt 500 ppm BHT	1,6 ± 0,3	76 %	1,2 ± 0,2	60 %	4,4	73 %
Tilsatt 200 ppm PG	4,5 ± 0,3	32 %	2,0 ± 0,1	32 %	11,0	32 %
Tilsatt 500 ppm PG	3,2 ± 0,3	51 %	1,4 ± 0,1	53 %	7,9	52 %

Tilsats av BHT eller PG før prosessering av restråstoffet førte til en reduksjon i lipidoksidasjon. BHT var den mest effektive i lab skala produksjonen, og tilsetning av 200 og 500 ppm til råstoffet førte til en reduksjon (inhibering, % I) av total oksidasjonen på henholdsvis 65 og 73 %. Antioksidanten hadde størst effekt på PV, henholdsvis 71 % (200 ppm) og 76 % (500 ppm) inhibering. Dette er i samsvar med egenskapene til BHT, som er å senke oksidasjonshastigheten og dannelsen av peroksider ved å reagere med dannede radikaler (Laguerre et al., 2007). Økning av antioksidantkonsentrasjonen fra 200 ppm til 500 ppm førte ikke til en dobling i inhiberingseffekten på hverken PV eller TOTOX, men det førte til en økning i % I fra 32 % til 60 % på AV.

Tilsats av PG til restråstoffet ga en reduksjon på total oksidasjonen på henholdsvis 32 % (200 ppm PG) og 52 % (500 ppm PG).

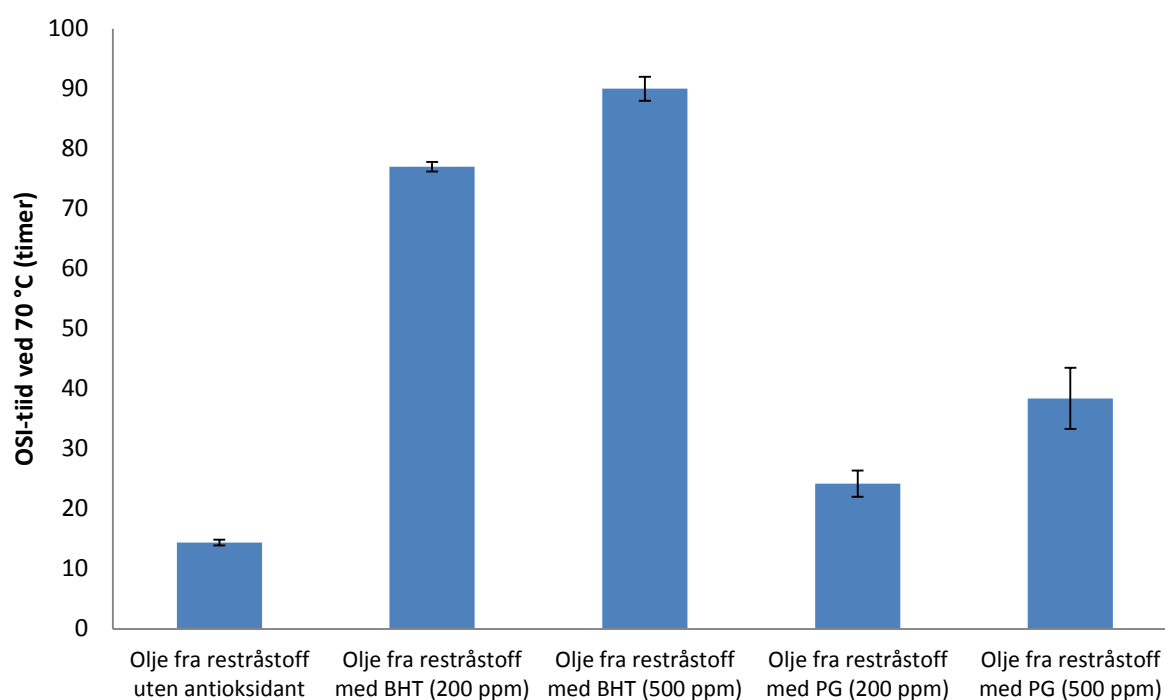
Tabell 4-6: Antioksidantinnhold i oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidant (200 ppm BHT, 500 ppm BHT, 200 ppm PG og 500 ppm PG)

Oljer fra restråstoff	Konsentrasjon av antioksidanter i oljen (ppm)		Konsentrasjon av antioksidanter i graksen (ppm)	
	BHT	PG	BHT	PG
Uten tilsatt antioksidant	< 15	< 10	< 15	< 10
Tilsatt 200 ppm BHT	1700	< 10	1341	< 10
Tilsatt 500 ppm BHT	2733	< 10	2151	< 10
Tilsatt 200 ppm PG	< 15	12	< 15	442
Tilsatt 500 ppm PG	< 15	48	< 15	1231

