

Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat

Åge Oterhals og Lars Thoresen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1433 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sundalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat</p>	<p>ISBN 978-82-8296-675-7 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Phospholipid levels in mackerel and herring residuals and intermediate products from the fish meal and fish protein hydrolysate process</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 11/2021</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Åge Oterhals og Lars Thoresen</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p>
<p><i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi</p>	<p><i>Dato:</i> 25.03.2021</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 15</p>
<p><i>Stikkord:</i> Restråstoff, makrell, sild, fosfolipider, prosess</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> 901504</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Det er gjennomført forsøk for å undersøke egnethet til restråstoff fra makrell og sild til ekstraksjon av fosfolipider. Restråstoff makrell ga et høyt oljeutbytte, men lave nivå av polare lipider i fettfase fra mellomproduktene presskake (3,4 %), grakse (9,1 %) og konsentrat (2,2 %). Nivå i fraseparert olje var 0,8 %. Makrell gyter vår-forsommer og fangstsesonen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gyttesesong slik tilfelle er for sild. Samlet vurdert er restråstoff makrell lite egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider.</p> <p>Restråstoff sild viser en betydelig økning av nivå polare lipider i fettfase fra presskake/grakse sammenlignet med råstoffet. Effekten er høyest for en hydrolyseprosess (3-4 dobling) med oppnådde nivå i grakse på 22,1 % for NVG-sild og 17,7 % for Norsjøsild. En fiskemelprosess ga en presskake/grakse med hhv. 8 % og 5 % lavere nivå. Ved å ta utgangs i buklist-rogn-melke-fraksjonen kunne nivå polare lipider økes fra 19,6 % til 47 % i presskake/grakse basert på en fiskemelprosess. Forsøkene bekrefter at de polare lipidene primært følger den partikulære proteinfraksjonen. Ved å varmebehandle og mekanisk separere råstoffet kan en stor andel av vann og nøytrale lipider (triglyserider) fjernes før ekstraksjon av de polare lipidene. Dette vil kunne muliggjøre bruk av restråstoff med relativt lave nivå polare lipider inn i en ekstraksjonsprosess.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>Assessment of the suitability of mackerel and herring residuals as source for phospholipid extraction has been carried out. Mackerel gave low levels of polar lipids in the fishmeal/hydrolysis intermediate products and is less suitable for extraction of phospholipids. Herring shows a significant increase in polar lipids from presscake/decanter solids with obtained levels up to 22.1 %. Based on the belly flap-roe-milt fraction, the level could be increased to 47 %. The experiments confirm that the polar lipids primarily follow the solid protein fraction. By heat treatment and mechanical separation of the raw material, a large proportion of water and neutral lipids (triglycerides) can be removed before extraction of polar lipids. This could enable the use of residual raw materials with relatively low levels of polar lipids into an extraction process.</p>	

Forord

FHF har i løpet av de siste årene arbeidet systematisk og målrettet med utvikling av kunnskap og teknologi for økt bearbeiding av makrell. Satsingen kalles «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell». Bakgrunnen er at bare 2–4 % av landets makrell foredles til filét. Resten av de ca. 350 000 tonn eksporteres ut av landet rundfrosset. Makrell er en art med stort fettinnhold og rik på essensielle fettsyrer som bl.a. EPA og DHA. Neste fase i «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell» ser nærmere på hvilke muligheter som finnes for utnyttelse av restråstoffet fra filétproduksjon til produksjon av høyverdige olje- og protein-komponenter til human konsum og petfood-markedet. Arbeidet med å unytte restråstoffet har utfordringer som krever betydelig FoU-innsats. Det er laget eget «veikart» for denne satsingen som danner grunnlaget for prioriteringer.

Denne rapporten er den første i en serie som ser på egnethet av forskjellige typer av restråstoff fra pelagisk fisk (makrell og sild) til merverdiskapning med spesielt fokus på kartlegging av nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra fremstilling av fiskemel og fiskeolje (delmål 1).

Innhold

1	Eksperimentelt	1
1.1	Materialer.....	1
1.2	Metoder.....	1
1.2.1	Prosessbetingelser.....	1
1.2.2	Analysemetoder	1
2	Resultater og diskusjon	3
2.1	Industriell opparbeidelse av makrellavskjær.....	3
2.2	Laboratorieskala opparbeidelse av restråstoff sild	9
3	Konklusjon	14
4	Referanser	15

1 Eksperimentelt

1.1 Materialer

Restråstoff fra filetering av sild og makrell er levert fra Pelagia sine anlegg i Norge:

- Makrell 3/8-18: Samfengt restråstoff levert direkte i bulk til fiskemelfabrikk.
- NVG-sild 26/1-20: Samfengt restråstoff med noe melke; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.
- Nordsjø-sild 3/10-19: Samfengt restråstoff med noe rogn; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.
- NVG-sild 26/1-20: Buklapp-rogn-melke-fraksjon; tatt ut fra fileteringslinje og frosset inn før forsendelse til Nofima.

1.2 Metoder

1.2.1 Prosessbetingelser

Det er gjennomført forsøk med prosessering av makrellavskjær ved fiskemelfabrikk primo oktober 2018. Fabrikken hadde en konvensjonell kontinuerlig prosesslinje bestående av skrukoker, sil/presse, dekanter-sentrifuge, oljeseperator, inndamper og tørke. Prøve av råstoff, mellomprodukter og mel ble frosset inn lokalt før forsendelse til Nofima i Bergen.

Sildeavskjær er opparbeidet i laboratorieskala ved Nofima sin avdeling i Bergen. Frosset råstoff ble delvis tint over natten ved 2-3 °C og malt på kjøttkvern (6 mm hullskive). Buklapp med melke og rogn ble kvernet i frosset tilstand.

Konvensjonell lab-skala opparbeidelse til fiskemel og -olje er gjennomført ved bruk av en batch-koker. Formalt råstoff (1000 g) ble tilsatt 250 g vann, varmet opp til 85 °C under kontinuerlig omrøring, og holdt ved denne temperaturen i 10 minutter. Kokt råstoff ble deretter mekanisk avvannet i en presse. Pressvæsken ble separert i en sentrifuge ved 20 000 x g i 10 minutter. Væske- (limvann) og olje-fase ble dekantert over i en skilletrakt for separasjon. Sediment (tilsvarende dekantergrakse) ble blandet med presskaken og homogenisert i en foodprocessor. Prøver ble oppbevart på frys inntil analyse.

