



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Biokjemiske egenskaper og kitininnhold i skallfraksjoner fra bioraffinering av raudåte (*Calanus finmarchicus*)

Britt-Nora Alvheim

*Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)
Mai 2019*



Biokjemiske egenskaper og kitininnhold i skallfraksjoner fra bioraffinering av raudåte (*Calanus finmarchicus*)

Britt-Nora Alvheim

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Norges fiskerihøgskole

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

UiT, Norges arktiske universitet

og

Calanus AS

Tromsø

Mai 2019



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole (NFH) Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE) ved Universitetet i Tromsø (UiT). Oppgaven ble utført i samarbeid med bedriften Calanus AS. Takk til Alice Marie Pedersen og Calanus AS for spennende problemstillinger, samt god veiledning og kunnskap.

Jeg vil starte med å takke min hovedveileder Ida-Johanne Jensen for god hjelp og oppfølging under hele prosessen. Din hjelpsomhet, tid og ditt engasjement har vært uvurderlig. Takk til biveiledere Karl-Erik Eilertsen fra NFH og Alice Marie Pedersen fra Calanus AS. Dere har vært til stor hjelp under denne prosessen, og jeg har lært så mye av dere. Jeg vil også takke Isak Bøgwald fra Calanus AS, som har svart på spørsmål og ellers har vært veldig behjelpelig.

Takk til Guro Kristine Edvinsen, Lars Dalheim og Carina H. Otnæs for god veiledning og assistanse på lab. Jeg setter veldig pris all tid dere har brukt på meg. Takk til Ragnar L. Olsen som lånte bort kontoret sitt under hans forskningstermin i Roma, slik at jeg og min studiekamerat Martin fikk en fin plass å sitte. Jeg vil også rette en stor takk til hele sjømatgruppa for å ha tatt meg så godt imot, og hjulpet til med stort og smått.

Til min kjære samboer Ørjan som har holdt ut med meg i krevende eksamensperioder og under arbeidet med masteroppgaven. Tusen takk for at du er den du er. Til min kjære familie som alltid har støttet meg og kommet med gode tips og råd. Takk til mine gode venner som bestandig har heiet på meg. Takk til alle mine studiekamerater for en fin studietid.

Britt-Nora Alvheim

Tromsø, mai 2019

Sammendrag

Høsting lengre ned i de trofiske nivåene etter arter som er lite utnyttet, slik som raudåte (*Calanus finmarchicus*), er foreslått som et tiltak for mer bærekraftig utnyttelse av ressursene i havet. Raudåte inneholder viktige næringsstoffer som lipider, proteiner og kitin. Artens lave plassering i næringskjeden sammen med en kort ettårig livssyklus gjør bioakkumuleringen av tungt nedbrytbare miljøgifter svært lav i raudåta. Firmaet Calanus AS høster og prosesserer raudåta, og det lages tre produkter av råstoffet: Calanus® Oil, en hydrolysert proteinfase (Calanus® Hydrolysate) og en skallfraksjon (Calanus® Powder). Bedriften arbeider med utvikling og optimalisering av raffineringstrinn med sitronsyrevask i prosessering av skallfraksjonen for å forbedre og optimalisere produktet, samt å minimalisere innholdet av mineraler og metaller. Hensikten med oppgaven var å karakterisere den biokjemiske sammensetningen, fettsyresammensetningen og å bestemme kitininnholdet i skallfraksjonene før og etter sitronsyrevask. Fire skallfraksjoner ble undersøkt. Standardprotokollene som ble benyttet på de våte skallfraksjonene 1 og 2 var: væske-tørrstoffratio (V/TS) 12 ml/g, 0,12 M syrekonsentrasjon, behandlingstid på 2 timer og varmebehandling ved 80 °C i vannbad. Effektene av å variere parameterne: V/TS (6, 9 og 12 ml/g), syrekonsentrasjon (0,0 M, 0,06 M eller 0,18 M) og behandlingstid (1 t) ble undersøkt. De tørkede skallfraksjonene var vasket med en behandlingstid på en time ved 60 °C (inkubator ved 150 rpm.) med en V/TS på 12 ml/g og syrekonsentrasjon på enten 0,06 eller 0,12 M. Næringsinnholdet i skallfraksjonene ble undersøkt før og etter vask og effektene av de ulike vaskebetingelsene ble sammenlignet.

Resultatene viste at næringsinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 2 skilte seg fra de andre skallfraksjonene ved å ha et høyt innhold av aske. Den generelle trenden var at sitronsyrevask resulterte i et betraktelig lavere innhold av aske og et høyere innhold av fett i skallfraksjonene. Videre økte det relative proteininnholdet stort sett i skallfraksjonene og mengden TAA og EAA ble oppkonsentrert. Fettsyresammensetningen ble lite påvirket av sitronsyrevask, men kitininnholdet ble påvirket i varierende grad. Det kan se ut som at syrevask hadde større effekt i seg selv og at endring av de ulike vaskeparameterne hadde mindre effekt. Det er derfor vanskelig å konkludere med hvilken behandling som gir best effekt, men for næringsinnholdet ser alle betingelsene ut til å kunne gi et godt produkt. Det må her også tas hensyn til reduksjon av eventuelle uønskede komponenter etter syrevask. Skallfraksjonene kan anvendes videre innen fôrindustri og til andre næringsrike produkter etter at de har vært gjennom et vasketrinn med 0,06 eller 0,12 M sitronsyre. En viktig observasjon er at variasjon i biokjemisk sammensetning av råstoffet hadde stor innvirkning på sluttresultatet.

Summary

Harvesting unexploited species at lower trophic levels, such as copepods (*Calanus finmarchicus*), is suggested as an action to obtain more sustainable utilization of the resources in the sea. Copepods contain important nutrients such as lipids, proteins and chitin. The low trophic level of the species in addition to a short one-year life cycle makes the bioaccumulation of pollutants very low. Calanus AS is harvesting and processing raw materials, and produces three products: Calanus® Oil, a protein hydrolysate (Calanus® Hydrolysate) and a shell fraction (Calanus® Powder). The company is developing and optimizing refining steps with a citric acid-wash, to improve and optimize the product, as well as minimizing the content of minerals and metals. The aim of this thesis has been to characterize the biochemical properties, fatty acid composition and to determine the chitin content of the shell fractions before and after a wash with citric acid. Four shell fractions were examined. The standard protocols of the treatment of shell fraction 1 and 2 was: liquid-dry matter ratios (V/TS) 12 ml/g, 0.12 M citric acid, 2-hour treatment time and 80 °C heat treatment in water bath. Effects of the various parameters were investigated: V/TS (6, 9 and 12 ml/g), acid concentration (0.0 M, 0.06 M or 0.18 M) and treatment time (1 h). For the dried shell fractions a treatment time of one hour at 60 °C (incubator at 150 rpm) with a V/TS of 12 ml/g and varying acid concentration of 0.06 and 0.12 M was used. The effect the various parameters on the nutrient content of the shell fraction was examined.

Nutrient content of shell fraction 2 differed from the other fractions due to its high ash content. The general trend showed that citric acid-wash resulted in a significantly lower ash content and a higher fat content in the shell fractions. Furthermore, the relative protein content increased in the shell fractions and the amount of TAA and EAA was concentrated. The fatty acid composition was not affected by citric acid wash, but the chitin content was affected in varying degrees. It may seem that acid-wash had a greater effect in itself and the change of the different washing parameters had less effect. It is therefore difficult to conclude on the best treatment. Regarding nutrient contents all protocols appear to result in a high-quality product. The reduction of unwanted components must, however, also be considered. The shell fractions can be used in feed industry and in nutritional products also after wash treatment with 0.06 or 0.12 M citric acid. Finally, it should be emphasized that variation in biochemical composition of the raw material greatly influenced the results.

Forkortelser

AA	Aminosyrer
C1-C6	Kopeodittstadier 1-6
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre
DPA	Dokosapentaensyre
EAA	Essensielle aminosyrer
EPA	Eikosapentaensyre
HCl	Saltsyre
IS	Internstandard
MeOH	Metanol
NaCl	Natriumklorid
N1-N6	Naupliestadier 1-6
N ₂ -gass	Nitrogengass
PUFA	Flerumettet fettsyre
PUFA n-3	Flerumettede omega-3 fettsyrer
RT	Romtemperatur
SDA	Stearidonsyre
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SFA	Mettede fettsyrer
TAA	Totale aminosyrer
TAG	Triacylglycerol (triglyserid)
TS	Tørrstoffbasis
V/TS	Væske-tørrstoffratio

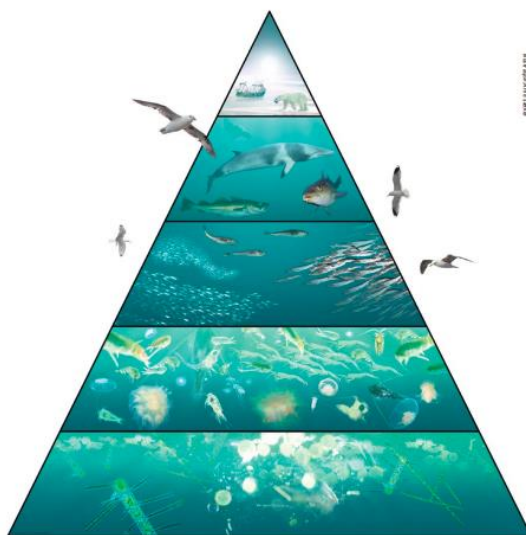
Innholdsfortegnelse

Forord	IV
Sammendrag	VI
Summary	VII
Forkortelser	VIII
1 Innledning	1
2 Bakgrunn	4
2.1 <i>Calanus finmarchicus</i>	4
2.2 <i>Bioøkonomi – bærekraftig utnyttelse av biologiske ressurser</i>	7
2.3 <i>Biokjemisk sammensetning av C. finmarchicus</i>	9
2.3.1 <i>Lipid- og fettsyresammensetning hos C. finmarchicus</i>	9
2.3.1 <i>Proteiner og aminosyresammensetning i C. finmarchicus</i>	11
2.3.2 <i>Kitin og andre komponenter i C. finmarchicus</i>	12
3 Materialer og metoder	13
3.1 <i>Råmateriale</i>	13
3.2 <i>Forsøksdesign våte skallfraksjoner</i>	13
3.3 <i>Forsøksdesign tørkede skallfraksjoner</i>	15
3.4 <i>Metoder</i>	16
3.4.1 <i>Bestemmelse av fettinnhold ved hjelp av fettekstraksjon</i>	16
3.4.2 <i>Metylering før analyse av fettsyreprofil</i>	16
3.4.3 <i>Analyse av fettsyresammensetning ved gasskromatografi</i>	17
3.4.4 <i>Bestemmelse av vann- og askeinnhold</i>	17
3.4.5 <i>Analyse av totale aminosyrer med aminosyreanalysator</i>	18
3.4.6 <i>Bestemmelse av proteinbånd med SDS-PAGE</i>	19
3.4.7 <i>Kitinekstraksjon ved base og syre</i>	19
4 Resultater	20
4.1 <i>Biokjemisk sammensetning av råmaterialene som ble brukt</i>	20
4.2 <i>Effekt av endring av væske/tørrestoffratio</i>	20
4.2.1 <i>Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike V/TS</i>	20
4.2.2 <i>Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av V/TS</i>	22
4.2.3 <i>Totale aminosyrer påvirkes av endring av V/TS</i>	25
4.3 <i>Effekt av endring av sitronsyrekonsentrasjon</i>	28
4.3.1 <i>Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike sitronsyrekonsentrasjoner</i>	28
4.3.2 <i>Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon</i>	30
4.3.3 <i>Totale aminosyrer påvirkes av endring av sitronsyrekonsentrasjon</i>	33
4.4 <i>Effekt av behandlingstid</i>	36
4.4.1 <i>Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter endret behandlingstid</i>	36
4.4.2 <i>Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av behandlingstid</i>	37
4.4.3 <i>Totale aminosyrer påvirkes av endring av behandlingstid</i>	40
4.5 <i>Effekt ved endring av sitronsyrekonsentrasjon hos tørkede skallfraksjoner</i>	42
4.5.1 <i>Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike sitronsyrekonsentrasjoner</i>	42
4.5.2 <i>Fettekstraksjon påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon</i>	44

4.5.3	Totale aminosyrer påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon.....	46
4.6	Bestemmelse av proteinband med SDS-PAGE.....	48
5	Diskusjon	50
6	Konklusjon.....	57
Referanser		58

1 Innledning

Verdens fiskerier fangster per i dag hovedsakelig i øvre del av næringskjeden, og presset på mange av artene i disse fiskeriene er stort. I EU-rapporten «Food from the oceans» (Bujnicki, 2017) diskuteres det hvordan vi kan høste mer bærekraftig av ressursene som finnes i havet. Det er på verdensbasis økende behov for næringsrike matkilder til en befolkning i vekst. Det vil være utfordrende å produsere nok mat til en verdensbefolkning som er estimert å nå 9 milliarder mennesker innen 2050 (FAO, 2018). For å møte behovet og samtidig høste bærekraftig, er et tiltak som foreslås å høste lengre ned i trofisk nivå etter uutnyttede arter som planteetere og alger (Figur 1). Disse artene har et stort potensial og er dokumentert å produsere store biomasser og kan gi opphav til næringsrike produkter. (Bujnicki, 2017). Utnyttelse av underutnyttede marine ressurser som krepsdyr, dyreplankton og alger kan trolig senke presset på fiskeriene i den øvre delen av næringskjeden (Olsen, 2011). Raudåte eller *Calanus finmarchicus* er et eksempel på en lite utnyttet art på lavt trofisk nivå.



Figur 1. Det pelagiske systemet i Barentshavet systematisert etter trofisk nivå. Nederst er planteplankton, deretter dyreplankton, i midten er større dyreplankton, fiskeyngel, sild og torsk. Nest øverst er større rovfisk, sel, bardehval og sjøfugl, øverst er spekkhogger og isbjørn representert. Den største produksjonen er på bunnen, og den laveste produksjonen er på toppen av pyramiden, hvor det tradisjonelt høstes mest. Bildet er en illustrasjon av Arild Sæther og er hentet fra havforskningsinstituttets rapport, 2015 (Bakketeig, 2015).

C. finmarchicus (raudåte) er et dyreplankton og en art av hoppekreps i ordenen calanoider (Broms, 2016). I de nordlige havområdene er det en årlig produksjon av *Calanus*-arter på ca. 300 millioner tonn, der raudåte er den dominerende arten (Fiskeridirektoratet, 2016; Skjoldal

et al., 2004). Raudåte er en del av det komplekse næringsnett i det marine miljøet og har en nøkkelrolle i næringskjeden mellom primærprodusenter og organismer i høyere trofiske nivåer slik som sild, laks og torskelarver (Falk-Petersen *et al.*, 2009; Skjoldal *et al.*, 2004). Raudåte inneholder lipider, proteiner, kitin og antioksidanter (karotenoider), og det økonomiske potensialet for arten er derfor stort (Maria Bergvik *et al.*, 2012b; Eysteinnsson *et al.*, 2018). Artens lave nivå i næringskjeden, og en kort ettårig livssyklus, gjør bioakkumulasjon av tungt nedbrytbare miljøgifter som dioksiner og PCB svært lav (Grimaldo *et al.*, 2011; Mizukawa *et al.*, 2009).

Raudåte blir høstet i sommerhalvåret når de holder seg høyt i havoverflaten. Høstingen har siden 2003 vært drevet i henhold til en forsøksstillatelse på raudåte tildelt Calanus AS. I 2016 ble det foreslått en totalkvote av raudåte på 165 000 tonn (Fiskeridirektoratet, 2016) og tidligere i år ble det åpnet for kommersiell høsting av arten med en kvote på 254 000 tonn ut året (Regjeringen, 2019).

Calanus AS har utviklet hele verdikjeden ved at de utfører alle operasjoner fra fangst av raudåte til salg og distribusjon av kosttilskudd. Produksjon av kosttilskudd basert på raudåte drives ved industriell bioraffinering for å utvinne Calanus® Oil fra raudåta. Det lages tre produkter under denne prosesseringen av råstoffet: Calanus® Oil, en hydrolysert proteinfase (Calanus® Hydrolysate) og en skallfraksjon (Calanus® Powder). Calanus® Oil er rik på voksestere, omega-3 fettsyrer og astaxhantin, som bidrar til å holde oljen stabil og tillegger den ekstra egenskaper. Calanus® Hydrolysate er et proteinekstrakt i væskeform som er utvunnet ved enzymatisk hydrolyse av raudåta, og brukes som smaksforsterker i marint fôr og til kjæledyr. Skallfraksjonen selges i dag i tørket form og brukes som fôrtilskudd innen akvakultur og dyrefôr. Bedriften arbeider kontinuerlig med utvikling av raffineringstrinn i produksjonen av skallfraksjonen for å forbedre og optimalisere produktet.

Formålet med raffineringen benyttet på materialet i denne oppgaven var å redusere innholdet av uønskede komponenter med bruk av enkle behandlingsmetoder. Men for å øke lønnsomheten i produksjonen er det avgjørende at denne raffineringen ikke fjerner noen av de ønskede «verdifulle» komponentene i skallfraksjonen. Det er derfor nødvendig å undersøke om raffineringprosessen påvirker næringsinnholdet i skallfraksjonen. De viktigste komponentene som inngår i skallfraksjonen er proteiner og lipider. Innholdet av kitin i skallfraksjonen, er også av interesse siden kitin-deriverte produkter er dokumentert å ha mange funksjonelle egenskaper, deriblant funksjon som prebiotika og antimikrobielle egenskaper (Rinaudo, 2006).

Målet med oppgaven var å karakterisere næringsinnholdet i et utvalg skallfraksjoner av *calanus finmarchicus*, før og etter raffinering med sitronsyrevask med ulike parametere, for å evaluere dette raffineringstrinnet.

Delmål:

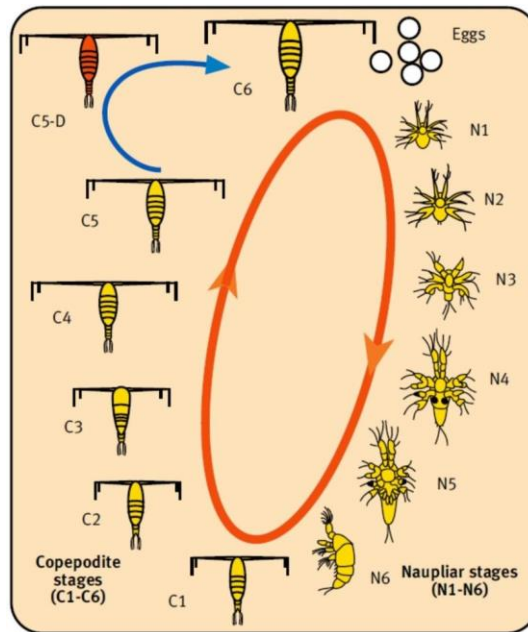
- Undersøke biokjemisk sammensetning før og etter raffineringstrinn
- Se på fettsyresammensetningen i fett ekstrahert fra skallfraksjon
- Bestemme kitininnholdet i skallfraksjonene

2 Bakgrunn

2.1 *Calanus finmarchicus*

I norske og arktiske farvann eksisterer fire arter av *Calanus*; *C. finmarchicus* (raudåte), *C. helgolandicus*, *C. glacialis* og *C. hyperboreus*. Disse artene er de viktigste biomassene i disse farvannene. Som tidligere nevnt er de dokumentert å ha en årlig biomasseproduksjon på ca. 300 millioner tonn, hvor raudåte er den dominerende arten blant disse i Norskehavet (Fiskeridirektoratet, 2016). Raudåte har en nordlig utbredelse og føres med havstrømmene inn i Barentshavet, Norskehavet og nærliggende fjorder, hvor arten spiller en nøkkelrolle i de marine økosystemene. Raudåta dominerer disse miljøene sammen med mesoplankton og er et viktig bindeledd mellom primærprodusenter til arter av høyere trofisk nivå (Melle *et al.*, 2014). Arten har stor betydning i næringskjeden som mat og startføde for mange fiskearter. Fordi raudåta er sekundærprodusent og livnærer seg av planteplankton fra bunnen av næringskjeden, er den rik på flerumettede omega-3 fettsyrer (Eysteinnsson *et al.*, 2018).

Livssyklusen til raudåte er ettårig, og følger oppblomstringen av planteplankton som den livnærer seg av. Livssyklusen har tolv utviklingsstadier, fra egg til voksen kjønnsmoden (Figur 2). Raudåta klekkes som naupliilarver, utvikles gjennom seks naupliistadier (N1-N6), og seks kopepodittstadier (C1-C6) og blir kjønnsmoden ved stadium C6 (Falk-Petersen *et al.*, 2009; Fiskeridirektoratet, 2016). Ferdigutviklet i kjønnsmodent stadium oppnår raudåta en lengde på 2-3 mm (Eysteinnsson *et al.*, 2018).



Figur 2. Raudåtas livssyklus fra egg til naupliistadier (N1-N6) og kopepodstadier (C1-C6). I stadiet C5 er raudåta på sitt mest lipidrike og i stadium C5-D går raudåte inn i diapausen (dvaletilstand) på 500-2000 meter dyp. I stadiet C6 avslutter diapausen og raudåta når sitt voksne, kjønnsmodne stadium (Fisheries Research Services, 2004).

