

Optimalisering av prosess- betingelser for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sundalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 10/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-712-9	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 26. mai 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 32 + 4	<i>Prosjektnummer:</i> 12492
<i>Tittel:</i> Optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider i silderogn		
<i>Title:</i> Optimization of process conditions for extraction of phospholipids in herring roe		
<i>Forfatter(e):</i> Åge Oterhals og Lars Thoresen		
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi		
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901504 / Lars Lovund		
<i>Stikkord:</i> Fosfolipider, flerumettede fettsyrer, silderogn, ekstraksjon, prosessoptimalisering		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Umoden silderogn inneholder høye nivåer av fosfolipider og omega-3 fettsyrer og er et godt utgangspunkt for utvikling av produkter rettet mot kosttilskudd og helsekostmarkedet. Det er i prosjektet optimalisert en prosess for ekstraksjon av fosfolipider fra tørket rogn basert på etanol-vann ekstraksjon. Optimal vann% i etanolfasen er funnet å være 11,3 %. Det ble ikke funnet effekt av temperatur i området 20-60 °C. Høyeste oppnådde utbytte av fosfolipider ved bruk av ett ekstraksjonstrinn er 83 %. Etanolekstraksjon gir økende co-ekstraksjon av salt og protein med økende vann%, men ingen effekt på farge. Lipidekstraktet har høy viskositet som kan reduseres ved tilsetning av makrellolje. Direkte ekstraksjon av våt rogn ga 25 % lavere utbytte sammenlignet med spraytørket rogn. Nivå av organiske miljøgifter (POPs) og tungmetaller i lipidekstraktet er lave og godt under gjeldende grenseverdier. Rapporten inkluderer også en oversikt over patenter med relevans for den studerte teknologi.		
<i>English summary/recommendation:</i> Immature herring roe contains high levels of phospholipids and omega-3 fatty acids and is a good starting point for the development of products in the dietary supplements and health food market. The project has optimized a process for the extraction of phospholipids from dried roe using aqueous ethanol. Optimal water content in the ethanol phase was found to be 11.3 %. No effect of temperature in the range 20-60 °C was observed. The highest achieved yield of phospholipids using one extraction step is 83 %. Ethanol extraction gives increasing co-extraction of salt and protein with increasing water content, but no effect on colour. The lipid extract has a high viscosity which can be reduced by blending with mackerel oil. Direct extraction of wet roe gave 25 % lower yield compared to spray-dried roe. The level of organic pollutants (POPs) and heavy metals in the lipid extract are low and well below current maximum levels. The report also includes an overview of patents with relevance to the studied technology.		

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 høyt 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 humant 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.

Innledende undersøkelser konkluderte at restråstoff fra makrell i mindre grad er egnet som utgangspunkt for ekstraksjon av fosfolipider sammenlignet med sild (Oterhals og Thoresen, 2021). I samråd med prosjektets referansegruppe og FHF er det besluttet å videreføre arbeidet med optimalisering av prosessbetingelser for ekstraksjon av fosfolipider (delmål 2) fra silderogn i stedet for grakse fra prosessering av restråstoff makrell. Denne rapporten er den andre i en serie som ser på egnethet av forskjellige typer av restråstoff fra pelagisk fisk (makrell og sild) til merverdiskapning med fokus på fosfolipider.

Innhold

1	Eksperimentelt	1
1.1	Materialer	1
1.2	Metoder	1
1.2.1	Spraytørking av silderogn	1
1.2.2	Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser	1
1.2.3	Sammenligning ekstraksjon av våt og tørket silderogn	2
1.2.4	Reintroduksjon av lipidekstrakt i makrellolje	2
1.2.5	Analysemetoder	2
1.2.6	Statistiske metoder	2
2	Resultater og diskusjon	4
2.1	Sammensetning silderogn	4
2.2	Innledende screeningforsøk	6
2.3	Optimaliseringsdesign	8
2.3.1	Responsflatemodellering	9
2.3.2	Utbytte individuelle fosfolipider	11
2.3.3	Teoretisk utbytte ved vask av filterkake	13
2.3.4	Farge og struktur på frysetørket ekstrakt	15
2.4	Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje	17
2.5	Direkte ekstraksjon av våt rogn	19
2.6	Nivå organiske miljøgifter og tungmetaller	22
3	Patentsøk	25
4	Konklusjon	31
5	Referanser	32
6	Vedlegg	i

1 Eksperimentelt

1.1 Materialer

Umoden og rensset blokkfrosset silderogn produsert i 2020 (batch #0441; 2/2-20) og 2021 (batch #1157; 27/1-21) ble levert fra Pelagia Liavåg. Raffinert makrellolje ble levert fra EPAX (Ålesund). Etanol anvendt i ekstraksjonsforsøk var av typen Absolutt alkohol prima 99,9 % (Kiilto, Finland). Alle kjemikalier anvendt under ekstraksjon av fosfolipider var av næringsmiddelkvalitet.

1.2 Metoder

1.2.1 Spraytørrking av silderogn

En blokk med rogn (20 kg batch #0441) ble tint over natten og tilsatt 5 kg vann før tørrking i en GEA Niro P 6,3 spraytørke ved innløps/utløps-temperatur på hhv. 212 og 94-96 °C. Tørket rogn ble homogenisert, vakuumpakket i mindre porsjoner, og oppbevart i -80 °C frys inntil analyse og bruk i ekstraksjonsforsøk.

1.2.2 Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser

Innledende ekstraksjonsforsøk ble gjennomført ved romtemperatur basert på 100 % etanol tilsatt økende mengde ionebyttet og filtrert vann på hhv. 0, 10, 20, 30, 40 og 50 % (w/w). 10 g spraytørket silderogn ble tilsatt 100 g etanol/vann-fase ved romtemperatur og blandet ved bruk av en T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet (IKA Werke, Germany) i 5 minutter ved 6500 rpm. Løsemiddelfasen var tilsatt 0,8 mg per 100 g av antioksidanten TBHQ tilsvarende ca. 400 ppm på fettbasis. Blandingen ble deretter vakuumpakket gjennom et GF/C glassfiberfilter (Whatman International, England). Oppsamlet løsemiddelfase ble dampet inn under vakuumpumpe i en rotavapor (BÜCHI Labortechnik, Sveits) v/35 °C og 80 mbar. Ekstraktet ble deretter slemmet opp i 50 g vann og frysetørket for å fjerne rester av løsemiddel.

Tabell 1 Kodet og eksperimentelt nivå i det anvendte optimaliseringsdesignet (2-faktoriell CCD)

Forsøk #	Kodet nivå		Design nivå	
	Vann (%)	T (°C)	Vann (%)	T (°C)
1	-1,00	-1,00	5,8	25,8
2	-1,00	1,00	5,8	54,2
3	1,00	-1,00	34,2	25,8
4	1,00	1,00	34,2	54,2
5	-1,41	0,00	0	40
6	1,41	0,00	40	40
7	0,00	-1,41	20	20
8	0,00	1,41	20	60
9	0,00	0,00	20	40
10	0,00	0,00	20	40
11	0,00	0,00	20	40

Optimaliseringsforsøk ble gjennomført basert på et 2-faktorielt central composite design (CCD) med variablene vann% (0-40 % (w/w) i etanolfasen) og temperatur (20-60 °C) (Tabell 1). Mengdeforholdet mellom tørket rogn og etanolfase ble holdt konstant lik 1:10 ved bruk av 30 g spraytørket rogn og 300 g

løsemiddelfase. Etanolfasen ble forvarmet til nivå gitt i design (Tabell 1) før tilsetning av spraytørket rogn og homogenisering ved bruk av T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet i 5 minutter ved 6500 rpm. Løsemiddelfasen var tilsatt 0,8 mg per 100 g av antioksidanten TBHQ tilsvarende ca. 400 ppm på fettbasis. Etanolfasen ble fjernet ved vakuumfiltrering gjennom PALL T2600 dybdefilter, ekstraktet konsentrert på rotavapor (35 °C, 80 mbar), og deretter slemmet opp i ca. 150 g vann og frysetørket for å fjerne rester av løsemiddel.

1.2.3 Sammenligning ekstraksjon av våt og tørket silderogn

Våt eller spraytørket rogn (batch #0441, 2020), tilsvarende 30 g tørrstoff, ble tilsatt etanol eller etanol og vann slik at den endelige vannprosenten var 11,3 wt%. Våt rogn (100,7 g) ble tilsatt 555 g etanol. Spraytørket rogn (30 g) ble tilsatt en mengde etanol med 11,3 % vann slik at forholdet mellom tørrstoff og løsemiddelfase var likt (1:20,8) i begge forsøk. Blandingen ble homogenisert ved romtemperatur i 5 minutter med bruk av T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet (13 500 rpm). Etanolfasen ble fjernet ved vakuumfiltrering gjennom PALL T2600 dybdefilter. Ekstraktene ble konsentrert på rotavapor (35 °C, 80 mbar). Ca. 150 ml vann ble tilsatt og prøven frysetørket. Det er gjennomført tre eksperimentelle gjentak.

1.2.4 Reintroduksjon av lipidekstrakt i makrellolje

Lipidekstrakt og makrellolje ble blandet mekanisk ved bruk T25 Ultra-Turrax dispergeringsenhet i 2 x 2 minutter med bruk av hastighet 3 (13 500 rpm). Ved tilsetning i etanolfase ble tørket lipidekstrakt løst opp i ca. 30 ml etanol før tilsetning av makrellolje. Etanolfasen ble deretter fjernet under vakuum på rotavapor og siste rest ved bruk av frysetørking.

1.2.5 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 (B&D) ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959). Råprotein (N x 6,25) ble målt ved bruk av Kjeldahl metode (ISO 5983-2:2009). Protein ble bestemt basert på analyse av aminosyrer ved bruk av HPLC-metode (Liu et. al, 1995). Salt (NaCl) ble bestemt basert på innhold av klorid-ioner ved bruk av Vollharts metode (Haouet 2006). Fettsyreprofil ble analysert med bruk av gass-kromatografi 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). Analyse av fosfolipider basert på 31P-NMR ble gjennomført i henhold til Zailer et al. (2018). Miljøgiftanalyser er gjennomført ved Forskningsgruppe for Massespektrometri, SINTEF Industri basert på GC-MS/MS (POPs) og ICP-MS/MS (tungmetaller).

1.2.6 Statistiske metoder

Resultater i fra forsøkene ble behandlet i programmene Excel og Statistica. Responsflatemodellering ble gjennomført ved å tilpasse den uavhengige variabelen basert på multipel regresjon til følgende generelle modell:

$$y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_j x_j + \beta_{ij} x_i x_j + \beta_{ii} x_i^2 + \beta_{jj} x_j^2 + \epsilon \quad [1]$$

I modellen er y den estimerte responsen (dvs. utbytte ekstrakt, fosfolipider, salt, protein, farge), β_0 krysningpunktet med y-aksen, β_i , β_j , β_{ij} , β_{ii} og β_{jj} regresjonskoeffisientene for hhv. hver enkelt faktor, kvadratisk ledd og interaksjonen mellom dem, ϵ er residualet (error), og x_i og x_j de uavhengige variablene vann% i etanolfasen og temperatur (°C). Den beste reduserte modellen ble identifisert basert

på «forward» og/eller «backward» fjerning av ikke-signifikante variable ($p > 0,05$). Kvaliteten på de tilpassede modellene ble evaluert basert på ANOVA, F-statistikk og regresjonskoeffisient (R^2).

Parvis sammenligning av responser ble gjennomført basert på Student t-test med 5 % signifikansnivå.

2 Resultater og diskusjon

2.1 Sammensetning silderogn

Sammensetning på umoden silderogn fra 2020 og 2021 viser små variasjoner (Tabell 2). Viktigste forskjell er innhold av vann som påvirker de andre komponentene i negativ retning med unntak av salt som øker litt. På tørrstoffbasis blir disse forskjellene minimale.

Tabell 2 Sammensetning av umoden rogn fra 2020 og 2021 før og etter tørking

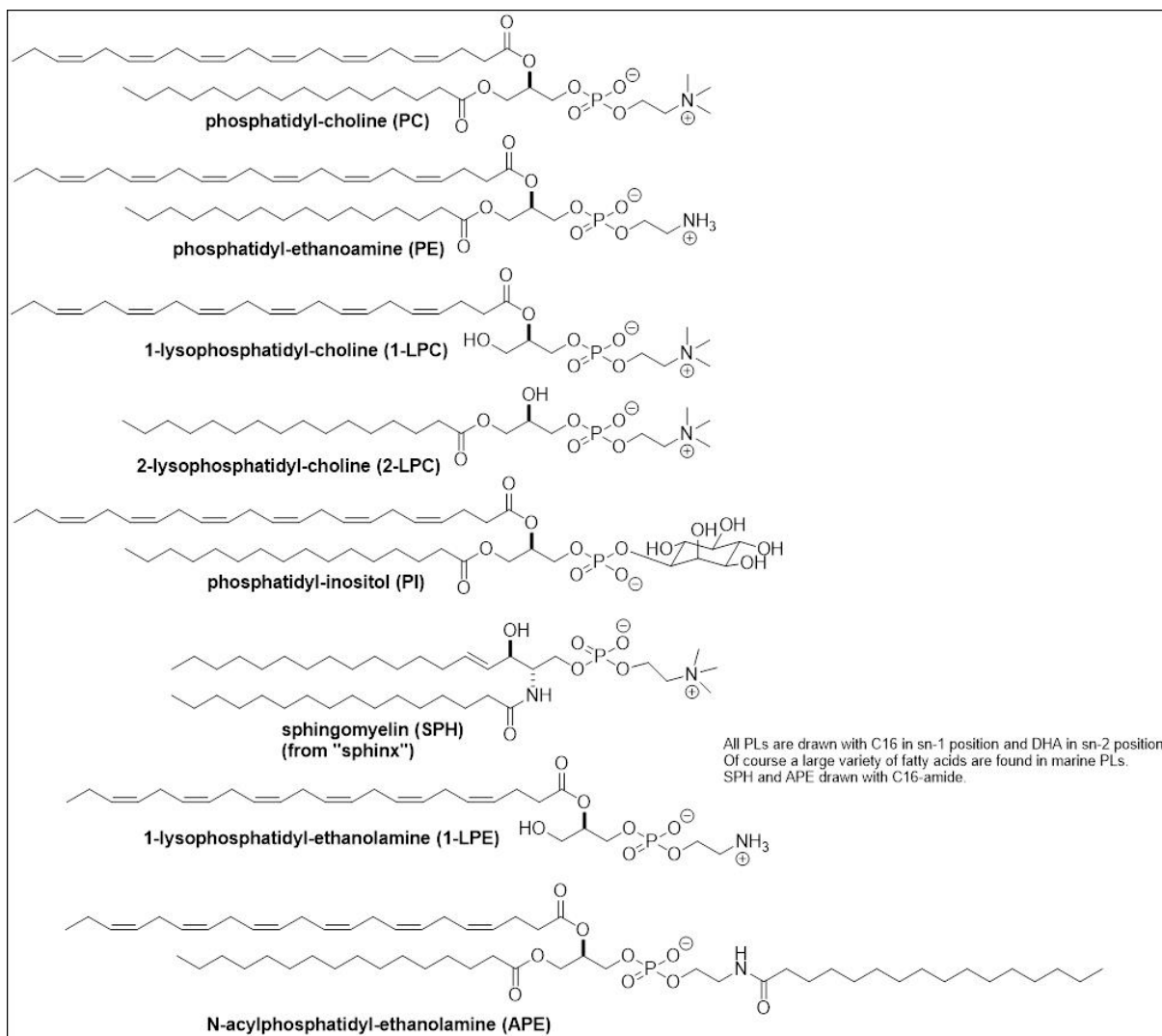
Vekt%	Rogn batch #0441 2020	Rogn batch #1157 2021	Spraytørket rogn batch #0441*	Frysetørket rogn batch #0441*	Frysetørket rogn batch #1157*
Vann	70,2	72,5	3,5	1,0	2,1
Aske	2,2	2,2	7,1	7,3	7,8
NaCl	1,9	2,1	6,2	6,3	7,5
Fett (B&D ekstrakt)	5,4	5,1	17,5	17,9	18,2
Protein (Nx6,25)	21,5	19,5	69,6	71,4	69,4
Protein (sum aminosyrer)	22,0	20,9	71,2	73,0	74,2

*) Sammensetning beregnet basert på tørrstoff nivå relativt til våt rogn.