Lab-skala enzymatisk hydrolyse ble gjennomført i en batchreaktor. Kvernet råstoff (1000 g) ble tilsatt vann (1000 g) og varmet opp til 55 °C under kontinuerlig omrøring. FoodPro enzymløsning (1,0 g) ble tilsatt og hydrolysen kjørt i 60 min. Temperaturen ble økt til 90 °C og holdt ved denne temperaturen i 10 minutter for inaktivering av enzym, og blandingen deretter kjølt ned til romtemperatur før separasjon ved 20 000 x g i 10 minutter. Væske- (hydrolysat) og olje-fase ble dekantert over i en skilletrakt for separasjon. Sediment (tilsvarende dekantergrakse) ble manuelt homogenisert før uttak av prøve. Prøver ble oppbevart på frys inntil analyse.

1.2.2 Analysemetoder

Analyse av sammensetning, fettsyrer og lipidklasser er gjennomført ved Nofima BioLab, Bergen. Analyse av fosfolipider basert på ³¹P-NMR er gjennomført hos Spectral Service AG, Köln, Tyskland.

Tørrstoff ble målt gravimetrisk etter tørking av prøven i ovn ved 103 °C i 4,5 timer eller over natt dersom vanninnholdet var >15 % (ISO 6496). Aske ble bestemt gravimetrisk i henhold til ISO 5984:2002. Fett-nivå ble målt basert på kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959). Råprotein (N x 6,25) ble målt ved bruk av Kjeldal metode (ISO 5983-2:2009). Vannløselig råprotein ble bestemt etter ekstraksjon av en 10 g prøve med 150 ml kokende destillert vann i 30 minutter og filtrering gjennom et Whatman 589/1 black ribbon paper (Whatman, Dassel, Germany). Fettsyreprofil ble analysert med bruk av gasskromatografi i henhold til AOCS-metode Ce 1b-89. C23:0 metylester ble tilsatt som internstandard. Lipidklasser ble analysert ved bruk av HPLC og Corona Plus charged aerosol detektor (Oterhals et al., 2010). Innhold av fosfolipider basert på ³¹P-NMR ble gjennomført i henhold til Zailer et al. (2018).

2 Resultater og diskusjon

2.1 Industriell opparbeidelse av makrellavskjær

Formålet med undersøkelsen var å kartlegge sammensetning og fosfolipidnivået i samfengt makrellavskjær og i mellomprodukter fra en konvensjonell fiskemelprosess etter koking og separering til presskake, grakse, limvann og olje (Tabell 1). Råstoffet hadde god kvalitet med et flyktig N-nivå på 33 mg N/100 gram, og et TMAO og TMA nivå på hhv. 1 og 10 mg N/100g.

Fettnivået i makrell restråstoffet var høyt (20,9 %; Tabell 1) og dette ga et estimert oljeutbytte på 17 kg per 100 kg råstoff (Figur 1). Fettnivået i melet ble relativt høyt (19,7 %) og dette gjenspeiles også i fett på ts-basis i presskake, grakse og blanding av mellomproduktene. Det må her anmerkes at fettnivået er målt basert på kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh&Dyer-ekstraksjon) for å kvantifisere totale lipider i prøvene. Dette gir et litt høyere fettnivå enn Soxhlet-ekstraksjon (petroleumseter) som normalt anvendes for å angi fettnivå i fiskemel. Det er funnet noe avvikende nivå fett i limvann og konsentrat. Dette skyldes trolig variasjon i prosessen og prøveuttak. Nivå i limvannet var svært lavt, og konsentratet ligger nærmere det som normalt kan forventes. Sistnevnte er derfor brukt i diskusjonen nedenfor. Massebalansen (Figur 1) viser at totale lipider i råstoffet fordeler seg med 3,1 kg (15 %) i presskake/grakse, 0,6 kg (3 %) i konsentrat, og 17,0 kg (81 %) i oljen.

Formål med prosjektet er å evaluere egnethet til makrellavskjær som råstoff for ekstraksjon av fosfolipider fra graksemel etter makrelloljeproduksjon. Kvantifisering av fosfolipider i lipidekstrakt fra råstoff, mellomprodukter, mel og olje viser store variasjoner (Tabell 2). Koking og mekanisk avvanning i en fiskemelprosess fjerner primært triglyserider fra råstoffet. Fraseparert fiskeolje vil hovedsakelig bestå av triglyserider og kun inneholde lave nivå av polare lipider (fosfolipider), i dette tilfellet målt til 0,8 % (Tabell 2). Polare lipider er membranbundne og vil følge proteinfasen i prosessen. Dette har medført at nivå polare lipider på fettbasis øker betydelig fra 1,5 % i råstoffet til hhv. 3,4 %, 9,1 % og 2,2 % i mellomproduktene presskake, grakse og konsentrat (Tabell 2). Høyest nivå i graksefasen kan trolig forklares med at dette hovedsakelig består av partikulært muskelprotein som separeres fra sil/pressvæske i en dekanterentrifuge. Dette vil gi lavere nivå av separerbar fettfraksjon (triglyserider) sammenlignet med presskake og limvannkonsentrat. For å verifisere nivåene av fosfolipider i lipider ekstrahert fra presskake/grakse, er det gjennomført analyser også ved Spectral Service i Tyskland. Sistnevnte laboratorium anvender ³¹P-NMR-metode mens Nofima BioLab bruker en HPLC-basert metode. NMR gir et noe lavere kvantifiseringsgrense og noen ekstra lipidklasser (sphingomyelin, lyso-PE, N-acetyl-phosphatidylethanolamine, andre PL; alle med meget lave nivå og ikke angitt i Tabell 2). HPLC-metoden gir på den andre siden info om andre lipider som mono-, di- og triglyserider, kolesterol og kolesterolestere. Nivå av fosfolipider i presskake/grakse-prøven er kvantifisert til 11 % basert på ³¹P-NMR. Sammenlignet med polare lipider i silderogn som kan være >70 % (Moriya et al., 2007), er dette lavt og bekrefter at makrellavskjær er mindre egnet for ekstraksjon av fosfolipider sammenlignet med alternativt råstoff.