Raudåta gyter i de øverste vannmassene under våroppblomstringen fra april til mai (Falk-Petersen *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2008). Under våroppblomstringen vil det være økende lysintensitet og varme. Våroppblomstringen bidrar til høye forekomster av planteplankton og isalger som dyreplankton livnærer seg av (Falk-Petersen *et al.*, 2009; Hirche & Kosobokova, 2007). Naupliilavene livnærer seg av planteplanktonet, og opparbeider seg på denne måten et lipidlager på sommer og høsten (Figur 3). Lipider lagres i form av voksester hos raudåte i de siste kopepod-stadiene (C3-C5) og hos voksne (C6) (M. Bergvik *et al.*, 2012a). Voksesterlipidene lagres som depotfett, og en viktig funksjon til disse lipidene er å bidra til å regulere oppdriftsegenskapene under vandringen til dypet, opp til havoverflaten og til vertikal migrasjon (Visser & Jónasdóttir, 1999). Når tilgangen til næring er svært begrenset går raudåta over til en dvaletilstand kalt diapausen (M. Bergvik *et al.*, 2012a; Lee *et al.*, 1971). Diapausen kan vare i opptil seks måneder. I denne fasen synker raudåta til dyp på 500-2000 m og blir der frem til neste vår. Når diapausen avslutter starter raudåta sin vandring til overflaten for å gyte (Broms, 2016).

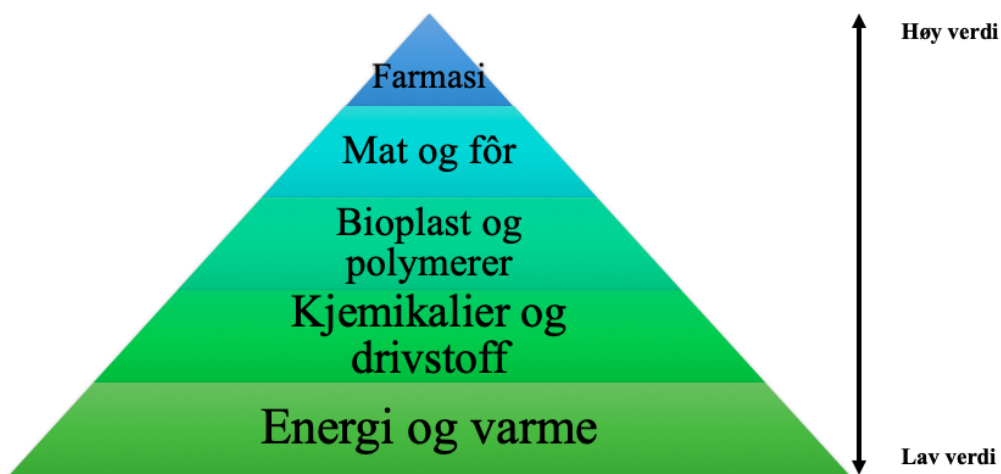


Figur 3. En voksen raudåte og tre naupliilarver. Fotograf: Terje van der Meeren, Havforskningsinstituttet (Hoddevik, 2019).

Høstingen av raudåta skjer på sommer-halvåret ved tråling i havoverflaten hvor raudåta holder til (0-50 m). De høye konsentrasjonene av næring fører til store mengder med raudåte i havoverflaten og dette utnyttes under den kommersielle høstingen som skjer i dette tidsrommet (M. Bergvik *et al.*, 2012a). Når raudåta er i livsstadium C5 er den på sitt mest lipidrike, og maskevidden i flytetralen som benyttes er tilpasset raudåte i C5 og mens raudåte i yngre stadier blir selektert ut (Fiskeridirektoratet, 2016).

2.2 Bioøkonomi – bærekraftig utnyttelse av biologiske ressurser

Svinn er et av de største problemene i verdens fiskerier (Feeckings *et al.*, 2012). De begrensede fiskeressursene i verden gjør det nødvendig å optimalisere utnyttelsen fra fiskeriene. Det har derfor over flere år vært et økende fokus på å utnytte alt som høstes av biologiske ressurser, og dette har ført til utviklingen av en bioøkonomi. Bioøkonomi omfatter bærekraftig og lønnsom produksjon av fornybare biologiske ressurser og utnyttelse av disse til mat og fôr, ingredienser, helseprodukter, kjemikalier, energi, materialer og andre produkter (Fiskeridepartementet, 2016). Disse produktene er av ulik verdi og volumpotensial (Figur 4).

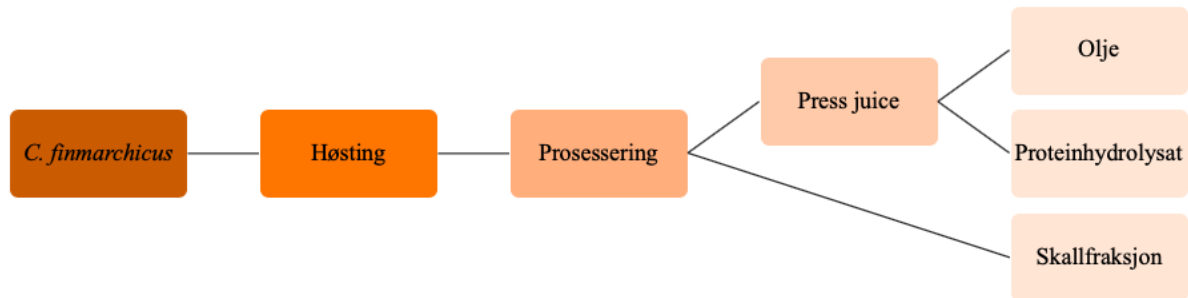


Figur 4. Verdipyramide som viser verdi og volumpotensial for ulike anvendelser av biomasse. Den laveste verdien oppnås ved forbrenning av biomasse. Høy-verdi produkter oppnås når biomassen benyttes innen mat, fôr og farmasi (Lange *et al.*, 2012).

Innen fiskeri og havbruksindustrien er marint restråstoff er en viktig verdiskapende ressurs som gjenstår etter utnyttelsen av hovedprodukter. Restråstoff fra fisk og skalldyr er definert som de deler som ikke er det primære hovedproduktet (Richardsen *et al.*, 2017). Det er deler som slo, hoder, rygg, avskjær, blod, melke/rogn skinn, buklapp, hale, mage og skall fra skalldyr. I hovedsak blir disse delene brukt som ingrediens i fôr, eller som konsumprodukter. Utnyttelse av restråstoff i Norge rapporteres årlig, og dokumenterer utnyttelsesgraden hos de ulike næringene. I 2016 ble 28 % av restråstoffet fra skalldyrnæringen utnyttet, slik at potensialet for å øke utnyttelsen er derfor stor (Richardsen *et al.*, 2017).

Calanus® Oil utvinnes fra *C. finmarchicus* og selges i kapselform. Oljen utvinnes ved hydrolyseprosesser med enzymer som er en miljøvennlig og sikker metode for å ekstrahere oljen, samt at det gir et høyt utbytte (Dumay, 2006; Vang, 2015). Under utvinningen av oljen, dannes det to andre produkter; en hydrolysert proteinfase (Calanus® Hydrolysate) og en

skallfraksjon (Calanus® Powder). Ifølge firmaet benyttes Calanus® Powder i dag innen akvakultur i fôrformuleringer til rekeindustri, anrikning av artemia, koraller, akvariefisk og som agn. Calanus® Powder benyttes også til kjæledyr som hund og katt, og på sikt kan det være aktuelt å utvikle produkt til human konsum. Selskapet har utviklet produksjonsprosesser for å utnytte hele råvaren, og det er ingen komponenter som går til spille (Figur 5).

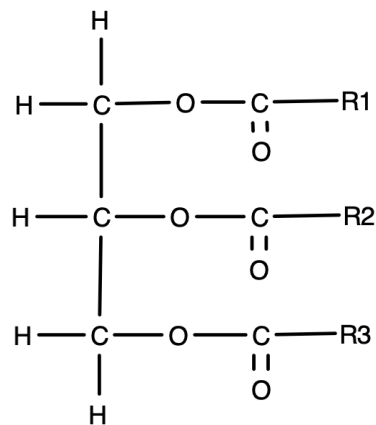


Figur 5. Flytskjema som illustrerer den industrielle lipidekstraksjonen fra *C. finmarchicus* og de tre sluttproduktene som dannes under produksjon av Calanus® Oil. Illustrasjon modifisert fra Vang (2015).

2.3 Biokjemisk sammensetning av *C. finmarchicus*

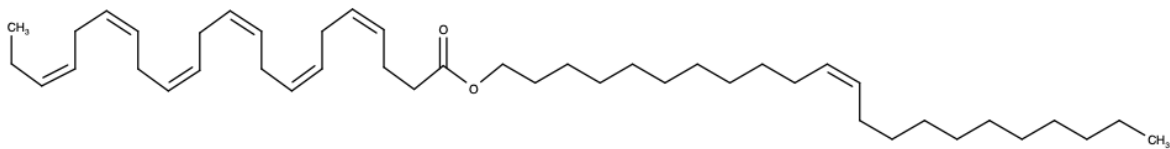
2.3.1 Lipid- og fettsyresammensetning hos *C. finmarchicus*

Marint fett har et relativt høyt innhold av de langkjedede omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA, 20:5 n-3), dokosaheksaensyre (DHA, 22:6 n-3) og andre flerumettede fettsyrer (PUFA). I fiskeolje er fettsyrene normalt forestret som triacylglycerol (TAG) (De Silva, 2011), hos krill er de i form av fosfolipider (Gigliotti *et al.*, 2011), og hos hoppekreps i kalde farvann bindes lipidene til voksesterer (Tande *et al.*, 2016). I hoppekrepsen raudåte akkumuleres lipidene i en oljesekk i form av voksesterer som utvikles ved C3 stadiet. Akkumuleringen skjer under sommerhalvåret med forberedelse til diapausen hvor voksesterer dominerer lipidprofilen under sensommer og vinter, og mengden TAG (Figur 6) øker gjennom våren og tidlig sommer (Falk-Petersen *et al.*, 1987). Med et høyt lipidinnhold i livsstadiene C4 og C5 kan lipidene stå for 65 % av tørrvektbasis. Disse lipidene er rike på høyenergi voksesterer (70-90 %), langkjedede fettalkoholer og fettsyrer (Falk-Petersen *et al.*, 1987; Kattner *et al.*, 1989; Richard *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2000). Det har tidligere vært tvil om fisk har evne til å utnytte voksesterer fra krepsdyr, men det er dokumentert at laks kan fordøye og absorbere voks like godt som TAG (Bogevik, 2011). Mennesker kan også innta og utnytte begrensede mengder voksesterer, og oljen fra raudåte er en godt egnet kilde til DHA og EPA (Cook *et al.*, 2016).



Figur 6. Triacylglycerol (TAG) er bygd opp av glyserol forestret med tre fettsyrer, hydrokarbonkjeder er representert ved R1, R2 og R3.

Fettsyreprofilen til voksesterlipidene (Figur 7) i raudåta reflekteres i stor grad av fettsyresammensetningen til planteplanktonet den spiser (Lee *et al.*, 1971). Raudåtas voksesterlipider inneholder flere ulike omega-3 fettsyrer og har et høyt innhold av EPA og DHA (Tande *et al.*, 2016). I tillegg inneholder raudåta stearidonsyre (SDA, 18:4 n-3) (Kattner & Hagen, 1995), som hovedsak foreligger i depotfettet.



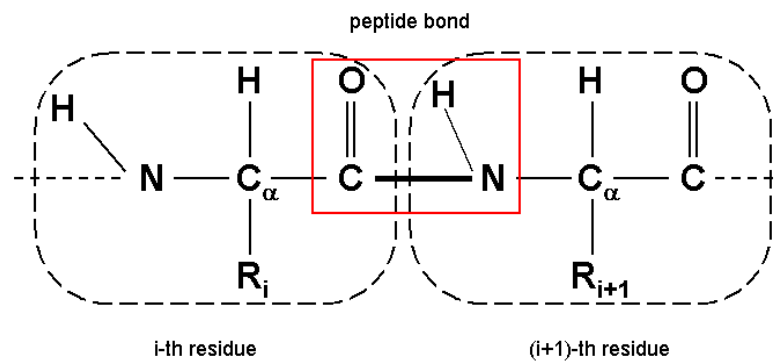
Figur 7. En marin voksester i raudåte, som består av dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) forestret til et langkjedet, en-umettet fettsyrealkohol (22:1 n-11) (Olsen, 2017).

Omega-3 fettsyrer inngår i cellemembranen og er viktige for at cellene skal fungere optimalt, samtidig som de er dokumentert å bidra til reduksjon av inflammasjon og anti-trombotisk effekt (Calder, 2015). Studier har vist at omega-3 fettsyrer kan redusere smerter knyttet til leddgikt (Abdulrazaq *et al.*, 2017), være betennelsesdempende, senke risiko for hjerte- og karsykdommer (Calder, 2015) samt muligens å ha virkning mot noen normale kreftformer (Rose & Connolly, 1999). Nyere studier har imidlertid gitt indikasjoner på at enkelte av de etablerte effektene av omega-3 tilskudd må revurderes. Flere internasjonale forskningsmiljøer hevder i dag at det ikke er godt nok dokumentert at inntak av omega-3 som kosttilskudd kan bidra til å minske risikoen for hjerte og karsykdommer (Abdelhamid, 2018; Balk *et al.*, 2006).

Linolsyre (LA, C18:2 n-6) og α -linolensyre (ALA, 18:3 n-3) er essensielle fettsyrer for mennesker. Det er bare planter og planteplankton som kan syntetisere disse, hvor syntesen er særlig effektiv hos marint fytoplankton som omsetter de videre til langkjedede omega-3 og omega-6 fettsyrer. Disse fettsyrene overføres videre oppover i den marine næringskjeden (Calder & Yaqoob, 2009). Forholdet mellom fettsyrene omega-6/omega-3 (n-6/n-3) er et viktig mål, ettersom en høy ratio kan gi økt risiko for sykdommer som hjerte- og karsykdom og kreft (Calder, 2015; Simopoulos, 2002). Ideelt sett er det ønskelig at forholdet mellom omega-6 og omega-3 holdes på 5, eller lavere. I løpet av evolusjonens gang hos mennesket har forholdet av n-6/n-3 endret seg fra 1:1 til omtrent 16:1, eller høyere i dagens vestlige diett (Simopoulos, 2002).

2.3.1 Proteiner og aminosyresammensetning i *C. finmarchicus*

Hel raudåte består av 10 –11 % protein (Vang *et al.*, 2013). Proteiner er makromolekyler, bygd opp av mindre enheter av aminosyrer koblet sammen med peptidbindinger (Figur 8) (Ceci *et al.*, 2007). Aminosyrer (AA) er organiske substanser som inneholder amino- og syregrupper. De har lik struktur og oppbygging, men variasjonene i sidegruppene gjør at AA har ulike biokjemiske egenskaper og funksjoner. I naturen eksisterer det rundt 300 forskjellige AA, men kun 20 inngår som byggesteiner i proteiner (Wu, 2009).



Figur 8. Peptidbinding mellom to aminosyrer (Ceci *et al.*, 2007)

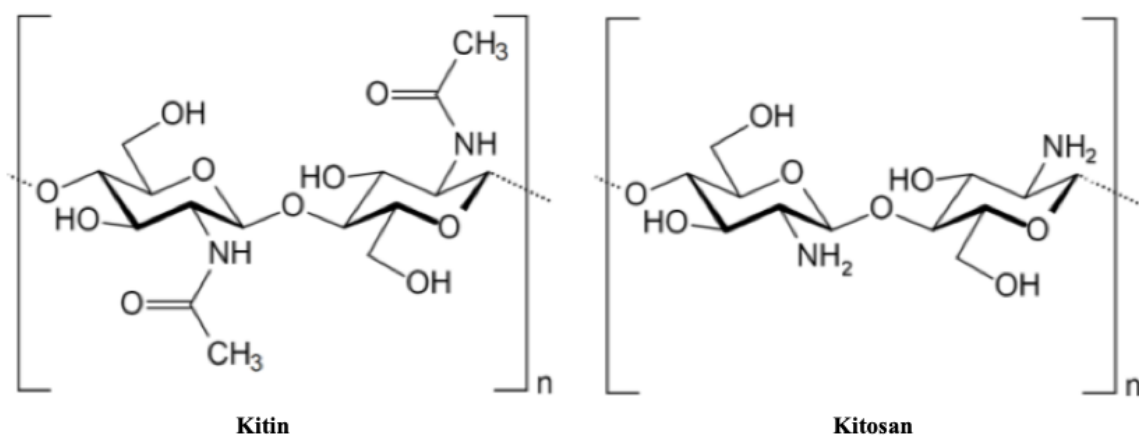
Det er vanlig å dele inn AA etter essensielle og ikke-essensielle. Aminosyrer som kan syntetiseres av kroppen i tilstrekkelige mengder kalles ikke-essensielle AA. Essensielle aminosyrer (EAA) kan ikke syntetiseres fra andre mellomprodukter i metabolismen og må tilføres via kosten. Noen aminosyrer kalles funksjonelle AA, da de spiller en nøkkelrolle i metabolismen som er nødvendig for vedlikehold av vekst, reproduksjon og immunsystem. Disse inkluderer arginin, cystein, glutamin, leucin, prolin og tryptofan (Wu, 2009). Enkelte AA er begrensede, som innebærer at det er den første EAA som er begrenset i proteinet.

Det er ni aminosyrer som er essensielle for mennesker (World Health Organization, 2007), mens det for fisk og reker er ti essensielle aminosyrer (Wilson & Halver, 1986). Skallfraksjonen benyttes per i dag innen akvakultur, blant annet som fôringrediens i rekeoppdrett. Dette er rekens ti EAA: arginin, methionin, valin, threonin, isoleucin, leucin, lysin, histidin, fenylalanin og tryptofan (Shiau, 1998). Av disse er methionin, lysin og arginin er de første begrensede AA i kommersiell fôrformel til reker (Fox, 2006). I raudåte er de høyeste forekomstene av frie AA vist å være arginin og lysin (Helland *et al.*, 2003).

2.3.2 Kitin og andre komponenter i *C. finmarchicus*

Hoveddelen av skallet til krepsdyr er kitin, og kitinet utgjør ca. 3-4 % av raudåtas tørrvekt (Solgaard *et al.*, 2007). Kitin er et polysakkarid og det naturlige polymeret man finner mest av i verden etter cellulose (Rinaudo, 2006). Hovedkildene til utvunnet kitin, er skall fra de marine krepsdyrene reke og krabbe (Raghu *et al.*, 2018; Younes & Rinaudo, 2015). Kitin har mange funksjonelle egenskaper slik som antimikrobielle-, antivirale- og antifungale egenskaper samt potensiale som prebiotika (Hahn *et al.*, 2018; Rinaudo, 2006). Det er tidligere karakterisert som et anti-næringsstoff og ufordøyelig fiber, men forskning har vist at kitinet er fordøyelig hos eksempelvis fisk (Hahn *et al.*, 2018).

Kitosan er det viktigste derivatet av kitin, og har i likhet med kitin mange funksjonelle egenskaper (Figur 9). Kitosan dannes ved ekstraksjon og deacetylering av kitin, men graden av deacetylering og ved mer enn 50 % deacylering karakteriseres dette som kitosan. Kitosan har kommersiell interesse og kan anvendes både som høyverdig produkt i farmasøytisk og biomedisinsk industri og som ingrediens til kosmetikk og mat (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007). Sammenlignet med kitin er kitosan enklere å prosessere, men fordi kitosan er hydrofilt og pH-sensitivt er stabiliteten i materialer av kitosan generelt lavere (Rinaudo, 2006). Det har vist seg utfordrende å analysere kitin-nivået på en nøyaktig måte, fordi kitinet er kryssbundet i en matrise av proteiner (Hahn *et al.*, 2018).



Figur 9. Kjemisk struktur av kitin og kitosan (Younes & Rinaudo, 2015).

3 Materialer og metoder

3.1 Råmateriale

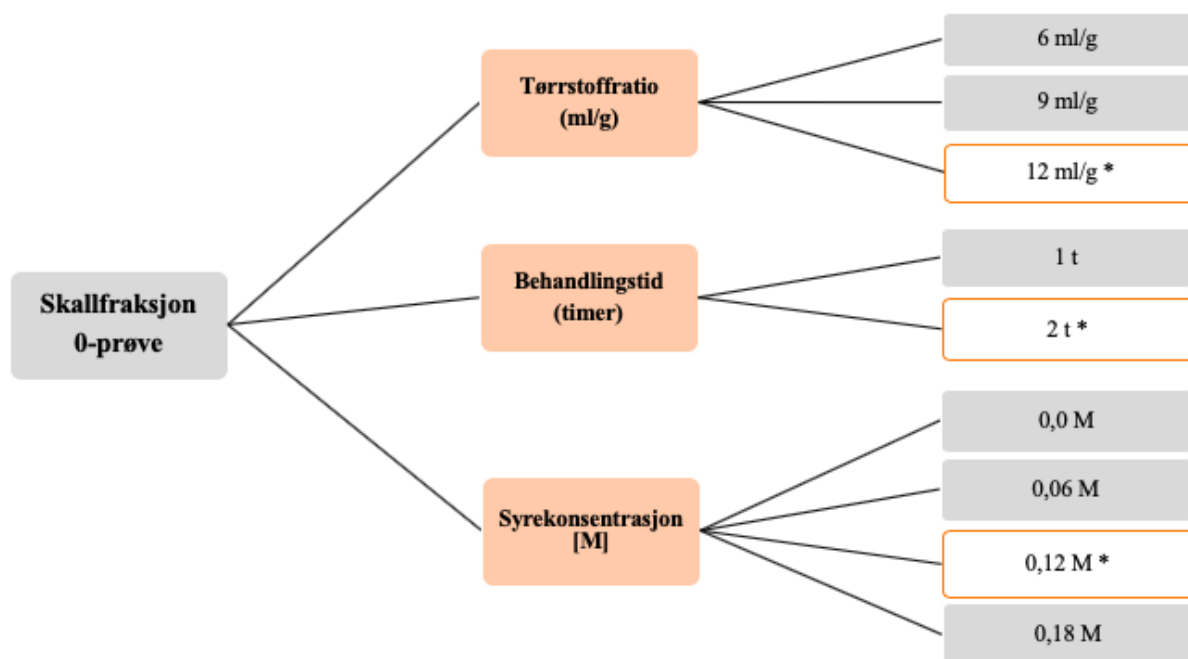
Prøver av våt- og tørket skallfraksjon ble levert av firmaet Calanus AS (Tromsø, Norge). Råmaterialet var av fire produksjonsbatcher av *Calanus* skallfraksjon før og etter ulike optimaliseringer av raffineringprosessen: To våte skallfraksjoner med batch nr. 1 og 2, produsert i 2018 henholdsvis i uke 33 og 42, og to tørkede skallfraksjoner med batch nr. 3 og 4 produsert i 2018 i henholdsvis uke 7 og 11. Råmaterialet ble lagret ved -20 grader inntil analyser.