Tabell 3 Lipidklasser (HPLC) og fosfolipider (³¹P-NMR) i våt og tørket rogn. Navn og kjemisk struktur for de respektive fosfolipider er gitt i Figur 1.

Lipidklasse	g/100 g B&D-ekstrahert lipid			g/100 g prøve	
	Rogn batch #0441 ¹⁾	Rogn batch #1157 ¹⁾	Spraytørket rogn batch #0441 ²⁾	Frysetørket batch #0441 ²⁾	Frysetørket batch #1157 ²⁾
TAG	21	20	---	---	---
DAG	<0.5	<0.5	---	---	---
MAG	<1	<1	---	---	---
FFA	0,7	0,8	---	---	---
Kolesterol	6,3	6,1	---	---	---
Kolesterol estere	<0.5	<0.5	---	---	---
PE	10	9,2	7,76	0,92	0,98
LPE	---	---	0,11	0,03	0,01
APE	---	---	0,37	n.d.	n.d.
PI	<1	<1	0,66	0,18	0,20
PS	<1	<1	n.d.	n.d.	n.d.
PC	58	57	60,8	7,44	8,59
LPC	1,5	0,9	---	---	---
1-LPC	---	---	0,17	0,03	0,03
2-LPC	---	---	0,70	0,18	0,11
SPH	---	---	1,56	0,24	0,33
Andre PL	---	---	0,4	0,06	0,11
Polare lipider	69,5	67,1	9,08	9,07	10,36
Nøytrale lipider	28,0	26,9	---	---	---
Sum lipider	97,5	94,0	---	---	---

1) Analyse basert på HPLC; 2) Analyse basert på ³¹P-NMR



Figur 1 Navn og kjemisk struktur for de respektive fosfolipider

Rognen ble spraytørket før ekstraksjonsforsøk. Dette ga et fint, lyst gult pulver med relativt gode flytegenskaper og et vanninnhold på 3,5 %. Smak og lukt var nøytral uten antydning til oksidasjon etter spraytørring. Pulveret ble straks etter tørring vakuumpakket i mindre porsjoner og oppbevart på -80 °C frys inntil bruk.

Lipidklasser og fosfolipider er kvantifisert ved bruk av HPLC og ³¹P-NMR (Tabell 3). Det er funnet små forskjeller mellom de to metodene, men ³¹P-NMR ansees å være den mest presise for kvantifisering av fosfolipider og er anvendt for å måle utbytte etter ekstraksjon i dette studiet. En fordel med HPLC basert metode er at den også gir informasjon om andre lipidklasser. Det er kun små forskjeller mellom nivå lipidklasser (Tabell 3) og fettsyrer (Tabell 4) for batchene fra 2020 og 2021 og datagrunnlaget gir ikke tilstrekkelig informasjon til å si noe om eventuelle variasjoner.

Tabell 4 Nivå fettsyrer (g/100 g) i B&D-ekstrakt fra umoden silderogn

Fettsyre	Rogn batch #0441	Rogn batch #1157
C14:0	2,9	2,5
C16:0	12,9	14
C18:0	0,9	1,1
C20:0	<0.1	<0.1
C22:0	<0.1	<0.1
C16:1 n-7	2,6	2,6
C18:1	10,3	11,1
C20:1	1,9	1,4
C22:1	0,7	0,6
C24:1 n-9	0,3	0,3
C16:2 n-4	0,1	0,1
C16:3 n-4	0,1	0,2
C18:2 n-6	0,8	0,8
C18:3 n-6	<0.1	<0.1
C20:2 n-6	0,1	0,1
C20:3 n-6	<0.1	0,1
C20:4 n-6	0,3	0,3
C22:4 n-6	<0.1	<0.1
C18:3 n-3	0,7	0,7
C18:4 n-3	0,9	0,7
C20:3 n-3	<0.1	<0.1
C20:4 n-3	0,5	0,5
C20:5 n-3 (EPA)	8,4	7,8
C21:5 n-3	0,1	0,1
C22:5 n-3	0,8	0,8
C22:6 n-3 (DHA)	20,4	20,9
Sum mettede	16,7	17,6
Sum monoene	15,8	16
PUFA n-6	1,3	1,3
PUFA n-3	31,7	31,5
PUFA totalt	33,3	33,1
Sum EPA+DHA	28,8	28,7
Identifiserte	70,4	70,8
Uidentifiserte	4,7	4,1

2.2 Innledende screeningforsøk

For å kartlegge effekt av et bredt område vann% i etanolfasen ble det innledningsvis gjennomført en forsøksserie med 0-50 % vann. Resultatene bekreftet at man kan anvende høyt vanninnhold i etanolfasen uten at dette reduserte utbytte av ekstrakt og fosfolipider (Tabell 5). Først ved vann% i etanolfasen >30 % ble det observert en betydelig reduksjon i utbytte. Økt tilsetning av vann medfører at løsemiddelfasen får høyere polaritet. En negativ effekt av dette er at det co-ekstraheres andre

vannløselige komponenter som frie aminosyrer, protein, salt etc. Det er her observert en eksponentiell sammenheng mellom vann% i etanolfasen og nivå protein i ekstraktet (Tabell 5 og Figur 2).

Det ble i forsøkene ikke anvendt vasking av filterkaken etter filtreringstrinnet. Filterkaken vil inneholde en del løsemiddel og det ble observert en økt svelling av rognen ved høyere vann% i etanolfasen (Tabell 5). Ved å anta at denne løsemiddelresten inneholder det samme nivå av fosfolipider som målt i den filtrerte etanolfasen, kan det beregnes et teoretisk korrigert utbytte dersom dette kvantitativt hentes ut ved vask av filterkaken. Det er estimert et potensielt økt utbytte på mellom 11-22 % ved bruk av en slik metodikk og et korrigert utbytte av fosfolipider med nivåer tilnærmet det som er oppnådd basert på referansemetoden kloroform-metanol ekstraksjon (Tabell 5).

Innhold av de individuelle fosfolipidene (Tabell 6) viser at PC er den dominerende komponenten. Inklusiv lyso-variantene 1-LPC og 2-LPC er det funnet nivåer opptil 53 % av ekstraktet. Sekundært er det PE som dominerer og med mindre mengder PI og SPH. Kjemisk struktur og fullt navn på de respektive fosfolipidene er gitt i Figur 1.

Tabell 5 Utbytte av lipidekstrakt og fosfolipider (PL) sammenlignet med referansemetoden kloroform-metanol ekstraksjon (B&D), korrigert utbytte basert på restmengde løsemiddel i våt filterkake, og proteinnivå i frysetørket ekstrakt.

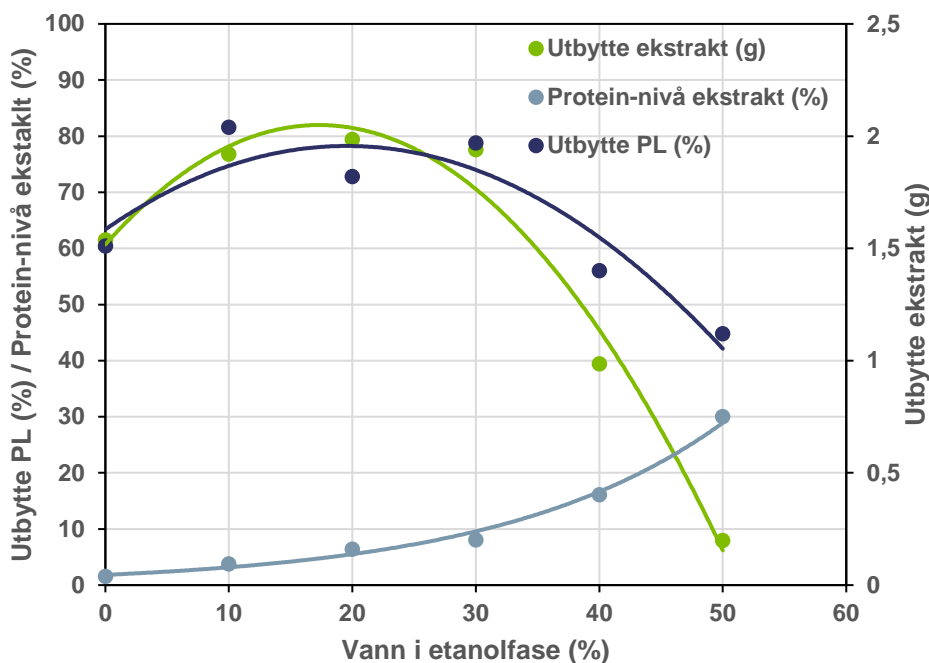
Vann etanolfase (%)	Utbytte ekstrakt (g)	Utbytte PL (g)	PL nivå ekstrakt (%)	Utbytte PL (%)	Våt filterkake (g)	Korr. utbytte PL (%)	Proteinnivå Ekstrakt (%)
B&D	2,03	1,47	72,6	100 ¹	---	---	---
0	1,51	0,91	60,0	61,5	18,6	68,4	1,6
10	2,04	1,13	55,4	76,8	22,9	90,2	3,8
20	1,82	1,17	64,3	79,4	27,3	98,1	6,4
30	1,97	1,14	58,0	77,6	26,3	94,9	8,1
40	1,4	0,58	41,5	39,4	27,9	48,9	16,1
50	1,12	0,12	10,4	7,9	26,4	9,6	30,0

1) Kvantitativ lipidekstraksjon, dvs. utbytte satt til 100%.

Tabell 6 Nivå (%) individuelle fosfolipider i ekstrakt etter etanol-vann ekstraksjon av frysetørket silderogn. Kloroform-metanol ekstraksjon (B&D) er tatt med som kvantitativ referansemetode. Kjemisk struktur og fullt navn på de respektive fosfolipider er gitt i Figur 1.

Vann etanolfase (%)	PC	1-LPC	2-LPC	PI	SPH	PE	LPE	APE	Andre PL	Sum PL
B&D	60,8	0,17	0,7	0,66	1,56	7,76	0,11	0,37	0,39	72,6
0	51,8	0,19	0,76	0,42	1,42	4,77	0,12	0,23	0,27	60,0
10	45,3	0,16	0,68	1,39	1,41	5,49	0,14	0,29	0,59	55,4
20	52,1	0,28	0,81	1,74	1,6	6,43	0,17	0,41	0,72	64,3
30	47,9	0,22	0,73	1,5	1,3	5,47	0,17	0,12	0,58	58,0
40	35,9	0,21	0,88	0,63	0,65	2,71	0,18	n.d.	0,31	41,5
50	8,5	0,21	0,68	0,15	0,18	0,53	0,12	n.d.	n.d.	10,4

n.d. – ikke detektert



Figur 2 Utbytte ekstrakt, utbytte fosfolipider (PL) relativt til B&D-ekstraksjon, og proteinnivå i ekstrakt etter etanol-vann ekstraksjon av frysetørket silderogn

2.3 Optimaliseringsdesign

Basert på resultater fra innledende screeningforsøk ble det gjennomført et 2-faktorielt «central composite» (CCD) optimaliseringsdesign med vann etanolfase i området 0-40 % og temperatur i området 20-60 °C (Tabell 7). Vann-nivå etanolfase ble basert på høyt utbytte opp til 30 % vann. Høyeste temperatur-nivå ble bestemt ut ifra en praktisk vurdering relativt til kokepunkt for etanol (78 °C). De innledende forsøkene viste at temperaturen steg noe under Ultra-Turrax homogeniseringen. I praksis må en akseptere noen grader økning på grunn av mekanisk energioverføring. For å kompensere for dette ble start-temperatur satt litt under design-temperatur og oppnådd snitt-temperatur (Tabell 7) anvendt i modellering av responsflater.

Tabell 7 Forsøksdesign (2-faktoriell CCD) med eksperimentelle forsøksbetingelser for vann i etanolfasen (%) og temperatur (T, °C)

Forsøk #	Design faktor		Design nivå		Eksperimentelt nivå	
	Vann	T	Vann	T	Vann	T1)
1	-1,0	-1,0	5,8	25,8	5,8	25,6
2	-1,0	1,0	5,8	54,2	5,8	54,6
3	1,0	-1,0	34,2	25,8	34,2	26,6
4	1,0	1,0	34,2	54,2	34,2	54,6
5	-1,41	0	0	40	0	39,7
6	1,41	0	40	40	40	40,2
7	0	-1,41	20	20	20	22,4
8	0	1,41	20	60	20	59
9	0	0	20	40	20	39,9
10	0	0	20	40	20	38,9
11	0	0	20	40	20	41,0

1) Snitt temperatur for gjennomføring av Ultra-Turrax homogenisering.

2.3.1 Responsflatemodellering

Responsflatemodellering basert på resultater gitt i Tabell 8 avdekket at temperatur ikke hadde noen signifikant innflytelse på utbytte ekstrakt og fosfolipider. Best kurvetilpasning ble oppnådd basert på «forward inclusion» av vann% og dette ga en 2. ordens modell med kun vann% i etanolfase som signifikant variabel (Tabell 10). Høyest utbytte av totale fosfolipider er oppnådd ved en vann% i etanolfasen på 11,3 %. Ved å øke signifikansnivået til $p < 0,10$ ble temperatur inkludert i modellen, men med positiv effekt kun på høyt nivå av vann i etanolfasen (figur ikke inkludert). Denne modellen ga kun marginalt bedre tilpasning til utbytterespons sammenlignet med modell basert kun på vann% i etanolfase; hhv. $R^2 = 0,90$ og $0,89$. Kurvetilpasning anvendt i figurer er basert på sistnevnte modellering.

Senterpunktet i designet er reproduisert eksperimentelt tre ganger og viser god reproduserbarhet på forsøkene med CV i området 1,4-5,0 %.

