

Sluttrappport DOCMAR

Delprosjekt: Marine oljer

Helsemessige konsekvenser av prosessering

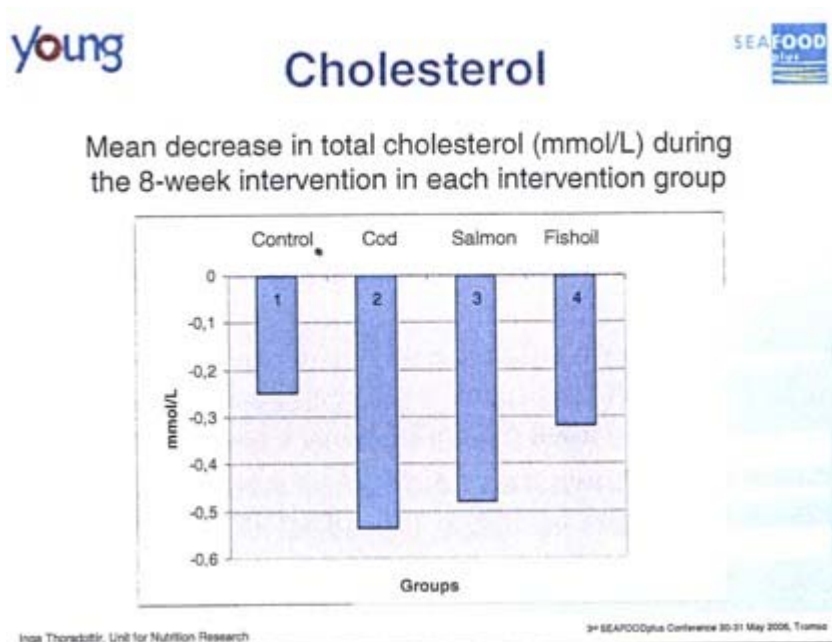
Delprosjektleder: Seniorforsker Jan Pettersen, Fiskeriforskning



Fiskeriforskning

'State of the art'.

Det er generelt akseptert at marine lipider i kostholdet har en positiv helseeffekt. Forsøksresultat har bl.a. vist at inntak av fiskeoljer virker forbyggende mot utviklingen av hjerte-/kar sykdommer og en rekke andre lidelser. Dagens oppfatning er at denne helsegevinsten skyldes at marine oljer inneholder langkjedete omega-3 fettsyrer som EPA og DHA. Imidlertid er det forskningsresultat som indikerer at vi ved å spise fisk får en helsegevinst utover det en oppnår ved inntak av fiskeoljer. I et studium publisert i 1998 fant Albert *et al.* at mennesker som spiste fisk 1 – 2 ganger pr. uke fikk en positiv helsegevinst og at effekten var uavhengig av om fisken var av type mager eller type fet. Dette blir støttet av resultatene fra et forsøk prof. Inga Thorsdottir, fra Universitetet i Reykjavik, presenterte på SeaFood Plus konferansen i Tromsø; mai 2006. Deler av resultatene er vist i figur 1.



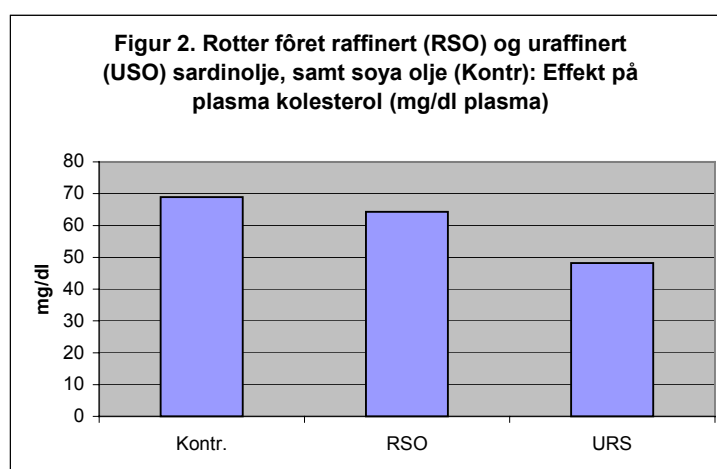
Figur 1.

Personene som deltok i forsøket ble gitt fire forskjellige dietter; hvor tre av diettene var basert på, henholdsvis, fiskeolje, torsk (mager fisk) og laks (fet fisk). Den fjerde gruppen gikk på vanlig kosthold (kontroll gruppen). Innholdet av totalkolesterol i blodplasma ble betydelig redusert hos personene som fikk fisk sammenlignet med fiskeolje- og kontroll- gruppen, og det var ikke statistisk signifikante forskjeller mellom de som ble gitt mager og fet fisk.

Tilsvarende effekt ble også vist for LDL- kolesterol; dvs. at 'usundt' kolesterol ble betydelig senket hos de som hadde spist fisk og at inntak av fiskeolje i denne sammenhengen var ubetydelig. Dette viser at inntak av fiskeoljer i seg selv ikke påvirket blodkolesterol, noe som samsvarer med den generelle oppfatningen om helseeffekter av fiskeolje.

For ca. 10 år siden gjennomførte prof. Edel Elvevoll, prof. Bjarne Østerud og medarbeidere et forsøk i Tromsø der forsøkspersonene bl.a. ble gitt rå kvalolje som var framstilt ved kaldpressing (Elvevoll & Østerud 2003). En annen forsøksgruppe ble gitt tilsvarende olje etter at oljen var raffinert. Resultatene fra dette forsøket viste at personene som inntok råoljen fikk betydelig økning av HDL-kolesterol i blodet ('sundt' kolesterol) og forbedret tilstand i immunsystemet. Disse positive helseeffektene ble ikke funnet hos personene som fikk den raffinerte kvaloljen.

Tilsvarende forsøksresultat ble vist i et forsøk med rotter som ble føret rå (uraffinert) sardinolje som var ekstrahert fra væskefasen ('vaskevannet') som oppstår under produksjon av surimi (Toyoshima et al. 2004). Denne produksjonen foregikk ved lav temperatur. Oljen ble blandet inn i en diett og gitt til rotter. Effekten på rottenes blodkolesterol ble sammenlignet med, henholdsvis, rotter som var gitt en raffinert, kommersielt tilgjengelig sardinolje; og rotter gitt soyaolje (kontroll gruppen). Resultatene er gjengitt i figur 2 og viser



Toyoshima et al. 2004

at rotter som var gitt råoljen (URS) fikk signifikant lavere totalkolesterol i blodet sammenlignet med de øvrige gruppene som var gitt kommersielt tilgjengelig sardinolje og soyaolje.

Sett under ett indikerer resultatene fra disse forsøkene med mennesker og rotter at råoljer produsert fra marine organismer innehar komponenter/egenskaper som gir en positiv helsegevinst utover effekten av omega-3 fettsyrene og at denne effekten tapes under raffineringprosessen.

Med bakgrunn i nevnte referanser er det nødvendig å gi en kort beskrivelse av prosessene som nyttes ved produksjon av råoljer og raffinering.

Tradisjonell produksjon av rå fiskeolje foregår ved at fiskeråstoffet varmes til ca. 90°C før det blir ledet gjennom en presse. Under pressingen framkommer en væskefraksjon og en presskake. Væskefasen består av vann og olje faser som skilles i en separator. Vannfasen, som er limvannet, blir oppkonsentrert (avdampet) og tilbakeført presskaken før tørking, og videre oppmaling til fiskemel. Oljefasen blir vasket (polert) med varmt vann for å fjerne det meste av uønskede komponenter; som for eksempel protein (Young 1982). Denne ekstraksjonsmetoden vil vi kalle varmepressing (VP).