De fysikalske egenskapene til antioksidantene vil påvirke fordelingen av antioksidanten i de ulike fraksjonene (olje, limvann og grakse) (Tabell 4-6). Kun 12 og 48 ppm PG ble funnet i oljen

produsert fra restråstoff tilsatt henholdsvis 200 og 500 ppm PG. I oljen produsert fra restråstoff tilsatt BHT var konsentrasjonen 1341 og 2151 ppm for restråstoff med henholdsvis 200 og 500 ppm. Selv om det ble tilsatt like mengder av de to antioksidantene så hadde de ulik fordeling i fraksjonene, og forskjellig mengder ble funnet i oljen. Selv om kun 12 og 48 ppm PG endte opp i oljefraksjonen, så hadde antioksidanten effekt under produksjon og førte til en reduksjon i lipidoksidasjon.

Effekt av antioksidantene på stabiliteten til oljene ble vurdert, og er presentert i **Figur 4-6**.



Figur 4-6: Stabilitet (målt som OSI-tid ved 70 °C) til oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidanter (200 eller 500 ppm BHT, 200 eller 500 ppm PG)

Tilsetning av 200 eller 500 ppm BHT ga en OSI-tid på henholdsvis 77 og 90 timer. Oljene produsert fra restråstoff tilsatt PG hadde en OSI-tid på 24 (200 ppm) og 38 timer. Det er vanskelig å konkludere med at BHT er mer effektiv enn PG når det kommer til å redusere oksidasjon under lagring siden konsentrasjonen av antioksidantene i oljen er forskjellig. Kun 12 og 48 ppm PG endte opp i oljen, mens innholdet av BHT var 10 ganger høyere. Likevel så hadde PG en signifikant effekt på oljestabiliteten.

4.3.3.1 Bruk av lavere antioksidantkonsentrasjoner

Tillatte mengder BHT i fiskeolje til humant konsum er 100 ppm (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL DIRECTIVE No 95/2/EC, 1995). Oljene produsert i dette prosjektet er råoljer som må renses før dem kan benyttes som kosttilskudd eller ingrediens i matvarer. Et av rensetrinnene som benyttes er deodorisering og det har blitt beregnet at opp til 2800 ppm kan fjernes under deodorisering hvis det i snitt er rundt 1000 ppm BHT i oljen (Carvajal et al., submitted). Det var likevel ønskelig å se om det er mulig å redusere konsentrasjonen av BHT som tilsettes til råstoffet da det vil påvirke produksjonskostnadene.

Oksidasjonsstatusen for olje fra restråstoff tilsatt 20 ppm BHT, 40 ppm BHT, 10 ppm BHT og 10 ppm PG, eller 20 ppm BHT og 20 ppm PG er gitt i **Tabell 4-7**. Innholdet av antioksidantene i oljen er gitt i

Tabell 4-8.

Tabell 4-7: Oksidasjonsstatus på oljene produsert fra silderåstoff tilsatt antioksidanter (20 ppm BHT, 40 ppm BHT, 10 ppm BHT og 10 ppm PG eller 20 ppm BHT og 20 ppm PG)

Oljer fra restråstoff	PV (meq peroksider/kg lipid)		AV		TOTOX	
		% I		% I		% I
Uten tilsatt antioksidant	5,7 ± 0,3		2,0 ± 0,3		13,4	
Tilsatt 20 ppm BHT	3,4 ± 0,2	41 %	1,5 ± 0,3	26 %	8,2	39 %
Tilsatt 40 ppm BHT	2,7 ± 0,1	53 %	1,7 ± 0,4	15 %	7,1	47 %
Tilsatt 10 ppm BHT + 10 ppm PG	5,0 ± 0,2	12 %	1,2 ± 0,3	42 %	11,2	17 %
Tilsatt 20 ppm BHT + 20 ppm PG	3,8 ± 0,1	54 %	0,8 ± 0,3	46 %	8,4	53 %

Tilsetning av 20 eller 40 ppm BHT hadde en inhiberingseffekt på henholdsvis 39 og 47 %. Størst effekt var på PV med en reduksjon på 41 og 53 %. BHT oppkonsentreres i oljen og tilsetning av 20 og 40 ppm ga henholdsvis 107 og 247 ppm i oljen.