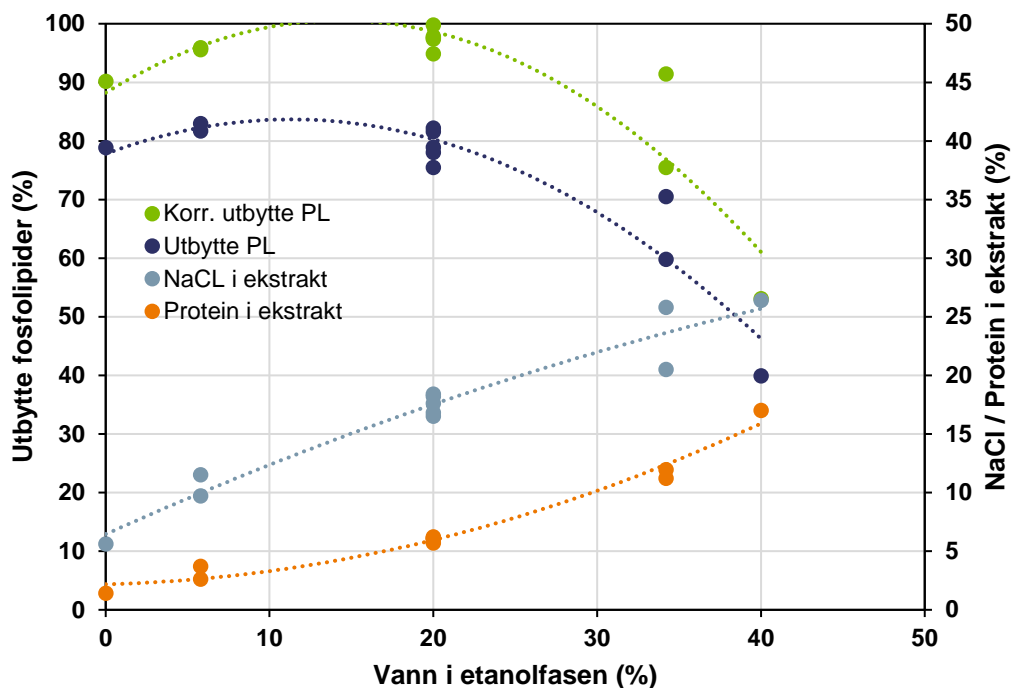
Økt temperatur kan teoretisk tenkes å ha gunstig effekt på ekstraksjonen ved at det senker viskositeten og øker løselighet av lipider i etanolfasen. For høye temperaturnivå vil imidlertid også kunne medføre denaturering av proteiner og dermed muligens mindre tilgjengelighet for ekstraksjon av fosfolipider. Basert på resultater oppnådd i dette forsøket kan det konkluderes med at temperatur ikke har noen signifikant effekt på ekstraksjon av fosfolipider innenfor optimalt området for vann% i etanolfasen (Figur 3). Dette vil også være fordelaktig prosessteknisk idet man slipper å varme opp etanolfasen under ekstraksjonsprosessen.

De anvendte ekstraksjonsbetingelser (Tabell 7) har gitt et utbytte av ekstrakt i området 4,2 - 6,0 g/30 g spraytørket silderogn (Tabell 8 og Figur 4) eller 140 – 200 g/kg. Høyest utbytte av lipidekstrakt er oppnådd ved en vann% på 13,9 %. Nivå fosfolipider varierte fra 42,2 – 65,1 %, i god overensstemmelse med observasjoner fra de innledende forsøkene (Tabell 5). De frysetørkede ekstraktene absorberte noe vann ved eksponering mot luft og innhold av flyktige komponenter (primært vann) ble målt gravimetrisk til 1,0 – 2,5 % basert på tørking i 4,5 timer ved 103 °C (Tabell 8).

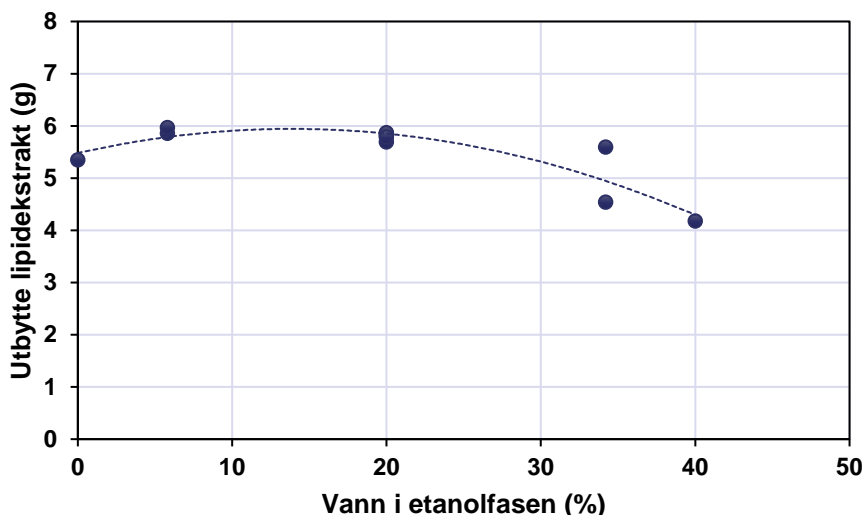
Co-ekstraksjon av protein ble funnet å øke eksponentielt med økende vann% i etanolfasen; i samsvar med funn fra det innledende forsøket (Tabell 2 og Tabell 3). Til sammenligning viste co-ekstraksjon av salt en lineær sammenheng. Dersom co-ekstraksjon av slike komponenter ønskes å holdes på et minimum, må det anvendes lavest mulig vann% i etanolfasen under ekstraksjonen. I forsøk #5 (ekstraksjon med ren alkohol) er det funnet et saltnivå på 5,6 % og et proteinnivå på 1,4 % (Tabell 8).

Tabell 8 Nivå fosfolipider, tørrstoff, salt og protein i frysetørkede ekstrakter. Utbytte PL i gram er basert på 30 g frysetørket silderogn og i prosent relativt til kloroform-etanolekstraksjon

Forsøk #	Utbytte ekstrakt	PL-nivå ekstrakt	Tørrstoff (%)	NaCl (%)	Protein (%)	Utbytte PL	Utbytte PL
	(g)	(%)				(g)	(%)
1	5,9	62,6	97,5	9,7	2,6	3,7	82,9
2	6,0	60,5	97,8	11,5	3,7	3,6	81,7
3	4,5	58,2	98,1	25,8	11,9	2,6	59,8
4	5,6	55,7	97,5	20,5	11,2	3,1	70,5
5	5,4	65,1	99,0	5,6	1,4	3,5	78,9
6	4,2	42,2	97,7	26,4	17,0	1,8	39,9
7	5,8	61,9	98,0	18,4	6,1	3,6	81,6
8	5,8	57,0	97,8	16,8	6,1	3,3	75,5
9	5,9	61,9	97,9	16,5	5,7	3,6	82,1
10	5,7	60,6	98,1	18,2	6,0	3,4	78,0
11	5,8	60,3	97,8	17,6	6,2	3,5	78,9



Figur 3 Oppnådd utbytte av fosfolipider basert på etanolekstraksjon og etter korreksjon basert på restmengde etanolfase i filterkake. Referanse er kvantitativ analytisk ekstraksjon med kloroform-metanol.



Figur 4 Oppnådd utbytte av lipidekstrakt basert på ekstraksjon av 30 g spraytørket silderogn

2.3.2 Utbytte individuelle fosfolipider

Utbytte av individuelle fosfolipider relativt til kloroform-metanol (B&D) ekstraksjon varierte betydelig (Tabell 9 og Figur 5) og dette ga forskjellig 2. ordens modell-tilpasning (Tabell 10). For de fleste modeller er det funnet en meget god tilpasning til datapunktene med $R^2 > 0,78$. Felles for de modellene som har lavere R^2 (0,63 – 0,74) er et lavt kvantitativt utbytte, dvs. at analyseusikkerhet vil gi større bidrag til reproduserbarhet og spredning av datapunkter. Høyest utbytte av hovedkomponenten PC oppnås ved bruk av 9,7 % vann i etanolfasen, mens lysosfosfolipidene 1-LPC og 2-LPC krever høyere vann% (Tabell 10). Det samme mønsteret er funnet for PE og LPE og kan indikere en korrelasjon mellom polaritet for de respektive fosfolipider og optimalt vann% i etanolfasen.

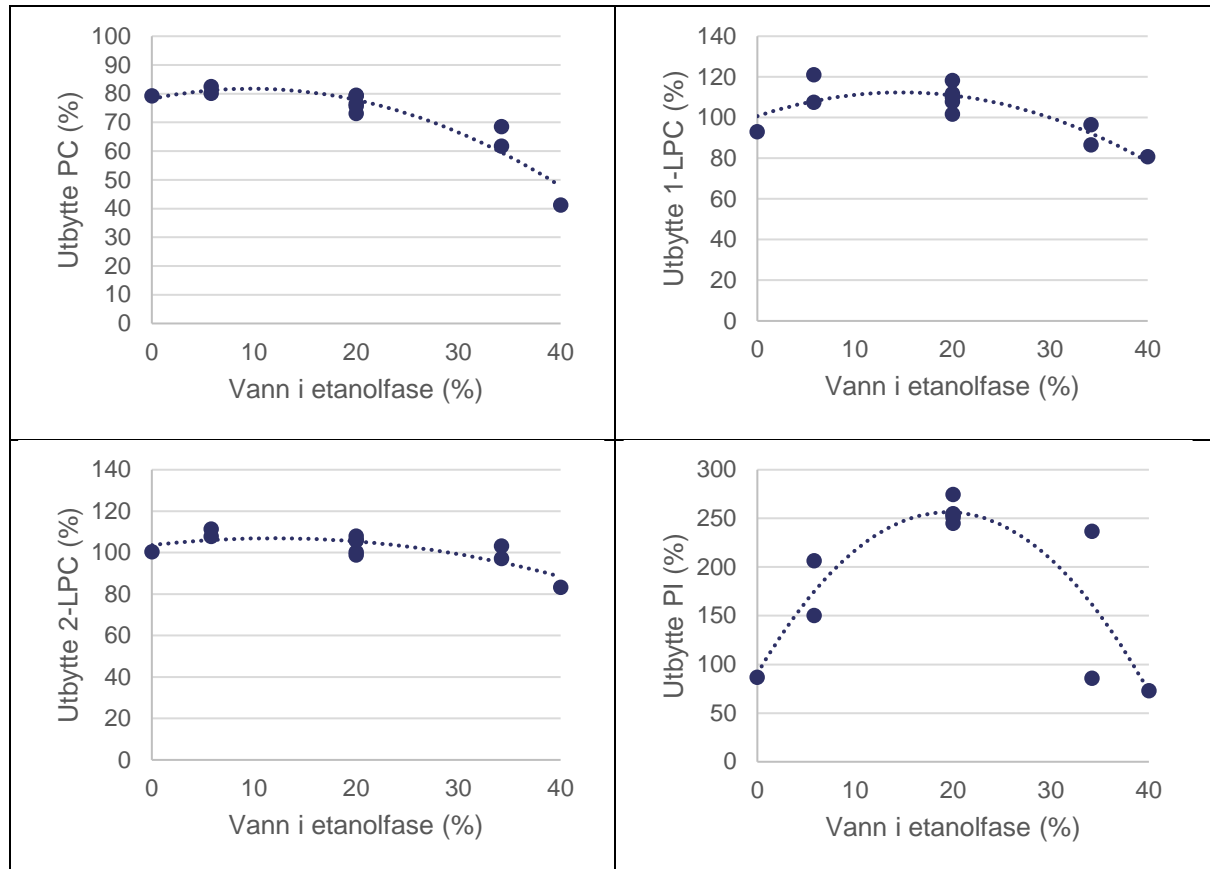
Tabell 9 Utbytte (% av totalt ekstrakt, Tabell 5) av individuelle fosfolipider. Forkortelser er angitt i Figur 1. B&D = referansem metode basert på kloroform-metanol ekstraksjon.

Forsøk #	PC	1-LPC	2-LPC	PI	SPH	PE	LPE	APE	Andre PL	Sum PL
B&D	60,8	0,17	0,7	0,66	1,56	7,76	0,11	0,37	0,39	72,6
1	52,1	0,19	0,81	1,03	1,96	5,84	0,11	0,26	0,25	62,6
2	49,7	0,21	0,77	1,39	1,72	5,77	0,12	0,36	0,42	60,5
3	50,4	0,22	0,97	0,76	1,19	4,08	0,16	0,00	0,46	58,2
4	45,4	0,16	0,74	1,70	1,41	5,36	0,11	0,22	0,62	55,7
5	54,9	0,18	0,80	0,65	1,88	6,03	0,11	0,30	0,31	65,1
6	36,5	0,20	0,85	0,70	0,80	2,78	0,13	0,00	0,23	42,2
7	50,4	0,21	0,79	1,69	1,55	6,16	0,19	0,32	0,63	61,9
8	46,3	0,18	0,73	1,75	1,49	5,52	0,14	0,36	0,59	57,0
9	50,1	0,19	0,77	1,88	1,68	6,00	0,16	0,43	0,65	61,9
10	49,2	0,20	0,74	1,77	1,58	5,97	0,14	0,37	0,61	60,6
11	48,9	0,20	0,80	1,80	1,60	5,90	0,10	0,40	0,60	60,3

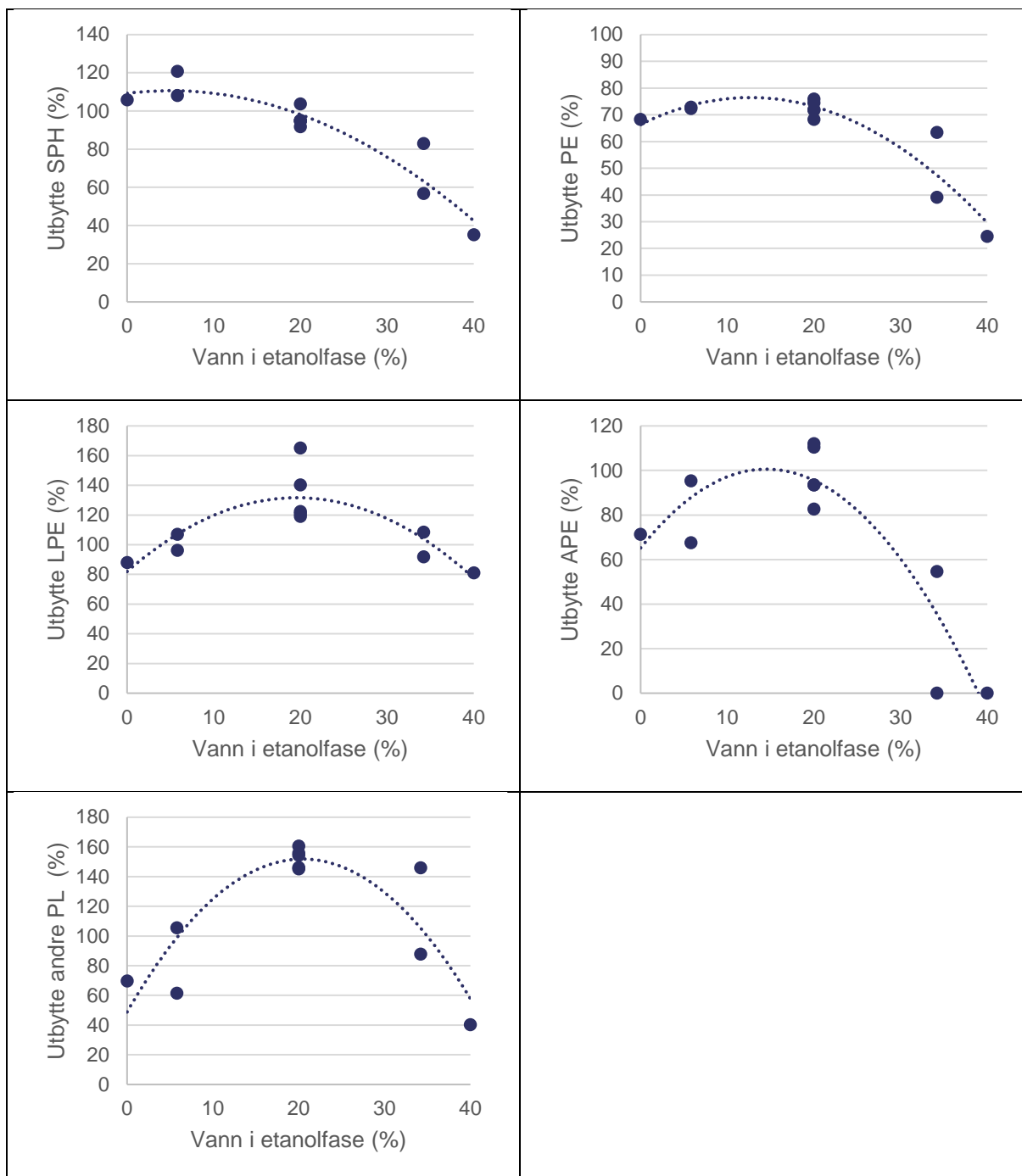
Tabell 10 Modellering av utbytte for de respektive fosfolipider, korrelasjon (R^2), og beregnet optimum vann% i etanolfasen. Forkortelser forklart i Figur 2.