Kaldpressing (KP) er en alternativ metode til å ekstrahere olje fra fiskeråstoff. Dette foregår ved at et råstoffet (for eksempel hel makrell eller lakseavskjær) males/kvernes før det hurtig blir frosset til for eksempel -20°C, og lagret natten over. Neste dag tines råstoffet under innkubering i vannbad med en maksimal temperatur på 40°C. Væskefasen overføres til et kar og oljefasen dekanteres av etter henstand.

Tradisjonelt framstilt rå fiskeolje inneholder tre typer forurensinger; uløselige (vann, proteiner o.l.), løselige (pigment, oksidasjonsprodukt, spormetaller, fosfatider, svovel- og nitrogen – forbindelser, frie fettsyrer, mono- og di- glyserider, og ufosåpbart materiale) og kolloide (partikler bestående av proteiner, fosfatider, karbohydrater). Det meste av disse urenheterne blir fjernet under raffineringsprosessen som stort sett blir gjort i tre prosesstrinn. Det første trinnet er avsyring hvor råoljen tilsettes lut for å fjerne frie fettsyrer, pigment, fosfolipider og svovelforbindelser. Under blekingen, som er det neste trinnet (filtreing gjennom blekegjord), fjernes pigment, oksidasjonsprodukt, spormetaller og såperester etter lutbehandlingen. Damping (deodorisering) foregår ved en temperatur på ca. 170°C og under et lavt trykk (vakuum); og med denne prosessen fjernes hydrokarboner, ketoner, svovelforbindelser og dekomposisjonsprodukt av pigment (Young 1982).

Raffineringsprosessen fjerner dermed mange komponenter fra råoljen som kan ha ernæringsverdi. Dette er en kjent problemstilling innen prosessering av vegetabiliske oljer og er årsaken til at en framstiller *virgin oils*; som er oljer framstilt under spesielt milde betingelser hva angår temperatur og fysisk belastning under ekstraksjonen. Dunford (2001) har diskutert hvilke komponenter med positiv helseeffekt som finnes i råoljer og som blir fjernet under en ordinær raffinering.

Rå fiskeoljer inneholder noe vann (0,3- 0,5 %) og disse vanndråpene (emulsjon) kan inneholde vannløselige komponenter og komponenter som finnes i interfasen mellom olje og vann. Eksempler på sistnevnte er tokoferoler (for eksempel E-vitamin). Det er vist at fiskemuskel inneholder både vannløselige (glutathion og ascorbinsyre (C-vitamin)), og fettløselige (E-vitamin og ubiquinone) antioksidanter (Jia et al. 1996; Petiello et al 1998). Antioksidanter som naturlig finnes i næringsmidler har en positive helseeffekt og er eksempel på ønskede produkt som fjernes ved raffineringen.

Målsetningen med dette delprosjektet var å karakterisere og isolere komponenter som finnes i kaldpresset, rå fiskeolje som har en positiv helseeffekt i tillegg til omega-3 fettsyrene. Råoljen skal være framstilt fra biprodukt fra den marine næringen.

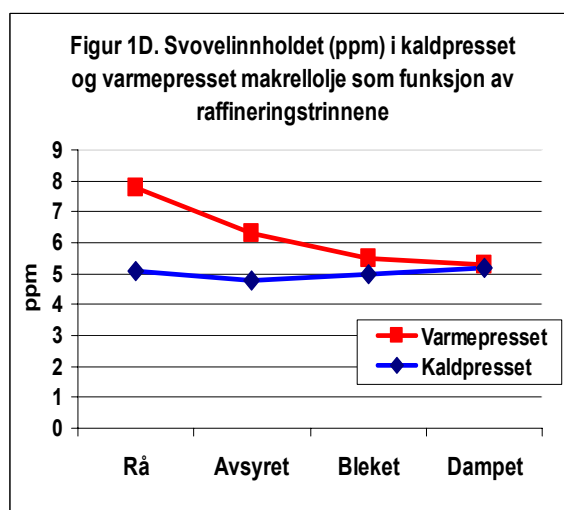
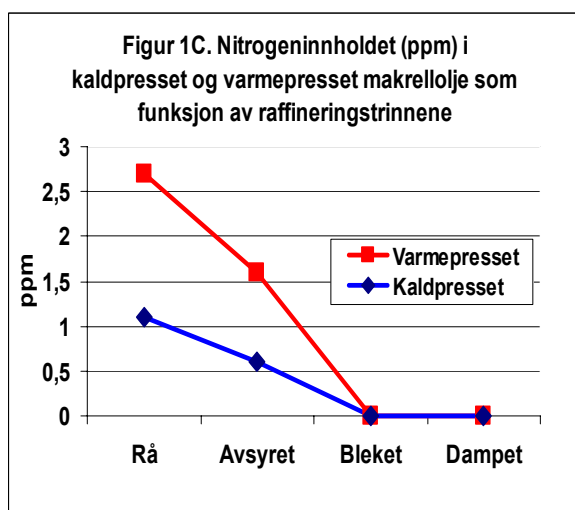
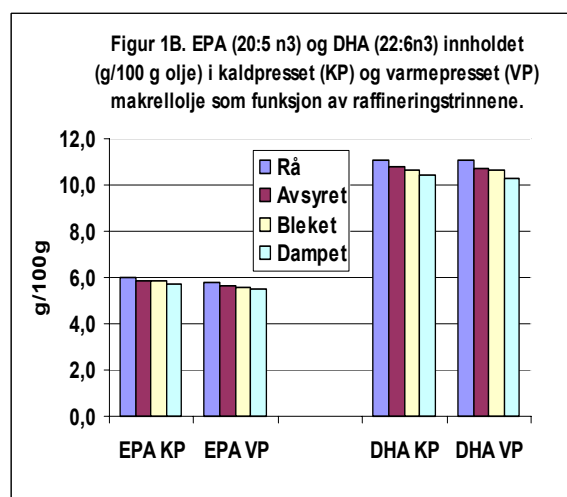
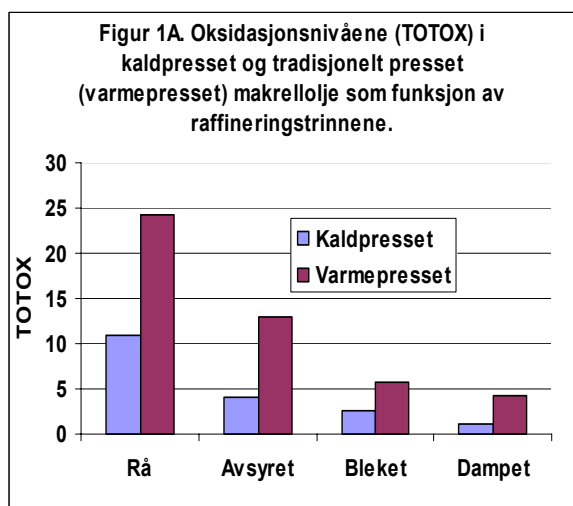
For å gjennomføre denne målsetningen var det imidlertid nødvendig å dokumentere at rå fiskeolje har en spesiell positiv ernæringseffekt sammenlignet med tilsvarende raffinert olje. Dokumentasjon ble gjennomført etter følgende plan:

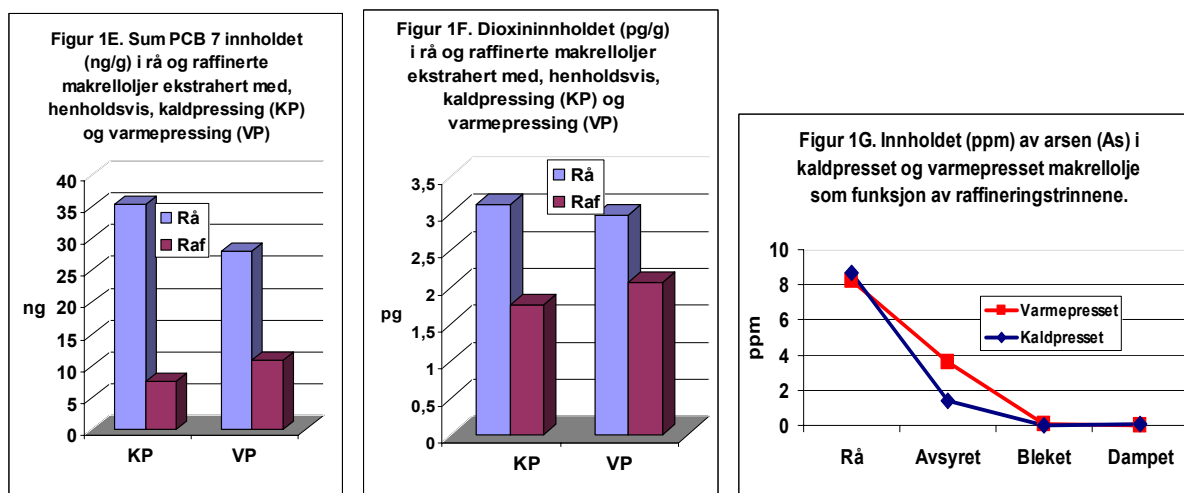
- Fremstille rå fiskeolje med forskjellig ekstraksjonsmetode (varmepressing og kaldpressing)
- Raffinere deler av råoljene
- Gjennomføre kjemiske analyser av råoljene og gjennom raffineringprosessen
- Komponere/preparere fôr til forsøksdyr basert på respektive olje fraksjoner
- Gjennomføre fôringsforsøk (rotter og gris)
- Utføre analyser i biologisk materiale fra fôringsforsøkene.

Resultat og diskusjon.

Oljeproduksjon.

Olje ble framstilt fra hel makrell (konsumkvalitet) ved henholdsvis kaldpressing (KP) og varmepressing (VP). Det samme råstoffet ble nyttet for begge produksjonene. Prosessene er kort beskrevet ovenfor. Tilsvarende oljer ble også framstilt med lakseavskjær (hode/rygg) som råstoff. Respektive råoljefraksjoner ble raffinert ved avsyring, bleking og deodorisering (se ovenfor). Oljenes sammensetning forandret seg betydelig under raffineringprosessen. Dette er vist for makrelloljen i figurene 1A - 1G.





Oksidasjonsnivået er vist som funksjon av TOTOX. TOTOX er en funksjon av peroksidtallet (PV), som er et mål for primære oksidasjonsprodukt, og anisidintallet (AV), som er et mål for sekundære oksidasjonsprodukt (aldehyder), og er bestemt med formelen $(AV + 2 \cdot PV)$. Figur 1A viser at råoljen framstilt ved kaldpressing var betydelig mindre oksidert enn varmpresset råolje. Oksidasjonsnivået blir redusert som funksjon av respektive raffineringstrinn, men forholdet mellom oksidasjonsnivåene i KP og VP oljene ble opprettholdt gjennom hele rensingsprosessen.

Innholdet av omega-3 fettsyrene EPA og DHA, bestemt som gram/100 gram olje, ble noe redusert under raffineringen (figur 1B). Dette gjaldt spesielt DHA, og kan forklares ved at rå fiskeoljer inneholder en mindre andel fosfolipider (PL) som fjernes under raffineringen. Spesielt DHA er anrikt i PL sammenlignet med oljens molekylære hovedbestanddel; som er triglyserider.

Innholdet av nitrogen- og svovelholdige komponenter var størst i råoljen framstilt ved varmpressingen (figur 1C og D). Videre ser vi at de nitrogenholdige komponentene i begge råoljene ble fjernet ved avsyringen (figur 1C). De svovelholdige komponentene i VP råoljen ble delvis fjernet under raffineringen, men slik at nivået etter dampingen (deodoriseringen) var på ca. 5 ppm (mg/kg olje). Vi ser også (figur 1C) at innholdet av svovel i KP-råoljen var uendret under hele raffineringen; d.v.s. 5 ppm.

Kjente nitrogenholdige komponenter i råoljene er proteiner og frie aminosyrer (se nedenfor), samt fosfolipider. Svovel finnes også i proteiner og aminosyrer. Det er kjent at proteiner og aminosyrer fjernes under raffineringen. Imidlertid vet vi ikke hvilke komponenter som finnes i de raffinerte oljene som har et S-innhold tilsvarende 5 ppm. Det samme S-innholdet ble også funnet i raffinert olje framstilt av lakseavskjær.

Miljøgiftene PCB og doxiner var stort sett på samme nivå de respektive råoljene. Som det framgår av figurene 1E og 1F, ble disse komponentene delvis fjernet under raffineringen; d.v.s. 60-80% og 30-40% reduksjon av PCB- og dioxin- innholdet, henholdsvis.

Det ble funnet ca. 8 ppm av tungmetallet arsen (As) i begge råoljene, men As ble fjernet etter avsyringsprosessen.

For øvrig ble analysert for innholdet av tungmetallene kvikksølv, kadmium og bly uten at disse ble detektert over angitte grenseverdier (ca. 0,3 ppm). Analyse for fosfor-innholdet ga heller ikke utbytte, men her var grenseverdien for deteksjonen 41 ppm som er relativt høyt for en eventuell deteksjon av fosfolipider.

Aminosyresammensetningen i vannekstraktet fra forskjellig råoljer er vist i tabell 1.

Sammensetningen varierte noe mellom råoljene fra makrell og laks, men det synes om

Tabell 1. Aminosyresammensetningen (%) i vannekstrakt fra råoljer: Varmepresset (VP) makrellolje, varmpresset og kaldpresset (KP) lakseolje. Tilsvarende er vist for fiskemel.

	Makrell (VP)	Laks (VP)	Laks (KP)	Fiskemel
Asp	5,8	9,6	9,8	10,2
Glu	8,4	12,7	12,2	14,3
HyP	3,5	1,8	0,6	0,8
Ser	6,2	4,5	4,3	4,6
Gly	13,3	9,1	6,7	6,1
His	5,3	2,3	1,8	1,8
Arg	10,6	8,2	9,1	5,6
Thr	4,4	4,7	4,9	4,6
Ala	4,4	7,9	8,5	7,1
Pro	9,3	5,4	5,5	4,6
Tyr	1,8	2,8	3,7	3,1
Val	4,9	5,8	6,7	6,1
Met	2,7	2,4	2,4	3,6
Ile	3,5	4,1	4,9	5,1
Leu	7,1	7,5	7,9	9,2
Phe	3,5	4,5	4,3	4,6
Lys	5,3	6,6	6,7	8,7
Sum	100,0	100	100	100,0

aminosyrene Glu, Gly, Arg og Leu var mest dominerende i begge oljene. Sammenlignes sammensetningene i råoljene med et gjennomsnittelig fiskemel, er mønsteret tilnærmet det samme bortsett fra at Lys- og Leu- innholdet var lavere, og Arg-innholdet var høyere i råoljene. Effekten av kaldpressing versus effekten av varmpressing på aminosyresammensetningen i rå lakseolje synes liten, men innholdet av Gly og HyP var høyere i VP-oljen.