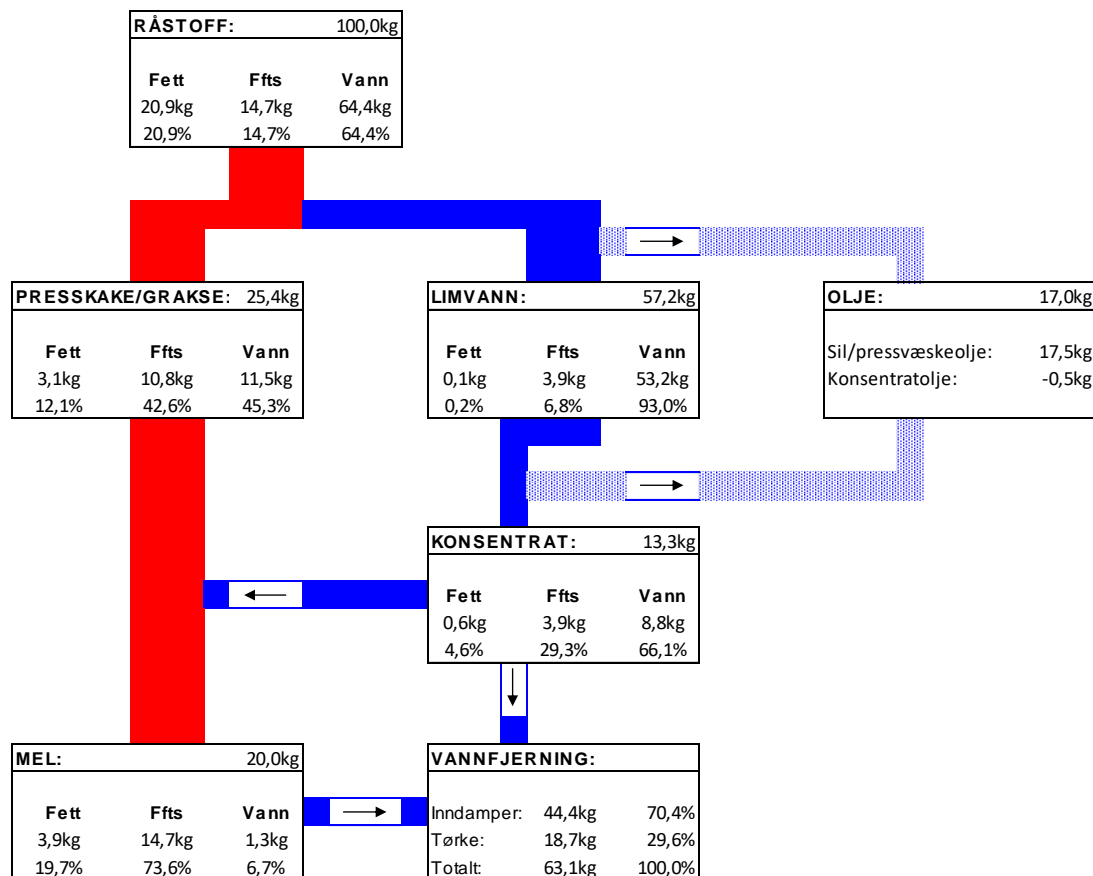
Det ble oppnådd et oljeutbytte på 17,0 kg/100 kg restråstoff, tilsvarende 81 % av totale lipider. Dette er betydelig høyere enn tidligere rapportert (4,8-6,6 %) i FHF-prosjekt 901317 «Kartlegging av oksidasjonsstatus i råolje produsert fra makrellavskjær» (Kjerstad et al., 2019) basert på makrellavskjær fra samme tidsperiode (oktober måned). Fett-nivå i råstoff og mellomprodukter er ikke angitt i denne rapporten og det er derfor vanskelig å si om dette skyldes råstoff-sammensetning

og/eller dårligere fettseparasjon. Oksidasjonsnivået i makrellolje fra industriskala forsøk (Tabell 1) er høyere enn rapportert i pilotskala basert på termisk prosess (totox 8,5; Kjerstad et al., 2019). Peroksidnivået (PV) var sammenlignbart i de to forsøkene, mens anisidinverdien (AV) var betydelig høyere i det her rapporterte industriskala forsøk. Dette er som forventet og kan forklares med en kombinasjon av råstoffkvalitet og høyere varmebelastning (tid-temperatur) og lufteksponering i fabrikkkala sammenlignet med det aktuelle pilotanlegg. Totox-nivå oppnådd i industriskala er likevel sammenlignbart med det som er rapportert basert på en hydrolyseprosess i pilotskala (totox 22,5; Kjerstad et al., 2019).

Tabell 1 Sammensetning råstoff og mellomprodukter, og oksidasjonsnivå i restfett og olje under opparbeidelse av makrell restråstoff

	Råstoff	Press- kake	Grakse	Presskake /grakse	Limvann	Konsen- trat	Mel	Olje
Råprotein (N*6,25) (%)	13,0	27,2	24,2	33,5	5,3	24,0	59,4	---
Vlp ¹ (g/100 g protein)	44,9	8,3	16,8	19,9	98,6	76,6	28,4	---
Fett (BI&D) (%)	20,9	12,5	5,6	12,1	0,2	4,6	19,7	---
Fett/Ts-basis (%)	58,6	24,8	17,0	22,1	2,9	13,4	21,1	---
Aske (%)	3,5	9,6	2,3	8,6	1,7	6,0	15,3	---
Vann (%)	64,4	49,8	66,9	45,3	93,0	66,1	6,7	---
Ts (%)	35,6	50,2	33,1	54,7	7,0	33,9	93,3	
PV (m.ekv./kg)	37	---	---	488	---	---	---	2,2
AV	54	---	---	309	---	---	---	19
Frie fettsyrer (%)	---	---	---	---	---	---	---	2,5

Vlp – vannløselig protein, Ts – tørrstoff, PV – peroksidtall, AV - anisidinverdi



Figur 1 Estimert masse og komponentbalanse per 100 kg råstoff under opparbeidelse av makrell restråstoff i industriell skala