Respons	2. ordens polynom			R^2	Optimum (vann% i etanolfase)
	x^2	x	Konstant		
Lipidekstrakt	-0,002	0,067	5,48	0,81	13,9
Totale PL	-0,046	1,035	77,8	0,89	11,3
PC	-0,037	0,718	78,2	0,88	9,7
1-LPC	-0,053	1,576	100,7	0,74	14,8
2-LPC	-0,023	0,556	103,6	0,63	11,9
PI	-0,437	17,02	90,8	0,78	19,5
SPH	-0,056	0,560	109,2	0,88	5,0
PE	-0,062	1,590	66,4	0,86	12,7
LPE	-0,129	5,077	82,0	0,69	19,6
APE	-0,168	4,877	65,2	0,81	14,5
Andre PL	-0,246	10,07	48,8	0,78	20,5

For noen av fosfolipidene er det funnet et utbytte >100 % relativt til B&D-ekstraksjon. Kloroform-metanol (B&D ekstraksjon) ansees for å være en kvantitativ ekstraksjonsteknikk og det er overraskende at det her i noen tilfeller er oppnådd betydelig høyere utbytte for noen av fosfolipidene; spesielt for PI, LPE og andre PL (Figur 5). Dette kan indikere at etanol-vann er et mer effektivt løsemiddel for enkelte av fosfolipidene, men dette må reproduseres og sjekkes mer grundig før en slik konklusjon kan fremmes.



Figur 5 Utbytte av de respektive fosfolipider relativt til kloroform-metanol-ekstraksjon som funksjon av vann% i etanolfasen



Figur 5 (forts.). Utbytte av de respektive fosfolipider relativt til kloroform-metanol-ekstraksjon som funksjon av vann% i etanolfasen

2.3.3 Teoretisk utbytte ved vask av filterkake

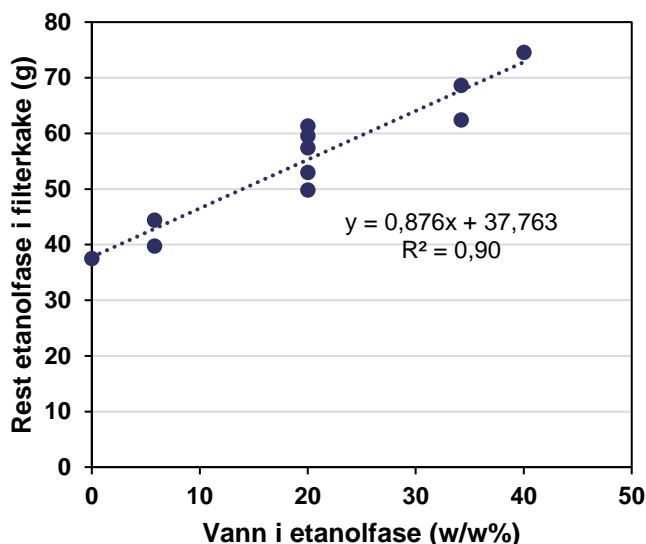
I referansemotoden kloroform-metanol ekstraksjon (Bligh and Dyer, 1959) blir mengde fett i kloroformfasen beregnet basert på inndampet delprøve korrigert for total mengde kloroform tilsatt under ekstraksjonen, dvs. eventuelle kloroformrester i filter og filterkaken påvirker ikke beregning av lipidutbyttet. I de gjennomførte etanolekstraksjoner er lipidutbyttet basert på mengde i oppsamlet løsemiddelfase og det ble ikke anvendt vask av filterkaken etter ekstraksjonen. Mengde etanol i filterkaken økte lineært med økende vann (Tabell 11 og Figur 6), trolig grunnet økt hydratisering og dermed svelling av rognpulveret. Antar man at denne etanolfasen har tilsvarende sammensetning som filtratet, kan det beregnes et teoretisk korrigert utbytte av fosfolipider basert på vasking av filterkaken (Tabell 11 og Figur 3). Modellering av denne responsen ($y = 88,21 + 1,723 \cdot x - 0,06 \cdot x^2$; $R^2 = 0,85$) viste

samme trend som for eksperimentelt oppnådd ekstrakt. Teoretisk kan utbyttet av fosfolipider økes med 14-33 % basert på et slikt prinsipp og gi tilnærmet kvantitativ ekstraksjon av fosfolipider basert på optimale betingelser. I praksis vil dette ikke være lønnsomt å gjennomføre. En total utvasking av fosfolipider vil kreve betydelig økte mengder etanol og dermed økte driftsbetingelser i industriell skala. Her må det etableres en balanse mellom økt utbytte av å vaske filterkaken og økte driftskostander.

Basert på de innledende forsøkene ble tid ikke inkludert i optimaliseringsdesignet. Forsøkene ble gjennomført basert på 5 minutter homogenisering. I tillegg vil filtreringstrinnet bidra noe til økt kontaktid med ekstraksjonsmiddel. Det tilnærmet kvantitative korrigerede ekstraksjonsutbyttet indikerer at anvendt tid er tilstrekkelig for en effektiv ekstraksjon av fosfolipidene basert på den anvendte fremgangsmåte. Om det er mulig å redusere kontakttiden er ikke undersøkt i dette studiet.

Tabell 11 Mengde og rest av etanol i filterkake og teoretisk korrigert utbytte av PL basert på vasking av filterkaken

Forsøk	Filter kake	Etanol i filterkake	Teoretisk korrigert utbytte PL	Teoretisk økt utbytte PL
#	(g)	(g)	(%)	(%)
1	63,9	39,7	95,6	15,3
2	68,4	44,4	95,9	17,4
3	87,9	62,4	75,5	26,3
4	93,0	68,6	91,4	29,6
5	62,1	37,5	90,1	14,3
6	100,4	74,5	53,1	33,1
7	74,0	49,8	97,8	19,9
8	85,5	61,3	94,8	25,7
9	77,1	53,0	99,8	21,4
10	83,8	59,5	97,3	24,7
11	81,6	57,4	97,6	23,7



Figur 6 Rest av etanolfase i filterkake avhengig av nivå vann i etanolfasen

Ved oppskalering av ekstraksjonsprosessen vil det også være av interesse å se på forholdet mellom rogn og løsemiddel relativt til bruk av vasking av filterkaken. I tillegg vil et optimum på 11,3 % vann i etanolfasen muliggjøre en prosess der silderogn kontaktes direkte med etanolfasen uten forutgående tørking (jfr. 2.5 Sammenligning ekstraksjon av våt og spraytørket rogn).

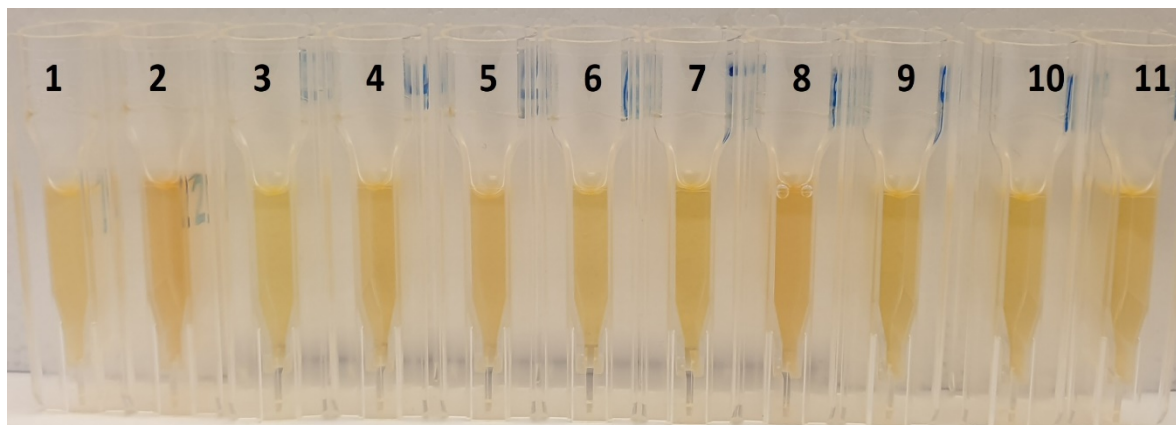
2.3.4 Farge og struktur på frysetørket ekstrakt

Etter frysetørring av ekstraktene ble det oppnådd et lyst gulorange til fløtehvitt pulver (Figur 7). Visuelt er det ekstrakt basert på ren etanol og nest laveste nivå vann i designet (5,8 %; Tabell 7) som har sterkest farge. Grad av agglomerering samsvarer også med vann% i etanolfasen; høyest for ren alkohol (forsøk 5) og 5,8 % vann i etanolfasen (forsøk 1 og 2). Ved bruk av 40 % vann i etanolfasen ble det oppnådd et melkehvitt pulver, men denne prøven hadde også det laveste nivå av fosfolipider (forsøk 6; Tabell 7 og Tabell 8).



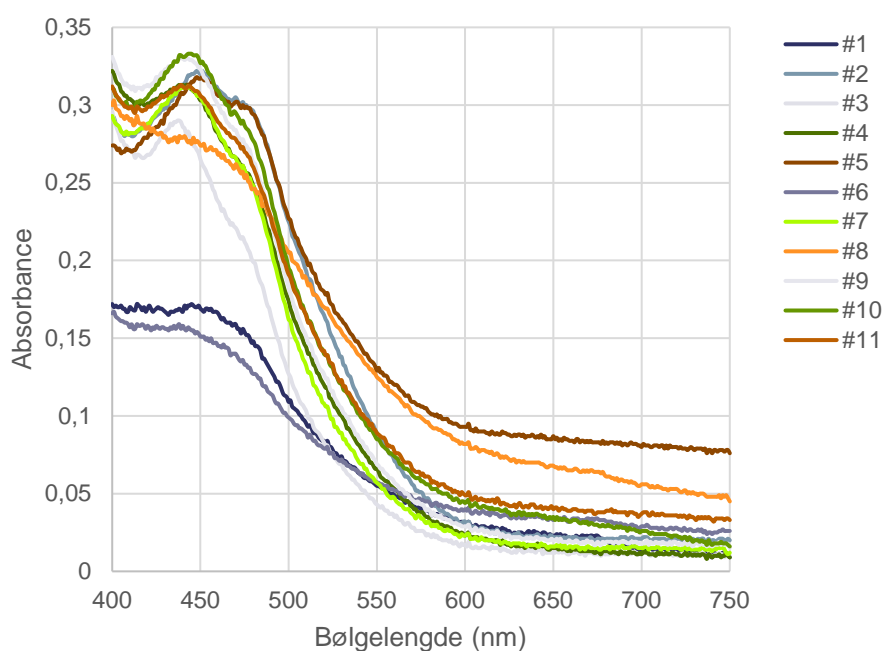
Figur 7 Bilde av frysetørkede lipidekstrakt oppnådd basert på betingelser i CCD. Nummerering av prøvene (LATH-2-57-##) angir forsøksnummer gitt i Tabell 7.

Visuell sammenligning av farge på ekstrakt oppløst i metanol ga ikke et like entydig bilde av fargeforskjeller (Figur 8). Her kan det virke som prøve #2 og #8 har mørkest farge. Fargeforskjeller på frysetørket pulver kan derfor skyldes en kombinasjon av reell farge, protein og pulverstruktur (et fint pulver oppfattes visuelt som lysere i fargen sammenlignet med et grovt pulver).

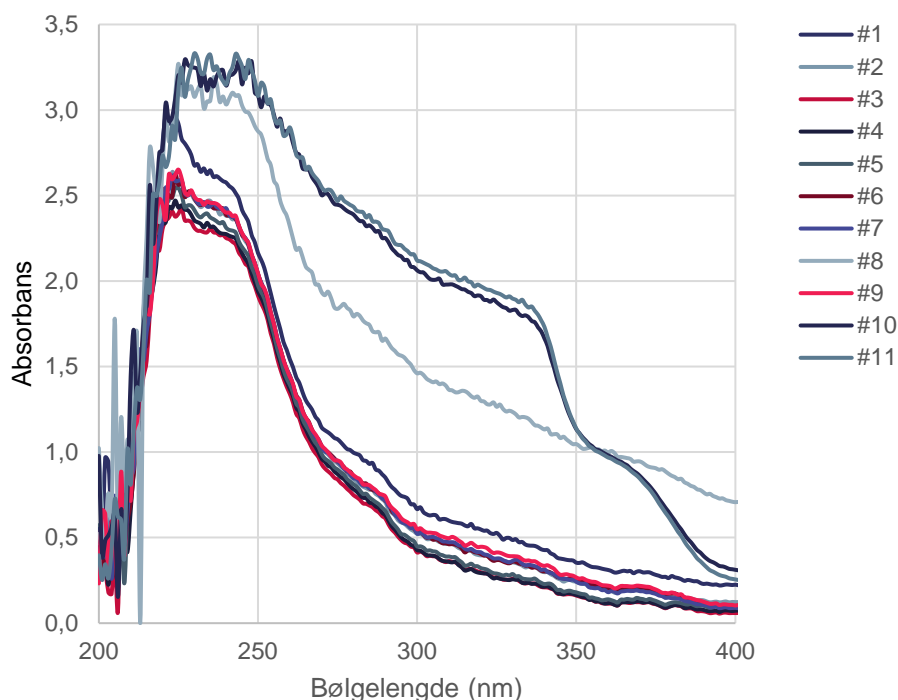


Figur 8 Visuell farge på 40 mg ekstrakt oppløst i 1 ml metanol og filtrert gjennom et 0,45 μm filter. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 7.