Tabell 2 viser innholdet av enkelte frie aminosyrer i respektive rå lakseoljer, dvs. aminosyrer som ikke var bundet i peptidkjeder/protein. Det synes som at innholdet av enkelte frie aminosyrer ble påvirket av hvordan råoljene ble prosessert. Eksempelvis kan nevnes at innholdet av taurin, anserin og kreatinin var større i varmpresset råolje.

Tabell 2. Innholdet av frie aminosyrer (ikke-protein bundne) i varmpresset (VP-R) og kaldpresset (KP-R) rå (KP) lakseolje.

Frie aminosyrer (mg/liter olje)	KP-Rå	VP-Rå
Glutaminsyre	0,171	0,418
Asparagin	0,095	0,076
Glysin	0,627	0,190
Glutamin	0,475	0,304
3-amino-propansyre	0,152	0,171
Taurin	0,323	0,855
Treonin	0,266	0,513
Alanin	0,532	0,114
Anserin	0,000	1,197
Kreatinin	0,551	1,064

Biologiske forsøk.

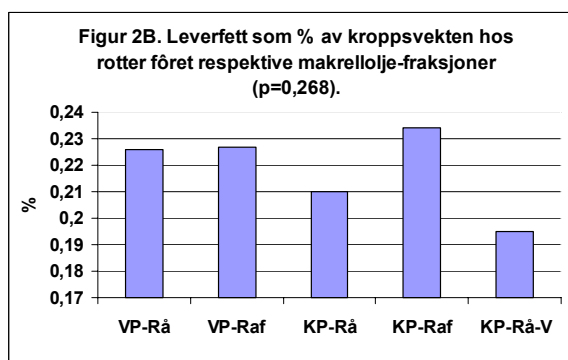
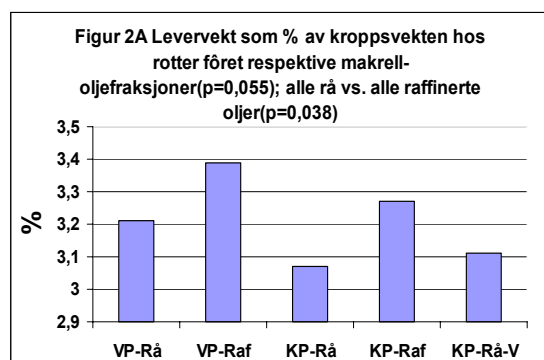
Rotteforsøk.

Rotter ble gitt 7 forsøksfôr som inneholdt 10% av respektive forsøksoljer. Råoljene (Rå) var framstilt fra hel makrell, og ble ekstrahert med, henholdsvis, kaldpressing (KP) og varmpressing (VP). Tilsvarende raffinerte (Raf) oljer ble også fôret. Forsøksoljene var: Varmepresset rå (VP-Rå) og raffinert (VP-Raf), kaldpresset rå (KP-Rå) og raffinert (KP-Raf), samt en fraksjon av den kaldpressede råoljen som var varmebehandlet (KP-Rå-V) med tilsvarende belastning (tid/temperatur) som ved prosessering av varmpresset råolje. I tillegg ble gitt to kontrolldietter; én basert på soyaolje (SBO) og én på rapsolje (RSO).

Tabell 3. Analyser for lipidoksidasjon i diettene: Anisidintall (AV) og peroksidtall (PV) i lipidekstrakt (Bligh & Dyer), og kjemiluminescens analysert direkte pr. 50 mg fôr. TOTOX=AV+2*PV.

Diettolje	AV	PV	TOTOX	CL
SBO	140	0	140	57760
RSO	54	0	54	57550
VP-Rå	310	32	374	57800
VP-Raff	50	0	50	64250
KP-Rå	250	41	332	59300
KP-Rå-V	190	35	260	58775
KP-Raff	140	0	140	67480

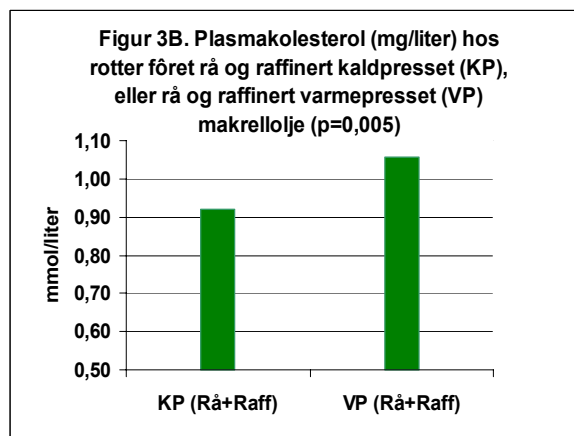
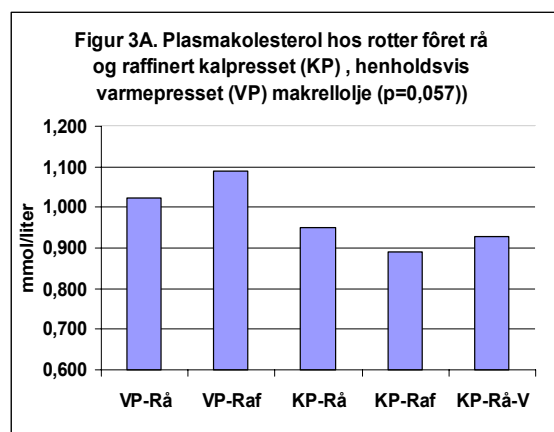
Analyser for oksidasjonsnivået i ekstrahert diettfett er vist i Tabell 3. Tabellen viser at innholdet av oksidasjonsprodukt (aldehyder (AV) og peroksider (PV)) var betydelig lavere i diettene basert på raffinerte oljer sammenlignet med råolje-diettene. Intensiteten av kjemiluminescensen (CL) gir imidlertid et annet bilde da CL er størst for diettene basert på raffinerte fiskeoljer; sammenlignet med råoljene. Dette kan forstås ved at analyser av oksidasjonsproduktene (AV og PV) reflekterer noe som har skjedd i oljen før analysen ble utført, mens høy CL-intensitet viser at oksidasjon er under utvikling når analysen blir utført.



Rottene ble fôret i 3 uker, 6 rotter pr. diett. Vekst/kroppsvekt ble ikke påvirket av diettene. Hjertets vekt, som andel av kroppsvekten, ble heller ikke påvirket av forsøksdiettene. Vi så imidlertid at leverens vekt og fettinnhold varierte som funksjon av diettoljene. Dette er vist i figurene 2A og 2B. Levervekten, som prosent av kroppsvekten, økte i gruppene gitt raffinert olje, sammenlignet med rotter fôret råoljene ($p=0,038$). Resultatene viste også at rottene som var gitt kaldpresset olje (rå + raffinert) hadde signifikant lavere levervekt enn rottene som var gitt VP-oljene ($p=0,050$). Leverens fettinnhold, som funksjon av kroppsvekten, var spesielt lavt hos rotter fôret varmebehandlet kaldpresset råolje; sammenlignet med gruppene gitt VP-Rå ($p=0,010$) og VP-Raf ($p=0,016$). Resultatene indikerer at kaldpresset råolje, uavhengig om den var varmebehandlet, ga en lever med minst vekt og fettinnhold.

Dette viser også at både ekstraksjonsmetode for framstilling av råoljen og raffineringprosessen ga biologiske effekter.