3.2 Forsøksdesign våte skallfraksjoner

De to våte skallfraksjonene var i utgangspunktet ubehandlet og kom direkte fra produksjonen til Calanus AS, men deler av begge fraksjonene fikk ulik behandling med sitronsyre. Utgangsmetoden var en behandling hvor disse parameterne var brukt: Væske-tørrestoffratio (V/TS) 12 ml/g (som vil si at 1 g tørket skallfraksjon var løst i 12 ml sitronsyreløsning), 0,12 M syrekonsentrasjon, behandlingstid på 2 timer og varmebehandling ved 80 °C i vannbad (Tabell 1). Standardbetingelsene (12 ml/g, 0,12M, 2t, 80 °C) ble bestemt av Calanus AS etter pilotforsøket på tørket skallfraksjon, og dannet utgangspunktet for en potensiell behandling av produktet i fremtiden. Denne seneste runden med forsøk ble satt opp for å undersøke om disse parameterne kunne optimaliseres, samt å verifisere at metoden også fungerte på skallfraksjonen, slik den vil foreligge i produksjonen. I oppgaven ble effekten av følgende parametere undersøkt: i) V/TS (6 ml/g og 9 ml/g, i tillegg til 12 ml/g), ii) syrekonsentrasjon (0,0 M, 0,06 M eller 0,18 M, i tillegg til 0,12 M), og iii) redusert behandlingstid (1 t, i tillegg til 2 t) (Figur 10).

Tabell 1. Oversikt over parameterne som ble brukt ved styrebehandling av våte skallfraksjoner fra batch 1 og 2, med varierte parametere. Standardbetingelsene er merket med stjerne *.

Tørrstoff (ml/g)	Sitronsyrekons. (M)	Behandlingstid (timer)	Temperatur (°C)
6	0.12	2	80
9	0.12	2	80
12	0.12	2	80
12	0	2	80
12	0.06	2	80
12	0.18	2	80
12	0.12	2	80
12	0.12	1	80
12	0.12	2	80



Figur 10. Flytskjema som viser de ulike behandlingene benyttet på skallfraksjonene. Standardprotokollen er merket med *.

3.3 Forsøksdesign tørkede skallfraksjoner

Tørkede skallfraksjoner fra pilotprosjektet ble også analysert. Hver batch (nr. 3 og 4) hadde en ubehandlet prøve og to prøver med ulike behandlinger. Behandlingen av disse avvike noe fra behandlingen av de våte skallfraksjonene. Behandlingstiden var på en time ved 60 °C (inkubator ved 150 rpm.) med en V/TS på 12 ml/g og syrekonsentrasjon på 0,06 og 0,12 M (Tabell 2). Det var to ekte paralleller av hver prøve.

Tabell 2. Oversikt over parametere som ble brukt ved styrebehandlingen av de tørkede skallfraksjonene (batch 3 og 4).

Tørrstoff (ml/g)	Sitronsyrekons. [M]	Behandlingstid (timer)	Temperatur (°C)
12	0.06	1	60
12	0.12	1	60

3.4 Metoder

3.4.1 Bestemmelse av fettinnhold ved hjelp av fettekstraksjon

Fettekstraksjonen ble utført basert på Folchs metode (1957) med noen modifikasjoner. Omtrent 1 g prøvemateriale (n=3) ble tilsatt 19 ml Diklormetan/Metanol (DCM:MeOH) (2:1) (diklormetan: Honeywell, Muskegon, USA og metanol: Fisher Scientific AS, Loughborough, England). En internstandard (IS), C17:0 heptadecanoic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ble løst ut til en konsentrasjon på 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1) og 1 ml ble tilsatt i hver prøve før røring i 40 minutter (Multi Reax Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland). Løsningen ble filtrert med foldefilter (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) og tilsatt 4 ml 0,9 % natriumklorid (NaCl) (VWR chemicals international, Conshohocken, USA), før sentrifugering i Heraeus Multifuge 1 SR (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Tyskland) på 2000 x g i 10 minutter. To adskilte faser fremkom, hvor den nederste fasen som bestod av DCM og lipider, ble pipettert i glass (8 ml) og dampet til tørrhet ved N₂-gass (AGA AS, Oslo, Norge). Fettprosenten ble deretter bestemt basert på vektdifferansen.

$$\text{Fettprosent (\%)} = \left(\frac{\text{Ekstrahert fett (g)}}{\text{Innveid prøve (g)}} \right) \times 100\%$$

3.4.2 Metylering før analyse av fettsyreprofil

Fettsyresammensetningen ble bestemt basert på metoden beskrevet av Stoffel W. (1959). Lipidprøvene ble løst ut i DCM:MeOH (2:1) til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Det ble tilsatt 100 µl prøve, 0,9 ml DCM og 2 ml 2 % Svovelsyre (95-97 %) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i metanol i Duran-rør. Prøvene ble satt i varmeklokk (Termaks Labolytics AS, Trondheim, Norge) på ca. 100 °C i en time, og deretter tilsatt 3,5 ml heptan (Honeywell, Muskegon, USA) og 3,5 ml 5 % NaCl og rørt i vortex (VWR international, Conshohocken, PA, USA) på 30 sek. Heptan og lipidfasen ble pipettert over i nye rør og dampet tørr ved bruk av N₂-gass. Prøvene ble løst opp i 100 µl heptan og overført til analyserør.

3.4.3 Analyse av fettsyresammensetning ved gasskromatografi

En gasskromatograf 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med en 7683B autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor (FID) ble brukt. Helium ble benyttet som bæregass og de ulike fettsyrene ble separert ved ulik vandrings hastighet gjennom en Varian CP7419 kapillærkolonne (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal), med injektor (240 °C) og detektor (250 °C). Fettsyrene ble identifisert med basis i retensjonstiden sammenlignet med fettsyrestandarder til gasskromatografen; 1PUFA, 2PUFA og 3PUFA (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Andelen enkelte fettsyrer (FA) ble bestemt som arealprosent og mengde fettsyre per 100 g prøve.

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

3.4.4 Bestemmelse av vann- og askeinnhold

AOAC 950.46b og AOAC 938.08 ble benyttet. Prøvene (10 g) (n=3) ble veid i forhåndsveide aluminiumsbegere før tørking i varmeskap (Termaks - Labolytics AS, Trondheim, Norge) ved 100-110 °C i 2-5 døgn til konstant vekt.

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Våttvekt (g)} - \text{Tørrvekt (g)}}{\text{Våttvekt (g)}} \times 100 \%$$

Tørkede prøver ble forbrent i forbrenningsovn (Nabertherm GmbH. Program Controller S27, Lilienthal, Tyskland) ved 540 °C i 16 timer og veid.

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt etter forbrenning (g)}}{\text{Våttvekt (g)}} \times 100\%$$

3.4.5 Analyse av totale aminosyrer med aminosyreanalysator

Aminosyrenivået ble bestemt, basert på Moore og Stein sin metode (1963). Totale aminosyrer ble bestemt ved syrehydrolyse hvor tørket skallfraksjon (40 mg) eller våt skallfraksjon (200 mg) ble blandet med dH₂O, IS 20 mM norleucin (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) og 1,2 ml konsentrert saltsyre (HCl, 37%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland, Saltsyre 37 %). Prøven ble flushet med N₂-gass i 10-15 sek, og satt i varmeskap på 110 °C i 22-24 timer. Fra prøvene ble 100 µl overført til analyserør, tørrdampet ved N₂-gass og løst ut i 1 ml loading buffer (Lithium citratbuffer med pH 2,2, Biochrom Co. Cambridge, UK).

Kromatografisk separasjon med ionebytterkolonne ble brukt for analyse av materialet. Prøvene ble analysert med en Biochrom 30 aminosyreanalysator med et litiumcitrat kolonne og postkolonne-derivatisering med ninhydrin. I aminosyreanalysatoren ble aminosyrene separert i kolonnen på en ionebytter med trinnvist bufferskifte, før de ble derivatisert med ninhydrin og detektert ved 440 og 570 nm. Aminosyrene ble representert i topper med ulik retensjonstid. Ved hjelp av standarder kunne aminosyrene identifiseres basert på retensjonstiden, og mengden aminosyre ble bestemt ved IS.

3.4.6 Bestemmelse av proteinbånd med SDS-PAGE

Skallfraksjon på 0,150 g ble tilsatt 1,5 ml 10 % sodium dodecyl sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i et eppendorfrør. Prøvene ble så kokt i varmeblokk (Grant Instruments, Cambridge, England) ved 100 °C i 30 min, etterfulgt av avkjøling. Deretter ble prøvene sentrifugert (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) ved 4500 g i 10 min. I nye eppendorfrør ble 80 µl supernatant tilsatt 80 µl LDS SB elektroforesebuffer (25 % glyserol, 2 % SDS, 0,1 % bromfenolblå, 14,4 mmol 2-mercaptoetanol; 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Rørene ble varmet i 5 min ved 95°C, og spunnet raskt ned og tilsatt 4 µl dithiothreitol (DTT) (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen) før applisering på 4-12% NuPAGE® Novex® BIS-Tris polyacrylamid gel.

Gelen ble kjørt ved 200 V og 125 mA i 35 min i en XCell *SureLock™* Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) med MES-buffer (Novex, Carlsbad, USA). SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ble brukt som molekylær vektmarkør. Gelen ble rensset med 100 mL MilliQ-vann i 3x5 min og deretter farget med Coomassie blue (SimplyBlue™ Safe-Stain, Invitrogen, Carlsbad, USA) i 1 t romtemperatur (RT.) og avfarget i 1 t i MilliQ-vann.

3.4.7 Kitinekstraksjon ved base og syre

Kitininnholdet ble analysert ved metoden beskrevet av Spinelli, Lehman og Wieg (Spinelli, 1974). For å fjerne proteiner fra prøvene ble 1 g prøve veid ut, tilsatt 100 ml 2 % natriumhydroksid (NaOH) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) og satt i varmeskap ved 100 °C i en time. Etter nedkjøling ble produktet overført til en forhåndsveid filtertrakt med filterpapir (20-25 µm) (Whatman International Ltd, Maidstone, England) og vakuumfiltrert. Demineralisering (fjerning av kalk/aske) ble gjort ved at residualene ble overført til et begerglass med 100 ml 5 % HCl og behandlet i tolv timer ved RT. Produktet ble filtrert og restene ble vasket med varmt destillert vann to ganger. Glassfiltertrakten med filterpapir ble tørket ved 110 °C i 16 timer for å beregne utbytte.

4 Resultater

4.1 Biokjemisk sammensetning av råmaterialene som ble brukt

Den biokjemiske sammensetningen og kitininnholdet i råmaterialene ble undersøkt. Det viste seg at våte skallfraksjoner 1 og 2 hadde veldig ulik sammensetning. Skallfraksjon 2 hadde et meget høyt askeinnhold, sammenlignet med skallfraksjon 1. Dette gjorde også at innholdet av fett, protein og kitin var noe lavere i skallfraksjon 2, sammenlignet med skallfraksjon 1.

Den biokjemiske sammensetningen av de tørkede, ubehandlede skallfraksjonene 3 og 4 viste seg å være veldig lik. Askeinnholdet i disse skallfraksjonene var så nær som identiske, fettinnholdet var omtrent det samme, og kitin og proteininnholdet var likt med et prosentinnhold på mellom 30 til 40 %. De tørkede skallfraksjonene ble behandlet på en annen måte enn de våte skallfraksjonene, som fremkommer senere i kapittel 4.5.

Den oppsatte standardprotokollen for alle behandlede prøver var en V/TS på 12 ml/g, syrekonsentrasjon på 0,12 M og 2 timer behandlingstid ved 80 °C. I denne oppgaven ble alle disse variablene forsøkt optimalisert og i de følgende avsnittene beskrives effekten av å endre disse variablene for hver enkelt av de av de 4 tilgjengelige utgangsmaterialene/batchene av skallfraksjoner fra *Calanus*-produksjonen.

4.2 Effekt av endring av væske/tørrestoffratio

Den første variabelen som ble optimalisert var forholdet mellom væske og tørrestoff i prosessen. Sitronsyrevaskingen av skallfraksjonene ble gjennomført med følgende V/TS 6, 9 og 12 ml/g.

4.2.1 Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike V/TS

Fettinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 22,4 og 18,2 % (Tabell 3 og Tabell 4). Behandling med sitronsyre (0,12 M) på henholdsvis 6, 9 og 12 ml/g førte til at det relative fettinnholdet økte betydelig for begge skallfraksjonene. Etter behandlingen varierte fettinnholdet med 8,8 til 17,6 prosentpoeng. Proteininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 var 35,9 %, mens innholdet i skallfraksjon 2 var betydelig lavere på 23,2 %. Syrevask førte til en relativ økning i proteininnhold med hele 6,1 til 25,1 prosentpoeng. Askeinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 var 8,8 %, mens i skallfraksjon 2 var mengden langt høyere på 28,9 %. Relativt askeinnhold ble redusert betydelig på 5,6 til 27 prosentpoeng. Kitininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 36,3 og 31,6 %. Etter syrevask av skallfraksjon 1 og 2 var

relativt kitininnhold redusert til verdier mellom 22,2 og 28,3 %, mens prøven fra skallfraksjon 2, behandlet med 12 ml/g skilte seg ut med et økt relativt kitininnhold på 36,2 %.

Tabell 3. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i ubehandlet skallfraksjon 1, og prøver behandlet med V/TS på 6, 9 og 12 ml/g. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin regnet i prosentandel av tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1	Fett	Protein*	Aske	Kitin
Ubehandlet	22,4 ± 0,7	35,9 ± 1,2	8,8 ± 0,4	36,3 ± 1,9
6 ml/g	32,0 ± 1,0	45,2 ± 6,1	3,2 ± 0,1	22,2 ± 1,7
9 ml/g	31,2 ± 3,4	42,0 ± 3,5	2,6 ± 0,1	24,4 ± 4,4
12 ml/g	31,6 ± 1,6	47,5 ± 4,8	2,5 ± 0,2	26,3 ± 2,9

Ubehandlet skallfraksjon 1 inneholdt 7,2 % fett, 11,4 % protein, 2,8 % aske og 11,5 % kitin på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på paralleller.

Tabell 4. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i skallfraksjon 2. Analyser på ubehandlede prøver og prøver behandlet med V/TS 6, 9 og 12 ml/g. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin i prosentandel av tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2	Fett	Protein*	Aske	Kitin
ubehandlet	18,2 ± 0,8	23,2 ± 1,7	28,9 ± 0,6	31,6 ± 1,4
6 ml/g	30,8 ± 2,0	43,1 ± 2,2	1,9 ± 0,4	27,1 ± 2,6
9 ml/g	35,8 ± 0,2	48,3 ± 0,7	2,1 ± 0,2	28,2 ± 2,2
12 ml/g	29,6 ± 1,7	37,9 ± 4,1	2,5 ± 0,3	36,2 ± 1,8

Ubehandlet skallfraksjon 2 inneholdt 7,3 % fett, 9,8 % protein, 11,6 % aske og 12,7 % kitin, på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

4.2.2 Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av V/TS

Fettsyresammensetningen ble analysert i ekstraherte lipider fra ubehandlet skallfraksjon, og i de behandlede skallfraksjonene. I skallfraksjon 1 var innholdet av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $2,9 \pm 0,2$, $2,7 \pm 0,2$ og $3,6 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 5). Sitronsyrevask med en V/TS på 6 ml/g og 9 ml/g påvirket ikke det relative innholdet av disse fettsyrene, mens prøver behandlet med 12 ml/g hadde økning i innhold på $3,4 \pm 0,5$, $3,1 \pm 0,5$ og $4,1 \pm 0,6$ g/100g TS av henholdsvis SDA, EPA og DHA. Ubehandlet prøve av skallfraksjon 2 viste et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $1,9 \pm 0,2$, $1,5 \pm 0,2$ og $1,9 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 6). Syrevask med en V/TS på 6 ml/g resulterte i høyere innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $3,4 \pm 0,4$, $2,4 \pm 0,2$ og $3,2 \pm 0,4$ g/100g TS, og prøver behandlet med 9 og 12 ml/g var sammenlignbar med 6 ml/g.

Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 1 var 10,03 g/100g TS. Syrevask med V/TS 9 ml/g hadde ingen effekt på mengden n-3 PUFA, mens behandling med 6 ml/g resulterte en reduksjon på 8,67 g/100g TS, og behandling med 12 ml/g resulterte i totalt innhold n-3 PUFA på 11,5 g/100g TS. Den totale mengden n-3 PUFA hos ubehandlet skallfraksjon 2 var 5,65 g/100g TS. Behandling med V/TS 6, 9 og 12 ml/g resulterte i høyere innhold n-3 PUFA på henholdsvis 9,41, 8,7 og 8,9 g/100g TS.

Forholdet mellom n-3/n-6 var 0,03 i ubehandlet prøve av skallfraksjon 1 og 2, og etter syrevask av skallfraksjon 1 var den lik. Syrevask av skallfraksjon 2 førte til en forhøyet n-3/n-6 ratio til omtrent 0,06 hos henholdsvis V/TS 6, 9 og 12 ml/g.

Tabell 5. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 1. Ubehandlet og behandlede prøver med 6, 9 og 12 ml/g væske/tørrstoffratio, ekstrahert ved Folchs metode. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1 Fettsyre	Ubehandlet		6 ml/g		9 ml/g		12 ml/g	
	(%)	(g/ 100g)	(%)	(g/ 100g)	(%)	(g/ 100g)	(%)	(g/ 100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,07	0,21 ± 0,02	2,07 ± 0,03	0,42 ± 0,02	2,06 ± 0,07	0,43 ± 0,05	2 ± 0,05	0,49 ± 0,06
C14:0	12,5 ± 0,26	2,33 ± 0,15	12,89 ± 0,22	2,62 ± 0,14	12,89 ± 0,36	2,71 ± 0,23	12,62 ± 0,26	3,07 ± 0,33
C16:0	13,46 ± 0,15	2,66 ± 0,13	14,26 ± 0,18	2,91 ± 0,19	14,15 ± 0,3	2,97 ± 0,22	14,41 ± 0,41	3,51 ± 0,35
C18:0	1,41 ± 0,04	0,28 ± 0,01	1,62 ± 0,03	0,33 ± 0,02	1,62 ± 0,05	0,34 ± 0,02	1,73 ± 0,12	0,42 ± 0,03
C16:1 n-7	3,19 ± 0,04	0,63 ± 0,04	3,06 ± 0,02	0,62 ± 0,04	3,01 ± 0,07	0,63 ± 0,06	2,98 ± 0,05	0,73 ± 0,1
C18:1 n-9	4,25 ± 0,1	0,84 ± 0,05	4,03 ± 0,03	0,82 ± 0,05	4,03 ± 0,08	0,85 ± 0,07	4,41 ± 0,44	1,07 ± 0,15
C18:1 n-7	0,73 ± 0,03	0,15 ± 0,01	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
C20:1 n-9	3,03 ± 0,07	0,61 ± 0,04	2,91 ± 0,04	0,74 ± 0,21	2,86 ± 0,04	0,6 ± 0,05	2,93 ± 0,03	0,71 ± 0,09
C22:1 n-11	4,35 ± 0,04	0,86 ± 0,05	4,29 ± 0,02	0,58 ± 0,29	4,32 ± 0,08	0,91 ± 0,07	4,34 ± 0,05	1,06 ± 0,12
C22:1 n-9	1,57 ± 0,01	0,31 ± 0,02	1,51 ± 0,02	0,34 ± 0,06	1,54 ± 0,05	0,32 ± 0,03	1,51 ± 0,02	0,37 ± 0,04
C24:1 n-9	1,54 ± 0,11	0,3 ± 0,03	1,74 ± 0,07	0,24 ± 0,1	1,83 ± 0,07	0,38 ± 0,03	1,81 ± 0,05	0,44 ± 0,06
C18:3 n-4	i.d.	i.d.	2,59 ± 0,14	0,56 ± 0,08	1,53 ± 0,14	0,32 ± 0,03	1,65 ± 0,19	0,4 ± 0,05
C18:2 n-6 (LA)	1,48 ± 0,03	0,29 ± 0,02	2,59 ± 0,14	0,42 ± 0,17	2,26 ± 0,27	0,48 ± 0,07	2,62 ± 0,24	0,64 ± 0,06
C18:3 n-3 (ALA)	3,18 ± 0,03	0,63 ± 0,04	2,83 ± 0,24	0,59 ± 0,03	2,95 ± 0,04	0,62 ± 0,05	2,97 ± 0,04	0,72 ± 0,09
C18:4 n-3 (SDA)	15,02 ± 0,12	2,99 ± 0,17	14,28 ± 0,06	2,91 ± 0,19	14,34 ± 0,21	3,02 ± 0,24	14,01 ± 0,52	3,43 ± 0,5
C20:5 n-3 (EPA)	13,79 ± 0,14	2,74 ± 0,15	12,91 ± 0,09	2,63 ± 0,18	13,02 ± 0,22	2,74 ± 0,22	12,76 ± 0,42	3,12 ± 0,45
C22:5 n-3 (DPA)	0,61 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,24 ± 0,1	0,68 ± 0,15	0,14 ± 0,04	0,62 ± 0,13	0,15 ± 0,01
C22:6 n-3 (DHA)	18,01 ± 0,21	3,57 ± 0,2	16,84 ± 0,13	3,43 ± 0,24	16,91 ± 0,26	3,55 ± 0,28	16,63 ± 0,5	4,06 ± 0,57
SFA	27,36 ± 0,32	4,26 ± 0,26	28,76 ± 0,38	5,86 ± 0,35	28,66 ± 0,68	6,02 ± 0,46	28,76 ± 0,76	7 ± 0,71
MUFA	17,93 ± 0,22	3,71 ± 0,23	17,54 ± 0,1	3,34 ± 0,13	17,59 ± 0,35	3,7 ± 0,29	17,99 ± 0,48	4,39 ± 0,52
PUFA	52,04 ± 0,38	10,33 ± 0,57	59,28 ± 8,77	10,78 ± 0,56	51,7 ± 0,41	10,87 ± 0,86	51,26 ± 1,1	12,52 ± 1,66
PUFA n-3	50,56 ± 0,39	10,03 ± 0,56	55,26 ± 8,82	9,80 ± 0,64	47,9 ± 0,63	10,07 ± 0,82	46,99 ± 1,36	11,48 ± 1,6
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Fettsyreer med area <0,5 ble regnet som ikke detektert (i.d.).