En blanding av BHT og PG ble testet for å studere kombinasjonseffekten av antioksidantene. Tilsetning av 10 eller 20 ppm av begge antioksidantene resulterte i en inhiberingseffekt på 17 og 53 %.

Tabell 4-8: Antioksidantinnhold i oljer produsert fra restråstoff tilsatt antioksidant (20 ppm BHT, 40 ppm BHT, 10 ppm BHT og 10 ppm PG, 20 ppm BHT og 20 ppm PG)

Oljer fra restråstoff	Konsentrasjon av antioksidanter i oljen (ppm)		Konsentrasjon av antioksidanter i graksen (ppm)	
	BHT	PG	BHT	PG
Uten tilsatt antioksidant	< 15	< 10	< 15	< 10
Tilsatt 20 ppm BHT	107	< 10	77	< 10
Tilsatt 40 ppm BHT	247	< 10	153	< 10
Tilsatt 10 ppm BHT + 10 ppm PG	77	< 10	40	< 10
Tilsatt 20 ppm BHT + 20 ppm PG	141	< 10	121	23

4.4 Utnyttelse av fosfolipider fra grakse

4.4.1 Ekstraksjon av fosfolipider fra grakse

Grakse produsert fra restråstoff med og uten tilsatt antioksidant i pilotforsøket 17.01.2012 ble brukt som råstoff for ekstraksjon av fosfolipider. Etanolekstraksjon av fosfolipider fra graksen ga et utbytte på 80 % av totalt fett i frysetørket grakse (**Tabell 4-9**). Tilsetning av antioksidant påvirker ikke utbytte av etanol ekstraherte fosfolipider.

Tabell 4-9: Lipidinnhold i grakse, samt ekstraksjonsutbyttet av etanolløselige lipider

Grakse	Mengde lipider ekstrahert ved bruk av etanol (g) fra 100 g frysetørket grakse		
	Mengde lipider i frysetørket grakse (g/100g)	Mengde lipider ekstrahert ved bruk av etanol (g) fra 100 g frysetørket grakse	Utbytte(%)
grakse PP-C	13,7	11,3	82,4
grakse PP-500PG	15,6	12,8	81,7
grakse PP-500BHT	16,6	13,3	80,2
grakse L1-C	31,9	18,6	58,4
grakse L1-20BHT	30,4	19,0	62,6
grakse L1-40BHT	30,1	20,9	69,5
grakse L1-10BHT10PG	32,4	20,5	63,2
grakse L2-C	27,2	24,3	89,1
grakse L2-20BHT20PG	28,1	25,0	88,9

grakse PPC: grakse fra restråstoff uten tilsatt antioksidant (pilotforsøk), **grakse PP-500PG:** grakse fra restråstoff tilsatt 500 ppm PG (pilotforsøk), **grakse PP-500BHT:** grakse fra restråstoff tilsatt 500 ppm BHT (pilotforsøk), **grakse L1-C og L2-C:** grakse fra restråstoff uten tilsetning av antioksidanter (labforsøk, L1-labforsøk 1, L2-labforsøk 2), **grakse L1-20BHT:** grakse fra restråstoff tilsatt 20 ppm BHT (labforsøk), **grakse L1-40BHT:** grakse fra restråstoff tilsatt 40 ppm BHT (labforsøk), **grakse L1-10BHT10PG:** grakse fra restråstoff tilsatt 10 ppm BHT og 10 ppm PG, **grakse L2-20BHT20PG:** grakse fra restråstoff tilsatt 20 ppm BHT og 20 ppm PG

4.4.2 Oksidasjonsstatus på fosfolipider ekstrahert fra grakse

Oksidasjonsstatusen på fosfolipidene ekstrahert fra grakse ble analysert ved måling av konjugerte diener (CD) og TBARs. Resultatene er gitt i **Tabell 4-10**.

Tabell 4-10: Oksidasjonsstatus, målt som konjugerte diener (CD), peroksidverdi (PV) og TBARS, til fosfolipider ekstrahert fra grakse