Plasmakolesterolnivåene hos rottene ble påvirket av ekstraksjonsmetoden, men ikke av raffineringprosessen. Dette er vist på Figurene 3A og 3B. Figur 3B viser at gruppene som var gitt kaldpresset olje (KP-Rå + KP-Raf) hadde et klart lavere kolesterolnivå enn gruppene gitt varmepresst olje (VP-Rå + VP-Raf) ($p=0,005$).



Innholdet av fosfolipider i blodet hos rottene var sterkt korrelert til totalkolesterol i plasma ($r=0,999$) og samsvarer derfor med at blodlipidene som transporterer kolesterol også inneholder fosfolipider. Innholdet av triglyserider i blodplasma tenderte lavere hos gruppene gitt de raffinerte oljene sammenlignet med tilsvarende råoljer, mens nivået av redusert glutation syntes lavere hos dyrene gitt råoljer. De vegetabiliske oljene, rapsolje og soyaolje, ga mindre mengder av, henholdsvis, vitamin A og redusert glutation. Vitamin E innholdet i plasma var høyest hos rotter gitt soyaolje.

Redusert glutation, samt vitamin A og E fungerer bl.a. som antioksidanter i organismen, men plasmanivået gjenspeiler også diettinnholdet. Plasmanivåene av, henholdsvis, homocysteine, cysteine, cystine, cysteinyl-glycine og total glutathione var upåvirket av diettoljene.

Analysene viste også at plasmainnhold av triglyserider var positivt korrelert med TOTOX-verdien i fôrene ($r=0,798$), men negativt korrelert til kjemiluminescens-intensiteten i fôrene ($r= -0,969$). Fettsyreinnholdet i blodplasmaet var lavest hos rotter som var gitt kaldpresset råolje.

Sette under ett, synes de mest interessante resultatene å framkomme i gruppen rotter gitt kaldpresset råolje.

Griseforsøk 1.

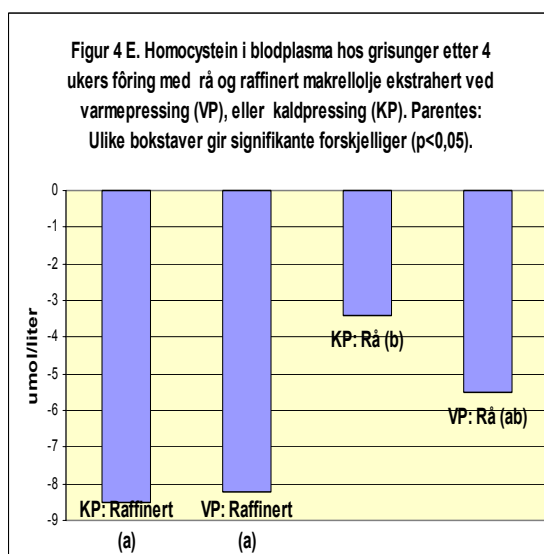
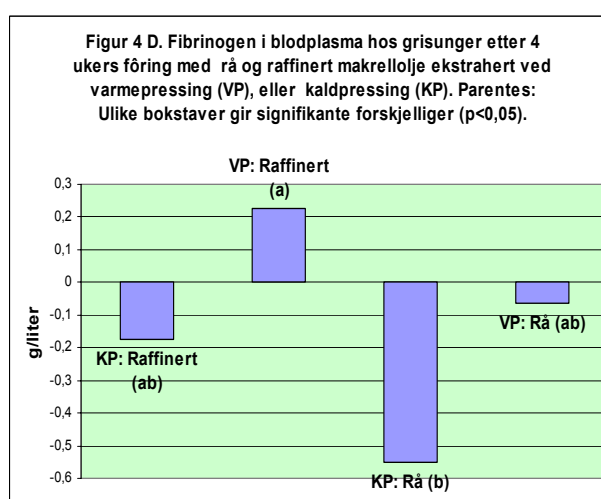
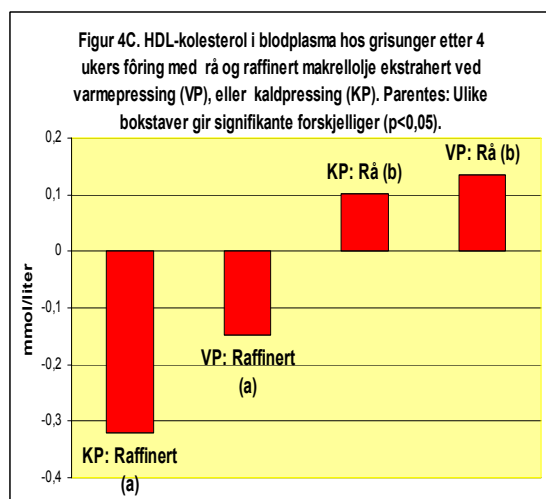
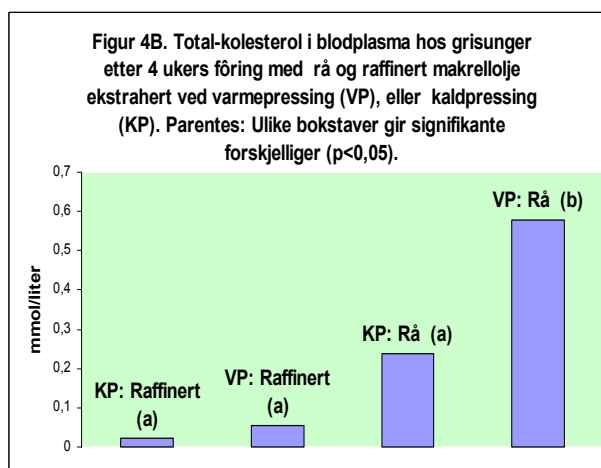
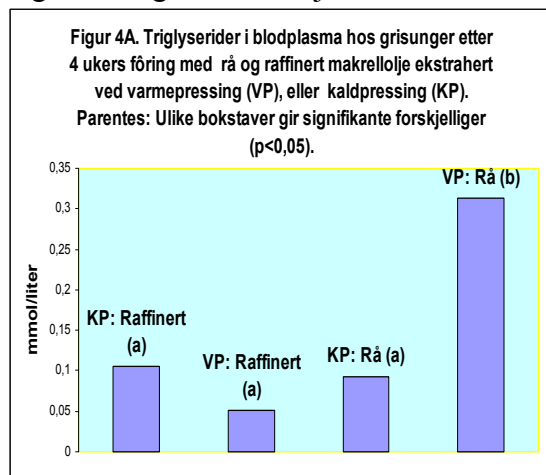
Grisunger ble gitt forsøksdietter som innholdt 10% av respektive forsøksoljer framstilt fra lakseavskjær: Kaldpresset rå (KP-Rå) og raffinert (KP-Raf) olje, samt varmepresst rå (VP-Rå) og raffinert (VP-Raf) olje.

Respektive dietter ble gitt til 4 griser og føret i 4 uker. Grisenes alder ved anskaffelsen var 5 uker. Etter en tilvendingsperiode på én uke ble forsøksdiettene føret. Det ble tatt blodprøver ved forsøkets start, samt etter 2 og 4 ukers føring.

Grisungene viste god trivsel og vekst og det var ingen forskjell mellom diettgruppene i denne sammenheng.

Resultat fra analyser i blodplasma er vist i figurene 4A-E.