Tabell 6. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) i skallfraksjon 2, ubehandlet og behandlede prøver med væske/tørrestoffratio 6, 9 og 12 ml/g. Lipidene var ekstrahert ved Folchs metode. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2 Fettsyre	Ubehandlet		6 ml/g		9 ml/g		12 ml/g	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,03	0,22 ± 0,02	2,12 ± 0,09	0,42 ± 0,05	2,04 ± 0,08	0,37 ± 0,07	2,08 ± 0,11	0,39 ± 0,04
C14:0	13,03 ± 0,23	1,46 ± 0,16	13,57 ± 0,6	2,71 ± 0,33	12,96 ± 0,37	2,35 ± 0,42	13,39 ± 0,53	2,52 ± 0,23
C16:0	13,19 ± 0,37	1,47 ± 0,16	13,15 ± 0,53	2,62 ± 0,29	13,25 ± 0,11	2,4 ± 0,38	13,67 ± 0,44	2,57 ± 0,19
C18:0	1,69 ± 0,12	0,19 ± 0,03	1,45 ± 0,08	0,29 ± 0,04	1,55 ± 0,07	0,28 ± 0,03	1,36 ± 0,37	0,26 ± 0,08
C16:1 n-7	2,77 ± 0,04	0,31 ± 0,03	2,72 ± 0,17	0,54 ± 0,08	2,68 ± 0,08	0,48 ± 0,07	2,78 ± 0,09	0,52 ± 0,04
C18:1 n-9	4,02 ± 0,07	0,45 ± 0,04	4,21 ± 0,2	0,84 ± 0,11	2,83 ± 1,49	0,54 ± 0,31	4,47 ± 0,2	0,84 ± 0,05
C20:1 n-9	3,36 ± 0,06	0,38 ± 0,04	3,3 ± 0,2	0,66 ± 0,09	3,3 ± 0,17	0,6 ± 0,08	2,59 ± 1,05	0,48 ± 0,18
C22:1 n-11	4,77 ± 0,09	0,53 ± 0,05	5,12 ± 0,26	1,02 ± 0,13	5,08 ± 0,18	0,92 ± 0,14	4,63 ± 1,59	0,87 ± 0,31
C22:1 n-9	1,61 ± 0,05	0,18 ± 0,02	1,7 ± 0,08	0,34 ± 0,04	1,62 ± 0,05	0,29 ± 0,04	1,52 ± 0,44	0,29 ± 0,09
C24:1 n-9	1,63 ± 0,11	0,18 ± 0,02	1,82 ± 0,12	0,36 ± 0,05	1,83 ± 0,08	0,33 ± 0,05	1,95 ± 0,13	0,37 ± 0,03
C18:2 n-6 (LA)	1,36 ± 0,04	0,15 ± 0,02	2,25 ± 0,14	0,45 ± 0,05	3,05 ± 0,7	0,54 ± 0,04	2,74 ± 0,45	0,51 ± 0,09
C18:3 n-3 (ALA)	2,85 ± 0,04	0,32 ± 0,03	2,77 ± 0,13	0,55 ± 0,07	2,72 ± 0,06	0,49 ± 0,08	2,88 ± 0,11	0,54 ± 0,04
C18:4 n-3 (SDA)	17,14 ± 0,19	1,92 ± 0,18	17,22 ± 0,84	3,44 ± 0,44	16,79 ± 0,41	3,04 ± 0,5	17,82 ± 0,67	3,35 ± 0,27
C20:5 n-3 (EPA)	13,16 ± 0,14	1,47 ± 0,14	10,82 ± 3,47	2,42 ± 0,15	12,53 ± 0,27	2,27 ± 0,36	9,52 ± 3,98	2,39 ± 0,02
C22:5 n-3 (DPA)	0,68 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,73 ± 0,15	0,14 ± 0,02	0,66 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,46 ± 0,14	0,09 ± 0,03
C22:6 n-3 (DHA)	16,72 ± 0,36	1,87 ± 0,15	15,83 ± 0,57	3,16 ± 0,37	15,63 ± 0,42	2,83 ± 0,44	16,63 ± 0,79	3,12 ± 0,26
SFA	27,92 ± 0,68	3,12 ± 0,34	28,18 ± 1,2	5,62 ± 0,66	27,76 ± 0,38	5,03 ± 0,84	28,42 ± 0,96	5,34 ± 0,46
MUFA	18,16 ± 0,28	2,03 ± 0,18	19,61 ± 1,16	4,01 ± 0,48	18,84 ± 0,91	3,43 ± 0,65	19,45 ± 2,19	3,65 ± 0,45
PUFA	51,92 ± 0,49	5,8 ± 0,52	50,5 ± 2,74	9,86 ± 0,55	51,36 ± 1,25	9,28 ± 1,38	50,05 ± 2,52	9,39 ± 0,56
PUFA n-3	50,55 ± 0,53	5,65 ± 0,5	46,95 ± 1,86	9,41 ± 0,53	48,32 ± 1,06	8,75 ± 1,4	47,32 ± 2,54	8,87 ± 0,54
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01

4.2.3 Totale aminosyrer påvirkes av endring av V/TS

Totale aminosyrer ble analysert med aminosyreanalysator. Av de detekterte AA inngår 17 i protein. Sum TAA i ubehandlet skallfraksjon 1 var 37,6 mg AA/g TS og i ubehandlet skallfraksjon 2 litt lavere på 30,4 mg AA/g TS (Tabell 7 og Tabell 8). Syrevask med sitronsyre (0,12 M) på henholdsvis 6, 9 og 12 ml/g førte til at den relative summen TAA økte betydelig i begge skallfraksjonene. Etter behandlingen varierte sum TAA på 41,4 til 55,9 mg AA/g TS. I ubehandlet skallfraksjon 1 var sum EAA 16,5 mg AA/g TS og i ubehandlet skallfraksjon 2 var summen lavere på 12,6 mg AA/g TS. Etter syrevask økte den relative summen EAA med 3,7 til 9,6 mg AA/g TS. Mengden av aminosyren alanin var 2,15 og 1,97 mg AA/g TS hos henholdsvis ubehandlede skallfraksjoner 1 og 2. Etter syrevask av skallfraksjonene økte den relative mengden alanin med i overkant av 8,2 mg AA/g TS. Taurin ble funnet i små mengder i ubehandlet prøve, men etter behandling ble ikke denne aminosyren detektert. Glycin ble halvert etter syrevask. Tryptofan ble ikke detektert i noen av prøvene.

Tabell 7. Totale aminosyrer for skallfraksjon 1, ubehandlede og vaskede prøver med 6, 9 og 12 ml/g. Tabellen inkluderer essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Resultater er oppgitt som gjennomsnitt +/- standardavvik for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert.

Skallfraksjon 1	mg AA/g TS			
	Ubehandlet	6 ml/g	9 ml/g	12 ml/g
Essensielle aminosyrer				
Arg - Arginin	2,16 ± 0,30	2,40 ± 0,27	2,20 ± 0,38	2,38 ± 0,03
Met - Metionin	0,96 ± 0,13	1,43 ± 0,13	1,23 ± 0,30	1,43 ± 0,02
Thr - Threonin	1,70 ± 0,21	2,49 ± 0,25	2,21 ± 0,56	2,50 ± 0,05
Phe - Fenylalanin	1,84 ± 0,26	2,85 ± 0,31	2,47 ± 0,57	2,80 ± 0,04
His - Histidin	0,95 ± 0,06	1,30 ± 0,12	1,15 ± 0,28	1,30 ± 0,01
Ile - Isoleucin	1,65 ± 0,23	2,36 ± 0,24	2,03 ± 0,56	2,33 ± 0,04
Leu - Leucin	2,81 ± 0,37	4,05 ± 0,40	2,03 ± 0,83	4,09 ± 0,07
Lys - Lysin	2,40 ± 0,31	3,19 ± 0,31	2,80 ± 0,71	3,19 ± 0,05
Val - Valin	1,98 ± 0,24	2,76 ± 0,23	2,47 ± 0,66	2,76 ± 0,07
Sum EAA	16,45 ± 2,09	22,81 ± 2,59	20,11 ± 4,84	22,78 ± 0,37
Ikke essensielle aminosyrer				
Tau - Taurin	0,15 ± 0,02	i.d.	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	2,15 ± 0,43	11,9 ± 1,13	10,75 ± 0,42	10,47 ± 0,04
Asp – Asparbinsyre*	2,54 ± 0,33	3,27 ± 0,31	2,82 ± 0,70	3,20 ± 0,07
Cys – Cystein	0,45 ± 0,10	0,29 ± 0,40	0,73 ± 0,15	0,98 ± 0,06
Gly – Glycin	6,67 ± 0,44	3,05 ± 0,26	2,87 ± 0,24	2,96 ± 0,08
Glu - Glutaminsyre**	4,52 ± 0,56	5,83 ± 0,56	5,14 ± 1,22	5,90 ± 0,09
Pro - Prolin	1,62 ± 0,18	2,43 ± 0,20	2,14 ± 0,05	2,44 ± 0,06
Ser - Serin	1,63 ± 0,21	2,19 ± 0,22	1,96 ± 0,49	2,23 ± 0,02
Tyr - Tyrosin	1,41 ± 0,62	1,94 ± 1,57	2,5 ± 0,99	3,16 ± 0,10
Sum TAA	37,59 ± 4,23	53,71 ± 6,10	49,97 ± 10,97	54,12 ± 0,54

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og asparbin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

Tabell 8. Totale aminosyrer for skallfraksjon 2, ubehandlede og vaskede prøver med 0,0, 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen inkluderer essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Resultatet er oppgitt som gjennomsnitt +/- standardavvik for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert.

Skallfraksjon 2	mg AA/g TS			
	Ubehandlet	6 ml/g	9 ml/g	12 ml/g
Essensielle aminosyrer				
Arg - Arginin	1,08 ± 0,05	2,48 ± 0,18	2,11 ± 0,61	2,11 ± 0,61
Met - Metionin	0,74 ± 0,08	1,22 ± 0,2	1,07 ± 0,31	1,07 ± 0,31
Thr - Threonin	1,36 ± 0,16	2,2 ± 0,24	1,95 ± 0,48	1,95 ± 0,48
Phe - Fenylnanin	1,45 ± 0,17	2,49 ± 0,37	2,47 ± 0,71	2,47 ± 0,71
His - Histidin	0,76 ± 0,19	1,16 ± 0,02	1,06 ± 0,25	1,06 ± 0,25
Ile - Isoleucin	1,28 ± 0,14	2,06 ± 0,31	1,78 ± 0,46	1,78 ± 0,46
Leu - Leucin	2,2 ± 0,24	3,61 ± 0,54	3,16 ± 0,9	3,16 ± 0,9
Lys - Lysin	2,15 ± 0,23	2,72 ± 0,29	2,44 ± 0,6	2,44 ± 0,6
Val - Valin	1,56 ± 0,19	2,44 ± 0,23	2,14 ± 0,52	2,14 ± 0,52
Sum EAA	12,58 ± 1,59	20,36 ± 2,39	22,16 ± 0,82	18,19 ± 4,83
Ikke essensielle aminosyrer				
Tau - Taurin	0,12 ± 0,02	i.d.	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	1,97 ± 0,25	11,15 ± 1,50	13,39 ± 0,10	10,22 ± 1,87
Asp – Asparbinsyre*	2,02 ± 0,01	2,79 ± 0,34	2,45 ± 0,62	2,45 ± 0,62
Cys - Cystein	0,32 ± 0,06	0,74 ± 0,01	0,58 ± 0,15	0,58 ± 0,15
Gly - Glycin	6,36 ± 0,53	2,63 ± 0,28	2,32 ± 0,72	2,32 ± 0,72
Glu – Glutaminsyre**	3,73 ± 0,09	4,89 ± 0,51	4,35 ± 1,03	4,35 ± 1,03
Pro - Prolin	1,34 ± 0,15	2,5 ± 0,09	2,14 ± 0,79	2,14 ± 0,79
Ser - Serin	1,21 ± 0,16	1,96 ± 0,26	1,7 ± 0,48	1,7 ± 0,48
Tyr - Tyrosin	0,7 ± 0,25	2,79 ± 0,12	2,47 ± 0,74	2,47 ± 0,74
Sum TAA	30,35 ± 3,70	49,81 ± 2,49	55,88 ± 0,75	44,41 ± 11,19

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og asparbin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

4.3 Effekt av endring av sitronsyrekonsentrasjon

Den andre variabelen som ble optimalisert var sitronsyrekonsentrasjon. Sitronsyrevaskingen av skallfraksjonene ble gjennomført med sitronsyrekonsentrasjoner 0,06 og 0,18 M samt vann (0,0 M sitronsyre).

4.3.1 Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike sitronsyrekonsentrasjoner

Fettinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 22,4 og 18,2 % (Tabell 9 og Tabell 10). Vasking av prøvene med rent vann (0,0 M) førte ikke til noen endring i fettinnholdet for skallfraksjon 1, mens det relative fettinnholdet ble betraktelig høyere i skallfraksjon 2. Behandling med sitronsyrekonsentrasjon på 0,06 og 0,18 M førte til en tydelig økning i relativt fettinnhold i begge fraksjonene selv om det ble relativt store variasjoner i mellom de analyseparallellene (tatt ut fra den store heterogene produksjonsbatchen) og fettinnholdet ble høyere etter vask med 0,06 M syre enn etter 0,18 M syre. Proteininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 35,9 og 23,2 %. Etter vasking med vann alene var det relative proteininnholdet økt til ca. 40 % i begge fraksjonene. Moderat sitronsyrevask (0,06 M) ga en ytterligere økning i proteinandelen (i fraksjon 2), mens 0,18 M vask ikke ga noen ytterligere økning for noen av fraksjonene. Behandlet skallfraksjon 2 vasket med 0,06 M syre skilte seg ut med et proteininnhold på 47,5 %. Askeinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 var 8,8 %, mens i skallfraksjon 2 var mengden betydelig høyere (28,9 %). Det relative askeinnholdet ble noe redusert i begge fraksjonene etter vask med kun vann (0,0 M), men begge konsentrasjonene med sitronsyrevask (0,06 og 0,18 M) reduserte askeinnholdet helt ned til å ligge i området fra 1,6% til 2,6% for begge fraksjonene. Kitininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 36,3 og 31,6 %. Behandling med 0,0 M hadde ingen betydning for kitininnhold av skallfraksjon 1, mens behandling med 0,06 og 0,18 M førte til reduksjon. Syrevask av skallfraksjon 2, førte til økt innhold på 37,3 til 41,3 %.

Tabell 9. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i skallfraksjon 1. Analyser på ubehandlede prøver og prøver behandlet med 0,0, 0,06 og 0,18 M sitronsyre. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin i prosentandel av tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1	Fett	Protein	Aske	Kitin
Ubehandlet	22,4 ± 0,7	35,9 ± 1,2	8,8 ± 0,4	36,3 ± 1,9
0,0 M	23,3 ± 1,3	39,9 ± 2,9	5,7 ± 0,2	36,3 ± 4,0
0,06 M	32,3 ± 3,3	40,5 ± 6,4	1,6 ± 0,2	33,3 ± 2,5
0,18 M	27,1 ± 3,9	37,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2	17,2 ± 1,0

Ubehandlet skallfraksjon 1 inneholdt 7,2 % fett, 11,4 % protein, 2,8 % aske og 11,5 % kitin på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

Tabell 10. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i skallfraksjon 2. Analyser av ubehandlede prøver og behandlede prøver med 0,0, 0,06 og 0,18 M sitronsyre. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin basert på prosentandel tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2	Fett	Protein*	Aske	Kitin
Ubehandlet	18,2 ± 0,8	23,2 ± 1,7	28,9 ± 0,6	31,6 ± 1,4
0,0 M	34,3 ± 1,6	39,7 ± 8,5	6,8 ± 0,1	41,3 ± 4,5
0,06 M	33,3 ± 1,6	47,5 ± 1,9	2,6 ± 0,1	37,3 ± 2,4
0,18 M	26,9 ± 0,1	34,4 ± 6,9	2,1 ± 0,1	38,6 ± 0,5

Ubehandlet skallfraksjon 2 inneholdt 7,3 % fett, 9,8 % protein, 11,6 % aske og 12,7 % kitin, på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

4.3.2 Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon

Fettsyresammensetningen ble analysert i de ekstraherte lipidene fra ubehandlet skallfraksjon, samt fra de behandlede skallfraksjonene. I skallfraksjon 1 var innholdet av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $2,9 \pm 0,2$, $2,7 \pm 0,2$ og $3,6 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 11). Behandling med kun vann (0,0 M) og 0,06 M sitronsyre påvirket ikke det relative innholdet av disse fettsyrene, mens prøver behandlet med 0,18 M inneholdt $1,8 \pm 0,4$, $1,6 \pm 0,4$ og $2,1 \pm 0,5$ g/100g TS av henholdsvis SDA, EPA og DHA. Innholdet av SDA, EPA og DHA var noe lavere i ubehandlet prøve av skallfraksjon 2 henholdsvis $1,9 \pm 0,2$, $1,5 \pm 0,2$ og $1,9 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 12). Syrebehandling med 0,0 M og 18 M ga ingen nevneverdig endring i innhold, mens sitronsyrevask med 0,06 M resulterte i et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $3,1 \pm 0,1$, $2,3 \pm 0,1$ og $2,9 \pm 0,1$ g/100g TS.

Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 1 var 10,03 g/100g TS. Syrevask med 0,0 M (vann) og 0,06 M ga liten endring, 0,18 M resulterte i reduksjon hvor n-3 PUFA var 6,5 g/100g TS. Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 2 var 5,65 g/100g TS. Syrevask med 0,0 M (vann) og 0,18 M hadde liten effekt, mens behandling med 0,06 M resulterte i høyere innhold av n-3 PUFA på 8,9 g/100g TS.

Forholdet mellom n-6/n-3 var 0,03 i begge skallfraksjonene. Syrevask hadde ingen effekt på ratioen i skallfraksjon 1, men i skallfraksjon 2 hadde syrevask 0,06 og 0,18 M førte til forhøyet ratio på omtrent 0,06.

Fettsyren C18:1 n-7 ble ikke detektert i behandlede prøver av skallfraksjon 1. Syrevask med 0,06 og 0,18 M førte til at fettsyren C18:3 n-4 ble detektert, men denne fettsyren ble ikke detektert hos ubehandlet prøve og prøve behandlet med 0,0 M. Dokosapentaensyre (DPA) ble ikke detektert etter behandling med 0,06 og 0,18 M sitronsyre i skallfraksjon 1.