Prøve	CD	TBARS
ekstrakt PP-C	2,6	3,6
ekstrakt PP-500PG	1,3	0,3
ekstrakt PP-500BHT	1,3	1,6
ekstrakt L1-C	2,7	2,4
ekstrakt L1-20BHT	2,2	2,3
ekstrakt L1-40BHT	2,1	2,0
ekstrakt L1-10BHT10PG	2,3	3,1
ekstrakt L2-C	1,4	0,4
ekstrakt L2-20BHT20PG	1,3	0,3

ekstrakt PP-C: fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff uten tilsatt antioksidant (pilotforsøk), **ekstrakt PP-500PG:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 500 ppm PG (pilotforsøk), **ekstrakt PP-500BHT:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 500 ppm BHT (pilotforsøk), **ekstrakt L1-C og L2-C:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff uten tilsatt antioksidanter (labforsøk, L1-labforsøk 1, L2-labforsøk 2), **ekstrakt L1-20BHT:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 20 ppm BHT (labforsøk), **ekstrakt L1-40BHT:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 40 ppm BHT (labforsøk), **ekstrakt L1-10BHT10PG:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 10 ppm BHT og 10 ppm PG, **ekstrakt L2-20BHT20PG:** fosfolipidekstrakt fra grakse fra restråstoff tilsatt 20 ppm BHT og 20 ppm PG

De målte verdiene for CD og TBARS i fosfolipidekstraktene viste at fosfolipider ekstrahert fra grakse produsert fra restråstoff tilsatt antioksidanter hadde lavere oksidasjonsstatus sammenlignet med fosfolipider fra restråstoff uten tilsatt antioksidanter. Dette tyder på at tilsetning av antioksidanter til restråstoffet før videre prosessering også beskytter lipidene som ender opp i graksefraksjonen. Resultatet er fosfolipider med bedre kvalitet.

5 Konklusjon

Restråstoff fra sild kan benyttes til å produsere olje av god kvalitet som kan benyttes i produkter til humant konsum. Oljen hadde lav oksidasjonsstatus ($PV = 2,6$ meq/kg lipid, $AV = 1,3$), verdier som ligger langt under verdiene som er rapportert for kommersielle råolje på markedet. I tillegg tilfredstilte oljene kravene for raffinerte fiskeoljer selv om oljen ikke hadde gjennomgått en renseprosess.

Antioksidanter blir tilsatt til råoljen etter produksjon for å øke stabiliteten. I midlertid kan oksidasjon forekomme under produksjon av oljen. Tilsetning av antioksidanten til råstoffet før prosessering kan være en strategi for å redusere oksidasjon under prosessering og lage en olje med lav oksidasjonsstatus og høy stabilitet.

Tilsats av antioksidanter (BHT, propyl gallat eller sitronsyre) til råstoffet før oljeproduksjon resulterte i en olje med redusert oksidasjonsstatus (opptil 70 % reduksjon i total oksidasjon), samt økt oljestabilitet.

6 Referanser

- Aidos, I., A. Van Der Padt, et al. (2003). "Quality of Crude Fish Oil Extracted from Herring Byproducts of Varying States of Freshness." Journal of Food Science **68**(2): 458-465.
- Bimbo, A. P. (2007). Processing of marine oils. Long-Chain Omega-3 speciality oils. H. Breivik. Bridgewater, England, The Oily Press. **21**.
- Carvajal, A. K. (2013). Utilization of by-products from Norwegian spring spawning herring for human consumption. Department of Biotechnology. Trondheim, The Norwegian University of Science and Technology. **PhD**.
- Carvajal, A. K., R. Mozuraityte, et al. (submitted). "Antioxidants in fish oil production for improved quality." Journal of the American Oil Chemists' Society.
- Carvajal, A. K., R. Slizyte, et al. (accepted). "Production of high quality fish oil by thermal treatment and enzymatic hydrolysis from fresh Norwegian spring spawning herring by-products." Journal of Aquatic Food Product Technology.
- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL DIRECTIVE No 95/2/EC (1995). "EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL DIRECTIVE No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners." Official Journal of the European Communities L 61: 1-40.
- Hamm, W. (2009). Processing of Fish Oil. Fish Oils. B. Rossell, Blackwell Publishing Ltd: 81-98.
- Jacobsen, C., K. Schwarz, et al. (1999). "Partitioning of Selected Antioxidants in Mayonnaise." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(9): 3601-3610.
- Kristinová, V., R. Mozuraityte, et al. (2009). "Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(21): 10377-10385.
- Laguerre, M., J. Lecomte, et al. (2007). "Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges." Progress in Lipid Research **46**(5): 244-282.
- Medina, I., D. Alcántara, et al. (2010). "Antioxidant Activity of Resveratrol in Several Fish Lipid Matrices: Effect of Acylation and Glucosylation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(17): 9778-9786.
- Slotte, A. (1999). "Differential utilization of energy during wintering and spawning migration in Norwegian spring-spawning herring." Journal of Fish Biology **54**(2): 338-355.
- Slotte, A. and Ø. Fiksen (2000). "State-dependent spawning migration in Norwegian spring-spawning herring." Journal of Fish Biology **56**(1): 138-162.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no