Samtlige grupper fikk et økt triglyserid (TG) –innhold i blodplasma i forsøksperioden, men økningen var størst for gruppen gitt varmepresst råolje (figur 4A). De andre gruppene viste ikke statistisk signifikante forskjeller. Resultatene var imidlertid uventet da inntak av fiskeoljer hos voksne mennesker medfører reduksjon av TG-nivået i plasma. Dette har vært diskutert med sakkyndige, men de medgir at vi ikke vet hvordan TG-nivået hos barn endrer seg som følge av fiskeolje i kostholdet.



Totalkolesterol i blodet økte betydelig mer hos gruppen gitt varmpresset råolje i forhold til de andre gruppene som innbyrdes ikke var signifikant forskjellige (figur 4B). Tilsvarende gruppeendringer ble også funnet for innholdet av LDL-kolesterol ('usundt' kolesterol), mens innholdet av HDL-kolesterol ('sundt' kolesterol) økte for begge gruppene som var gitt råoljer og ble redusert i gruppene gitt raffinerte oljer (figur 4C).

Variasjonene i blodlipidenes sammensetning, sett under, viser at kaldpresset råolje synes å gi mest interessante resultat.

Figur 4D viser at reduksjonen i fibrinogen nivået var størst for gruppen gitt kaldpresset råolje, som også er en helsemessig fordel.

Analysen av fettsyresammensetningen i plasma viste at totalinnholdet av fettsyrer (mg/dl plasma) etter 2 ukers føring var betydelig lavere hos dyrene som var gitt kaldpresset råolje. Dette samsvarer med det vi fant i rotteforsøket. Imidlertid forsvant denne effekten etter at grisene var føret i 4 uker.

Homocystein-innholdet ble mest redusert i forsøksperioden hos grisene gitt raffinerte oljer. Gruppen gitt kaldpresset råolje ga signifikant minst reduksjon i homocystein-nivået. Dette var en ugunstig effekt av denne oljefraksjonen.

LDL-partikler fra blodet ble isolert og oksidasjonspotensialet analysert. Det ble ikke funnet forskjell mellom gruppene i denne forbindelsen.

Oppsummering.

Resultatene fra forsøkene med rotter og gris har vist at prosessering av oljer har ernæringseffekter. Rottforsøket viste at ekstraksjonsmetoden for framstilling av råolje påvirket leverens vekt og fettinnhold. Det samme gjaldt for raffineringsprosessen. Det ble vist at råolje framstilt ved kaldpressing ga minst lever og minst fettinnhold i leveren. Både hos gris og rotter ble det funnet at kaldpresset olje ga lavest blodkolesterol, og i griseforsøket ble funnet at kolesterolet var betydelig økt i gruppen gitt varmpresset råolje. Dette underbygger at ekstraksjonsmetoden har en betydning for blodlipidenes sammensetning. Effekt av raffineringsprosessen ble bl.a. vist med at raffinert fiskeolje ga redusert innhold av 'sundt' blod kolesterol, mens dette kolesterolet økte hos grisene som var gitt råoljene; uavhengig av ekstraksjonsmetoden.

Et spørsmål er om raffineringsprosessen fjerner komponenter fra råoljen, som tilsatt i næringsmidler, vil gi en helsegevinst.

Griseforsøk 2.

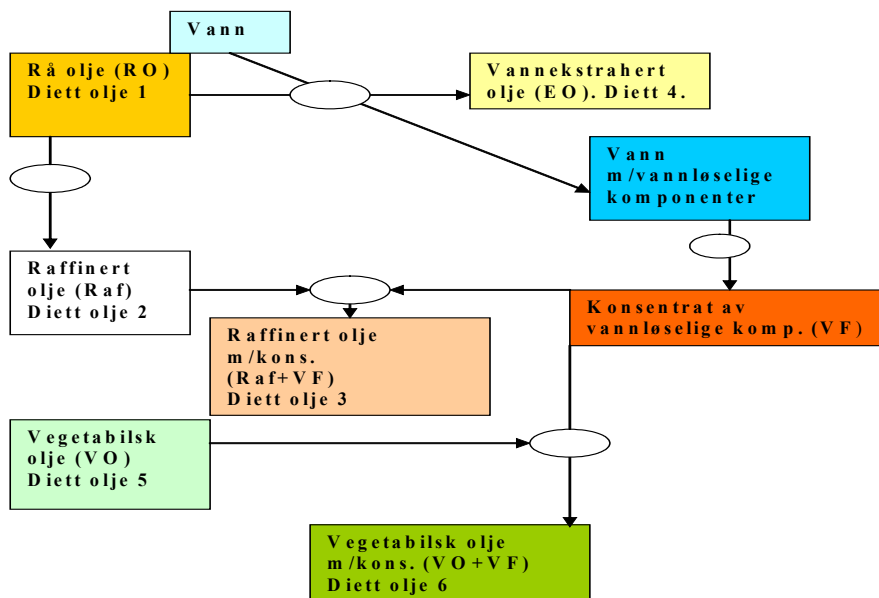
Hensikten med dette forsøket er å vise om de interessante komponentene, som finnes i råoljen, er vannløselige.

Vi vet at råoljen inneholder noe vann/vanndråper (emulsjon) som kan inneholde vannløselige komponenter. Analysene som ble utført i råoljene viste at nitrogenholdige komponenter, som vannløselige protein og aminosyrer, ble fjernet under raffineringsprosessen (se figur 1).

Råolje ble framstilt fra lakseavskjær (hode/rygg) ved kaldpressing. Noe av råoljen ble raffinert, mens noe av oljen ble ekstrahert (vasket) med vann ('polert' olje). Denne vannfasen ('vaskevannet') ble oppkonsentrert ved lav temperatur (filminndamper). Noe av konsentratet ble tilsatt den raffinerte oljen, og noe ble tilsatt i rapsolje. Respektive oljer ble nyttet i griseføder. En skjematisk oversikt av oljefraksjonene og tilsvarende forsøksdietter er vist på Figur 5.

Forsøksdiettene var basert på følgende oljefraksjoner: Råolje (Rå), raffinert olje (Raf), raffinert olje tilsatt konsentrert vannekstrakt (Raf+VE), polert olje (PO), rapsolje (VO) og

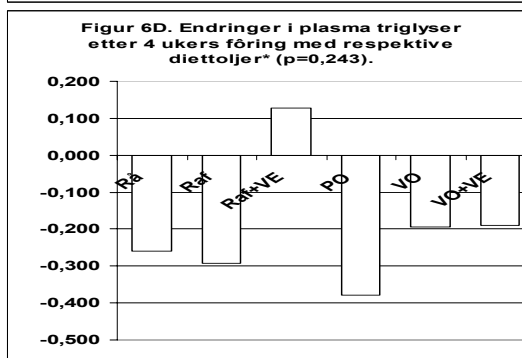
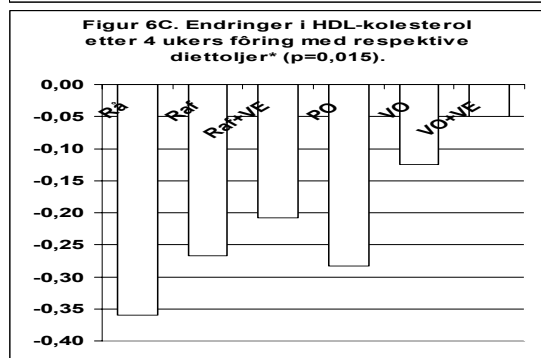
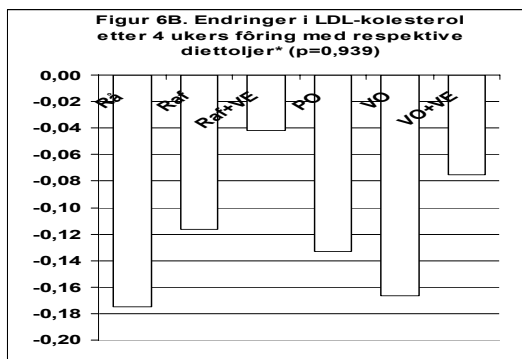
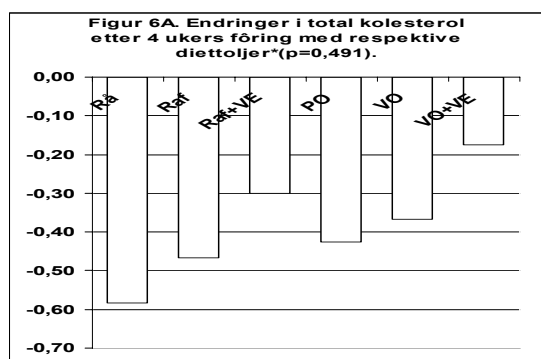
rapsolje tilsatt konsentrert vannekstrakt (VO+VE). Respektive oljer ble blandet inn i forsøksdiettene (10 vekt-%) og fôret til grisunger. Grisungene var fire uker gamle ved anskaffelse, og etter en ukes tilvending ble forsøksdiettene gitt i nye 4 uker. Det var 6 forsøksdietter og 6 grisunger pr. diettgruppe. Det ble tatt blodprøver ved start av fôringsperioden, etter 2 ukers og etter 4 ukers fôring.