Tabell 11. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 1, ubehandlet prøve og behandlede prøver med 0,0, 0,06 og 0,18 M sitronsyre, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1 Fettsyre	Ubehandlet		0,0 M		0,06 M		0,18 M	
	(%)	(g/ 100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,07	0,21 ± 0,02	1,95 ± 0,04	0,44 ± 0,04	1,78 ± 0,1	0,34 ± 0,06	1,8 ± 0,13	0,22 ± 0,06
C14:0	12,5 ± 0,26	2,33 ± 0,15	12,44 ± 0,22	2,78 ± 0,26	11,94 ± 0,25	2,28 ± 0,34	11,7 ± 0,79	1,47 ± 0,4
C16:0	13,46 ± 0,15	2,66 ± 0,13	14,36 ± 0,14	3,21 ± 0,3	14,17 ± 0,22	2,71 ± 0,4	14,52 ± 0,39	1,81 ± 0,43
C18:0	1,41 ± 0,04	0,28 ± 0,01	2,02 ± 0,04	0,45 ± 0,05	1,89 ± 0,06	0,36 ± 0,05	2,19 ± 0,12	0,27 ± 0,05
C16:1 n-7	3,19 ± 0,04	0,63 ± 0,04	3,17 ± 0,01	0,71 ± 0,07	2,93 ± 0,03	0,56 ± 0,1	2,97 ± 0,08	0,37 ± 0,09
C18:1 n-9	4,25 ± 0,1	0,84 ± 0,05	4,12 ± 0,04	0,92 ± 0,09	4,05 ± 0,06	0,78 ± 0,14	4 ± 0,09	0,5 ± 0,11
C18:1 n-7	0,73 ± 0,03	0,15 ± 0,01	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
C18:3 n-4	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	2,96 ± 0,03	0,52 ± 0,02	2,88 ± 0,06	0,24 ± 0,04
C20:1 n-9	3,03 ± 0,07	0,61 ± 0,04	2,94 ± 0,02	0,66 ± 0,07	2,88 ± 0,04	0,55 ± 0,1	2,86 ± 0,09	0,37 ± 0,1
C22:1 n-11	4,35 ± 0,04	0,86 ± 0,05	4,42 ± 0,03	0,99 ± 0,1	4,46 ± 0,05	0,85 ± 0,15	4,48 ± 0,05	0,51 ± 0,07
C22:1 n-9	1,57 ± 0,01	0,31 ± 0,02	1,61 ± 0,03	0,36 ± 0,04	1,59 ± 0,07	0,3 ± 0,05	1,5 ± 0,06	0,19 ± 0,05
C24:1 n-9	1,54 ± 0,11	0,3 ± 0,03	1,83 ± 0,02	0,41 ± 0,04	1,9 ± 0,04	0,37 ± 0,07	1,87 ± 0,05	0,23 ± 0,04
C18:2 n-6 (LA)	1,48 ± 0,03	0,29 ± 0,02	1,51 ± 0,04	0,34 ± 0,02	1,43 ± 0,01	0,27 ± 0,05	1,41 ± 0,03	0,18 ± 0,04
C18:3 n-3 (ALA)	3,18 ± 0,03	0,63 ± 0,04	3,1 ± 0,03	0,69 ± 0,07	2,49 ± 0,29	0,47 ± 0,03	4,06 ± 1,44	0,49 ± 0,09
C18:4 n-3 (SDA)	15,02 ± 0,12	2,99 ± 0,17	14,7 ± 0,13	3,28 ± 0,33	14,48 ± 0,21	2,53 ± 0,1	14,14 ± 0,34	1,58 ± 0,22
C20:5 n-3 (EPA)	13,79 ± 0,14	2,74 ± 0,15	13,49 ± 0,13	3,01 ± 0,3	13,36 ± 0,12	2,56 ± 0,44	13,1 ± 0,35	1,63 ± 0,38
C22:5 n-3 (DPA)	0,61 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,78 ± 0,14	0,18 ± 0,04	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
C22:6 n-3 (DHA)	18,01 ± 0,21	3,57 ± 0,2	17,56 ± 0,19	3,92 ± 0,4	17,66 ± 0,19	3,09 ± 0,09	17,26 ± 0,38	2,15 ± 0,26
SFA	27,36 ± 0,32	4,26 ± 0,26	28,82 ± 0,36	6,44 ± 0,61	28 ± 0,44	5,35 ± 0,79	28,4 ± 1,05	3,55 ± 0,89
MUFA	17,93 ± 0,22	3,71 ± 0,23	18,1 ± 0,04	4,04 ± 0,4	17,82 ± 0,18	3,41 ± 0,6	17,67 ± 0,25	2,5 ± 0,63
PUFA	52,04 ± 0,38	10,33 ± 0,57	51,13 ± 0,36	11,43 ± 1,14	52,39 ± 0,31	10,03 ± 1,71	52,13 ± 1,34	6,46 ± 1,21
PUFA n-3	50,56 ± 0,39	10,03 ± 0,56	49,62 ± 0,38	11,09 ± 1,12	48,47 ± 0,52	9,19 ± 1,56	46,66 ± 0,97	6,04 ± 1,3
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0

Fettsyrer med area <0,5 ble regnet som ikke detektert (i.d.).

Tabell 12. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) i skallfraksjon 2. Analyser på ubehandlet prøve og prøver behandlet med 0,0, 0,06 og 0,18 M sitronsyre, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2 Fettsyre	Ubehandlet		0,0 M		0,06 M		0,18 M	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,03	0,22 ± 0,02	2,11 ± 0,06	0,29 ± 0,03	1,94 ± 0,04	0,35 ± 0,02	1,91 ± 0,12	0,25 ± 0,02
C14:0	13,03 ± 0,23	1,46 ± 0,16	13,14 ± 0,46	1,83 ± 0,17	12,58 ± 0,2	2,3 ± 0,08	12,4 ± 0,56	1,61 ± 0,16
C16:0	13,19 ± 0,37	1,47 ± 0,16	13,47 ± 0,51	1,87 ± 0,18	13,08 ± 0,21	2,39 ± 0,12	12,93 ± 0,22	1,66 ± 0,13
C18:0	1,69 ± 0,12	0,19 ± 0,03	1,79 ± 0,08	0,25 ± 0,02	1,61 ± 0,12	0,26 ± 0,09	1,53 ± 0,01	0,19 ± 0,02
C16:1 n-7	2,77 ± 0,04	0,31 ± 0,03	2,78 ± 0,15	0,39 ± 0,05	2,62 ± 0,03	0,48 ± 0,02	2,61 ± 0,04	0,32 ± 0,04
C18:1 n-9	4,02 ± 0,07	0,45 ± 0,04	4,27 ± 0,18	0,46 ± 0,28	4,22 ± 0,23	0,77 ± 0,04	4,31 ± 0,53	0,53 ± 0,05
C20:1 n-9	3,36 ± 0,06	0,38 ± 0,04	3,35 ± 0,16	0,36 ± 0,06	3,21 ± 0,04	0,59 ± 0,02	3,16 ± 0,08	0,38 ± 0,05
C22:1 n-11	4,77 ± 0,09	0,53 ± 0,05	5,15 ± 0,2	0,55 ± 0,09	4,94 ± 0,06	0,91 ± 0,02	4,89 ± 0,04	0,59 ± 0,07
C22:1 n-9	1,61 ± 0,05	0,18 ± 0,02	1,75 ± 0,07	0,19 ± 0,03	1,63 ± 0,04	0,3 ± 0,01	1,57 ± 0,05	0,19 ± 0,03
C24:1 n-9	1,63 ± 0,11	0,18 ± 0,02	1,91 ± 0,12	0,27 ± 0,02	1,8 ± 0,07	0,33 ± 0,01	1,73 ± 0,1	0,21 ± 0,03
C18:2 n-6 (LA)	1,36 ± 0,04	0,15 ± 0,02	1,51 ± 0,09	0,16 ± 0,03	2,45 ± 0,31	0,45 ± 0,06	3,93 ± 1,39	0,46 ± 0,03
C18:3 n-3 (ALA)	2,85 ± 0,04	0,32 ± 0,03	2,79 ± 0,16	0,39 ± 0,07	2,72 ± 0,05	0,5 ± 0,01	2,64 ± 0,04	0,32 ± 0,04
C18:4 n-3 (SDA)	17,14 ± 0,19	1,92 ± 0,18	17,47 ± 0,69	2,46 ± 0,27	16,85 ± 0,25	3,08 ± 0,09	16,28 ± 0,14	2,08 ± 0,15
C20:5 n-3 (EPA)	13,16 ± 0,14	1,47 ± 0,14	11,38 ± 0,05	1,2 ± 0,63	12,73 ± 0,13	2,33 ± 0,07	12,26 ± 0,08	1,49 ± 0,18
C22:5 n-3 (DPA)	0,68 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,67 ± 0,06	0,09 ± 0,01	0,6 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,87 ± 0,1	0,1 ± 0
C22:6 n-3 (DHA)	16,72 ± 0,36	1,87 ± 0,15	16,46 ± 0,61	1,77 ± 0,25	15,8 ± 0,27	2,89 ± 0,12	15,58 ± 0,2	1,51 ± 0,22
SFA	27,92 ± 0,68	3,12 ± 0,34	28,4 ± 0,99	3,89 ± 0,39	27,26 ± 0,4	4,95 ± 0,27	26,86 ± 0,78	3,26 ± 0,47
MUFA	18,16 ± 0,28	2,03 ± 0,18	19,21 ± 0,82	2,7 ± 0,31	19,65 ± 0,11	3,47 ± 0,32	19,68 ± 0,73	2,54 ± 0,28
PUFA	51,92 ± 0,49	5,8 ± 0,52	50,28 ± 1,84	7,02 ± 1,17	51,15 ± 0,4	9,35 ± 0,34	51,56 ± 1,43	6,48 ± 0,43
PUFA n-3	50,55 ± 0,53	5,65 ± 0,5	48,77 ± 1,91	6,81 ± 1,14	48,7 ± 0,62	8,9 ± 0,31	47,63 ± 0,42	6,07 ± 0,43
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,01

4.3.3 Totale aminosyrer påvirkes av endring av sitronsyrekonsentrasjon

Sum TAA hos ubehandlet av skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 37,6 og 30,4 mg AA/g TS (Tabell 13 og Tabell 14). Behandling kun med vann (0,0 M) og sitronsyrekonsentrasjoner på 0,06 og 0,18 M førte alle til en betydelig økning av den relative summen av TAA som varierte mellom 39,75 og 54,89 mg AA/g TS for de forskjellige behandlingene og fraksjonene. I ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var sum EAA henholdsvis 16,5 og 12,6 mg AA/g TS. Etter syrevask økte den relative mengden EAA mellom 16,2 og 22,6 mg AA/g TS. Mengden av aminosyren alanin var 2,15 og 1,97 mg AA/g TS i ubehandlede skallfraksjoner 1 og 2. Etter syrevask av skallfraksjonene var det en betydelig økning av den relative mengden ala på 6,5 til 10,3 mg AA/g TS. Glycin ble halvert etter syrevask. Taurin ble funnet i små mengder i ubehandlet prøve, men etter behandling ble ikke denne aminosyren detektert. Tryptofan ble heller ikke detektert i noen av prøvene.

Tabell 13. Totale aminosyrer i skallfraksjon 1, ubehandlede prøver og prøver behandlet med 0,0, 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen inkluderer essensielle aminosyrer i rekeoppdrett. Resultatet er oppgitt som gjennomsnitt +/- standardavvik for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert.

Skallfraksjon 1	mg AA/g TS			
	Ubehandlet	0,0 M	0,06 M	0,18 M
Essensielle aminosyrer				
Arg - Arginin	2,16 ± 0,3	2,18 ± 0,25	2,1 ± 0,43	2,07 ± 0,08
Phe - Fenylalanin	0,96 ± 0,13	1,14 ± 0,16	1,31 ± 0,24	1,16 ± 0,01
His - Histidin	1,70 ± 0,21	2,02 ± 0,24	2,32 ± 0,57	2,03 ± 0,02
Ile - Isoleucin	1,84 ± 0,26	2,33 ± 0,33	2,68 ± 0,47	2,28 ± 0,03
Leu - Leucin	0,95 ± 0,06	1,07 ± 0,12	1,21 ± 0,22	1,05 ± 0,01
Lys - Lysin	1,65 ± 0,23	1,88 ± 0,28	2,18 ± 0,38	1,87 ± 0,02
Met - Metionin	2,81 ± 0,37	3,33 ± 0,39	3,75 ± 0,7	3,34 ± 0,03
Thr - Threonin	2,40 ± 0,31	2,61 ± 0,34	2,94 ± 0,52	2,55 ± 0,04
Val - Valin	1,98 ± 0,24	2,27 ± 0,25	2,56 ± 0,45	2,26 ± 0,02
Sum EAA	16,45 ± 2,09	18,84 ± 2,36	21,05 ± 3,85	18,60 ± 0,26
Ikke essensielle aminosyrer				
Tau - Taurin	0,15 ± 0,02	i.d.	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	2,15 ± 0,43	11,40 ± 0,07	9,34 ± 1,05	8,61 ± 1,05
Asp – Asparbinsyre*	2,54 ± 0,33	2,61 ± 0,32	3,00 ± 0,57	2,59 ± 0,03
Cys - Cystein	0,45 ± 0,10	0,76 ± 0,20	0,49 ± 0,01	0,70 ± 0,03
Gly - Glycin	6,67 ± 0,44	2,89 ± 0,32	2,82 ± 0,41	2,54 ± 0,06
Glu – Glutaminsyre**	4,52 ± 0,56	4,70 ± 0,58	5,40 ± 1,00	4,78 ± 0,04
Pro - Prolin	1,62 ± 0,18	2,18 ± 0,26	2,3 ± 0,38	2,11 ± 0,07
Ser - Serin	1,63 ± 0,21	1,79 ± 0,20	2,06 ± 0,39	1,80 ± 0,01
Tyr - Tyrosin	1,41 ± 0,62	2,62 ± 0,37	1,91 ± 2,02	2,64 ± 0,01
Sum TAA	30,35 ± 4,23	47,79 ± 4,45	48,36 ± 10,36	44,39 ± 0,56

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og aspargin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

Tabell 14. Totale aminosyrer for skallfraksjon 2, ubehandlede prøver og prøver behandlet med 0,0, 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen inkluderer essensielle aminosyrer i rekeoppdrett. Resultatet er oppgitt som gjennomsnitt +/- standardavvik for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert.

Skallfraksjoner 2	mg AA/g TS			
	Ubehandlet	0,0 M	0,06 M	0,18 M
Essensielle aminosyrer				
Arg - Arginin	1,08 ± 0,05	2,18 ± 0,46	2,53 ± 0,11	1,74 ± 0,41
Met - Metionin	0,74 ± 0,08	1,05 ± 0,17	1,33 ± 0,03	0,95 ± 0,12
Thr - Threonin	1,36 ± 0,16	1,98 ± 0,36	2,46 ± 0,01	1,81 ± 0,28
Phe - Fenylalanin	1,45 ± 0,17	2,19 ± 0,43	2,75 ± 0,08	1,95 ± 0,25
His - Histidin	0,76 ± 0,19	1,06 ± 0,24	1,41 ± 0,01	0,95 ± 0,18
Ile - Isoleucin	1,28 ± 0,14	1,71 ± 0,25	2,24 ± 0,08	1,63 ± 0,27
Leu - Leucin	2,20 ± 0,24	3,10 ± 0,57	3,93 ± 0,09	2,78 ± 0,45
Lys - Lysin	2,15 ± 0,23	2,53 ± 0,43	3,15 ± 0,01	2,28 ± 0,34
Val - Valin	1,56 ± 0,19	2,22 ± 0,35	2,77 ± 0,05	2,11 ± 0,32
Sum EAA	12,58 ± 1,59	18,01 ± 18,01	22,58 ± 0,18	16,20 ± 2,62
Ikke essensielle aminosyrer				
Tau - Taurin	0,12 ± 0,02	i.d.	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	1,97 ± 0,25	11,23 ± 2,7	12,23 ± 0,00	10,16 ± 1,37
Asp – Asparbinsyre*	2,02 ± 0,01	2,50 ± 0,47	3,14 ± 0,02	2,26 ± 0,34
Cys - Cystein	0,32 ± 0,06	0,63 ± 0,19	0,68 ± 0,08	0,36 ± 0,51
Gly - Glycin	6,36 ± 0,53	2,45 ± 0,60	3,02 ± 0,20	2,07 ± 0,33
Glu - Glutaminsyre**	3,73 ± 0,09	4,44 ± 0,78	5,68 ± 0,01	4,1 ± 0,54
Pro - Prolin	1,34 ± 0,15	2,48 ± 1,07	2,91 ± 0,73	1,8 ± 0,28
Ser - Serin	1,21 ± 0,16	1,74 ± 0,32	2,16 ± 0,02	1,56 ± 0,26
Tyr - Tyrosin	0,70 ± 0,25	2,52 ± 0,43	2,47 ± 1,01	1,23 ± 1,74
Sum TAA	30,35 ± 3,70	46,01 ± 9,85	54,89 ± 2,24	39,75 ± 8,00

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og aspargin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

4.4 Effekt av behandlingstid

Behandlingstiden av sitronsyrevasken ble forsøkt optimalisert, med en test av behandlingstid på 1 time.

4.4.1 Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter endret behandlingstid

Fettinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 22,4 og 18,2 % (Tabell 15 og Tabell 16). Fettandelen økte betydelig etter en times behandling med 6,4 til 16,3 prosentpoeng. Proteinnivået i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 35,9 og 23,2 %. Etter behandling i 1 t av skallfraksjon 1, var det relative proteininnholdet redusert til 33,4%, mens relativt proteininnhold i behandlet skallfraksjon 2 hadde økt til 39,5 %. Askeinnhold i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 8,8 og 28,9 %. Behandlingstid på en time førte til en betydelig reduksjon av askeinnholdet på 6,8 til 26,7 prosentpoeng. Kitininnholdet i ubehandlet prøve av skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 36,3 og 31,6 %. Behandling med syrevask i en time førte til at relativ mengde kitin i skallfraksjon 1 ble redusert med 2,9 prosentpoeng, mens skallfraksjon 2 økte med 3,1 prosentpoeng.

Tabell 15. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i skallfraksjon 1. Analyser på ubehandlede prøver fra skallfraksjonen og prøver behandlet i 1 t med sitronsyre. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin basert på prosentandel tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1	Fett	Protein*	Aske	Kitin
Ubehandlet	22,4 ± 0,7	35,9 ± 1,2	8,8 ± 0,4	36,3 ± 1,9
1 t	28,8 ± 1,4	33,4 ± 3,0	2,0 ± 0,4	33,4 ± 2,5

Ubehandlet skallfraksjon 1 inneholdt 7,2 % fett, 11,4 % protein, 2,8 % aske og 11,5 % kitin på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

Tabell 16. Biokjemisk sammensetning og kitininnhold i skallfraksjon 2. Analyser på ubehandlede prøver fra skallfraksjonen og prøver behandlet i 1 t med sitronsyre. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin i prosentandel basert på prosentandel tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2	Fett	Protein*	Aske	Kitin
Ubehandlet	18,2 ± 0,8	23,2 ± 1,7	28,9 ± 0,6	31,6 ± 1,4
1 t	34,5 ± 0,7	39,5 ± 2,0	2,2 ± 0,2	34,7 ± 1,4

Ubehandlet skallfraksjon 2 inneholdt 7,3 % fett, 9,8 % protein, 11,6 % aske og 12,7 % kitin, på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

4.4.2 Fettsyresammensetning påvirkes lite av endring av behandlingstid

Ekstraherte lipider fra ubehandlet prøve av skallfraksjon 1 viste et innhold av fettsyrene SDA, EPA og DHA på henholdsvis $2,9 \pm 0,2$, $2,7 \pm 0,2$ og $3,6 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 17). Behandling i en time med sitronsyrevask (12 M) av skallfraksjon 1 førte til en svak økning av fettsyrene. Ekstrahert fett fra ubehandlet prøve av skallfraksjon 2 viste et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $1,9 \pm 0,2$, $1,5 \pm 0,2$ og $1,9 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 18). Syrevask i 1 t av skallfraksjon 2 førte til økning av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $3,0 \pm 0,2$, $2,3 \pm 0,2$ og $2,8 \pm 0,2$ g/100g TS.

Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 10,03 og 5,65 g/100g TS. Syrevask med behandlingstid på 1 t av skallfraksjon 1 førte til økning av n-3 PUFA på 11,5 g/100g TS. Etter behandling av skallfraksjon 2 økte totalt PUFA n-3 nivå til 8,6 g/100g TS. Ratioen n-6/n-3 holdt seg stabil på 0,03 i begge skallfraksjonene før og etter behandlingstid på en time.

Etter behandlingstid på 1 t av skallfraksjon 1, ble ikke fettsyre C18:1 n-7 detektert. Syrevask av skallfraksjon 2 førte til at dokosapentaensyre (DPA, C22:5 n-3) ble ikke detektert.

Tabell 17. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 1 ubehandlet prøve og prøve behandlet 1 t, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 1 Fettsyre	Ubehandlet		1 t	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,07	0,21 ± 0,02	1,99 ± 0,04	0,46 ± 0,03
C14:0	12,5 ± 0,26	2,33 ± 0,15	12,59 ± 0,2	2,93 ± 0,21
C16:0	13,46 ± 0,15	2,66 ± 0,13	14,45 ± 0,05	3,36 ± 0,21
C18:0	1,41 ± 0,04	0,28 ± 0,01	2,04 ± 0,11	0,47 ± 0,02
C16:1 n-7	3,19 ± 0,04	0,63 ± 0,04	3,19 ± 0,04	0,74 ± 0,04
C18:1 n-9	4,25 ± 0,1	0,84 ± 0,05	4,08 ± 0,03	0,95 ± 0,07
C18:1 n-7	0,73 ± 0,03	0,15 ± 0,01	i.d.	i.d.
C20:1 n-9	3,03 ± 0,07	0,61 ± 0,04	2,9 ± 0,01	0,68 ± 0,04
C22:1 n-11	4,35 ± 0,04	0,86 ± 0,05	4,31 ± 0,04	1 ± 0,07
C22:1 n-9	1,57 ± 0,01	0,31 ± 0,02	1,55 ± 0,04	0,36 ± 0,03
C24:1 n-9	1,54 ± 0,11	0,3 ± 0,03	1,84 ± 0,09	0,43 ± 0,04
C18:2 n-6 (LA)	1,48 ± 0,03	0,29 ± 0,02	1,45 ± 0,01	0,34 ± 0,02
C18:3 n-3 (ALA)	3,18 ± 0,03	0,63 ± 0,04	3,1 ± 0,03	0,72 ± 0,05
C18:4 n-3 (SDA)	15,02 ± 0,12	2,99 ± 0,17	14,71 ± 0,03	3,42 ± 0,22
C20:5 n-3 (EPA)	13,79 ± 0,14	2,74 ± 0,15	13,5 ± 0,02	3,14 ± 0,2
C22:5 n-3 (DPA)	0,61 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,7 ± 0,12	0,16 ± 0,02
C22:6 n-3 (DHA)	18,01 ± 0,21	3,57 ± 0,2	17,59 ± 0,09	4,09 ± 0,25
SFA	27,36 ± 0,32	4,26 ± 0,26	29,09 ± 0,18	6,77 ± 0,43
MUFA	17,93 ± 0,22	3,71 ± 0,23	17,88 ± 0,14	4,16 ± 0,29
PUFA	52,04 ± 0,38	10,33 ± 0,57	51,05 ± 0,15	11,88 ± 0,73
PUFA n-3	50,56 ± 0,39	10,03 ± 0,56	49,6 ± 0,16	11,54 ± 0,71
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0

Fettsyreer med area <0,5 ble regnet som ikke detektert (i.d.).

Tabell 18. Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 2 ubehandlet prøve og prøve behandlet i 1 time med sitronsyre, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 4 analyseparalleller.