Prøver oppløst i metanol viste maksimum absorbans av synlig lys i området 440-450 nm (Figur 9). Laveste verdier er observert for prøve #1 og #6, og høyeste for prøve #9 og #10, men det er ikke funnet noen korrelasjon med de anvendte prosessvariablene. Det kan også sees en skulder i området 470 nm som anvendes for måling av astaxanthin basert på HPLC-metodikk. Absorpsjon i dette området (blått lys) og tilsvarende lavt ved lengre bølgelengder, er hovedårsaken til den gul-orange fargen på pulver og ekstrakt. I motsatt ende av skalaen (rødt lys) viser prøvene mindre forskjeller med høyest nivå i prøve #5 etterfulgt av prøve #8. UV-spekteret (Figur 10) viser også små forskjeller og heller ikke her er det funnet noen korrelasjon mot de anvendte forsøksbetingelser.



Figur 9 Absorbans i synlig lys området (400-750 nm) for ekstrakt oppløst i metanol. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 7.



Figur 10 Absorbans i UV lys området (200-400 nm) for ekstrakt oppsluttet i metanol. Nummerering av prøvene angir forsøksnummer gitt i Tabell 7.

2.4 Reintroduksjon av fosfolipider i makrellolje

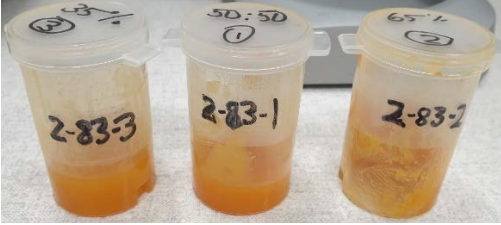

Ekstraherte fosfolipider fra silderogn har form av et høyviskøst plastisk granulat til fint pulver avhengig av vann% i etanolfasen under ekstraksjonen (Figur 7). Dette gir tekniske utfordringer i forhold til håndtering av produktet og formulering, f.eks. i form av hard eller myk gelatinkapsel. Et alternativ er å tilsette en olje for å redusere viskositeten og dermed gjøre produktet pumpbart. Forsøk med tilsetning av en raffinert makrellolje er her gjennomført basert på to tilnærminger:

- Mekanisk innblanding ved bruk av intensiv mixing (Ultra-Turrax).
- Tilsetning til etanolekstrakt før fjerning av siste rest av etanolfasen.

Effekt på fettsyreprofil vil avhenge av type olje som tilsettes og er ikke en del av dette prosjektet. Generelt vil tilsetning av en marin eller vegetabilsk triglyseridolje gi tilnærmet like egenskaper, og fokus i dette studiet har vært å gjennomføre innledende forsøk for å avdekke tekniske begrensninger under innblanding og effekt på reduksjon av viskositet avhengig av forholdet mellom lipidekstrakt og makrellolje, og temperatur.

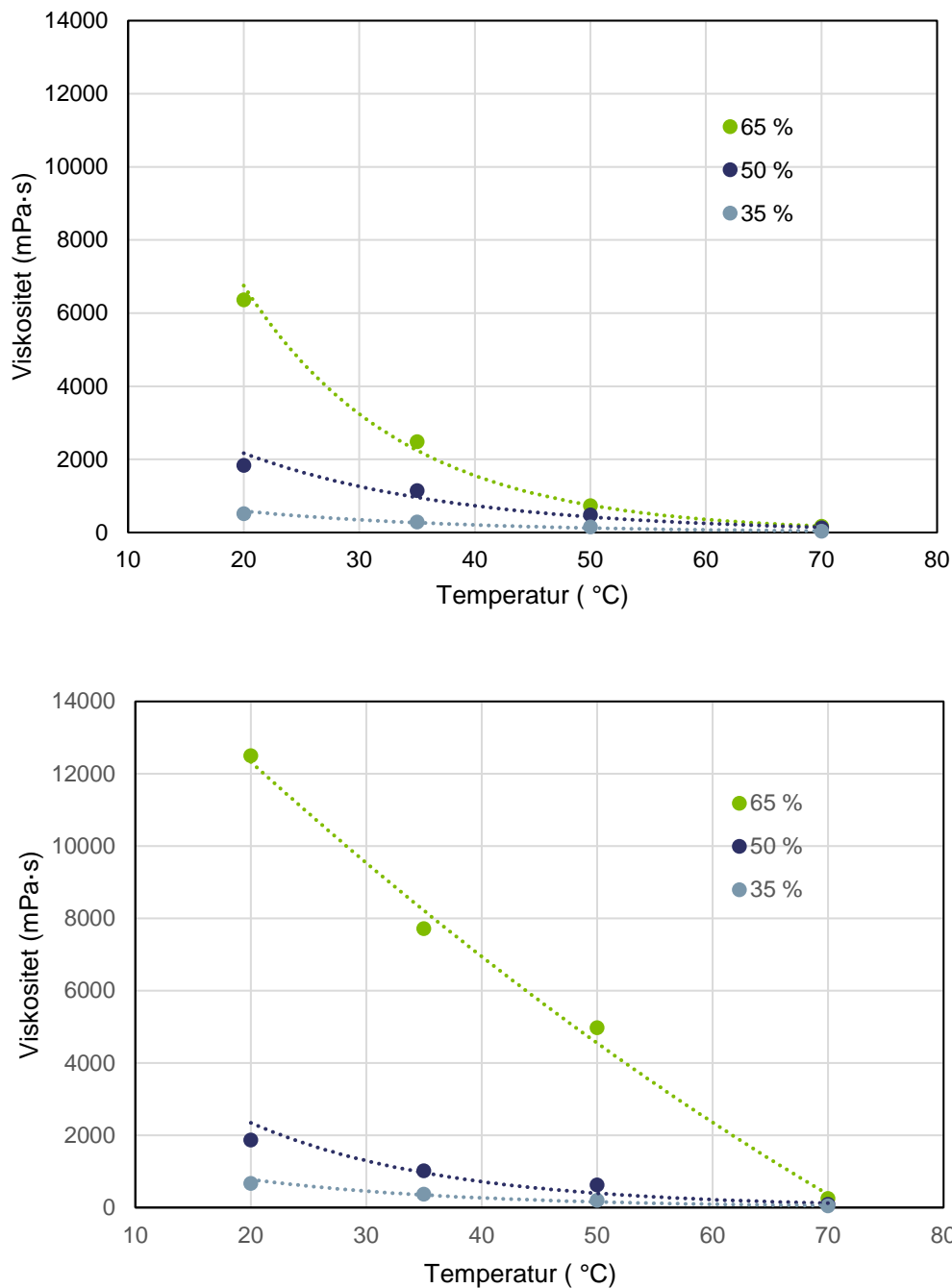
Ved det høyeste nivå lipidekstrakt (80 %) var det ikke mulig å oppnå en homogen blanding ved bruk av mekanisk innblanding. Dette var også utfordrende ved en innblanding på 65 % og det ble i tillegg observert en faseskilling ved henstand av produktet. Ved tilsetning til etanolfase var det teknisk mulig å oppnå homogent produkt selv med 80 % lipidekstrakt i blandingen, men det var praktisk ikke mulig å få målt viskositet ved det høyeste nivået med bruk av det anvendte spindelviskosimeter. Bilder av de respektive produkter er gitt i Figur 11. Sammenlignes viskositetsprofilen for produkter basert på de to anvendte fremgangsmåtene, er kurvene tilnærmet like for innblandingsnivåene 35 og 50 % (Figur 12). For innblandingsnivå 65 % er det observert store forskjeller mellom teknikkene. Prøve basert på mekanisk innblanding viser en betydelig lavere viskositet og dette kan forklares ved faseskilling under målingen. En tettere og mer viskøs fase falt til bunns i viskosimeteret med en tynnere fase på toppen. Dette resulterte i lavere motstand for rotasjon av spindel og dermed lavere viskositet. 65 % blanding

basert på tilsetning i etanolfasen viste svakt eksponentiell reduksjon med temperatur og det observerte nivå i temperaturområdet 20-50 °C kan sammenlignes med en konsistens som honning.

Mekanisk blanding med Ultra-Turrax homogenisator. Mengde lipidekstrakt i blanding:			Tilsetning av makrellolje til etanolfase etter ekstraksjon. Mengde lipidekstrakt i blanding:			
35 %	50 %	65 %	80 %	65 %	50 %	35 %
						

Figur 11 Bilde av blanding lipidekstrakt og makrellolje basert på mekanisk innblanding (venstre) og ved tilsetning av makrellolje til etanolfase etter ekstraksjon (høyre). Prosentnivå angir mengde lipidekstrakt i blandingen basert på vekt.

Ved innblanding av høy andel lipidekstrakt er det klart enklest å oppnå et homogent produkt ved tilsetning av olje til etanolfasen etter ekstraksjon av lipider. Dette gir et homogent produkt uten problemer med faseskilling ved henstand. Skal det anvendes lavere innblanding kan en mekanisk blandeteknikk være tilstrekkelig.



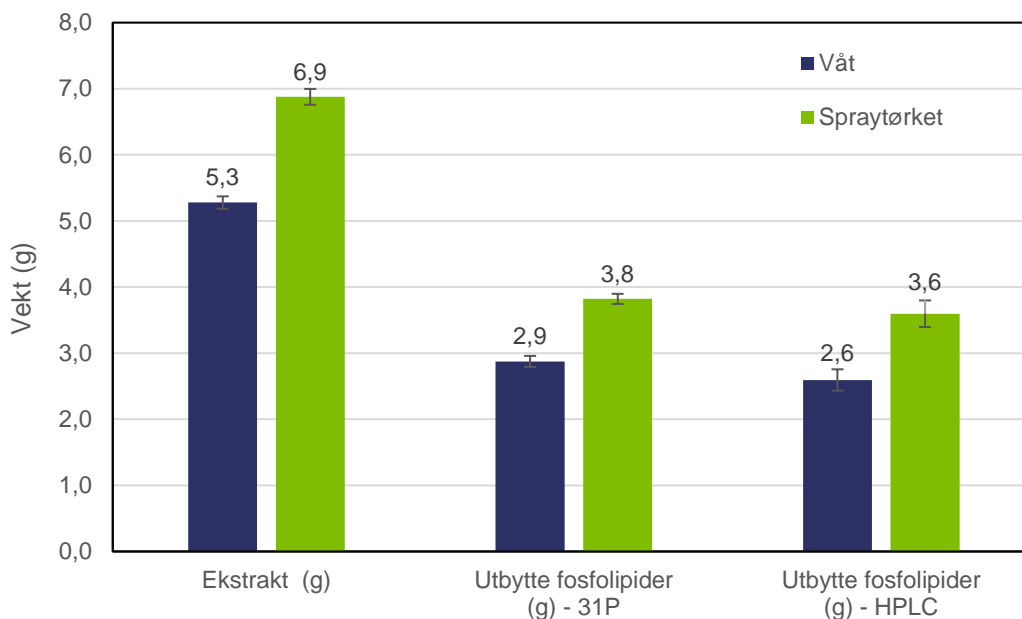
Figur 12 Effekt av nivå lipidekstrakt (vekt%) og temperatur på viskositet i blanding med makrellolje. Øverst - basert på mekanisk blanding av produktene. Nederst – basert på tilsetning av makrellolje til etanolfasen etter ekstraksjon av fosfolipider.

2.5 Direkte ekstraksjon av våt rogn

Det identifiserte området for optimalt vanninnhold i etanolfasen (11,3 %) muliggjør alternativt å fjerne vann ved bruk av overskudd 100 % etanol i stedet for at dette gjennomføres gjennom en forutgående tørkeprosess. Dette vil muliggjøre bruk av enda mer skånsomme prosessbetingelser ved at det unngås å eksponere rognen for høy temperatur under tørking i varmluft. For å teste om denne fremgangsmåten ga tilsvarende utbytte og kvalitet på lipidekstraktet, er det gjennomført en komparativ studie basert på likt vann-nivå i etanolfasen. Umoden rogn inneholdt 70,2 % vann (batch #0441). For å oppnå 11,3 % vann etter tilsetning av etanol måtte mengden økes til 555 g tilsvarende et forhold mellom tørrstoff og

løsemiddelfase på 1:20,8. Forsøkene er gjennomført basert på tre eksperimentelle gjentak for å muliggjøre en statistisk evaluering av resultatene.

Ekstraksjon av 30 g ts basert på våt rogn ga et signifikant lavere utbytte sammenlignet med spraytørket rogn. På vektbasis var reduksjonen på 1,6 g eller 25 % (Figur 13). Utbytte fosfolipider var også signifikant lavere og tilsvarte 0,9 og 1,0 g basert på kvantifisering med hhv. ^{31}P -NMR og HPLC. Dette tilsvarer et redusert utbytte på hhv. 25 og 28 %. En mulig forklaring på økt utbytte er at celleveggen i rognkornene sprenges ved bruk av spraytørking og dermed blir lettere tilgjengelig for ekstraksjon. Komparative forsøk basert på frysetørket rogn er ikke gjennomført, men det er grunn til å anta at slik tørking vil bevare strukturen i rognen og være sammenlignbare med direkte ekstraksjon av våt rogn.



Figur 13 Totalt utbytte lipidekstrakt, og utbytte fosfolipider basert på kvantifisering med hhv. ^{31}P -NMR og HPLC etter ekstraksjon av 30 g tørrstoff av våt og spraytørket silderogn. Stolpe angir \pm SD basert på 3 uavhengige forsøk.

De to fremgangsmåtene ga kun små forskjeller i sammensetning på lipidklasser (Tabell 12). Unntak er fritt kolesterol og frie fettsyrer der det ble funnet et hhv. signifikant ($p < 0,01$) og nært signifikant ($p = 0,065$) høyere nivå i ekstrakt opparbeidet basert på våt rogn. Sistnevnte skyldes trolig tilstedeværelse av lipaseaktivitet i råstoffet som ble helt eller delvis inaktivert ved spraytørking av rognen. Årsaken til et litt høyere kolesterolnivå kan også være koblet til lipaseaktivitet med omdanning av kolesterolestere til fritt kolesterol. Kolesterolester nivået i prøven ble funnet å være under kvantifiseringsgrensen for analysemetoden ($< 0,5 \text{ g}/100 \text{ g}$) og det er derfor ikke mulig å bekrefte denne hypotesen, men det samfallende høyere nivå av frie fettsyrer bekrefte indirekte en slik årsakssammenheng.