Det ble registrert kun mindre forskjeller i sum PUFA n-3 fettsyrer i lipider ekstrahert fra makrell restråstoffet og makrelloljen (Tabell 3). I mellomprodukter og mel er det imidlertid påvist en betydelig nedgang i flerumettede fettsyrer. Dette skyldes trolig oksidasjon og indikerer at restråstoff fra makrell gir svært reaktive mellomprodukter og et fiskemel som er vanskelig å stabilisere. Det ble ikke tilsatt antioksidant til råstoff, mellomprodukter eller mel, og slik tilsetning kan forventes å gi effekt på oksidasjonsnivået. Alle prøver ble frosset ned direkte etter uttak, men dette har likevel ikke vært tilstrekkelig for å unngå oksidasjon. Høyt oksidasjonsnivå er også bekreftet ved måling av peroksidtall og anisidinverdi i ekstrahert fett fra presskake/grakse (Tabell 1). For å etterprøve om dette kan skyldes oksidasjon under selve ekstraksjonen er det gjennomført en parallell ekstraksjon med tilsetning av antioksidant. Dette ga samme nivå og vi kan konkludere med at selve ekstraksjonsbetingelsene ikke kan forklare det høye nivået. Høyt oksidasjonsnivå i prøvene ble også kommentert av Spectral Service uten at vi ba spesifikt om at dette ble undersøkt. En konsekvens av denne oksidasjonen er tap av EPA og DHA og trolig intakte fosfolipider. Her er det store forskjeller mellom resultater fra BioLab (HPLC) og Spectral Service (31P-NMR). Slik vi tolker forskjellene er at dannelse av peroksider og dimere/polymere i mindre grad vil påvirke kvantifisering basert på NMR, men i sterk grad basert på HPLC. Førstnevnte er basert på 31P-NMR og kjemisk skift i fosfatidyl sidekjeden. Sistnevnte er basert på en partisjon av molekyler i en kolonne ved bruk av en elueringsgradient, og dannelsen av dimere og polymere forbindelser vil kunne endre på elueringsmønsteret til disse fosfolipidene og dermed kvantifiseringen.

Det er også observert store forskjeller i nivået av fosfolipider i presskake sammenlignet med graksefasen i prosessen (Tabell 2). Graksen vil i en konvensjonell fiskemelprosess utgjøre en mindre andel sammenlignet med presskaken, men resultatene indikerer at graksen er mer stabil overfor oksidasjon. Det samme bildet kan sees basert på nivået av EPA+DHA (Tabell 3). Blanding av presskake /grakse ble samlet opp fra overløp transportskrue etter tilførsel av grakse fra dekanter. Det ble ikke foretatt noen ytterligere homogenisering av denne massestrømmen og det er derfor knyttet en viss usikkerhet til hvor representativ mindre prøveuttak er for hele massestrømmen. Nivå fosfolipider i presskake/grakse basert på ³¹P-NMR stemmer godt overens med nivå i grakse basert på HPLC. En mulig bias effekt er derfor mulighet for høyere andel grakse i presskake/grakse-prøve sendt inn til analyse hos Spectral Service. Resultatene bør derfor reproduseres før det kan trekkes en sikker konklusjon på forskjeller i nivå fosfolipider mellom grakse og presskake. Mel ble tatt ut før mølle og uten tilsetning av antioksidant. Melet virket noe tørkeskadet og dette har trolig også bidratt til reduksjon i nivå fosfolipider og EPA+DHA (Tabell 2 og 3). Lav mengde råstoff i forhold til fabrikkens normale kapasitet har her trolig bidratt til lang oppholdstid i tørken.

Uttak av presskake/grakse var tiltenkt brukt til gjennomføring av delmål 2 i prosjektet: Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser. Det observerte nivå på 8,9 g/100 g (basert på ³¹P-NMR; Tabell 2) er et lavt utgangsnivå for etablering av en prosess for ekstraksjon av fosfolipider. Makrell gyter på vår-forsommer og fangstsesongen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gytesesong slik tilfelle er for sild. Lipidfraksjonen i rogn og melke inneholder høye nivå av fosfolipider og vil bidra betydelig til nivå i et samfengt restråstoff. Lavt nivå av fosfolipider i makrell restråstoff er derfor biologisk bestemt. Kombinert med at makrellen også har et høyt fettnivå, medfører dette at fosfolipidnivået på fettbasis blir lavt. Ved bruk av etanolekstraksjon vil triglyseridene helt eller delvis bli co-ekstrahert med de polare lipidene og gi et produkt med lavt nivå fosfolipider sammenlignet med konkurrerende produkter i markedet. En etterfølgende konsentrering av fosfolipider vil være nødvendig basert på et slikt utgangspunkt. Kombinert med de observerte utfordringer knyttet til oksidasjon og stabilisering av mellomprodukt og mel gjør restråstoff fra makrell mindre attraktivt som utgangspunkt for industriell ekstraksjon av marine fosfolipider.

Tabell 2 Lipidklasser (g/100 g ekstrahert fett) i restråstoff, mellomprodukter og olje fra industriell opparbeidelse av restråstoff makrell. Dersom ikke annet er angitt er prøvene analysert basert på HPLC-metode

	Presskake/grakse							
	Råstoff	Presskake	Grakse	HPLC	³¹ P-NMR	Konsentrat	Mel	Olje
Triacylglycerol (TAG)	97	62	49,5	57	---	72,5	45,5	99
Diacylglycerol (DAG)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	---	0,6	1,4	<0,5
Monoacylglycerol (MAG)	<1	<1	<1	<1	---	<1	<1	<1
Frie fettsyrer (FFA)	1,1	1,65	1,05	1,35	---	0,85	<0,5	0,75
Kolesterol	<0,5	1,7	1,95	1,5	---	0,65	2,05	<0,5
Kolesterolester	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	---	<0,5	<0,5	<0,5
Fosfatidyletanolamin (PE)	1,05	2,45	1,55	1,35	1,57	1,45	1,3	0,65
Fosfatidylinositol (PI)	<1	<1	<1	<1	0,91	<1	<1	<1
Fosfatidylserin (PS)	<1	<1	<1	<1	ND	<1	<1	<1
Fosfatidylcholin (PC)	<1	<1	6,6	2,1	5,95	<1	<1	<1
Lyso-fosfatidylcholin	0,7	0,9	1,5	1,35	0,50	0,8	<0,5	<0,5
Totale polare lipider	1,5	3,4	9,1	4,9	8,93	2,2	1,6	0,8
Totale neutrale lipider	98,6	65,7	52,5	60,5	---	74,8	49,1	100,2
Total sum lipider	100,1	69,1	61,5	65,3	---	77,0	50,7	100,9