Skallfraksjon 2 Fettsyre	Ubehandlet		1 t	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	2,01 ± 0,03	0,22 ± 0,02	1,86 ± 0,09	0,29 ± 0,08
C14:0	13,03 ± 0,23	1,46 ± 0,16	12,67 ± 0,41	2,25 ± 0,19
C16:0	13,19 ± 0,37	1,47 ± 0,16	14,08 ± 0,83	2,46 ± 0,31
C18:0	1,69 ± 0,12	0,19 ± 0,03	1,97 ± 0,2	0,31 ± 0,08
C16:1 n-7	2,77 ± 0,04	0,31 ± 0,03	2,69 ± 0,04	0,47 ± 0,04
C18:1 n-9	4,02 ± 0,07	0,45 ± 0,04	4,17 ± 0,02	0,73 ± 0,05
C20:1 n-9	3,36 ± 0,06	0,38 ± 0,04	3,34 ± 0,08	0,58 ± 0,04
C22:1 n-11	4,77 ± 0,09	0,53 ± 0,05	5,14 ± 0,08	0,81 ± 0,06
C22:1 n-9	1,61 ± 0,05	0,18 ± 0,02	1,64 ± 0,03	0,26 ± 0,02
C24:1 n-9	1,63 ± 0,11	0,18 ± 0,02	1,87 ± 0,12	0,32 ± 0,03
C18:2 n-6 (LA)	1,36 ± 0,04	0,15 ± 0,02	1,37 ± 0,01	0,24 ± 0,02
C18:3 n-3 (ALA)	2,85 ± 0,04	0,32 ± 0,03	2,84 ± 0,05	0,5 ± 0,03
C18:4 n-3 (SDA)	17,14 ± 0,19	1,92 ± 0,18	17,06 ± 0,38	2,98 ± 0,18
C20:5 n-3 (EPA)	13,16 ± 0,14	1,47 ± 0,14	13,06 ± 0,17	2,28 ± 0,14
C22:5 n-3 (DPA)	0,68 ± 0,09	0,07 ± 0,01	i.d.	i.d.
C22:6 n-3 (DHA)	16,72 ± 0,36	1,87 ± 0,15	16,24 ± 0,35	2,83 ± 0,18
SFA	27,92 ± 0,68	3,12 ± 0,34	28,72 ± 1,17	5,06 ± 0,54
MUFA	18,16 ± 0,28	2,03 ± 0,18	18,85 ± 0,23	3,29 ± 0,22
PUFA	51,92 ± 0,49	5,8 ± 0,52	50,57 ± 0,93	8,83 ± 0,56
PUFA n-3	50,55 ± 0,53	5,65 ± 0,5	49,2 ± 0,94	8,59 ± 0,54
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0

Fettsyreer med area <0,5 ble regnet som ikke detektert (i.d.).

4.4.3 Totale aminosyrer påvirkes av endring av behandlingstid

Sum TAA hos ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 37,6 og 30,4 mg AA/g TS (Tabell 19 og Tabell 20). Etter sitronsyrevask i 1 t økte den relative summen av TAA til verdier mellom 43,6 og 45,8 mg AA/g TS hos henholdsvis skallfraksjon 1 og 2. I ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var sum EAA henholdsvis 16,5 og 12,6 mg AA/g TS. Etter syrevask var innholdet av EAA i skallfraksjon 1 tilsvarende, mens sum EAA økte til 18,7 mg AA/g TS hos skallfraksjon 2. Etter syrevask av skallfraksjonene økte den relative mengden av ala med i overkant av 7 mg AA/g TS. Taurin ble funnet i små mengder i ubehandlet prøve, men etter behandling ble ikke denne aminosyren detektert. Tryptofan ble heller ikke detektert i noen av prøvene.

Tabell 19 Totale aminosyrer for Skallfraksjon ubehandlet og prøve med behandlingstid på 1 t. Tabellen viser essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 2 paralleller av hver prøve. i.d. = ikke detektert

Skallfraksjon 1	mg AA/g TS	
	Ubehandlet	1 t
Essensielle aminosyrer		
Phe - Fenylalanin	2,16 ± 0,3	1,85 ± 0,32
Arg - Arginin	0,96 ± 0,13	1,07 ± 0,18
His - Histidin	1,7 ± 0,21	1,86 ± 0,31
Ile - Isoleucin	1,84 ± 0,26	2,1 ± 0,35
Leu - Leucin	0,95 ± 0,06	0,99 ± 0,17
Lys - Lysin	1,65 ± 0,23	1,76 ± 0,25
Met - Metionin	2,81 ± 0,37	3 ± 0,43
Thr - Threonin	2,4 ± 0,31	2,36 ± 0,31
Val - Valin	1,98 ± 0,24	2,12 ± 0,31
Sum EAA	16,45 ± 2,09	17,08 ± 2,62
Ikke essensielle aminosyrer		
Tau - Taurin	0,15 ± 0,02	i.d.
Ala - Alanin	2,15 ± 0,43	9,69 ± 0,9
Asp – Asparbinsyre*	2,54 ± 0,33	2,37 ± 0,36
Cys - Cystein	0,45 ± 0,1	0,58 ± 0,06
Gly - Glycin	6,67 ± 0,44	4,76 ± 3,92
Glu - Glutaminsyre**	4,52 ± 0,56	4,25 ± 0,6
Pro - Prolin	1,62 ± 0,18	1,77 ± 0,41
Ser - Serin	1,63 ± 0,21	1,67 ± 0,29
Tyr - Tyrosin	1,41 ± 0,62	1,41 ± 0,16
Sum TAA	37,59 ± 4,23	44,16 ± 10,56

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og asparbin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

Tabell 20 Totale aminosyrer for skallfraksjon 2, ubehandlet og behandlet i 1t. Tabellen viser essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 2 paralleller av hver prøve. i.d. = ikke detektert

Skallfraksjon 2	mg AA/g TS	
	Ubehandlet	1 t
Essensielle aminosyrer		
Arg - Arginin	1,08 ± 0,05	1,91 ± 0,18
Met - Metionin	0,74 ± 0,08	1,11 ± 0,04
Thr - Threonin	1,36 ± 0,16	2,13 ± 0,06
Phe - Fenylalanin	1,45 ± 0,17	2,31 ± 0,03
His - Histidin	0,76 ± 0,19	1,07 ± 0,13
Ile - Isoleucin	1,28 ± 0,14	1,90 ± 0,11
Leu - Leucin	2,20 ± 0,24	3,25 ± 0,13
Lys - Lysin	2,15 ± 0,23	2,67 ± 0,06
Val - Valin	1,56 ± 0,19	2,41 ± 0,07
Sum EAA	12,58 ± 1,59	18,75 ± 0,80
Ikke essensielle aminosyrer		
Tau - Taurin	0,12 ± 0,02	i.d.
Ala - Alanin	1,97 ± 0,25	12,56 ± 0,05
Asp – Asparbinsyre*	2,02 ± 0,01	2,77 ± 0,10
Cys - Cystein	0,32 ± 0,06	0,23 ± 0,32
Gly - Glycin	6,36 ± 0,53	2,36 ± 0,29
Glu – Glutaminsyre**	3,73 ± 0,09	4,83 ± 0,13
Pro - Prolin	1,34 ± 0,15	2,07 ± 0,06
Ser - Serin	1,21 ± 0,16	1,86 ± 0,06
Tyr - Tyrosin	0,70 ± 0,25	0,39 ± 0,55
Sum TAA	30,35 ± 3,70	45,73 ± 2,27

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og aspargin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

4.5 Effekt ved endring av sitronsyrekonsentrasjon hos tørkede skallfraksjoner

Behandlingen av de tørkede skallfraksjonene avvike noe fra behandlingen av de våte skallfraksjonene. Behandlingstiden var på 1 time ved 60 °C (inkubator ved 150 rpm.) med en V/TS på 12 ml/g og parametere på 0,06 og 0,12 M syrekonsentrasjon.

4.5.1 Biokjemisk sammensetning og kitininnhold etter vask med ulike sitronsyrekonsentrasjoner

Fettinnholdet i de ubehandlede skallfraksjonene 3 og 4 var på henholdsvis 18,2 og 19,9 % (Tabell 21 og Tabell 22). Det relative fettinnholdet økte med i overkant av 10 prosentpoeng, til et totalt fettinnhold på 29,4 til 32,2 % etter behandling med 0,06 M og 0,12 M sitronsyre. Proteininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 3 og 4 var på henholdsvis 35,8 og 39,0 %, og etter sitronsyrevask var nivået relativt likt. Askeinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 9,8 og 9,6 %. Etter syrevask ble det relative askeinnholdet redusert med i overkant av 7 prosentpoeng til et totalt askeinnhold på 0,9 og 1,2 % hos henholdsvis 0,06 og 0,12 M. Kitininnholdet i ubehandlet skallfraksjon 1 og 2 var henholdsvis 36,3 og 33,9 %. Etter behandling ble relativt kitininnhold i skallfraksjon 3 redusert til 27,9 og 28,5 % hos prøver behandlet med 0,06 og 0,12 M. Relativt kitininnhold i skallfraksjon 4 var lik ubehandlet skallfraksjon.

Tabell 21. Biokjemisk sammensetning og kitin i skallfraksjon 3. Analyser på ubehandlede prøver og prøver behandlet med 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen viser fett, protein, aske og kitin basert på prosentandel av tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 3 analyseparalleller.

Tørket Skallfraksjon 3	Fett	Protein*	Aske	Kitin
ubehandlet	19,9 ± 0,3	35,8 ± 0,2	9,8 ± 0,1	36,3 ± 1,3
0,06 M	32,2 ± 0,3	35,1 ± 3,7	0,9 ± 0,1	27,9 ± 0,5
0,12 M	30,7 ± 3,0	34,2 ± 0,7	1,2 ± 0,0	28,5 ± 2,9

Ubehandlet prøve av skallfraksjon 3 inneholdt 19,1 % fett, 34,2 % protein, 9,4 % aske og 34,8 % kitin på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

Tabell 22. Biokjemisk sammensetning og kitin av skallfraksjon 4. Analyser på ubehandlede prøver og prøver behandlet med 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen viser fett, protein aske og kitin basert på prosentandel tørrstoff. Gjennomsnitt og standardavvik beregnet for 3 analyseparalleller.

Tørket Skallfraksjon 4	Fett	Protein*	Aske	Kitin
ubehandlet	18,2 ± 0,6	39,0 ± 0,7	9,6 ± 0,2	33,9 ± 0,6
0,06 M	31,7 ± 0,1	35,9 ± 0,5	1,0 ± 0,3	31,8 ± 3,9
0,12 M	29,4 ± 5,8	38,4 ± 2,9	1,4 ± 0,4	31,1 ± 1,1

Ubehandlet prøve av skallfraksjon 4 inneholdt 17,4 % fett, 37,2 % protein, 9,2 % aske og 32,4 % kitin på våtvektbasis. *Proteinmålingene var basert på to paralleller.

4.5.2 Fettekstraksjon påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon

Ekstrahert fett fra ubehandlet prøve av tørket skallfraksjon 3 viste et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $2,4 \pm 0,1$, $2,2 \pm 0,1$ og $2,6 \pm 0,1$ g/100g TS (Tabell 23). Syrevask med 0,06 M og 0,12 M førte til sammenlignbart innhold med ubehandlet prøve. Ekstrahert fett fra ubehandlet prøve av tørket skallfraksjon 4 viste et innhold av SDA, EPA og DHA på henholdsvis $2,4 \pm 0,2$, $2,0 \pm 0,2$ og $2,6 \pm 0,2$ g/100g TS (Tabell 24). Etter syrevask med 0,06 og 0,12 M, var sammensetningen av fettsyrene tilsvarende.

Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 3 var 7,9 g/100g TS. Syrevask på 0,06 og 0,12 M hadde ingen effekt på mengden n-3 PUFA. Den totale mengden n-3 PUFA i ubehandlet skallfraksjon 4 var 7,7 g/100g TS. Etter syrevask var nivået tilsvarende.

Tabell 23 Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 3, ubehandlet prøve og prøver behandlet ved 0,06 og 0,12 M sitronsyre, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 3 analyseparalleller.

Skallfraksjon 3 Fettsyre	Ubehandlet		0,06 M		0,12 M	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	$1,11 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,06$	$1,13 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,06$
C14:0	$12,38 \pm 0,36$	$1,6 \pm 0,67$	$12,4 \pm 0,15$	$2 \pm 0,05$	$12,35 \pm 0,18$	$1,63 \pm 0,69$
C16:0	$14,58 \pm 0,19$	$2,22 \pm 0,06$	$14,89 \pm 0,15$	$2,4 \pm 0,06$	$14,82 \pm 0,11$	$2,23 \pm 0,11$
C18:0	$1,39 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,02$	$1,57 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$
C16:1 n-7	$3,16 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,01$	$3,23 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,02$
C18:1 n-9	$4,07 \pm 0,06$	$0,62 \pm 0,02$	$4,02 \pm 0,08$	$0,65 \pm 0,01$	$3,99 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,03$
C18:1 n-7	$0,64 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,01$
C20:1 n-9	$2,62 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,01$	$2,58 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$	$2,57 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,02$
C22:1 n-11	$3,33 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,02$	$3,28 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,01$	$3,27 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,02$
C22:1 n-9	$1,72 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$	$1,72 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0$	$1,73 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,01$
C24:1 n-9	$1,67 \pm 0,16$	$0,25 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,11$	$0,3 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,02$
C18:2 n-6 (LA)	$1,44 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,01$	$1,47 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01$
C18:3 n-3 (ALA)	$3,78 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,02$	$3,72 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,01$	$3,77 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,03$
C18:4 n-3 (SDA)	$15,65 \pm 0,2$	$2,38 \pm 0,07$	$15,43 \pm 0,12$	$2,48 \pm 0,03$	$15,45 \pm 0,1$	$2,33 \pm 0,11$
C20:5 n-3 (EPA)	$14,49 \pm 0,12$	$2,21 \pm 0,06$	$14,4 \pm 0,1$	$2,32 \pm 0,03$	$14,47 \pm 0,09$	$2,18 \pm 0,1$
C22:5 n-3 (DPA)	$0,6 \pm 0,08$	$0,09 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,11$	$0,1 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,02$
C22:6 n-3 (DHA)	$17,36 \pm 0,51$	$2,64 \pm 0,07$	$17 \pm 0,16$	$2,74 \pm 0,07$	$17,18 \pm 0,18$	$2,59 \pm 0,12$
SFA	$28,35 \pm 0,43$	$4,03 \pm 0,67$	$28,89 \pm 0,3$	$4,65 \pm 0,13$	$28,74 \pm 0,21$	$4,09 \pm 0,78$
MUFA	$16,69 \pm 0,3$	$2,62 \pm 0,08$	$16,69 \pm 0,14$	$2,79 \pm 0,05$	$17,2 \pm 0,13$	$2,59 \pm 0,13$
PUFA	$53,32 \pm 0,4$	$8,12 \pm 0,18$	$52,62 \pm 0,24$	$8,47 \pm 0,14$	$52,87 \pm 0,36$	$7,96 \pm 0,36$
PUFA n-3	$51,88 \pm 0,41$	$7,9 \pm 0,17$	$51,15 \pm 0,23$	$8,24 \pm 0,13$	$51,45 \pm 0,34$	$7,74 \pm 0,35$
n-6/n-3	$0,03 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	$0,03 \pm 0$

Tabell 24 Fettsyresammensetning (arealprosent) og mengde (g prøve per 100 g TS) fra skallfraksjon 4 ubehandlet prøve og prøve behandlet ved 0,06 og 0,12 M sitronsyre, ekstrahert ved Folchs metode. Standardavvik beregnet for 3 analyseparalleller av samme oljeprøve.

Skallfraksjon 4 Fettsyre	Ubehandlet		0,06 M		0,12 M	
	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)
uidentifisert	1,05 ± 0,01	0,06 ± 0,06	1,03 ± 0,05	0,15 ± 0,01	1,05 ± 0,05	0,16 ± 0,01
C14:0	12,83 ± 0,15	0,79 ± 0,79	12,46 ± 0,37	1,82 ± 0,1	12,85 ± 0,45	1,94 ± 0,07
C16:0	13,95 ± 0,07	2,09 ± 0,17	14,34 ± 0,2	2,09 ± 0,06	14,57 ± 0,42	2,2 ± 0,05
C18:0	1,43 ± 0,05	0,21 ± 0,02	1,69 ± 0,08	0,25 ± 0,01	1,7 ± 0,05	0,26 ± 0,01
C16:1 n-7	3,01 ± 0,03	0,45 ± 0,03	3,19 ± 0,11	0,46 ± 0,02	3,12 ± 0,15	0,47 ± 0,03
C18:1 n-9	4,27 ± 0,07	0,64 ± 0,05	4,22 ± 0,07	0,61 ± 0,02	4,2 ± 0,05	0,64 ± 0,02
C18:1 n-7	0,64 ± 0,05	0,1 ± 0,01	0,65 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,63 ± 0,04	0,1 ± 0,01
C20:1 n-9	3,06 ± 0,03	0,46 ± 0,04	3,02 ± 0,04	0,44 ± 0,02	3,02 ± 0,04	0,46 ± 0,02
C22:1 n-11	4,09 ± 0,04	0,61 ± 0,05	4,01 ± 0,04	0,58 ± 0,02	4,03 ± 0,06	0,61 ± 0,02
C22:1 n-9	1,66 ± 0,01	0,25 ± 0,02	1,66 ± 0,01	0,24 ± 0,01	1,66 ± 0,04	0,25 ± 0,01
C24:1 n-9	1,56 ± 0,23	0,23 ± 0,04	1,66 ± 0,22	0,25 ± 0,03	1,65 ± 0,21	0,25 ± 0,03
C18:2 n-6 (LA)	1,44 ± 0,02	0,22 ± 0,02	1,44 ± 0,04	0,21 ± 0,01	1,47 ± 0,06	0,22 ± 0,01
C18:3 n-3 (ALA)	3,3 ± 0,04	0,5 ± 0,04	3,39 ± 0,23	0,48 ± 0,02	3,24 ± 0,06	0,49 ± 0,02
C18:4 n-3 (SDA)	16,16 ± 0,17	2,43 ± 0,19	15,94 ± 0,19	2,32 ± 0,08	15,82 ± 0,36	2,39 ± 0,1
C20:5 n-3 (EPA)	13,6 ± 0,07	2,04 ± 0,17	13,59 ± 0,15	1,98 ± 0,06	13,42 ± 0,24	2,03 ± 0,09
C22:5 n-3 (DPA)	0,53 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,57 ± 0,06	0,09 ± 0,01	0,6 ± 0,04	0,09 ± 0
C22:6 n-3 (DHA)	17,42 ± 0,24	2,62 ± 0,23	17,24 ± 0,26	2,5 ± 0,09	16,96 ± 0,32	2,56 ± 0,11
SFA	28,2 ± 0,17	3,1 ± 0,68	28,49 ± 0,27	4,16 ± 0,15	29,12 ± 0,83	4,4 ± 0,12
MUFA	17,66 ± 0,13	2,75 ± 0,21	18,42 ± 0,13	2,68 ± 0,1	18,32 ± 0,3	2,77 ± 0,12
PUFA	52,45 ± 0,22	7,88 ± 0,65	53,83 ± 0,32	7,57 ± 0,25	53,16 ± 0,84	7,79 ± 0,32
PUFA n-3	51,01 ± 0,2	7,66 ± 0,63	50,73 ± 0,39	7,36 ± 0,25	50,04 ± 0,95	7,57 ± 0,31
n-6/n-3	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0

4.5.3 Totale aminosyrer påvirkes lite av endring av sitronsyrekonsentrasjon

Sum TAA i ubehandlet av skallfraksjon 3 og 4 var henholdsvis 38,3 og 41,1 mg AA/g TS (Tabell 25 og Tabell 26). Etter syrevask var det en svak økning i sum TAA. Sum EAA i ubehandlet skallfraksjon 3 og 4 var henholdsvis 17,0 og 17,8 mg AA/g TS. Etter syrevask var sum EAA lik de ubehandlede skallfraksjonene. Taurin ble funnet i små mengder i ubehandlet prøve, men etter behandling ble ikke denne aminosyren detektert. I tørket skallfraksjon 4, behandlet med 0,06 M sitronsyre ble heller ikke aminosyrene tyrosin eller cystein detektert. Tryptofan ble ikke detektert i noen av prøvene.