Tabell 12 Fordeling av lipidklasser (\pm SD; N=3) i fettfase fra lipidekstrakter basert på våt og spraytørket silderogn

Lipidklasse	Våt rogn		Spraytørket rogn	
	Nivå	\pm SD	Nivå	\pm SD
TG	19,3	0,6	22,0	2,0
DG	<0,5	---	<0,5	---
MG	<1	---	<1	---
FFA	2,8	0,9	1,5	0,1
Kolesterol	6,7	0,1	6,3	0,1
Kolesterol ester	<0,5	---	<0,5	---
PE	9,4	0,5	10,3	0,6
PI	<1		<1	---
PS	<1		<1	---
PC	58,0	4,6	59,3	4,6
LPC	<1		<1	---
Totale polare lipider	67,8	4,7	69,7	4,0
Totale nøytrale lipider	28,9	0,8	29,8	2,0
Total sum lipider	96,7	4,4	99,5	2,6

Sammenligning av fettsyresammensetning fra de to ekstraksjonsprotokollene viser også svært små forskjeller (Tabell 13). Sum identifiserte og ikke-identifiserte fettsyrer er tilnærmet likt i de to ekstraktene, men det er funnet generelt litt lavere nivå av PUFA i ekstrakt basert på spraytørket rogn. Statistiske analyser viser at nivå PUFA ikke er signifikant forskjellig ($p = 0,132$), mens nivå n-3 PUFA er nært signifikant ($p = 0,078$). For sum EPA+DHA er det funnet en signifikant forskjell mellom protokollene ($p = 0,023$). Den kvantitative forskjellen er imidlertid lav (28,6 vs. 28,0 %), men resultatene kan indikere at den anvendte spraytørkeoperasjon gir et lite tap av PUFA generelt og spesielt EPA og DHA. Tørkeprosesser generelt gir en økt risiko for lipidoksidasjon. I de gjennomførte forsøk er det ikke tilsatt antioksidanter under spraytørkingen og eventuelt tap av PUFA bør reproduseres og eventuelt sammenlignes med alternativ tørketeknologi basert på frysetørking før det kan konkluderes med behov for tiltak på dette punkt.

Tabell 13 Fettsyre nivå (g/100g \pm SD; N=3) i ekstrakt basert på våt og spraytørket silderogn

Fettsyre (g/100 g ekstrakt)	Rå rogn	\pm SD	Tørket rogn	\pm SD
C14:0	2,7	0,06	2,8	0,06
C16:0	12,5	0,31	12,5	0,15
C18:0	0,9	0,06	1,0	<0,01
C20:0	<0,1	---	<0,1	---
C22:0	<0,1	---	<0,1	---
C16:1 n-7	2,4	0,06	2,5	<0,01
C18:1	9,6	0,25	10,1	0,15
C20:1	1,7	<0,01	1,8	<0,01
C22:1	0,4	<0,01	0,5	0,06
C24:1 n-9	0,3	<0,01	0,3	0,06
C16:2 n-4	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C16:3 n-4	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C18:2 n-6	0,7	<0,01	0,7	<0,01
C18:3 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C20:2 n-6	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C20:3 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C20:4 n-6	0,3	<0,01	0,3	<0,01
C22:4 n-6	<0,1	---	<0,1	---
C18:3 n-3	0,6	<0,01	0,6	0,06
C18:4 n-3	0,8	<0,01	0,8	<0,01
C20:3 n-3	<0,1	---	<0,1	---
C20:4 n-3	0,4	<0,01	0,5	<0,01
C20:5 n-3 (EPA)	8,3	0,10	8,2	0,06
C21:5 n-3	0,1	<0,01	0,1	<0,01
C22:5 n-3	0,7	<0,01	0,7	<0,01
C22:6 n-3 (DHA)	20,3	0,12	19,9	0,15
Sum mettede	16,1	0,40	16,2	0,21
Sum monoene	14,4	0,30	15,1	0,17
PUFA n-6	1,1	<0,01	1,1	0,06
PUFA n-3	31,2	0,21	30,8	0,21
PUFA totalt	32,5	0,21	32,1	0,26
Sum EPA+DHA	28,6	0,21	28,0	0,15
Identifiserte	63,0	0,90	63,4	0,50
Uidentifiserte	4,0	0,06	3,9	0,12

2.6 Nivå organiske miljøgifter og tungmetaller

Nivå persistente organiske miljøgifter (POPs) er funnet å være svært lave i silderognprøver fra 2020 og 2021 (Tabell 14). POPs er fettløselige komponenter og ekstraksjon av lipider vil dermed føre til en konsentrering av disse komponentene relativt til fettnivået i rognen (Tabell 2); tilsvarende 5,6x økning i konsentrasjonen for frysetørket batch 0441. Dette stemmer godt overens med de nivåene som er observert i hhv. frysetørket rogn og etanolekstrakt basert på 11,3 % vann i etanolfasen (Tabell 14).

EU-regulativet for maksimum nivå av POPs i næringsmidler er basert på såkalt «upper bound» nivå, dvs. at for alle kongenerer under kvantifiseringsgrensen (LOQ) settes bidraget til lik LOQ. Spesielt for gruppene polychlorinated dibenzodioxin (PCDD) og polychlorinated dibenzofuran (PCDF) var flere av kongenerene under LOQ (Vedlegg 1-3) og dette har medført noe høyere nivå av toksiske ekvivalenter (TEQ) i prøven basert på «upper bound» sammenlignet med «lower bound» (dvs. nivå settes til null dersom <LOQ). De observerte nivåene i etanolekstrakt basert på batch #0441 viser nivå av POPs godt under gjeldende grenseverdier for marine oljer brukt i næringsmidler. Analyser av rogn fra 2021 viser en god del lavere nivå av PCDD/F og DL-PCB og dette vil resultere i enda lavere nivå i ekstraktet. Til sammenligning er det i et tidligere FHF-prosjekt på modning av silderogn (Larsen, 2015) gjennomført analyser av silderogn fra både NVG- og Nordsjøisild. Også her er det funnet lave nivå godt innenfor gjeldene grenseverdier for fisk. Nivåene er oppgitt på prøvebasis og kan derfor ikke direkte sammenlignes med våre tall i tørket rogn. Basert på et estimert ts-nivå på 30 % er nivåene litt høyere enn det som er funnet i dette studiet, men alder og fangstområde kan trolig forklare forskjellen.

Tabell 14 Nivå persistente organiske miljøgifter (PCDD/F, DL-PCB og NDL-PCB) på vekt- og fettbasis i frysetørket rogn og lipidekstrakt

	Prøvebasis			Fettbasis			Max nivå marine oljer ¹⁾
	Fryse-tørket batch #0441	Fryse-tørket batch #1157	Etanol-ekstrakt batch #0441	Fryse-tørket batch #0441	Fryse-tørket batch #1157	Etanol-ekstrakt batch #0441	
Lower bound nivå							
PCDD-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,029	<LOQ	0,192	0,162	<LOQ	0,221	---
PCDF-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,111	0,047	0,504	0,619	0,258	0,579	---
PCDD/F-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,140	0,047	0,696	0,781	0,258	0,799	---
DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,155	0,074	0,710	0,864	0,410	0,816	---
PCDD/F+DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,295	0,121	1,406	1,645	0,668	1,616	---
NDL-PCBs (µg/kg)	2,3	0,8	10,3	12,9	4,7	11,8	---
Upper bound nivå							
PCDD/F-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,195	0,123	0,869	1,086	0,678	0,998	1,75
DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,155	0,074	0,710	0,864	0,410	0,816	---
PCDD/F+DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (ng/kg)	0,350	0,198	1,579	1,950	1,088	1,815	6,0 ²⁾
NDL-PCBs (µg/kg)	2,3	0,8	10,3	12,9	4,7	11,8	200

1) EU (2019). Commission regulation (EC) No. 1881/2006.

2) Norsk grenseverdi 4,0 (FOR-2015-07-03-870).

PCDD – Polychlorinated dibenzodioxin; PCDF - Polychlorinated dibenzofuran; DL-PCB - Dioxin-like polychlorinated biphenyl; NDL-PCB - Non-dioxin-like polychlorinated biphenyl (sum PCB6: PCB-28, 52, 101, 138, 153 and 180); TEQ – toksiske ekvivalenter.

Tilsvarende viser nivå av tungmetallene kadmium (Cd), bly (Pb) og kvikksølv (Hg) lave nivå sammenlignet med gjelde grenseverdier for kosttilskudd (Tabell 15). Det finnes ikke egne grenseverdier for arsen. Toksisitet for dette tungmetallet er i første rekke relatert til uorganisk arsen. I fisk og sjømat foreligger arsen primært i form av vannløselig arsenobetain (Frantzen et al., 2015) som har en betydelig lavere toksisitet (Næss et. al., 2020). Nivå av arsen i lipidekstrakt fra rogn batch #0441 er omtrent det samme som på fettbasis i frysetørket rogn, dvs. at arsen co-ekstraheres kvantitativt sammen med lipider basert på de anvendte betingelser (11,3 % vann i etanolfasen). Kvikksølv foreligger også organisk bundet i form av metylkvikksølv (MeHgX). Nivå av kvikksølv på fettbasis i rogn batch #0441 er tett opp

mot maksimum for kosttilskudd (0,1 mg/kg), men det er betydelig lavere nivå (<LOQ) i lipidekstraktet (Tabell 15). Det samme gjelder også for kadmium og bly, som antyder at disse tre tungmetallene forekommer i lite fettløselige former i rognen. Selen er et essensielt spormineral som inngår i aminosyren selenocystein og overskudd lagres i form av selenocystein eller selenomethionin. Selen kan virke detoksifiserende på metylkvikksølv gjennom dannelse av stabilt MeHg-selenocystein og reduksjon av MeHg til uorganisk form (Azad, 2019). Kvikksølv og selennivået i filet fra sild fanget i Norskehavet er funnet å være hhv. 0,04 og 0,61 mg/kg våtvekt (Azad, 2019). Ts-nivå er ikke oppgitt i denne publikasjonen, men basert på et omtrentlig nivå på 25 % tilsvarer dette 0,16 og 2,4 mg/kg tørrstoff. Dette er et betydelig høyere kvikksølvnivå sammenlignet med frysetørket rogn analysert i dette studiet (Tabell 15), mens selen-nivåene er sammenlignbare. På molbasis har dette økt ratio Se:Hg fra gjennomsnittlig 51,1 for filet fra sild fanget i Norskehavet (Azad et al., 2019) til 433 og 1426 i hhv. silderogn batch #0441 og #1157. Selennivået i lipidekstrakt er funnet å være betydelig lavere (21 %) sammenlignet med fettbasis i rognen og lav co-ekstraksjon av selen kan muligens også ha påvirket tilsvarende effekt på kvikksølv gjennom dannelse av stabilt MeHg-selenocystein.

Tabell 15 Nivå tungmetaller (mg/kg) på vekt- og fettbasis i frysetørket rogn og lipidekstrakt

	Prøvebasis			Fettbasis			Max nivå i kost-Tilskudd ¹⁾
	Fryse-tørket batch# 0441	Fryse-tørket batch# 1157	Etanol-ekstrakt batch# 0441	Fryse-tørket batch# 0441	Fryse-tørket batch# 1157	Etanol-ekstrakt batch# 0441	
As (mg/kg)	1,4	1,3	6,0	7,8	7,2	6,9	---
Cd (mg/kg)	0,022	0,007	<LOQ	0,123	0,039	<LOQ	1,0
Pb (mg/kg)	0,0028	<LOQ	<LOQ	0,016	<LOQ	<LOQ	3,0
Hg (mg/kg)	0,017	0,006	<LOQ	0,095	0,031	<LOQ	0,1
Se (mg/kg)	2,9	3,2	3,0	16,2	17,6	3,4	---

1) FOR-2015-07-03-870

3 Patentsøk

Ekstraksjon av lipider basert på forskjellige typer av organiske løsemidler (metanol, etanol, isopropanol, aceton, heksan, kloroform etc.) er kjent teknologi i laboratorieskala og beskrevet i en rekke publikasjoner. Industriell praksis innen ekstraksjon av polare lipider (fosfolipider) er mindre kjent og det er derfor av interesse å undersøke i hvilken grad fremgangsmåten studert i denne rapporten kommer i konflikt med patentert teknologi. Det gjennomførte patentsøk kan kun sees på som innledende. Bedrifter som eventuelt ønsker å ta i bruk den beskrevne teknologien anbefales å gjøre mer grundige søk i samarbeid med et patentkontor for å sikre at ikke andre patenterte fremgangsmåter og/eller produkter er oversett. Slike søk bør også inkludere søk i vitenskapelig primær- og sekundærlitteratur for å få frem kjent kunnskap og teknologi på området.

Patentsøket er gjennomført i databasen Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com/patent/>) basert på følgende engelske søkeprofil: All textfields and names: phospholipid* and extract* and fish and roe and ethanol. Dette ga 461 treff hvorav 28 ble tatt ut for nærmere gjennomgang. Basert på søket er det funnet 8 patenter med spesiell relevans for den aktuelle problemstillingen. I Tabell 16 er det gitt en oversikt over informasjon relatert til søker, oppfinner, prioritet og legal status for disse. I tillegg er det lagt inn en hyperlink til Espacenet-databasen for dem som ønsker å se på ytterligere detaljer. I teksten under er det gitt en kort presentasjon i form av patent-nummer, tittel, sammendrag og hovedkrav. I noen tilfeller er også underkrav av spesiell interesse inkludert.

Hovedprinsippet for den fremgangsmåten som er anvendt i optimalisering av ekstraksjonsprosessen gitt i denne rapporten er nevnt i flere av disse patentene; dvs. tørking av rogn etterfulgt av ekstraksjon med polart løsemiddel (bestående av alkohol eller en kombinasjon av alkohol og vann), og fjerning av løsemiddel for å isolere de ekstraherte lipidene med høyt nivå av fosfolipider. Bruk av lavtemperatur tørketeknikk (<70 °C) og spesielt frysetørking er nevnt i patentkrav, men ikke bruk av spraytørking ved høy temperatur (>200 °C) som anvendt i dette studiet. Også direkte ekstraksjon av våt rogn er nevnt; f.eks. i CA2980043A1 (Tabell 16, #6). I JPH08325192A (Tabell 16, #1) er dette beskrevet generelt i hovedkravet og uavhengig av type råmateriale, men ekstraksjon av rogn fra tuna er nevnt spesifikt i eksempel. Tilsvarende er gitt for ekstraksjon av fiskemel i US2009028989A1 (Tabell 16, #2) og for fiskerogn i US2015018570A1 (Tabell 16, #3) og CN104479859 (Tabell 16, #5). Av andre ekstraksjonsteknikker for rogn er det her inkludert CN104327113A (Tabell 16, #4) på bruk av superkritisk CO₂ med etanol som «entrainer» (tilsettes for å øke polariteten på løsemiddelet). I CA2980043A1 (Tabell 16, #6) er ekstraksjon kombinert med membranfiltrering (MWCO 300 Dalton) for å fjerne deler av løsemiddelet, salt og miljøgifter. CN106987309A (Tabell 16, #7) er et eksempel der etanolekstraksjon for å ta ut fosfolipider er anvendt på krabbe, og WO2008060163A1 (Tabell 16, #8) på krill.

1) JPH08325192A - Production of phospholipid containing docosahexaenoic acid

Sammendrag:

PURPOSE: To obtain a phospholipid useful as an active ingredient or an additive of a medicine or a food by drying a raw material containing docosahexaenoic acid at a low temperature and then extracting it with a solvent at a high concentration of docosahexaenoic acid and at a high efficiency.

CONSTITUTION: This method for producing a liquid containing docosahexaenoic acid comprises drying a raw material containing docosahexaenoic acid at a low temperature of ≤ 70 deg. C, especially at (-)60-70 deg. C, e.g. by methods of a lyophilization, a vacuum drying and at a low temperature/low humidity drying, then extracting it by an organic solvent (e.g. an alcoholic solvent such as methanol, isopropanol and octanol, a chlorine-based solvent such as chloroform and methylchloride, hexane and acetone) or a mixed solvent of the organic solvent with water at e.g. 0-70 deg.C.