ND – ikke påvist

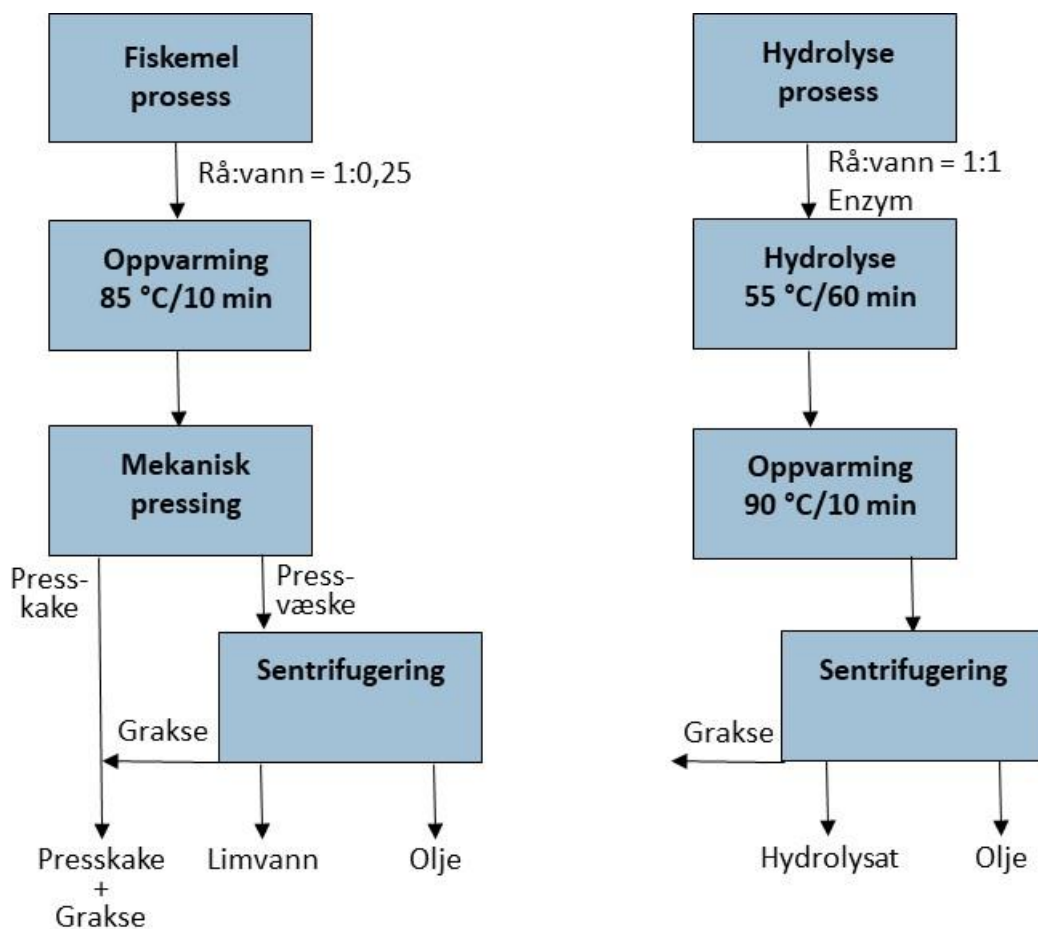
Tabell 3 Fettsyresammensetning i restråstoff, mellomprodukter og olje fra industriell opparbeidelse av restråstoff makrell

Fettsyrer g/100 g ekstrahert fett	Presskake/						
	Råstoff	Presskake	Grakse	grakse	Konsentrat	Mel	Olje
C14:0	6,4	5,3	4,2	5,6	5,3	5,2	6,3
C16:0	13,0	12,2	11,3	11,9	11,6	11,4	12,1
C16:1 n-7	3,5	3,1	2,1	3,1	2,8	2,8	3,2
C16:2 n-4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3
C16:3 n-4	0,1	0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C18:0	2,1	2,3	2,6	2,0	2,2	1,9	1,9
C18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	12,8	10,6	10,8	10,2	11,6	9,8	12,6
C18:2 n-6	1,5	1,1	1,1	1,1	1,3	1,0	1,5
C18:3 n-3	1,4	0,8	0,8	0,8	1,1	0,6	1,4
C18:3 n-6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C18:4 n-3	4,3	2,1	2,2	2,0	3,4	1,4	4,4
C20:0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:1 (n-9)+(n-7)	9,9	7,9	6,9	8,6	8,1	7,9	9,7
C20:2 n-6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C20:3 n-3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C20:3 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-3	1,1	0,6	0,7	0,6	0,9	0,4	1,1
C20:4 n-6	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,4
C20:5 n-3 (EPA)	7,6	4,0	4,7	3,9	6,3	2,5	7,3
C21:5 n-3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,5
C22:0	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	0,1	0,1
C22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	14,8	12,7	9,8	13,6	12,3	12,5	14,3
C22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:5 n-3 (DPA)	1,4	0,8	1,1	0,7	1,3	0,5	1,3
C22:6 n-3 (DHA)	11,5	5,9	9,5	5,7	10,6	3,7	11,0
C24:1 n-9	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8
Sum mettede fettsyrer	21,6	20,1	18,2	19,8	19,2	18,7	20,3
Sum monomettede fettsyrer	42,0	35,2	30,4	36,2	35,5	33,8	40,5
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	2,5	1,8	2,0	1,8	2,1	1,6	2,5
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	27,7	14,5	19,3	14,0	24,0	9,3	27,1
Sum total-PUFA fettsyrer	30,6	16,6	21,5	16,1	26,4	11,1	30,0
omega-6/omega-3 ratio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Sum EPA + DHA	19,0	9,9	14,2	9,6	16,9	6,2	18,3
Sum identifiserte fettsyrer	94,2	71,9	70,1	72,1	81,1	63,5	90,8
Sum uidentifiserte fettsyrer	5,6	5,7	5,0	5,3	5,8	4,9	6,4