Figur 5. Oversikt/skisse for framstilling av oljefraksjonene

Grisungene viste god trivsel og vekst. I denne sammenhengen var det var ingen forskjeller mellom diettgruppene.

Resultat fra blodanalysene er vist i figurene 6A - 6D og viser at blodplasmanivåene av total-



*) Diettoljer: Rå kaldpresset (Rå), og raffinert (Raf) lakseolje, raffinert tilsatt vannekstrakt av råoljen (Raf+VE), polert råolje (PO), rapsolje (VO) og VO tilsatt VE.

kolesterol (fig. 6A), LDL-kolesterol (fig. 6B), HDL-kolesterol (fig. 6C) og triglyserider (fig. 6D) stort sett ble redusert hos grisungene i forsøksperioden. Disse resultatene var svært uventet og avviker fra det vi fant i det første griseforsøket. Statistiske analyser viser at reduksjonen av total kolesterol, LDL-kolesterol og triglyserider i svært liten grad var påvirket av respektive dietter ($p > 0,05$). Reduksjonen av HDL-kolesterol var derimot påvirket av diettene ($p = 0,016$) og viste at reduksjonen var minst hos grisene gitt rapsolje tilsatt konsentrert vannekstrakt (VO+VE) sammenlignet med gruppene gitt, henholdsvis; rå, raffinert (Raf) og polert (PO) lakseolje. Det var ingen sikker forskjell mellom gruppene gitt (VO+VE) og ren rapsolje. Det første griseforsøket viste et griser gitt rå lakseolje fikk økt, mens raffinert olje ga redusert HDL-kolesterol i forsøksperioden. Da det er ønskelig at HDL-kolesterolet blir størst mulig, indikerer resultatene fra det siste forsøket at lakseoljene ga en uønsket effekt på blodlipidene; sammenlignet med rapsoljen.

Denne uoverensstemmelsen mellom griseforsøkene fra var vanskelig å tolke. Kontroll av resultatene fra blodlipidanalysene ble utført ved at et annet laboratorium gjentok analysene. Resultatene var imidlertid identiske med det som opprinnelig var rapportert. Denne kontrollen bekrefter også at resultatene fra de første forsøkene (rotter og gris) var riktige da det var samme laboratorium som da ble nyttet.

Ved nærmere ettersyn ble det imidlertid oppdaget at basisdiettene (dvs. diettens sammensetning før de eksperimentelle oljene ble tilsatt) var noe forandret i det siste forsøket. I det første griseforsøket var nyttet *ekstrahert soyaprotein* som proteinkilde, mens det i det siste forsøket ble nyttet *soyaprotein konsentrat*. Proteinkonsentrasjonen i diettene var imidlertid den samme i begge forsøkene. I ettertid har vi funnet at inntak av *soyaprotein konsentrat* spesielt medfører en generell reduksjon av blodlipidene (van Nieuwenhuyzen 2006; Potter 1995; Hoie 1998). En mulig årsak til at konsentratet, som inneholder ca. 65% protein, virker forskjellig fra *ekstrahert soyaprotein* (ca. 45% protein) kan være at anti-næringsstoffer, som finnes i soya, blir fjernet under oppkonsentreringsprosessen.

Med bakgrunn i de forandringene som ble gjort i basisdietten i det siste griseforsøket, må vi konkludere med at diettens proteiner påvirker blodlipidenes sammensetning og at denne effekten kan overskygge effekter fra diettlipidene. Beklageligvis var vi ikke på forhånd klar over at en slik endring av diettens proteinkilden ville ha så stor betydning for blodlipidenes sammensetning; at det overskygget effekten forsøksoljene. Tatt i betraktning den opprinnelige målsetningen, må forsøket derfor betraktes som mislykket. Imidlertid indikerer resultatene at diettfettets helsemessige betydning er samspilt med kostens fett-type og proteiner, og at dette samspillet bør fokuseres.

Konklusjon.

To uavhengige forsøk der, henholdsvis, rotter og gris ble gitt fiskeoljer produsert av hel makrell og lakseavskjær, har vist at råoljen har en gunstig helseeffekt som avviker fra effekten av tilsvarende raffinert olje.

Kommersialiseringspotensialet.

I følge boken, 'Marine produkt: Råvarer med muligheter', utgitt av stiftelsen RUBIN i januar 2007, er det teoretiske potensialet for lakseolje produksjonen i Norge lik 33 000 tonn/år. Beregningene er basert på tall fra 2003. Boken viser også at omsetningen av omga-3 produkt i 2005 var passert omsetningen av tran. Det er også en økende produksjon og markedsinteresse for smaksekstrakter, pulvere, fosfolipider og enzymer produsert fra biprodukt av marint råstoff. Dette viser markedet har økende interesse for marine produkt generelt, og for produkt framstilt fra marine biprodukt spesielt.

Lakseolje produseres i dag av avskjær fra laksefiletproduksjonen med bruk av to forskjellige prosesser; fra ferskt råstoff hvor avskjæret overføres direkte fra slakteriet, og fra ensilert avskjær. Oljeproduksjon fra ferskt råstoff gir en betydelig bedre kvalitet enn olje framstilt fra ensilert råstoff. Hovedandelen av disse oljene brukes til fôr, men noe av høykvalitetsoljen anvendes etter raffinering, til humant konsum.

Markedsprisen på rå fiskeoljer er pr. februar/mars 2007; ca. NOK 5.50/kg. Ensilasjeolje framstilt fra lakseavskjær prises imidlertid noe lavere. Høykvalitets lakseolje, som brukes i 'functional food' prises imidlertid høyere enn vanlig fiskeolje. Raffinert fiskeolje selges for ca. NOK 30/kg.

Rå lakseolje er rødfarget grunnet at laksemuskelens innhold av pigmentet astaxanthin, som er fettløselig og derfor gjenfinnes i råoljen. Denne oljen virker derfor mer 'delikat' enn andre råoljer produsert fra fisk. Ved en eventuell raffinering fjernes pigmentet. Astaxanthin er en antioksidant og betraktes som en ernæringskomponent med positive helseeffekter.