Hovedkrav:

1. After low-temperature drying at a temperature range of raw materials 70 °C for containing docosahexaenoic acid, docosahexaenoic acid-containing phospholipids method for producing and extracting with a mixed solvent of an organic solvent or an organic solvent and water.
2. The low-temperature drying method of claim 1, wherein at a temperature range of -60~70 °C.
3. Low temperature drying, lyophilization, by vacuum drying and/or low temperature and low humidity drying method, process according to claim 1 or 2 water content of the raw material is made from processing until a 10 wt% or less.
4. Vacuum drying method, temperature 70 °C or less. The method of claim 3, which consists of processing the raw materials below 500 mmHg.
5. Low temperature and low humidity drying method, temperature 70 °C or less. The method of claim 3, which consists of processing the raw material in the humidity from 0 to 70 %.
6. The organic solvent is an alcohol solvent, hexane, acetone, method according to claim 1 or 2 wherein is selected from chlorinated solvents.
7. Alcoholic solvents are methanol, ethanol, are those selected from isopropanol and octanol, method of claim 6, wherein chlorinated solvent is chloroform or methyl chloride.
8. The method of claim 1 wherein the temperature of the extraction is 0 to 70 °C.

2) US2009028989A1 - Process for the Production of Phospholipids

Sammendrag:

The present invention provides a phospholipid composition obtainable by a process comprising contacting a fish meal with an organic solvent to produce a lipid-containing liquid, and subjecting said liquid to microfiltration optionally followed by solvent stripping.

Hovedkrav:

1. A phospholipid composition obtainable by a process comprising contacting a fish meal with an organic solvent to produce a lipid-containing liquid, and subjecting said liquid to microfiltration optionally followed by solvent stripping.
2. The phospholipid composition according to claim 1, wherein said microfiltration comprises a membrane separation process.

3) US2015018570A1 – Lipid composition with high DHA content

Sammendrag:

The invention provides lipid compositions comprising phospholipids having a high docosahexaenoic acid (DHA) content, which compositions are preferably extracted from natural sources. The lipid compositions are excellent sources of highly bioavailable DHA and they can be used in oral delivery vehicles, dietary supplements, functional foods, and the like.

Hovedkrav:

1. A process for efficiently providing a composition with high amounts of omega-3 phospholipids comprising: contacting immature fish roe with a polar solvent; extracting a lipid fraction from the immature fish roe, to provide a primarily polar lipid fraction comprising omega-3 phospholipids; and removing the solvent from the lipid fraction, to provide a solid polar lipid composition comprising omega-3 phospholipids, wherein at least about 40 % of the total fatty acids of the lipid fraction are omega-3 fatty acids, the fatty acids of the composition comprise docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and the ratio of DHA to EPA is at least about 1.3:1.

4) CN104327113A - Supercritical CO₂ extraction method of phospholipid from roe

Sammendrag:

The invention relates to a method extracting phospholipid from a marine food processing by-product roe and particularly relates to a supercritical CO₂ extraction method of the phospholipid from the roe. The method includes steps of pre-heating, oil removing, extraction with ethanol carrying, and drying to obtain the phospholipid. By means of the method, not only is a problem of waste of the residual marine by-product roe solved but also a preparation source of the phospholipid is enriched. The method is low in production cost, is short in period and is simple in process. In addition, the extracted phospholipid is rich in unsaturated fatty acid.

Hovedkrav:

1. Supercritical CO₂ a method for extracting fish lecithin, characterized in that the method comprises the following steps: (1) preheating: loading the homogenized, freeze-dried fish egg powder into an extraction kettle, preheating to 40-50 °C; 2) Deoiling: Adjusting pressure 25-35MPa, flow rate 20-30L/h, time 90-105 min, dephosphorization-derived raffinate after deoiling; 3) Extraction: Adding 4-8 % ethanol to the carrier tank, mixing with CO₂ and entering the extraction tank, the extraction pressure is 30-40 Mpa, the extraction temperature is 30-50 °C, the extraction time is 2-3 h, the flow rate is 15-20 L /h, obtaining a phospholipid-rich extract; 4) The extract is concentrated and dried to obtain a phospholipid.

5) CN104479859 - A Preparation method of roe extract

Sammendrag:

The invention provides a preparation method of a roe extract. The preparation method comprises the following steps: directly performing static digestion on roes after freeze-drying, and then removing a solvent from the extracting solution to obtain the roe extract. According to the preparation method provided by the invention, dried roes do not need to be crushed or (and) puffed and granulated, so that a process is simple, dust pollution in a production process is prevented, and the quality of the roe extract can be improved.

Hovedkrav:

1. A method for preparing a fish egg extract, characterized in that the method comprises: In the first step, the frozen fish eggs are freeze-dried to a water content of 10 % or less at -10 °C to -50 °C and 10 Pa to 200 Pa; In the second step, the dried fish eggs obtained in the first step are placed in an extraction kettle, and static leaching is carried out by adding 3 to 15 times the weight of the dried fish eggs by 90 % to 100 % ethanol, and the leaching temperature is 10 °C to 50 °C. Dipping time 4-16 hours; In the third step, the extract is obtained by decompression distillation at 40 °C to 80 °C and -0.070 MPa to -0.095 MPa to obtain a fish egg extract.

6) CA2980043A1 – Methods for obtaining phospholipids and compositions thereof.

Sammendrag:

The invention provides methods for obtaining lipid compositions comprising phospholipids having a high docosahexaenoic acid (DHA) content, which compositions are preferably extracted from natural sources such as fish roe. The lipid compositions are excellent sources of highly bioavailable DHA and they can be used in oral delivery vehicles, dietary supplements, functional foods, and the like.

Hovedkrav:

1. A method for providing a composition with high amounts of omega-3 phospholipids comprising: contacting undried fish roe with a polar solvent and mixing the roe and solvent to form a first mixture; filtering the first mixture to remove solid particles larger than about 1 µm in size, to provide a solution of the polar solvent comprising extracted lipids; subjecting the solution to membrane filtration wherein the membrane has a MWCO of about 300 Daltons, to provide a retentate comprising greater than about 10 dry wt.% lipids; wherein at least about 40 % of the total fatty acid moieties of the retentate are omega-3 fatty acids, the fatty acid moieties of the retentate comprise docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and the DHA to EPA ratio at least about 2:1; and wherein the retentate comprises less than about 2 wt.% ash content, based on dry weight.
2. The method of claim 1 wherein the retentate is subjected to drying under reduced pressure to provide a solid.
3. The method of claim 1 wherein the fish roe is immature herring roe, immature salmon roe, immature mackerel roe, immature menhaden roe, or a combination thereof

7) CN106987309A - Method for extracting crab roe oil from swimming crab

Sammendrag:

The invention discloses a method for extracting crab roe oil from a swimming crab. The method comprises the following steps of (1) taking of a crab roe, selecting a fresh swimming crab, cleaning, removing a shell and absorbing the crab roe part; (2) drying, paving the crab roe flat and then drying to obtain dried crab roe; (3) ultrasonic treatment, crushing the dried crab roe and then adding 95% ethanol for ultrasonic treatment to obtain a crab roe-ethanol mixture; (4) ethanol extraction, further adding 95 % ethanol to the crab roe-ethanol mixture and stirring to obtain a stirred material; (5) filtering, carrying out secondary filtering on the stirred material by using filter paper to obtain filtrate; and (6) rotary evaporation, carrying out low-pressure rotary evaporation on the filtrate to remove the ethanol, thereby obtaining the crab roe oil of the swimming crab. The method is simple, fast and relatively high in controllability, the yield of the crab roe oil is relatively high and the extraction cost is relatively low.

Hovedkrav:

1. A crab butter extraction method, characterized in that it comprises the following steps:
 - (1) Take crab: Choose fresh shuttle crab, wash, go back shell, draw crab part;
 - (2) Drying: crab flattened after drying, dried crab yellow;
 - (3) Sonicated: After the dried crab crushed by adding 95 % ethanol was sonicated to give crab - ethanol mixture;
 - (4) Ethanol extraction: continue to add 95 % ethanol in the crab-ethanol mixture, and stir to obtain the stirring material;
 - (5) Filtration: the filter material was stirred twice with the filter paper, the filtrate;
 - (6) Rotary steaming: the filtrate was low-pressure rotary stripping alcohol that the shuttle crab butter.

8) WO2008060163A1 – Process for production of omega-3 rich marine phospholipids from krill

Sammendrag:

The present invention relates to a process for preparing a substantially total lipid fraction from fresh krill, a process for separating phospholipids from the other lipids, and a process for producing krill meal.

Hovedkrav:

1. A process for extracting a substantially total lipid fraction from fresh krill, comprising the steps of: a) reducing the water content of krill raw material; and b) isolating the lipid fraction.
2. A process of claim 1, wherein step a) comprises washing of the krill raw material with ethanol, methanol, propanol or iso-propanol in a weight ratio 1:0.5 to 1:5; and step b) comprises isolating the lipid fraction from the alcohol.

Tabell 16 Oversikt over patenter med relevans til den studerte ekstraksjonsteknologi

No	Title	Inventors	Applicants	Publication number	Earliest priority	Publication date	Kommentarer	Legal status
1	Production of phospholipid containing docosahexaenoic acid	ISHIHARA TAKAFUMI	BIZEN KASEI KK	JPH08325192A	1995-05-25	1996-12-10	Generell metodikk av tørt materiale basert på alkohol, klorert løsemiddel, vann.	Japansk patent - ingen status gitt
2	Process for the production of phospholipids	SCHNEIDER MICHAEL [NO] LOVAAS ERIK [NO]	PROBIO GROUP AS [NO]	US2009028989A1	2005-04-04	2009-01-29	Ekstraksjon av fiskemel - mikrofiltrering.	Application discontinued
3	Lipid composition with high DHA content	HALLARAKER HOGNE [NO] REMMEREIT JAN [MO] BERGER ALVIN [US] REMMEREIT JAN [NO]	HALLARAKER HOGNE [NO] REMMEREIT JAN [MO] BERGER ALVIN [US] ARCTIC NUTRITION AS [NO]	US2015018570A1 US9458409B2	2011-09-02	2015-01-15 2016-10-04	Etanol-ekstraksjon av frysetørket rogn med high-shear mixer, sekundær ekstraksjon og inndamping.	2016-09-14 US Patent grant; Non-entry into European phase
4	Supercritical CO2 extraction method of phospholipid from roe	LIANG PENG CHEN LIJIAO CHENG WENJIAN XU YANPING ZHANG HUITING LI DAN ZENG WENWU WU QINGYIN	UNIV FUJIAN AGRIC & FORESTRY	CN104327113A	2014-09-26	2015-02-04	Primær CO2 ekstraksjon for å fjerne TG etterfulgt av sekundær ekstraksjon med etanol som entrainer.	Kinesisk patent - ingen status gitt
5	Preparation method of roe extract	SUN ZHAOMIN CAI SHENGLI CAI AIYING HUANG SHASHA LI WENPING	WEIHAI BOOW FOODS CO LTD	CN104479859A	2014-11-27	2015-04-01	Statisk etanol-ekstraksjon av frysetørket rogn etterfulgt av vakuum destillasjon av ekstrakt.	2018-07-20 Patent application deemed withdrawn after publication
6	Methods for obtaining phospholipids and compositions thereof	SAEBO PER CHRISTIAN [NO] MANCINELLI DANIELE [NO]	ARCTIC NUTRITION AS [NO]	CA2980043A1	2015-03-19	2016-09-22	Etanol-ekstraksjon etterfulgt av nanofiltrering for å fjerne løsemiddel og lavmolekylære komponenter.	2021-02-17 European patent granted

No	Title	Inventors	Applicants	Publication number	Earliest priority	Publication date	Kommentarer	Legal status
7	Method for extracting crab roe oil from swimming crab	HU SHIWEI WANG JINHUI LI SHIJIE JIANG WEI LIU YU	UNIV ZHEJIANG OCEAN	CN106987309A	2017-04-24	2017-07-28	Krabberogn, tørking, etanolekstraksjon med ultrasonikering.	Kinesisk patent - ingen status gitt
8	PROCESS FOR PRODUCTION OF OMEGA-3 RICH MARINE PHOSPHOLIPIDS FROM KRILL	BREIVIK HARALD [NO]	PRONOVA BIOPHARMA NORGE AS [NO] BREIVIK HARALD [NO]	WO2008060163A1 WO2008060163A9	2008-05-22 2009-04-02	2008-05-22	Etanol-ekstraksjon av krill etterfulgt av isolering av fosfolipider.	2009-09-15 Entry into national phase

4 Konklusjon

Optimal vann% i etanolfase ved ekstraksjon av fosfolipider fra spraytørket silderogn er funnet å være i området 11,3 %. Temperatur i området 20-60 °C ble ikke funnet å ha signifikant effekt på utbytte. Etanolvann som løsemiddel gir økende co-ekstraksjon av salt og protein med økende vann%. Høyeste oppnådde utbytte lipidekstrakt ved bruk av ett ekstraksjonstrinn er 200 g/kg tørket rogn. Sammenlignet med kloroform-metanol ekstraksjon var det mulig å ekstrahere 84 % av fosfolipidene. Tilnærmet kvantitativ ekstraksjon kan oppnås gjennom vasking av filterkaken, men dette vil også øke driftskostnadene. Vann% i etanolfasen ved optimum utbytte for de individuelle fosfolipidene varierte mellom 9,7 % (PC) og 19,6 % (LPE).

Lipidekstrakter basert på 0-40 % vann i etanolfasen ga produkter med en lys gul farge. Etter frysetørrking av ekstraktene ble det oppnådd produkter som varierte fra en granulert form til fint pulver ved økende vann%. Det er ikke funnet noen systematisk effekt av vann% på farge.

Direkte ekstraksjon av våt rogn ga 25 % lavere utbytte av ekstrakt og fosfolipider sammenlignet med spraytørket rogn basert på samme betingelser. Fordeling av lipidklasser i de to ekstraktene viste ingen signifikante forskjeller, men det er funnet et litt lavere nivå (0,6 %) av EPA+DHA i ekstrakt basert på spraytørket rogn.

Viskositet i lipidekstraktet kan reduseres gjennom tilsetning av f.eks. makrellolje. Ved tilsetning av olje til etanolfasen før fjerning av siste rest ble det oppnådd et homogent produkt med 65 % lipidekstrakt. Ved mekanisk innblanding av olje ble det oppnådd et homogent produkt ved 50 % innblanding. 65 % ga faseskilling av produktet ved henstand.

Nivå av miljøgifter i silderogn er generelt funnet å være lave og godt under gjeldende grenseverdier. Persistente organiske miljøgifter (POPs) ekstraheres kvantitativt og det er funnet tilnærmet samme nivå i ekstrakt som på lipidbasis i rognen. For tungmetallene cadmium, bly og kvikksølv er det funnet lavere nivå i lipidekstrakt enn på lipidbasis i rognen. Arsen er funnet å bli tilnærmet kvantitativt ekstrahert, mens selenivået er betydelig lavere i ekstrakt sammenlignet med nivå på lipidbasis i rognen.