ND – ikke påvist

2.2 Laboratorieskala opparbeidelse av restråstoff sild

Fiskemelprosessen kan karakteriseres som en mekanisk-termisk separasjonsprosess for å fjerne olje og vann fra råstoffet. Mellomproduktene presskake, grakse og limvann vil ha et redusert fettnivå på ts-basis. Det er hovedsakelig triglyserider som fjernes i prosessen, dvs. kun små mengder av fosfolipider i råstoffet ender opp i den fraseparerte oljen (Tabell 2; Young 1986). Fosfolipidene vil følge proteinfasen og en effekt av dette vil være en økning av fosfolipid-nivået på fettbasis i mellomproduktene. Separert limvann vil hovedsakelig inneholde vannløselig protein og lave nivå av partikulært bundet protein. Tilsvarende vil separert hydrolysat fra en hydrolyseprosess inneholde lave nivå av partikulært protein. Mesteparten av fosfolipidene vil derfor ende opp i presskake/dekantergrakse basert på førstnevnte prosessdesign og i dekantergraksen fra sistnevnte. For å kvantifisere denne effekten er det gjennomført forsøk i laboratorieskala basert på simulering av en konvensjonell fiskemelprosess og hydrolyseprosess (Figur 2). I fiskemelprosessen ble råstoffet tilsatt vann (1:0,25) før oppvarming til 85 °C etterfulgt av mekanisk pressing og sentrifugering. Dette vil gi en presskake og et sediment etter sentrifugering som vil representere hhv. presskake og grakse i en industriell fiskemelprosess. Hydrolyse ble gjennomført på råstoff tilsatt vann (1:1) og 1 % protease (FoodPro PNL) på råstoffbasis. Etter 60 minutter hydrolyse ble massen sentrifugert. Sedimentet vil her tilsvare graksefasen i en industriell prosess.



Figur 2 Forenklet prosessflytskjema for labskala simulering av fiskemel- og hydrolyseprosess. Rå = råstoff

Opparbeidelse av restråstoff sild viste en normal prosentfordeling (80:20) av fettfritt tørrstoff mellom presskake/grakse og limvann (Tabell 4). Buklapp-rogn-melke avvek fra dette med en litt lavere andel i limvannet (75:16). Hydrolyse av råstoffet forskjøv denne balansen mot væskefasen med 36-39 % av fettfritt tørrstoff i hydrolysate. Fettseparasjon i laboratorieskala kan forventes å være bedre enn i industriskala grunnet høyere g-kraft og tid. Dette bekreftes av lave nivå fett på ts-basis i limvann- og hydrolysat-prøvene. Fersk sild kan gi utfordringer med høye nivå fett i presskake/grakse fasen. Dette er også tilfelle her med nivå på 13 og 17 %. Her må det legges til at den anvendte ekstraksjonsmetode for kvantifisering av lipider (kloroform-metanol ekstraksjon) gir 1-2 % høyere fettnivå i en presskake-prøve sammenlignet med den industrielt anvendt Soxhlet-metoden (petroleumseter ekstraksjon; Oterhals og Nygård, 2008). På ts-basis tilsvarer dette 2-4 % høyere fettnivå og de her oppnådde resultater kan derfor sies å ligge innenfor det som forventes industrielt. Hydrolyse av råstoffet ga en graksefase som var betydelig lavere i ts (26-27 %), og høyere i fett på ts-basis (21-22 %). Proteinene fulgte som forventet i store trekk fett-fritt ts balansen i prosessen. Nivå vannløselig protein er lavt i presskake/grakse fra melprosess og noe høyere i grakse fra hydrolyseprosessen. Sistnevnte er primært forårsaket av et lavere ts-nivå i graksen. Opparbeidelse av buklist-rogn-melke ga emulsjonsproblemer under separasjon av limvannet. Dette har gitt seg utslag i en del tap i prosess-apparatur og en dårligere kvantifisering av massefordelingen. De oppnådde resultater for fettfritt ts og protein er tilnærmet lik som for samfengt restråstoff. Størst avvik er observert for fettbalansen. En noe større andel endte opp i limvannfasen hvilket skyldes de nevnte emulsjonsproblemer. En noe høyere andel fett er også observert i presskake/grakse fasen og dette skyldes trolig primært at en større andel av fett er knyttet til rogn og melke i form av polare lipider og at disse strukturene ikke ødelegges gjennom koke- og presse-prosessen.

En hypotese som ønsket prøvd ut i disse forsøkene var i hvilken grad fosfolipidene fulgte den ikke-løselige proteinfasen i prosessene og om nivået ville øke i graksefasen etter hydrolyse. Nivå fosfolipider i råstoff og presskake/grakse-fase fra mel- og hydrolyseprosess (Tabell 5) viser et økt nivå av polare lipider (PL) i presskake/grakse sammenlignet med råstoffet. Dette er en effekt av at fiskemelprosess primært fjerner de nøytrale lipidene (triglyserider). Sammenlignet med nivå i råstoffet er det her oppnådd en 3-4 dobling av nivå polare lipider i presskake/grakse med høyest nivå i graksefase fra hydrolyseprosess.

Andel restfett i limvannet er svært lavt (2-3 %) og utgjør <10 % av restfett i presskake/grakse (Tabell 4). Nivå fosfolipider i separert olje er ikke kvantifisert, men er tidligere rapportert å ligge svært lavt (5-100 ppm P; Young, 1986). Fosfolipider har både hydrofil og hydrofob karakter og vil danne emulsjoner i olje (vann i olje emulsjon) og vann (olje i vann emulsjon). Nivået av fosfolipider i en olje vil derfor avhenge av hvor effektiv separasjon av vann og protein har vært, om oljen er polert (vann-vasket) eller ikke, og om det i prosessen er blitt dannet emulsjonsfase som er vanskelig å separere. Eksempel på sistnevnte problem ble observert ved prosessering av buklist-rogn-melke-råstoffet. Her ble det dannet en emulsjonsfase som det ikke var mulig å separere ved sentrifugering. Emulsjonsfasen (25 g) inneholdt 30,5 % ts hvorav 23,7 % var lipider, 6,3 % protein og 1,0% aske. Lipidfasen viste nivå av polare lipider (Tabell 5) tilsvarende som i råstoffet og sammenlignbart med graksefase fra hydrolyseprosess.

Rogn og melke er kjent for å ha høye nivå av fosfolipider. I fileteringsprosessen blir rogn og melke tatt ut sammen med buklist og videre prosessert for separasjon av rogn som anvendes direkte til konsum eller ekstraksjon av fosfolipider. En direkte anvendelse av restråstoff-fraksjonen buklist-rogn-melke til ekstraksjon av fosfolipider kan være et interessant alternativt råstoff for ekstraksjon av fosfolipider idet man unngår et ekstra trinn for separasjon av rogn og forenkler prosessen. Nivå polare lipider i

ekstrahert fett fra dette råstoffet var 19,6 % og dette ble økt med en faktor på 2,4 i presskake/graksefasen til 47 % (Tabell 5). Sammenlignet med det resterende samfengte restråstoffet (hode, rygg, hale, slo) vil dette være det klart beste utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider. Nivå polare lipider i fett ekstrahert fra silderogn er tidligere rapportert til 73,6 % (Moriya et al., 2007).