Tabell 25 Totale aminosyrer for tørket skallfraksjon 3, ubehandlede prøver og vaskede prøver med 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen viser essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Gjennomsnitt +/- standardavvik beregnet for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert

Tørkede skallfraksjoner 3	mg AA/g TS		
	Ubehandlet	0,06 M	0,12 M
Essensielle aminosyrer			
Arg - Arginin	2,17 ± 0,12	1,77 ± 0,49	1,93 ± 0,31
Phe - Fenylalanin	1,92 ± 0,02	2,37 ± 0,22	2,24 ± 0,05
His - Histidin	0,91 ± 0,01	1,15 ± 0,27	0,93 ± 0,15
Ile - Isoleucin	1,79 ± 0,01	1,97 ± 0,13	2,00 ± 0,030
Leu - Leucin	2,96 ± 0,01	2,10 ± 0,20	3,27 ± 0,06
Lys - Lysin	2,43 ± 0,01	2,64 ± 0,18	2,54 ± 0,18
Met - Metionin	1,02 ± 0,01	1,25 ± 0,07	1,11 ± 0,03
Thr - Threonin	1,74 ± 0,01	2,11 ± 0,19	1,98 ± 0,06
Val - Valin	2,05 ± 0,03	2,38 ± 0,23	2,28 ± 0,06
Sum EAA	16,99 ± 0,22	17,74 ± 3,53	18,29 ± 0,59
Ikke essensielle aminosyrer			
Tau - Taurin	0,14 ± 0,01	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	2,13 ± 0,10	2,55 ± 0,21	2,56 ± 0,04
Asp – Asparbinsyre*	2,7 ± 0,15	2,82 ± 0,28	2,66 ± 0,08
Cys - Cystein	0,51 ± 0,03	0,56 ± 0,14	0,32 ± 0,20
Gly - Glycin	5,71 ± 0,01	8,50 ± 0,62	8,19 ± 0,31
Glu - Glutaminsyre**	4,61 ± 0,03	4,95 ± 0,55	4,57 ± 0,14
Pro - Prolin	1,67 ± 0,02	1,89 ± 0,14	1,82 ± 0,05
Ser - Serin	1,64 ± 0,01	1,87 ± 0,19	1,72 ± 0,05
Tyr - Tyrosin	2,22 ± 0,01	3,45 ± 0,31	0,58 ± 0,01
Sum TAA	38,33 ± 0,24	44,32 ± 1,96	40,70 ± 0,59

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og asparbin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

Tabell 26 Totale aminosyrer for tørket skallfraksjon 4, ubehandlede prøve og vaskede prøver med 0,06 og 0,12 M sitronsyre. Tabellen viser essensielle aminosyrer for rekeoppdrett. Gjennomsnitt +/- standardavvik for 2 paralleller. i.d. = ikke detektert

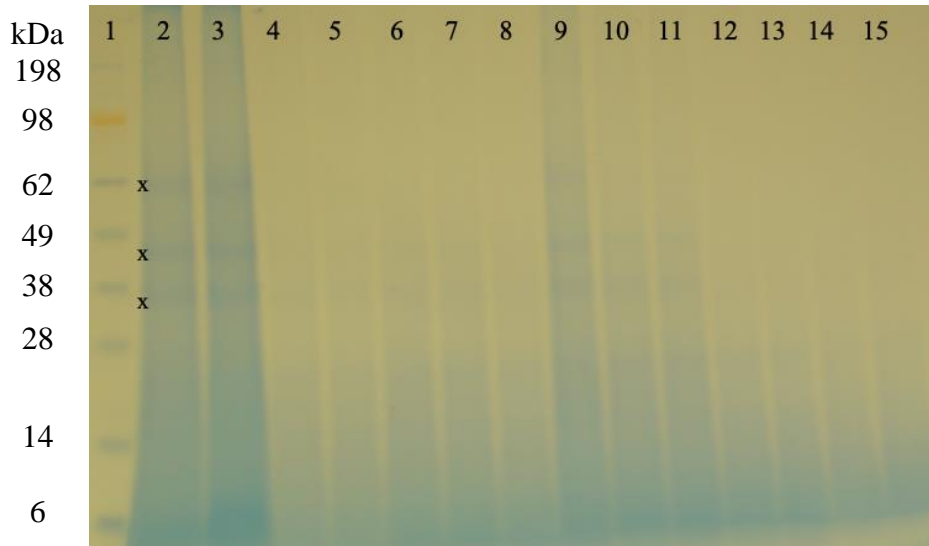
Tørkede skallfraksjoner 4	mg AA/g TS		
	Ubehandlet	0,06 M	0,12 M
Essensielle aminosyrer			
Arg - Arginin	2,07 ± 0,16	2,01 ± 0,44	2,51 ± 0,31
Phe - Fenylalanin	2,00 ± 0,01	2,31 ± 0,12	2,46 ± 0,18
His - Histidin	0,98 ± 0,01	0,59 ± 0,22	1,14 ± 0,02
Ile - Isoleucin	1,83 ± 0,01	2,14 ± 0,14	2,17 ± 0,18
Leu - Leucin	3,12 ± 0,03	3,45 ± 0,21	3,57 ± 0,26
Lys - Lysin	2,68 ± 0,04	2,65 ± 0,29	2,83 ± 0,26
Met - Metionin	1,10 ± 0,01	1,15 ± 0,05	1,26 ± 0,10
Thr - Threonin	1,87 ± 0,01	2,11 ± 0,13	2,19 ± 0,17
Val - Valin	2,12 ± 0,01	2,42 ± 0,16	2,46 ± 0,22
Sum EAA	17,77 ± 0,26	18,83 ± 1,18	20,60 ± 1,62
Ikke essensielle aminosyrer			
Tau - Taurin	0,17 ± 0,01	i.d.	i.d.
Ala - Alanin	2,21 ± 0,05	2,58 ± 0,23	2,55 ± 0,23
Asp – Asparbinsyre*	2,83 ± 0,03	2,81 ± 0,17	2,89 ± 0,23
Cys - Cystein	0,59 ± 0,02	i.d.	0,48 ± 0,17
Gly - Glycin	6,77 ± 0,23	8,5 ± 0,55	9,03 ± 0,55
Glu - Glutaminsyre**	5,02 ± 0,04	4,89 ± 0,32	5,04 ± 0,38
Pro - Prolin	1,72 ± 0,01	1,84 ± 0,10	1,91 ± 0,17
Ser - Serin	1,81 ± 0,02	1,85 ± 0,12	1,93 ± 0,15
Tyr - Tyrosin	2,27 ± 0,12	i.d.	1,78 ± 1,42
Sum TAA	41,14 ± 0,56	41,30 ± 2,53	46,19 ± 3,44

* asparbinsyre representerer aminosyrene asparbinsyre og asparbin (som deamineres i opparbeidelsen)

** glutaminsyre representerer aminosyrene glutaminsyre og glutamin (som deamineres i opparbeidelsen)

4.6 Bestemmelse av proteinband med SDS-PAGE

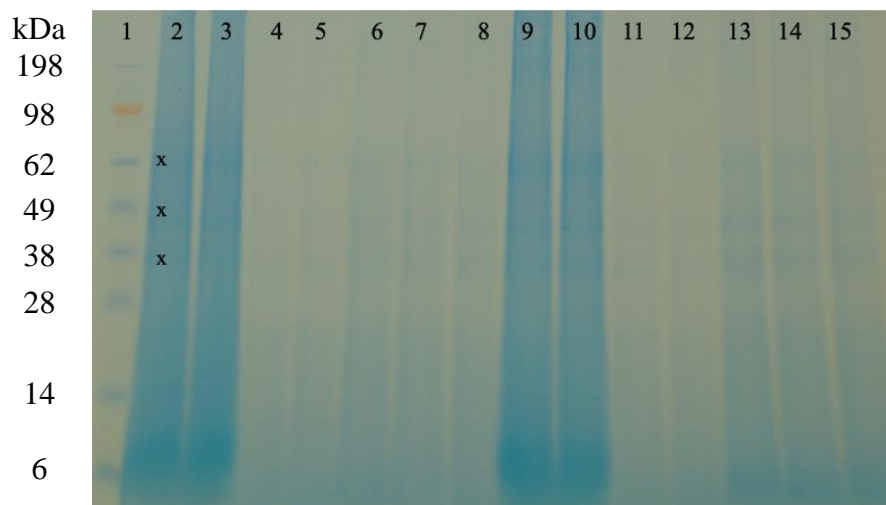
For å kartlegge størrelsesfordelingen av protein i skallfraksjonene ble Sodium dodecyl sulfat–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) utført. Våte skallfraksjoner med skallfraksjon 1 og 2 og tørkede skallfraksjoner 3 og 4 med ubehandlede prøver og tilhørende behandlede prøver ble analysert. Hos de analyserte ser det ut til at samtlige har proteinband i størrelsesorden 62 kDa, 45 kDa og 35 kDa (Figur 10, Figur 11 og Figur 12).



Figur 11 SDS-PAGE skallfraksjon 1, ubehandlet prøve og behandlede prøver **Spor 1**. viser en standard med molekylære vektmarkører (3 μ l), **Spor 2 og 3**. ubehandlet prøve, henholdsvis 9 og 10 μ l, **Spor 4 og 5**. 6 ml/g, henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 6 og 7**. 9 ml/g, henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 8**. 12 ml/g (10 μ l), **Spor 9**. 0,0 M (10 μ l), **Spor 10 og 11**. 0,06 M henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 12 og 13**. 0,18 M henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 14 og 15**. 1t henholdsvis 10 og 9 μ l.



Figur 12 SDS-PAGE skallfraksjon 2, ubehandlede prøver og behandlede prøver. **Spor 1.** viser en standard med molekylære vektmarkører (3 μ l), **Spor 2 og 3.** ubehandlet prøve henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 4 og 5.** 6 ml/g henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 6 og 7.** 9 ml/g henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 8.** 12 ml/g (9 μ l), **Spor 9.** 0,0 M (10 μ l), **Spor 10 og 11.** 0,06 M henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 12 og 13.** 0,18 M henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 14 og 15.** 1t, henholdsvis 10 og 9 μ l.



Figur 13 SDS-PAGE for tørket skallfraksjon 3 og 4, ubehandlede prøver og behandlede prøver. **Spor 1.** viser en standard med molekylære vektmarkører (3 μ l), **Spor 2 og 3.** ubehandlet prøve (skallfraksjon 4) henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 4 og 5.** 0,12 M (skallfraksjon 4) henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 6, 7 og 8.** 0,06 M (skallfraksjon 4) (10, 9 og 8 μ l), **Spor 9** ubehandlet prøve (skallfraksjon 3), henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 11 og 12.** 0,12 M (skallfraksjon 3), henholdsvis 10 og 9 μ l, **Spor 13, 14 og 15.** TS 0,06 M (skallfraksjon 3) 10, 9 og 8 μ l.

5 Diskusjon

Calanus AS produserer i dag tre produkter av raudåte: Calanus® Oil, et proteinhydrolysat (Calanus® Hydrolysate) og skallfraksjon (Calanus® Powder). Bedriften har som mål om å optimalisere skallfraksjonene fra prosessering av raudåte, og det arbeides derfor kontinuerlig med utvikling av bioraffineringen. Som et ledd i denne prosessen ønsket bedriften å undersøke hvordan behandling av skallfraksjonen med ulike konsentrasjoner av sitronsyre påvirket produktets sammensetning. Formålet med denne oppgaven var derfor å sammenligne hvordan variasjon av de ulike vaskeparameterne V/TS, konsentrasjon av sitronsyre og behandlingstid påvirket produktets næringssammensetning, sammensetning av fettsyrer og aminosyrer, samt innhold av kitin. Syrevasketrinnene som ble undersøkt ga en effektiv reduksjon i askeinnholdet, mens proteininnhold, aminosyresammensetning, fettinnhold, fettsyresammensetning og kitininnhold generelt ble lite påvirket av de ulike behandlingene.

Sitronsyre er en organisk syre som består av tre karboksylgrupper og dette bidrar til at denne syra har mange egenskaper og bruksområder. Blant annet er det en kjent kelator som er mye brukt i industrien til blant annet rensing av vannrør. En kelator er en kjemisk forbindelse som binder seg til metaller (positive ioner) slik som kalsium (Pérez-Heredia *et al.*, 2008) og jern (Zhang, 1984). Dette gjør at metallene blir løselige og kan vaskes ut fra biologisk materiale. Hvor effektiv sitronsyre løser og trekker ut ulike metaller varierer med konsentrasjon (og pH) av sitronsyre (Nascimento, 2006). Sitronsyre benyttes blant annet som smaksstoff og konserveringsmiddel (E330) og behandling med lave konsentrasjoner sitronsyre gir ingen fare for toksiske effekter, i motsetning til enkelte andre syrer som brukes innen farmasi- og næringsmiddelindustri (Soccol, 2006).

Fire forskjellige batcher skallfraksjoner fra raudåteproduksjonen ble undersøkt i denne oppgaven. Skallfraksjon 1 og 2 var fraksjoner som var lite tørket og derfor hadde et relativt høyt vanninnhold, men den biokjemiske sammensetningen av disse fraksjonene var også veldig ulik. Dette kan komme av at raudåten i skallfraksjonene var høstet ved ulike tidspunkt, og dermed ulike kopepodittstadier. Det er tidligere dokumentert at lipidinnholdet varierer med ulike kopepodittstadier (Kattner *et al.*, 1989). Skallfraksjon 1 består muligens av flere individer raudåte høstet i livsstadium C4 og C5 når arten har et lager av voksestere, sammenlignet med skallfraksjon 2. Det kan også tenkes at utvinningen av lipidene under den industrielle produksjonen av Calanus® Oil var mer fullstendig, og kan ha ført til et lavere fettinnhold i skallfraksjon 2. Det høye askeinnholdet i skallfraksjon 2 skilte denne fraksjonen fra de andre skallfraksjonene. Resultater fra et tidligere gjennomført tokt hvor raudåte ble høstet ved tre

ulike lokasjoner (Solgaard *et al.*, 2007), viste ulikhet i den biokjemiske sammensetningen av raudåte regnet i tørrvekt. Askeinnholdet ved en av lokalitetene var usedvanlig høyt, noe som ble antatt å skyldes et høyt innhold av ioner fra sjøvann i prøvene, samt påvirkning av ulike høstemetoder og håndtering av råstoffet (Solgaard *et al.*, 2007). Dette kan være tilfelle også for skallfraksjon 2 i denne oppgaven. Dersom raudåta var høstet ved et tidspunkt i livssyklusen med en lav proteinprosent og fettprosent, kan det ha påvirket askeinnholdet. En annen forklaring kan være innblanding av andre stoffer fra bifangst som larver og yngel fra torsk og sild som beiter på raudåta (Broms, 2016).

Skallfraksjonene ble syrevasket for å fjerne uønskede komponenter. Flere parametere ble testet for å optimalisere prosedyren med variasjon i tre ulike parametere: V/TS, syrekonsentrasjon og behandlingstid. Den generelle trenden etter syrevask var et betraktelig lavere innhold av aske, og et høyere innhold av fett. Vask med sitronsyre førte til en reduksjon av vannløselige komponenter og komponenter som løses opp ved binding til kelatoren. Effekten av dette var en effektiv reduksjon av askeinnholdet, fordi asken i hovedsak består av salter og mineraler. Dette stemmer godt overens med tidligere funn gjort av Bergvik *et al.*, (2012b) som observerte at under temperert vannbehandling av raudåte, ble saltkonsentrasjonen signifikant redusert. Det reduserte askeinnholdet førte så til en endring i sammensetningen av produktet som ga en relativ økning av lipider, som jo ikke er vannløselige (Olsen, 2017).

Det var stort sett en økning av protein etter sitronsyrebehandling, dog ikke like tydelig som for fett og aske. Syrevask førte til en oppkonsentrering av mengden TAA og EAA i alle skallfraksjonene. Syrebehandlingen fører antagelig til at noe av strukturen i skallfraksjonen brytes, på samme tid som mineraler og metaller fjernes, og dette kan føre til at hydrolyserbart protein blir lett tilgjengelig.

Et aktuelt bruksområde til skallfraksjonen er innen rekeoppdrett. Alle EAA som reker trenger, med unntak av tryptofan, ble detektert i prøvene. Tryptofan blir ødelagt under den anvendte syrehydrolysen før aminosyreanalyse, og ble derfor ikke detektert (Haugli, 1972). Det finnes flere metoder for bestemmelse av proteininnholdet i et næringsstoff. En vanlig metode for å bestemme proteininnhold er Kjeldahls metode. Metoden baserer seg på mengde nitrogen i prøven (Kjeldahl, 1883; Mariotti *et al.*, 2008). Kitin inneholder nitrogen og Kjeldahls metode vil derfor føre til en overestimering av det faktiske proteininnholdet i skallfraksjonen, med mindre man justerer for nitrogeninnholdet i kitinet. I denne masteroppgaven ble derfor aminosyreanalyse benyttet for å bestemme proteininnholdet. Denne metoden er regnet som mest nøyaktig og er anbefalt av FAO for analyse av næringsstoff (FAO, 2003).

Skallfraksjonene ble syrevasket for å fjerne uønskede komponenter. Flere parametere ble testet for å optimalisere prosedyren. Effekten av forholdet mellom volum sitronsyre og tørrstoff (V/TS) ble testet med ulikt volum på 6, 9 og 12 ml/g. Det viste seg at alle disse tre V/TS-forholdene ga omlag like stor effekt sammenlignet med ubehandlet prøve. Etter behandling av skallfraksjonene endret den biokjemiske sammensetningen seg ved at det relative fettinnholdet og proteininnholdet økte, og det relative aske- og kitininnholdet ble redusert. Det eneste unntaket var prøver av skallfraksjon 2 syrevasket med 12 ml/g V/TS som førte til en økning av kitininnholdet.

Kitin og kitosan er etterspurte produkter som brukes i mat, kosmetikk og farmasøytisk industri (Younes & Rinaudo, 2015). Hvis man klarer å etablere en kostnadseffektiv produksjon av kitin/kitosan, kan det være av interesse å utvinne kitinet i skallfraksjonen. Det er imidlertid et lavt innhold av kitin i raudåte, noe som kan føre til lavt utbytte og redusert kvalitet av kitinet som kan utvinnes (Eysteinnsson *et al.*, 2018). Industriell utvinning av kitin vil kreve en godt utviklet metode som sikrer høy renhet av kitin. Dette skyldes at protein er bundet til kitin og kan skape problemer ved videre prosessering av produktet, særlig innenfor biomedisin (Rinaudo, 2006). På grunn av det høye kravet til renhet og det lave innholdet av kitin i raudåte vil utvinning være kostbart, og muligens ikke hensiktsmessig med tanke på utbytte. I skallfraksjonene som ble analysert i denne oppgaven var utbyttet av kitin på mellom 17-41 % av den biokjemiske sammensetningen, før og etter syrevask. Dette er sammenlignbart med tidligere resultater av Udin, som dokumenterte at skallfraksjonen inneholdt 23,5 % kitin (Udin, 2017).

Fettsyresammensetningen i de ubehandlede skallfraksjonene 1 og 2 var ulike, og som tidligere nevnt kan dette skyldes fangst ved ulik årstid. Det er kjent fra tidligere publikasjon at fettsyresammensetningen i raudåte kan variere ved de ulike sesongene i året (Falk-Petersen *et al.*, 1987). Innholdet av omega-3 PUFA, SDA, EPA og DHA var størst hos ubehandlet skallfraksjon 1 og omtrent halvparten i skallfraksjon 2. Overordnet ble fettsyresammensetningen påvirket lite av ending av V/TS. Det var veldig variabelt hva ulike V/TS hadde å si for fettsyresammensetning, noe som kan forklares med at skallfraksjon 1 og 2 i utgangspunktet var så ulike.

Mengden TAA og EAA økte konsekvent etter syrevask med alle ulike V/TS. Det virket vilkårlig om innhold ble økt eller redusert med volumbehandlingene av 6, 9 og 12 ml/g. Den største endringen i aminosyresammensetningen ble observert hos alanin, med en økning på omtrent 8 mg/g etter behandling. Taurin ble ikke detektert i noen av de syrevaskede prøvene. Innholdet av taurin i ubehandlet prøve var i utgangspunktet lavt og siden taurin er vannløselig

(Huxtable, 1992), ble det vasket ut under syrevask. Mengden glycin i de våte skallfraksjonene 1 og 2 ble omtrent halvert som en effekt av syrevask. En årsak til dette kan være at glycin både finnes som fri aminosyre som vil være vannløselig og vaskes ut med syrebehandlingen (Chen *et al.*, 1989), men også bundet til protein og denne mengden glycin vil trolig ikke vaskes ut.

Skallfraksjon 1 og 2 ble også syrevasket med varierende konsentrasjon av sitronsyre (0,0, 0,06 og 0,18 M). Det viste seg at behandlingen med bare vann ga nokså stor effekt på sammensetningen sammenlignet med ubehandlet prøve, men sammenligningen av de ulike syrekonsentrasjonene (0,06 vs 0,18 M) viste ikke stor forskjell. Den biokjemiske sammensetningen ble endret som følge av behandlingen med ulike konsentrasjoner av sitronsyre. Etter syrevask økte fettinnholdet og proteininnholdet, men askeinnholdet ble redusert. I skallfraksjon 1 ble innholdet av kitin redusert, mens det derimot økte i skallfraksjon 2. Årsaken til at det økte kitininnholdet kan være knyttet til det høye nivået av aske i de ubehandlede prøvene som potensielt kan være bundet til kitinet, og at demineraliseringen under analysen ikke var fullstendig. Aske og kitininnholdet var funnet å være høyest i prøvene vasket med 0,0 M sitronsyre, noe om kan skyldes at disse prøvene var kontrollprøver som kun ble vasket med vann og derfor ikke utsettes for sitronsyren som binder og løser opp metallene i biomassen.

Fettsyresammensetningen ble i liten grad påvirket av å variere sitronsyrekonsentrasjonen. Syrevask med 0,18 M førte til reduksjon av SDA, EPA og DHA og mengde n-3 PUFA, mens syrevask på 0,06 M resulterte økende relativ mengde n-3 PUFA i skallfraksjon 2.

Mengde av TAA og EAA økte etter behandling med ulik sitronsyrekonsentrasjon, men også når fraksjonene ble vasket med bare vann (0,0 M sitronsyre). Syrevask med 0,06 M sitronsyre førte til den største økningen av EAA og TAA, samtidig som økt konsentrasjon med 0,18 M førte til den minste økningen. Det var en stor økning av mengde alanin og en halvering i innhold av glycin. Basert på funnene i oppgaven ser det ut til at vask med 0,18 M ga dårligst utbytte av næringsstoffer, og et bedre utbytte ble registrert etter sitronsyrevask med 0,06 M som regel ga høyeste utbytte av de ønskede næringsstoffene fett, protein og EAA i begge de undersøkte skallfraksjonene (1 og 2).

Effekten av å redusere behandlingstid til 1 t ble også undersøkt. Den biokjemiske sammensetningen ble muligens endret etter 1 times syrevask om man sammenligner med resultatene og endringene etter 2 timers vask, men resultatene fra skallfraksjon 1 og 2 var ikke helt entydige. Generelt førte 1 t behandling til at prøvene inneholdt mindre andel av proteiner

og fett (vs 2 t), men like mye aske. En times behandling førte til at kitinnholdet var relativt lite endret (selv om det var nokså store variasjoner for kitin). Ellers var trenden den samme for alle behandlingene, at prøvene etter vask inneholdt mye mere fett (vs ubehandlet).