Patentsøk har dokumentert at det generelle prinsipp for ekstraksjon av fosfolipider fra silderogn (dvs. bruk av et polart løsemiddel som etanol-vann) og ekstraksjon av våt eller tørket rogn er beskrevet i patentlitteraturen. Bruk av lavtemperatur tørketeknikk (<70 °C) og spesielt frysetørrking er nevnt i patentkrav, men ikke bruk av spraytørrking ved høy temperatur (>200 °C) som anvendt i dette studiet.

5 Referanser

- Bligh, E. G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911–917.
- Frantzen, S., Måge, A., Arnholt Iversen, S., Julshamn, K. (2011). Seasonal variation in the levels of organohalogen compounds in herring (*Clupea harengus*) from the Norwegian Sea. *Chemosphere* 85:179–187.
- Frantzen, S., Maage, A., Duinker, A., Julshamn, K., Iversen, S.A., (2015). A baseline study of metals in herring (*Clupea harengus*) from the Norwegian Sea, with focus on mercury, cadmium, arsenic and lead. *Chemosphere* 127:164–170.
- Haouet, M.N., Altissimi, M.S., Framboas, M., Galarini, R. (2006). Validation of the Volhard method for chloride determination in food. *Accred Qual Assur* 11: 23–28.
- Larsen, W.E., Fylling, T.S., Kvangarsnes, K., & Barnung, T. (2014). Råstoffanalyse av rogn fra norsk vårgytende sild og nordsjøsild (MA 14-20). Møreforskning.
- Liu, H.J., Chang, B.Y., Yan, H.W., Yu, F.H., Liu, X.X. (1995), Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimethyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, *Journal of AOAC International*, Vol. 78, No. 3, pp. 736-744.
- Nilsen, B., Wiech, M., Sanden, M. (2020). Miljøgifter i fisk og fiskevarer 2019. Organiske miljøgifter, tungmetaller, 3-MCPD og glysidylestere i marine oljer til humant konsum. Rapport fra Havforskningen Nr.: 2020-25. Havforskningsinstituttet, pp. 19.
- Næss, S., Aakre, I., Lundebye, A.K., Ørnsrud, R., Kjelleveid, M., Wik Markhus, M., Dahl, L. (2020). Mercury, lead, arsenic, and cadmium in Norwegian seafood products and consumer exposure. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 13:99–106.
- Oterhals, Å., Kvamme, B., Berntssen, M.H.G (2010). Modeling 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.
- Oterhals, Å., Thoresen, L. (2021). Nivå fosfolipider i råstoff og mellomprodukter fra prosessering av restråstoff makrell og sild til fiskemel og proteinhydrolysat. Nofima rapport 11/2021.
- 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.
- EU (2019). Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. Consolidated version 28.11.2019. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20191128&from=EN>
- FOR-2015-07-03-870: Forskrift om visse forurensende stoffer i næringsmidler, § 3 Gjennomføring av forordning (EF) nr. 1881/2006. <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-07-03-870>

6 Vedlegg

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441

Vedlegg 1

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #1157

Vedlegg 2

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441

Vedlegg 3

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441.

Vedlegg 1

Customer ID: Silderogn-batch 0441 (frysetørket)
SINTEF ID: 2022-164

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,140	0,0126	9,0	0,195	0,0135	6,9
WHO-DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,155	0,0219	14,1	0,155	0,0219	14,1
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,295	0,0252	7,9	0,350	0,0257	7,4
Sum NDL-PCB (ng/g)	2,32	0,265	11,4	2,32	0,265	11,4

Analyte	Individual results		
	LOQ (pg/g)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)
2378-TCDD	0,0195	<LOQ	± n/a
12378-PeCDD	0,0195	0,029	± 0,005
123478-HxCDD	0,0493	<LOQ	± n/a
123678-HxCDD	0,0493	<LOQ	± n/a
123789-HxCDD	0,0399	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDD	0,0493	<LOQ	± n/a
OCDD	0,123	<LOQ	± n/a
Sum Dioxins (pg/g)	0,0290	±	0,0050

2378-TCDF	0,0102	0,475	± 0,063
12378-PeCDF	0,0246	0,061	± 0,007
23478-PeCDF	0,0246	0,206	± 0,032
123478-HxCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
123678-HxCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
123789-HxCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
234678-HxCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
1234789-HpCDF	0,0493	<LOQ	± n/a
OCDF	0,123	<LOQ	± n/a
Sum Furans (pg/g)	0,742	±	0,0713
Sum PCDD/F (pg/g)	0,771	±	0,0714

PCB-77	0,0255	2,94	± 0,576
PCB-81	0,0255	0,058	± 0,013
PCB-126	0,0501	1,22	± 0,215
PCB-169	0,0255	0,540	± 0,118
PCB-105	0,408	128	± 23,4
PCB-114	0,204	15,20	± 4,96
PCB-118	0,204	306	± 75,6
PCB-123	0,204	<LOQ	± n/a
PCB-156	0,204	20,40	± 3,33
PCB-157	0,204	7,32	± 1,59
PCB-167	0,204	71,80	± 17,4
PCB-189	0,204	1,31	± 0,237
Sum DL-PCB (pg/g)	555	±	81,3
Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g)	556	±	81,3

PCB-28	0,204	232	± 86,3
PCB-52	0,204	458	± 80,6
PCB-101	0,408	510	± 113
PCB-138	0,408	448	± 165
PCB-153	0,408	557	± 124
PCB-180	1,00	112	± 24,9
Sum NDL-PCB (pg/g)	2317	±	265

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	1,4	27
Cd	0,00035	0,022	31
Pb	0,0025	0,0028	29
Hg	0,0040	0,017	27
Se	-	2,9	-

Individual results, TEQ		
TEF-value	Conc. (TEQ pg/g)	± U (TEQ pg/g)
1	<LOQ	± n/a
1	0,029	± 0,0050
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,0003	<LOQ	± n/a
Sum Dioxins - TEQ₂₀₀₅ (pg/g)	0,0290	± 0,0050

0,1	0,048	± 0,0063
0,03	0,002	± 0,0002
0,3	0,062	± 0,0096
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,0003	<LOQ	± n/a
Sum Furans - TEQ₂₀₀₅ (pg/g)	0,111	± 0,0115
WHO-PCDD/F-TEQ₂₀₀₅ (pg/g)	0,140	± 0,0126

0,0001	0,0003	± 0,0001
0,0003	0,0000	± 0,0000
0,1	0,1220	± 0,0215
0,03	0,0162	± 0,0035
0,00003	0,0038	± 0,0007
0,00003	0,0005	± 0,0001
0,00003	0,0092	± 0,0023
0,00003	<LOQ	± n/a
0,00003	0,0006	± 0,0001
0,00003	0,0002	± 0,0000
0,00003	0,0022	± 0,0005
0,00003	0,0000	± 0,0000
WHO-DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g)	0,155	± 0,022
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g)	0,295	± 0,025

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #1157

Vedlegg 2

Customer ID: Silderoغن-batch 1157 (frysetørket)
 SINTEF ID: 2022-165

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,0468	0,0047	10,1	0,123	0,0077	6,3
WHO-DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,0744	0,0114	15,3	0,0744	0,0114	15,3
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,121	0,0123	10,1	0,198	0,0137	7,0
Sum NDL-PCB (ng/g)	0,850	0,095	11,2	0,850	0,095	11,2

Analyte	LOQ (pg/g)	Individual results	
		Conc. (pg/g)	± U (pg/g)
2378-TCDD	0,0199	<LOQ	± n/a
12378-PeCDD	0,0199	<LOQ	± n/a
123478-HxCDD	0,0502	<LOQ	± n/a
123678-HxCDD	0,0502	<LOQ	± n/a
123789-HxCDD	0,0407	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDD	0,0502	<LOQ	± n/a
OCDD	0,125	<LOQ	± n/a

Sum Dioxins (pg/g) <LOQ ± n/a

2378-TCDF	0,0104	0,267	± 0,036
12378-PeCDF	0,0251	<LOQ	± n/a
23478-PeCDF	0,0502	0,067	± 0,010
123478-HxCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
123678-HxCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
123789-HxCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
234678-HxCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
1234789-HpCDF	0,0502	<LOQ	± n/a
OCDF	0,125	<LOQ	± n/a

Sum Furans (pg/g) 0,334 ± 0,037

Sum PCDD/F (pg/g) 0,334 ± 0,037

PCB-77	0,0260	2,49	± 0,489
PCB-81	0,0260	0,045	± 0,010
PCB-126	0,0511	0,64	± 0,113
PCB-169	0,0260	0,137	± 0,030
PCB-105	0,415	47	± 8,67
PCB-114	0,208	5,13	± 1,67
PCB-118	0,208	108	± 26,7
PCB-123	0,208	<LOQ	± n/a
PCB-156	0,208	6,82	± 1,11
PCB-157	0,208	2,56	± 0,56
PCB-167	0,208	27,60	± 6,71
PCB-189	0,208	0,37	± 0,068

Sum DL-PCB (pg/g) 201 ± 28,9

Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g) 202 ± 28,9

PCB-28	0,208	114	± 42,4
PCB-52	0,208	196	± 34,5
PCB-101	0,415	183	± 40,6
PCB-138	0,415	142	± 52,3
PCB-153	0,415	182	± 40,6
PCB-180	1,02	33	± 7,28

Sum NDL-PCB (pg/g) 850 ± 95

TEF-value	Conc. (TEQ pg/g)	Individual results, TEQ	
		Conc. (TEQ pg/g)	± U (TEQ pg/g)
1	<LOQ	± n/a	
1	<LOQ	± n/a	
0,1	<LOQ	± n/a	
0,1	<LOQ	± n/a	
0,1	<LOQ	± n/a	
0,1	<LOQ	± n/a	
0,01	<LOQ	± n/a	
0,0003	<LOQ	± n/a	

Sum Dioxins -TEQ₂₀₀₅ (pg/g) <LOQ ± n/a

0,1	0,027	± 0,004
0,03	<LOQ	± n/a
0,3	0,020	± 0,003
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,0003	<LOQ	± n/a

Sum Furans -TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,0468 ± 0,0047

WHO-PCDD/F-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,0468 ± 0,0047

0,0001	0,0002	± 0,000
0,0003	0,0000	± 0,000
0,1	0,0641	± 0,011
0,03	0,0041	± 0,001
0,00003	0,0014	± 0,000
0,00003	0,0002	± 0,000
0,00003	0,0032	± 0,001
0,00003	<LOQ	± n/a
0,00003	0,0002	± 0,000
0,00003	0,0001	± 0,000
0,00003	0,0008	± 0,000
0,00003	0,0000	± 0,000

WHO-DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,0744 ± 0,011

WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,121 ± 0,012

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	
		Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	1,3	27
Cd	0,00035	0,007	31
Pb	0,0025	<LOQ	29
Hg	0,0040	0,0057	27
Se	-	3,2	-

POPs og tungmetaller i frysetørket rogn batch #0441

Vedlegg 3

Customer ID: Etanolekstrakt av silderoggn-LATH-2-82
 SINTEF ID: 2022-166

Sum groups	LOWER BOUND			UPPER BOUND		
	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)	Conc. (pg/g)	± U (pg/g)	± U (%)
WHO-PCDD/F-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,696	0,0619	8,9	0,869	0,0638	7,3
WHO-DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	0,710	0,100	14,1	0,710	0,100	14,1
WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ ₂₀₀₅ (pg/g)	1,41	0,118	8,4	1,58	0,119	7,5
Sum NDL-PCB (ng/g)	10,3	1,26	12,3	10,3	1,26	12,3

Analyte	LOQ (pg/g)	Individual results	
		Conc. (pg/g)	± U (pg/g)
2378-TCDD	0,0619	<LOQ	± n/a
12378-PeCDD	0,0619	0,192	± 0,033
123478-HxCDD	0,156	<LOQ	± n/a
123678-HxCDD	0,156	<LOQ	± n/a
123789-HxCDD	0,127	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDD	0,156	<LOQ	± n/a
OCDD	0,390	<LOQ	± n/a

Sum Dioxins (pg/g) 0,1920 ± 0,0332

2378-TCDF	0,0323	2,140	± 0,285
12378-PeCDF	0,0781	0,300	± 0,037
23478-PeCDF	0,0781	0,935	± 0,146
123478-HxCDF	0,156	<LOQ	± n/a
123678-HxCDF	0,156	<LOQ	± n/a
123789-HxCDF	0,156	<LOQ	± n/a
234678-HxCDF	0,156	<LOQ	± n/a
1234678-HpCDF	0,156	<LOQ	± n/a
OCDF	0,390	<LOQ	± n/a

Sum Furans (pg/g) 3,375 ± 0,322

Sum PCDD/F (pg/g) 3,567 ± 0,324

PCB-77	0,0808	13,7	± 2,69
PCB-81	0,0808	0,249	± 0,056
PCB-126	0,159	5,58	± 0,982
PCB-169	0,0808	2,49	± 0,543
PCB-105	1,29	606	± 111
PCB-114	0,646	53,8	± 17,5
PCB-118	0,646	1387	± 343
PCB-123	0,646	<LOQ	± n/a
PCB-156	0,646	93,2	± 15,2
PCB-157	0,646	31,9	± 6,92
PCB-167	0,646	358	± 87,0
PCB-189	0,646	6,27	± 1,13

Sum DL-PCB (pg/g) 2558 ± 371,3

Sum PCDD/F+DL-PCB (pg/g) 2562 ± 371,3

PCB-28	0,646	887	± 330
PCB-52	0,646	1962	± 345
PCB-101	1,29	2420	± 537
PCB-138	1,29	2543	± 936
PCB-153	1,29	1920	± 428
PCB-180	3,18	524	± 116

Sum NDL-PCB (pg/g) 10256 ± 1261

Metals	LOQ (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	± U (%)
As	0,016	6,0	27
Cd	0,00034	<LOQ	31
Pb	0,0025	<LOQ	29
Hg	0,0039	<LOQ	27
Se	-	3,0	-

TEF-value	Individual results, TEQ	
	Conc. (TEQ pg/g)	± U (TEQ pg/g)
1	<LOQ	± n/a
1	0,192	± 0,033
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,0003	<LOQ	± n/a

Sum Dioxins - TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,192 ± 0,0332

0,1	0,214	± 0,028
0,03	0,009	± 0,001
0,3	0,281	± 0,044
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,1	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,01	<LOQ	± n/a
0,0003	<LOQ	± n/a

Sum Furans - TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,504 ± 0,0522

WHO-PCDD/F-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,696 ± 0,0619

0,0001	0,0014	± 0,000
0,0003	0,0001	± 0,000
0,1	0,5580	± 0,098
0,03	0,0747	± 0,016
0,00003	0,0182	± 0,003
0,00003	0,0016	± 0,001
0,00003	0,0416	± 0,010
0,00003	<LOQ	± n/a
0,00003	0,0028	± 0,000
0,00003	0,0010	± 0,000
0,00003	0,0107	± 0,003
0,00003	0,0002	± 0,000

WHO-DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 0,710 ± 0,100

WHO-PCDD/F+DL-PCB-TEQ₂₀₀₅ (pg/g) 1,41 ± 0,118