Tabell 4 Sammensetning og massefordeling under opparbeidelse av silderåstoff basert på fiskemel- og hydrolyseprosess (jfr. Fig. 2)

Vekt/sammensetning	NVG-sild restråstoff		Nordsjøsild restråstoff		NVG-sild bukklapp-rognmelke
	Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess	Fiskemel prosess	Hydrolyse prosess	Fiskemel prosess
Råstoff (g)	1000	1000	1000	1000	1000
Tørrstoff (%)	26,5	26,5	27,1	27,1	31,0
Fett (%)	8,5	8,5	9,6	9,6	9,7
Protein (%)	14,9	14,9	14,5	14,5	21,8
Aske (%)	3,9	3,9	4	4	1,8
Limvann (g)	725	1358	727	1319	300
Tørrstoff (%)	5,0	5,2	5,3	4,8	11,1
Fett (%; ts-basis)	4,0	3,8	3,8	4,2	18,2
Protein (%; ts-basis)	80	87	74	85	70
Vannløselig protein (%; ts-basis)	82	88	77	88	32
Aske (%; ts-basis)	22	12	25	13	10
Presskake (g)	285	na	190	na	164
Grakse (g)	118	537	183	512	468
Presskake+grakse (g)	403	537	373	512	632
Tørrstoff (%)	42,1	26,7	45,1	25,5	31,8
Fett (%; ts-basis)	13	21	17	22	21
Protein (%; ts-basis)	71	60	66	60	81
Vannløselig protein (%; ts-basis)	7,1	13,5	5,5	13,3	7,5
Aske (%; ts-basis)	17	20	17	20	7
Olje (g)	63,0	54,7	67,0	63,5	25,0
Fettbalanse (%)					
Limvann	2	3	2	3	6
Presskake+Grakse	26	36	29	29	43
Olje	74	64	70	66	32
Sum	102	104	100	98	81
Fettfritt ts-balanse (%)					
Limvann	20	39	22	36	16
Presskake+Grakse	82	63	80	59	75
Sum	102	102	102	95	90
Protein-balanse (%)					
Limvann	19	41	20	37	11
Presskake+Grakse	81	58	76	54	75
Sum	100	99	96	91	86

Tabell 5 Lipidklasser i totalfett ekstrahert fra råstoff og mellomprodukter basert på restråstoff fra NVG- og Nordsjøsil

Lipidklasser g/100 g ekstrahert fett	NVG sil - restråstoff			Nordsjøsil - restråstoff			NVG sil - bukklapp-rogn-melke		
	Råstoff	Fiskemel	Hydrolyse	Råstoff	Fiskemel	Hydrolyse	Råstoff	Fiskemel	
		prosess	prosess		prosess	prosess		prosess	Emulsjon
Triacylglycerol	86,0	38,0	66,0	90,0	38,0	60,0	59,0	32	50,0
Diacylglycerol	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Monoacylglycerol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Frie fettsyrer	1,3	0,5	0,6	5,3	2,0	2,2	2,1	2	0,6
Kolesterol	1,0	2,1	1,6	1,0	2,0	2,6	3,6	6,2	3,9
Kolesterolester	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Phosphatidyletanolamin	<0,5	0,7	2,3	0,7	1,0	2,7	0,6	11	5,4
Phosphatidylinositol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Phosphatidylserin	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Phosphatidylcholin	4,2	13,0	19,0	4,1	13,0	15,0	19,0	37	19,0
Lyso-Phosphatidylcholin	1,1	0,5	0,8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Total polare lipider	5,3	14,2	22,1	4,8	14,0	17,7	19,6	47	24,4
Total neutrale lipider	88,36	40,6	68,2	96,3	42,0	64,8	64,7	40,2	54,5
Total sum lipider	93,6	54,8	90,3	101,1	56	82,5	84,3	87,2	78,9

Nivå n-3 PUFA i råstoff og presskake/grakse viser et annet bilde enn nivå polare lipider (Tabell 6). Her er det observert en liten reduksjon i restfett presskake/grakse-fase fra melprosess, og en tilsvarende økning på 2-4 % i graksefase fra hydrolyseprosess. Den underliggende årsaken til dette er ikke kjent, men stemmer overens med det noe lavere nivået av polare lipider som ble observert i presskake/grakse fra industriell prosessering av restråstoff makrell (jfr. pkt. 2.1).

Tabell 6 Fettsyresammensetning i totalfett ekstrahert fra råstoff og mellomprodukter basert på restråstoff fra NVG- og Nordsjøsilid