Effekten av 1 times vask på fettsyresammensetningen var såpass liten at den ikke trenger noen videre diskusjon. De observerte endringene skyldes nok at andelen fett økte noe etter 1 t vask, en effekt som var mer uttalt i skallfraksjon 2. Det ble observert en relativ økning i TAA og EAA, og den største økningen var observert i skallfraksjon 2, som skyldes det lave proteininnholdet denne skallfraksjonen hadde i utgangspunktet. Videre ble den samme effekten observert for 2 timers vask også observert etter 1 times vask, nemlig at det relative innholdet av alanin økte betydelig, glycinivået omtrent ble halvert.

Effekten av sitronsyrevask ble også undersøkt i 2 tørkede skallfraksjoner (3 og 4), men vaskevariablene som ble undersøkt avvok noe fra behandlingene av skallfraksjon 1 og 2. Behandlingstiden som ble brukt var på 1 t ved 60 °C (inkubator ved 150 rpm.) med en V/TS på 12 ml/g og to syrekonsentrasjoner på 0,06 og 0,12 M ble inkludert. Næringsinnholdet mellom skallfraksjon 3 og 4 var svært like etter behandling. Behandlingen førte til økt relativt fettinnhold, et uforandret innhold av protein, reduksjon av kitin og meget stor reduksjon i askeinhold. Fettsyresammensetningen og innholdet av n-3 PUFA var uforandret etter syrevask. Effekten av syrebehandlingen på innholdet av EAA og TAA var minimal. Etter syrevask ble tyrosin bare påvist i enkelte av prøvene, men det var vanskelig å trekke noe mønster. En annen ting som er verdt å trekke fram er at i motsetning til for de våte fraksjonene hvor innholdet av alanin økte svært mye mens glycin ble kraftig redusert, så var økningen av alanin ubetydelig, mens glycin faktisk økte etter syrevask (uavhengig av syrekonsentrasjon). Syrevasken hadde minst effekt på sammensetningen av næringsinnholdet til de tørkede skallfraksjonene. Dette skyldes trolig at behandlingstiden kun var på 1 t, og at produktet ble behandlet med en lavere temperatur sammenlignet med de våte skallfraksjonene (60 vs 80 °C).

Biokjemisk sammensetning og kitin er representert i 8 ulike tabeller, og summen av alle komponentene er over 100 % i flere av prøvene. De høyeste summene var 121 og 122,4 % i skallfraksjon 2 vasket med henholdsvis 0,0 og 0,06 M sitronsyre. Analysene ga svært høye verdier av både fett, protein og kitin i disse prøvene og det kan indikere at en eller flere av disse analysene er usikre. Dette gjenspeiles også i relativt store standardavvik for disse prøvene. Det er derimot vanskelig å konkludere om dette skyldes unøyaktighet i utførelsen av disse analysene slik at f.eks. fettinnholdet var overestimert i prøvene. Kitinet kan også ha vært noe urent og bundet til mineraler og/eller protein, slik at nivået derfor kan være overestimert. Dette blir kun

spekulasjoner siden renheten av kitin ikke ble analysert. Det kan uansett være lurt å gjenta disse analysene for å utelukke eventuelle feilkilder, men det ble dessverre ikke tid til å undersøke dette før innlevering av oppgaven.

Proteinsammensetningen ble også undersøkt ved separasjon med SDS-PAGE. Det viste seg at skallfraksjonene, som forventet, hadde de samme proteinbandene, både før og etter behandling. Samtlige av prøvene analysert hadde proteinband i størrelsesorden 62 kDa, 45 kDa og 35 kDa (Figur 11, Figur 12

Figur 13). Dette stemmer godt overens med resultater vist i en tidligere masteroppgave fra vår gruppe (Udin, 2017). Udin dokumenterte at skallfraksjoner fra raudåte inneholdt proteinband på 62 kDa, 45 kDa og 30 kDa og 17 kDa (Udin, 2017). Det er mulig at 17 kDa-båndet også er med her, men det er svært vanskelig å påvise. Det er dokumentert at forstyrrelser med lipider kan gjøre proteinbånd uklare (Rigby *et al.*, 2011). I dette forsøket ble det ikke gjort noen forbehandling for å fjerne lipider fra prøvene, og dette er trolig en av årsakene til at proteinbåndene er uklare.

I teorien vil en sterkere syrekonsentrasjon føre til en mere effektiv syrevask. En forventning var derfor at verdiene av næringsstoffene skulle øke og synke i takt med styrken i behandlingen med sitronsyre. Dette var ikke alltid tilfellet, noe man særlig kunne se hos behandlede prøver av skallfraksjon 2. Dette skyldes trolig den spesielle sammensetningen med et svært høyt askeinnhold i ubehandlet prøve, som preget utfallet av resultatene etter behandling.

Oppsummert kan man se en endring i nærings sammensetning av alle prøver etter behandling. I alle behandlede skallfraksjoner førte syrevask til en reduksjon av relativt askeinnhold etter behandling. Hos alle prøver var det en økning av relativt fettinnhold etter syrevask. Det kan bidra til økt verdi fordi fett er en viktig fôrkomponent. Fettsyresammensetningen av produktet ble endret i liten grad, noe som gjør at produktet fortsatt inneholder rikelige mengder av de langkjedede omega-3 fettsyrene DHA og EPA. Det økede innholdet av TAA og EAA, gjør produktet til en god kilde til aminosyrer og proteiner. Alle de EAA for reker, med unntak av den frie aminosyre taurin, ble funnet intakt i prøvene, som gjør at produktet fortsatt har de viktige bestanddelene nødvendig for vekst av reker (Shiau, 1998). Det var også stort sett en økning i proteininnhold, som er positivt med tanke på at de er viktige byggesteiner for vekst og vedlikehold. Det ser ut til at sammensetningen av produktet etter syrevask gjør at det fortsatt er godt egnet til fôrformulering i rekeindustri, og potensielt til humant konsum.

Det var ikke noen tydelig trend mellom hvilken mengde av V/TS som ga best effekt, og det vil derfor være hensiktsmessig å behandle med minste volum av sitronsyre. Det ser ut til at syrebehandling med 0,18 M førte til størst reduksjon av næringsinnhold i prøvene. For å beholde så mye som mulig av næringsinnholdet intakt vil det være gunstig å behandle produktet med en lavere syrekonsentrasjon. Videre indikerer behandlingen av de tørkede fraksjonene at det kan være gunstig å senke temperaturen til 60 °C i vaskeprosessen. Selv om det er noe variasjon i mange av resultatene, og det er få paralleller, er det ingen problemer for videre anvendelse av skallfraksjonene etter at de har vært gjennom et vasketrinn med 0,06 eller 0,12 M sitronsyre.

6 Konklusjon

Næringsinnholdet i ubehandlet skallfraksjon 2 skilte seg fra de andre skallfraksjonene med et høyt innhold av aske. Den generelle trenden var at sitronsyrevask resulterte i et betraktelig lavere innhold av aske og et høyere innhold av fett i skallfraksjonene. Videre økte det relative proteininnholdet stort sett i skallfraksjonene og mengden TAA og EAA ble oppkonsentrert. Fettsyresammensetningen ble lite påvirket av sitronsyrevask, mens kitininnholdet ble påvirket i varierende grad.

Det kan se ut som at syrevask hadde større effekt i seg selv og at endring av de ulike vaskeparameterne hadde mindre effekt. Det er derfor vanskelig å konkludere med hvilken behandling som gir best effekt. Det må her også tas hensyn til reduksjon av uønskede komponenter etter syrevask. Skallfraksjonene kan anvendes videre innen fôrindustri og til andre næringsrike produkter etter at de har vært gjennom et vasketrinn med 0,06 eller 0,12 M sitronsyre. En viktig observasjon er at variasjon i biokjemisk sammensetning av råstoffet har stor innvirkning på sluttresultatet.

Videre kan det utføres flere forsøk for å optimalisere vasketrinnene i skallfraksjonen. Når metoden for syrevask er bestemt bør det jobbes videre med å inkorporere vaskemetoden i den industrielle produksjonen av skallfraksjonen.

Referanser

- Abdelhamid, A. S., Brown, T. J., Brainard, J. S., Biswas, P., Thorpe, G. C., Moore H. J., Deane K. H. O., AlAbdulghafoor F. K., Summerbell C. D., Worthington H. V., Song F., Hooper L. (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11). 10.1002/14651858.CD003177.pub4.
- Abdulrazaq, M., Innes, J. K. & Calder, P. C. (2017). Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on arthritic pain: A systematic review. *Nutrition*, 39-40(Supplement C), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.12.003>
- Bakketeig, I. E., Gjørseter, H., Hauge, M., Sunnset, B.H. og Toft, K.Ø. (red.) (2015). *Havforskningsrapporten 2015. Fisken og havet: særnr. 1–2015*.
- Balk, E. M., Lichtenstein, A. H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P. & Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis*, 189(1), 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.012>
- Bergvik, M., Leiknes Ø., Altin D., Dahl K. R. & Y., O. (2012a). Dynamics of the Lipid Content and Biomass of *Calanus finmarchicus* (copepodite V) in a Norwegian Fjord. *Lipids*, 47, 881-895. 10.1007/s11745-012-3700-3
- Bergvik, M., Overrein, I., Bantle, M., Evjemo, J. O. & Rustad, T. (2012b). Properties of *Calanus finmarchicus* biomass during frozen storage after heat inactivation of autolytic enzymes. *Food Chemistry*, 132(1), 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.058>
- Bogevik, A. S. (2011). Marine wax ester digestion in salmonid fish: a review. *Aquaculture Research*, 42(11), 1577-1593. 10.1111/j.1365-2109.2010.02766.x
- Broms, C., Strand, E., Utne, K. R., Hjøllo, S., Sundby, S., Melle, V. (2016). *Vitenskapelig bakgrunnsmateriale for forvaltningsplan for raudåte*. Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Bujnicki, J., Dykstra, P., Fortunato, E., Heuer, R., Keskitalo, C., Nurse, P. (2017). *Food from the Oceans*. Brussels: European Union.
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>
- Calder, P. C. & Yaqoob, P. (2009). Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Postgraduate Medicine*, 121(6), 148-157. 10.3810/pgm.2009.11.2083
- Ceci, G., Mucherino, A., D'Apuzzo, M., Di Serafino, D., Costantini, S., Facchiano, A. & Colonna, G. (2007). Computational Methods for Protein Fold Prediction: an Ab-initio Topological Approach. I *Data Mining in Biomedicine* (s. 391-429).
- Chen, C.-C., Zhu, Y. & Evans, L. B. (1989). Phase Partitioning of Biomolecules: Solubilities of Amino Acids. *Biotechnology Progress*, 5(3), 111-118. 10.1002/btpr.5420050309
- Cook, C. M., Larsen, T. S., Derrig, L. D., Kelly, K. M. & Tande, K. S. (2016). Wax Ester Rich Oil From The Marine Crustacean, *Calanus finmarchicus*, is a Bioavailable Source of EPA and DHA for Human Consumption. *Lipids*, 51(10), 1137-1144. 10.1007/s11745-016-4189-y
- De Silva, S., Francis, David S. and Tacon, Albert G. J. (2011). *Fish oil in aquaculture : in retrospect* (Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds). Boca Raton, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., and Bergé, J. P. . (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41 (11), 2327-2332.
- Eysteinnsson, S. T., Gudjónsdóttir, M., Jónasdóttir, S. H. & Arason, S. (2018). Review of the composition and current utilization of *Calanus finmarchicus* – Possibilities for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.019>
- Falk-Petersen, S., Mayzaud, P., Kattner, G. & Sargent, J. R. (2009). Lipids and life strategy of Arctic *Calanus*. *Marine Biology Research*, 5(1), 18-39. 10.1080/17451000802512267
- Falk-Petersen, S., Sargent, J. R. & Tande, K. S. (1987). Lipid composition of zooplankton in relation to the sub-arctic food web. *Polar Biology*, 8(2), 115-120. 10.1007/BF00297065
- FAO. (2003). *Food Energy—Methods of Analysis and Conversion Factors*. Rome, Italy.

- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome: FAO.
- Feeckings, J., Bartolino, V., Madsen, N. & Catchpole, T. (2012). Fishery Discards: Factors Affecting Their Variability within a Demersal Trawl Fishery. *Public Library of Science ONE*, 7(4), 9. 10.1371/journal.pone.0036409
- Fisheries, Research & Services. (2004). Zooplankton and Climate Change - the Calanus Story. Hentet 08.04.2019 fra http://www.vliz.be/docs/Zeecijfers/zooplankton_and_climate_change.pdf
- Fiskeridepartementet, N.-o. (2016). *Regjeringens bioøkonomistrategi, Kjente ressurser - uante muligheter*. Oslo.
- Fiskeridirektoratet. (2016). *Forvaltningsplan for raudåte* (Forvaltningsplan for raudåte). Bergen: Fiskeridirektoratet.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fox, J. M., Davis, D.D., Wilson, M. & Lawrence, A.L. (2006). Current status of amino acid requirement research with marine penaeid shrimp. I D. R. M. L.E. Cruz Suárez, M. Tapia Salazar, M.G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, A.C. Puello Cruz & A. García Ortega. (Red.), *Avances en Nutrición Acuicola VIII* (VIII utg., s. 182-196). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Gigliotti, J. C., Davenport, M. P., Beamer, S. K., Tou, J. C. & Jaczynski, J. (2011). Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry*, 125(3), 1028-1036. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.013>
- Grimaldo, E., Leifer, I., Gjørund, S. H., Larsen, R. B., Jeuthe, H. & Basedow, S. (2011). Field demonstration of a novel towed, area bubble-plume zooplankton (*Calanus* sp.) harvester. *Fisheries Research*, 107(1), 147-158. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.10.018>
- Hahn, T., Roth, A., Febel, E., Fijalkowska, M., Schmitt, E., Arsiwalla, T. & Zibek, S. (2018). New methods for high-accuracy insect chitin measurement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5069-5073. doi:10.1002/jsfa.9044
- Harish Prashanth, K. V. & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117-131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Haugli, T. E., & Moore, S. (1972). Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography og alkaline hydrolysates. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 2828-2834.
- Helland, S., Nejtgaard, J. C., Fyhn, H. J., Egge, J. K. & Båmstedt, U. J. M. B. (2003). Effects of starvation, season, and diet on the free amino acid and protein content of *Calanus finmarchicus* females. *143*(2), 297-306. 10.1007/s00227-003-1092-x
- Hirche, H.-J. & Kosobokova, K. (2007). Distribution of *Calanus finmarchicus* in the northern North Atlantic and Arctic Ocean—Expatriation and potential colonization. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 54(23), 2729-2747. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.08.006>
- Hoddevik, B. (2019). Kan fiske mye raudåte før bestanden påvirkes. Hentet 11.april fra <https://www.imr.no/hi/nyheter/2019/april/fiske-raudate>
- Huxtable, R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72(1), 101-163. 10.1152/physrev.1992.72.1.101
- Kattner, G. & Hagen, W. (1995). Polar herbivorous copepods – different pathways in lipid biosynthesis. *ICES Journal of Marine Science*, 52(3-4), 329-335. 10.1016/1054-3139(95)80048-4
- Kattner, G., Hirche, H. J. & Krause, M. (1989). Spatial variability in lipid composition of calanoid copepods from Fram Strait, the Arctic. *Marine Biology*, 102(4), 473-480. 10.1007/BF00438348
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Sticktoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, 22(1), 366-382.
- Lange, L., Bech, L., Busk, P., Grell, M., Huang, Y., Lange, M., Tong, X. (2012). *The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy* (bd. 3).

- Lee, R. F., Hirota, J. & Barnett, A. M. (1971). Distribution and importance of wax esters in marine copepods and other zooplankton. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 18(12), 1147-1165. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(71\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0011-7471(71)90023-4)
- Madsen, S. J., Nielsen, T. G., Tervo, O. M. & Søderkvist, J. (2008). Importance of feeding for egg production in *Calanus finmarchicus* and *C. glacialis* during the Arctic spring. *Marine Ecology Progress Series*, 353, 177-190. Hentet fra <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v353/p177-190/>
- Mariotti, F., Tomé, D. & Mirand, P. P. (2008). Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177-184. 10.1080/10408390701279749
- Melle, W., Runge, J., Head, E., Plourde, S., Castellani, C., Licandro, P., Chust, G. (2014). The North Atlantic Ocean as habitat for *Calanus finmarchicus*: Environmental factors and life history traits. *Progress in Oceanography*, 129, 244-284. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.04.026>
- Mizukawa, K., Takada, H., Takeuchi, I., Ikemoto, T., Omori, K. & Tsuchiya, K. (2009). Bioconcentration and biomagnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through lower-trophic-level coastal marine food web. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1217-1224. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.03.008>
- Moore, S. & Stein, W. H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. I *Methods in Enzymology* (bd. 6, s. 819-831): Academic Press. Hentet fra <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687963062571>
- Nascimento, C. W. A. d. (2006). Organic acids effects on desorption of heavy metals from a contaminated soil. *Scientia Agricola*, 63, 276-280. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162006000300010>
- Olsen, R. L. (2017). Lipidkjemi med vekt på fisk. *Trømsø: Norges Fiskerigøyskole, Universitetet i Trømsø*, 4. utgave.
- Olsen, Y. (2011). Resources for fish feed in future mariculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(3), 187-200. Hentet fra <https://www.int-res.com/abstracts/aei/v1/n3/p187-200/>
- Organization, W. H. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation* (Tech Rep Ser 0512-3054).
- Pérez-Heredia, M., Ferrer-Luque, C. M., González-Rodríguez, M. P., Martín-Peinado, F. J. & González-López, S. (2008). Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *International Endodontic Journal*, 41(5), 418-423. 10.1111/j.1365-2591.2007.01371.x
- Raghu, H. S., Raghavendra, S. N. & Rajeshwara, N. A. (2018). Isolation and characterization of chitin from Millipede (Spirobolida). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1), 30. 10.1186/s41936-018-0043-5
- Regjeringen. (2019). Forskrift om regulering av høsting av røddåte i 2019. Hentet 15.04 fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/forskrift-om-regulering-av-hosting-av-rodade-i-2019/id2632216/>
- Richard, F. L., Wilhelm, H. & Gerhard, K. (2006). Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 273-306. Hentet fra <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v307/p273-306/>
- Richardsen, R., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A. (2017). *Analyse marint restråstoff, 2016* (Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge OC2017A-095). Tromsø: SINTEF Ocean, Kontali Analyse AS.
- Rigby, N. M., Sancho, A. I., Salt, L. J., Foxall, R., Taylor, S., Raczynski, A., . . . Mills, E. N. C. (2011). Quantification and Partial Characterization of the Residual Protein in Fully and Partially Refined Commercial Soybean Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1752-1759. 10.1021/jf103560h
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rose, D. P. & Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 83(3), 217-244. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00026-1)

- Scott, C. L., Kwasniewski, S., Falk-Petersen, S. & Sargent, J. R. (2000). Lipids and life strategies of *Calanus finmarchicus*, *Calanus glacialis* and *Calanus hyperboreus* in late autumn, Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Biology*, 23(7), 510-516. 10.1007/s003000000114
- Shiau, S.-Y. (1998). Nutrient requirements of penaeid shrimps. This paper was presented at the Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps, 14–17 May 1996, Iloilo City, Philippines. *Aquaculture*, 164(1), 77-93. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00178-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00178-1)
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365-379. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Skjoldal, H. R., Dalpadado, P. & Dommasnes, A. (2004). *Food webs and trophic interactions*.
- Soccol, C. R., Luciana P. S., Vandenberghe, Rodrigues C. and Pandey A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.*, 2, 141-149.
- Solgaard, G., Standal, I. B. & Draget, K. I. (2007). Proteolytic activity and protease classes in the zooplankton species *Calanus finmarchicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(3), 475-481. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.02.014>
- Spinelli, J., Lehman, L., & Wieg. (1974). *Composition, processing, and utilization of red crab (Plerucondes planipes) as an aquacultural feed ingredient*. (Journal of the Fisheries Research Board of Canada, bd. 31).
- Stoffel W., C. F., Ahrens Edward H. . (1959). Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 31, 307-308.
- Tande, K. S., Vo, T. D. & Lynch, B. S. (2016). Clinical safety evaluation of marine oil derived from *Calanus finmarchicus*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.030>
- Udin, T. C. (2017). *Protein og kitin i grakse fra produksjon av Calanus® oil* (master). UiT, Norges arktiske universitet, Tromsø.
- Vang, B. (2015). *Recovery and properties of oil from the copepod Calanus finmarchicus* (PhD). UiT, Norges arktiske universitet, Tromsø.
- Vang, B., Pedersen, A. M. & Olsen, R. L. (2013). Oil extraction From the Copepod *Calanus finmarchicus* Using Proteolytic Enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(6), 619-628. 10.1080/10498850.2012.686008
- Visser, A. W. & Jónasdóttir, S. H. (1999). Lipids, buoyancy and the seasonal vertical migration of *Calanus finmarchicus*. *Fisheries Oceanography*, 8(s1), 100-106. 10.1046/j.1365-2419.1999.00001.x
- Wilson, R. P. a. & Halver, J., E., (1986). Protein and Amino Acid Requirements of Fishes. *Annual Review of Nutrition*, 6(1), 225-244. 10.1146/annurev.nu.06.070186.001301
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *J Amino Acids*, 37(1), 1-17. 10.1007/s00726-009-0269-0
- Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133-1174. Hentet fra <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/3/1133>
- Zhang, Y., Kallay, N., and Matijevic, E. (1984). Interactions of Metal Hydrous Oxides with Chelating Agents. 7. Hematite-Oxalic Acid and -Citric Acid Systems. *Langmuir*, 1, 201-203.