Fettsyrer g/100 g ekstrahert fett	NVG silid - restråstoff			Nordsjøsilid - restråstoff			NVG silid - bukklapp-rogn-melke		
	Råstoff	Fiskemel	Hydrolyse	Råstoff	Fiskemel	Hydrolyse	Råstoff	Fiskemel	
		prosess	prosess		prosess	prosess		Pk/Gr	Emulsjon
14:0	6,5	5,3	5,9	6,1	5,3	5,3	5,7	3,4	5,2
16:0	9,9	10,5	10,8	11,2	11,0	11,1	11,6	11	10,1
16:1 n-7	3,0	2,7	2,8	3,3	2,9	2,8	3,0	2,1	2,8
16:2 n-4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2
16:3 n-4	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
18:0	1,0	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,0	1,0	0,9
18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	9,9	9,8	9,9	8,7	7,8	7,5	11,1	9,2	9,8
18:2 n-6	0,8	0,7	0,8	1,1	0,9	0,9	0,9	0,7	0,8
18:3 n-3	0,5	0,4	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5
18:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1
18:4 n-3	1,2	0,6	1,1	2,0	1,2	1,5	1,1	0,9	1,2
20:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	<0,1	0,1
20:1 (n-9)+(n-7)	14,0	11,3	12,3	9,7	8,3	7,7	11,7	5,8	10,7
20:2 n-6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3 n-3	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20:3 n-6	0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20:4 n-3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4
20:4 n-6	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2
20:5 n-3 (EPA)	3,3	2,5	4,3	5,2	3,8	5,2	4,4	6,2	4,7
21:5 n-3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
22:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	23,4	17,6	19,8	18,7	15,6	15,3	17,1	8,0	15,9
22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
22:5 n-3	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	1,0	0,7
22:6 n-3 (DHA)	4,1	3,4	7,2	7,3	6,4	9,6	7,1	13,4	7,6
24:1 n-9	0,9	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,7	0,4	0,6
Sum mettede fettsyrer	17,7	17,3	18,2	18,9	18,0	18,2	18,4	15,4	16,3
Sum monoumettede fettsyrer	51,2	42,4	45,8	41,2	35,6	34,3	43,6	25,5	39,8
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4	1,6	1,3	1,1	1,2
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	10	7,6	14,1	16,6	12,9	18,4	14,4	22,4	15,2
Sum total-PUFA fettsyrer	11,5	8,8	15,6	19,1	14,8	20,5	15,9	23,7	16,7
omega-6/omega-3 ratio	0,12	0,14	0,09	0,1	0,11	0,09	0,09	0,05	0,08
Sum EPA + DHA	7,4	5,9	11,5	12,5	10,2	14,8	11,5	19,6	12,3
Identifiserte fettsyrer	80,4	68,5	79,6	79,2	68,4	73	77,9	64,6	72,8
Ikke-identifiserte fettsyrer	4,7	4,3	5,0	4,4	4,4	4,3	4,6	3,7	4,6

3 Konklusjon

Opparbeidelse av restråstoff fra makrell i industriell skala ga et høyt oljeutbytte på 17 kg per 100 kg råstoff. Masse og komponentbalanser viser en fettfordeling på 15 % i presskake/grakse, 3 % i konsentrat og 81 % i olje. Nivå polare lipider (fosfolipider) på fettbasis i råstoffet er svært lavt (1,5 %), men øker noe i mellomproduktene presskake (3,4 %), grakse (9,1 %) og konsentrat (2,2 %). Nivå i fraseparert olje var 0,8 %. Nivå av n-3 polyumettede fettsyrer (n-3 PUFA) var 19 % i råstoffet og 18,3 % i oljen. Lavere nivå n-3 PUFA i mellomproduktene presskake, grakse og konsentrat kan trolig primært tilskrives utfordringer med oksidasjon i disse prøvene. Makrell gyter vår-forsommer og fangstsesongen (august-oktober) sammenfaller dermed ikke med gytesesong slik tilfelle er for sild. Kombinert med høyt fettnivå (triglyserider) gir dette et meget lavt nivå av fosfolipider i ekstrahert fett fra restråstoff og mellomprodukter. Samlet vurdert er restråstoff fra makrell lite egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av marine fosfolipider.

Opparbeidelse av restråstoff sild basert på fiskemel- og hydrolyseprosess i labskala viser en betydelig økning av nivå polare lipider i fettfase fra presskake/grakse sammenlignet med utgangsnivå i råstoffet. Effekten er høyest for en hydrolyseprosess der det er oppnådd en 3-4 dobling av nivå polare lipider i graksen til 22,1 % for NVG-sild og 17,7 % for Nordsjø-sild. En fiskemelprosess ga en presskake/grakse med hhv. 8 og 5 % lavere nivå. Råstoffet i disse forsøkene inneholdt kun mindre mengder med rogn og melke. Ved å ta utgangspunkt i buklist-rogn-melke-fraksjonen kunne nivå polare lipider økes fra 19,6 til 47 % i presskake/grakse basert på en fiskemelprosess. I sistnevnte forsøk oppsto det problemer med fettseparasjonen grunnet emulsjonsdannelse og noe tap av polare lipider.

Forsøkene bekrefter at de polare lipidene primært følger den ikke-vannløselige (partikulære) proteinfraksjonen i fiskemel- og hydrolyseprosessen. Ved å varmebehandle og mekanisk separere råstoffet kan en stor andel av vann og nøytrale lipider (triglyserider) fjernes før ekstraksjon av de polare lipidene ved bruk av etanolekstraksjon. Dette vil muliggjøre bruk av restråstoff med relativt lave nivå polare lipider inn i en ekstraksjonsprosess.

4 Referanser

- AOCS Official Method Ce 1b-89. Fatty acid composition by GLC. Marine oils. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 5th ed.; Firestone, D., Ed.; AOCS Press: Champaign, IL, 1998.*
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917.
- ISO 6496. Animal feeding stuffs - Determination of moisture and volatile matter content. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.*
- ISO 5983-2:2009. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 2: Block digestion and steam distillation method. Geneva, Switzerland: *International Organization for Standardization (ISO); 2009.*
- ISO 5984:2002. Animal feeding stuffs – Determination of crude ash. Geneva, Switzerland: *International Organization for Standardization (ISO); 2002.*
- Kjerstad, M., Barnung, T., Mildenerger, J., Carvajal, A., Fugledal Remme, J., 2019. Sluttrapport: Kartlegging av oksidasjonsstatus i råolje produsert fra makrellavskjær. *Rapport nr. MA 19-08; FHF-prosjekt 901317.*
- Moriya, H., Kuniminato, T., Hosokawa, M., Fukunaga, K., Nishiyama, T., Miyashita, K., 2007. Oxidative stability of salmon and herring roe lipids and their dietary effect on plasma cholesterol levels of rats. *Fisheries Science* 73:668-674.
- Oterhals, Å., Nygård, E., 2008. Reduction of Persistent Organic Pollutants in Fishmeal: A Feasibility Study. *J. Agric. Food Chem.* 56:2012–2020.
- Oterhals, Å., Kvamme, B., Berntssen, M.H.B, 2010. Modelling of a short-path distillation process to remove persistent organic pollutants in fish oil based on process parameters and quantitative structure properties relationships. *Chemosphere* 80:83–92.
- Young, F. V. K., 1986. The chemical & physical properties of crude fish oils for refiners & hydrogenators. *IAFMM Fish Oil Bulletin* No. 18, IFOMA, London, UK.
- Zailer, E., Monakhova, Y.B., Diehl, B.W.K., 2018. ³¹P NMR Method for Phospholipid Analysis in Krill Oil: Proficiency Testing—A Step toward Becoming an Official Method. *J Am Oil Chem Soc* 95:1467–1474.