Som vist i forsøksresultatene medfører raffineringprosessen en delvis fjerning av smaksforringende oksidasjonsprodukt og miljøgifter (se over). Innholdet av PCB og dioxiner i rå lakseolje generelt ligger godt innenfor grenseverdiene for fôr, mens tilsvarende for den raffinerte oljen er omtrent på grenseverdiene for anvendelse i 'functional food'. En må imidlertid forvente at nivået av miljøgifter i oppdrettsfisk, og dermed i lakseoljen, vil bli redusert i tiden framover fordi innholdet av disse miljøgiftene i fôret blir redusert. Dette skyldes rensing av fôroljer og anvendelse av vegetabiliske komponenter i fôret.

Resultatene fra forsøkene, som her beskrevet, tilsier at vi burde anvende rå fiskeoljer til humant konsum da disse synes å gi en ekstra helsegevinst sammenlignet med høyrenset/raffinert fiskeolje. Forutsatt at innholdet av miljøgifter er på et akseptabelt nivå, må råoljen renses for oksidasjonsprodukt som gir uakseptabel smak på produktet. Denne rensesprosessen må til en viss grad være selektiv da vi ikke ønsker å fjerne komponenter som gir den positive helsegevinsten. Smaken av oljen kan, etter en slik rensesprosess, fremdeles være annerledes enn forventet av en smaksnøytral olje; fordi andre komponenter som proteinrester/aminosyrer vil innvirke.

En forutsetning for at vi skal få en olje med høy kvalitet er at råstoffet er ferskt, at produksjonsprosessen er skånsom og optimal, samt at produktet blir beskyttet mot oksidasjon/harskning under prosess og videre behandling.

Med bakgrunn i forsøksresultatene har følgende produkt kommersiell interesse:

- A. Produksjon av en olje med angitte egenskaper.
- B. Produksjon av råoljefraksjon/ekstrakt som har angitte egenskaper.

A. Produksjon av en olje med angitte egenskaper.

Fiskeriforskning har tidligere vist at prosessvariable, under framstilling av rå fiskeolje, gir oljefraksjoner som har forskjellig sammensetning hvor bl.a. kolesterolinnholdet varierer (Pettersen *et al.* 1997). Vi vet også at råoljens kvalitet blir betydelig redusert dersom fiskeråstoffet er dårlig, samt at en dårlig råoljekvalitet er vanskelig å raffinere til en kvalitetsolje.

Kaldpressing er en prosess som i dag anvendes ved produksjon av bl.a. tran og fiskeoljer. Denne oljen blir raffinert før den omsettes og anvendes i næringsmidler.

Et alternativ til full raffinering er en delvis raffinering (også kalt semiraffinering) der en unngår ett eller flere trinn i raffineringsprosessen; det være seg avsyringen, blekingen og/eller deodoriseringen (damping). Dette kan medføre at det semiraffinerte produkt innehar de ønskede egenskapene som vi fant i råoljen. Denne oljen kan anvendes i helsekostprodukt. Avhengig av smak og stabilitet kan oljen også nyttes i *functional food* og andre næringsmidler.

Markedspris på slike produkt kan være vanskelig å forutsi, men prisen vil sannsynligvis være betydelig høyere enn for raffinert fiskeolje.

B. Produksjon av råoljefraksjon/ekstrakt som har angitte egenskaper.

Et alternativ til å framstille en olje, som har de egenskapene vi her har vist, er å behandle/prosessere råoljen på en måte som gir en fraksjon som innehar de interessante egenskapene. Vi vet imidlertid enda ikke hvilke komponenter vi skal isolere, men det er realistisk å tro at vi relativt enkelt kan framstille en fraksjon med disse egenskapene. En sikker molekylær identifikasjon av de interessante komponentene kan derimot være mer tidkrevende.

Ved en slik fraksjonering kan vi ta ut de interessante komponentene fra råoljen før den raffineres, og eventuelt tilbakeføre produktet til den raffinerte oljen. Det er også muligheter for å oppkonsentrere/renframstille komponentene og bruke konsentratet i andre typer næringsmidler og/eller helsekostprodukt.

Eksempler på aktuelle fraksjoneringsmetoder som kan testes mht utbytte og prosesskostnader:

- Ekstrahering/vaskning med en vannfase som enten er rent vann, eller vann som er pH-justert og/eller inneholder spesielle ioner. Metoden gir en grovfraksjonering.
- Molekylær destillasjon der vi kan fraksjonere mht. ulik flyktighet av komponentene.
- Membranfiltrering der en nytter flere ulike filteråpninger (masker for molekylær fraksjonering), kan gi en fraksjon med de interessant komponentene.
- Sentrifugering av råoljen. I litteraturen er beskrevet en metode der en fraksjonerer rå - fiskeolje i tre fraksjoner ved sentrifugering (del Valle & Aguilera (1991): Vannfase, oljefase og sedimenterte partikler.
- Preparativ væskrokromatografi er en metode som anvendes for framstilling av rene produkt. Metoden har vært anvendt til å framstille høyrenset fiskeolje. Råoljens interessante urenheter kan fraksjoneres og samles.
- Superkritisk væske-ekstraksjon er en metode som i dag anvendes til bl.a. å fjerne kaffein under produksjon av kaffein-fri kaffe. Metoden tillater å separere/fraksjonere mht. molekylære egenskaper som polaritet og løselighet

Som det her er vist, finnes det en rekke prosessmetoder som ved optimalisering kan anvendes på rå lakseolje for separere ut den interessante egenskapen. En slik prosess kan imidlertid være kostbar og betinger at markedet vil betale en merpris for produktet.

Oppfølging.

En forutsetning for å utvikle nevnte produkt er at vi kan verifisere de aktuelle funn og gjøre den nødvendige dokumentasjon for å utvikle en prosess. Her en skisse for å gjennomføre oppfølgingen:

- Finne produksjonsbetingelser som gir optimalt utbytte av råoljen mht. interessante egenskaper. Variable kan være råstofftype/kvalitet temperaturlastning, pressing, separasjon.
- Identifisere/isolere komponenter som gir de interessante effektene:
 - o Analysere oljenes sammensetning
 - o Fraksjonere råoljene og analysere fraksjonenes sammensetning
 - o Teste fraksjonene i biologiske forsøk
- Utvikle relevant prosess for framstilling av produktet

Formidling/publisering.

Presentasjon på 'Maring fagdag' 31. januar 2006, Gardermoen:

'Er *virgin oil* annerledes enn *processed oil*? Jakten på de spesielle egenskaper' av Jan Pettersen v/Fiskeriforskning.

Presentasjon på RUBIN-konferansen 2007, 7-8. febr. 2007, Stjørdal:

'Marine oljer – helsemessige konsekvenser av prosessering' av Jan Pettersen v/Fiskeriforskning.

Publikasjon *submitted* (2007):

Dietary Effects of Processed Fish Oil on Growth, Organ weights and Blood Composition of Rats. Pettersen, J..

Publikasjon under arbeid (2007):

Dietary effects of processed fish oil on blood lipids, homocystein and fibrinogen of piglets. Pettersen, J.

'Acknowledgments'.

Delprosjektlederen vil uttrykke stor takk til stiftelsen RUBIN og Innovasjon Norge for finansieringen av prosjektet. Stor takk går også til Bjørn Liaseth og Åse Heltveit ved NIFES for hjelp under gjennomføring av rotteforsøket. Det rettes også takk til Rolf K. Berge og Ottar Nygård ved Haukeland Universitetssykehus i Bergen, og til Edel Elvevoll ved Fiskerihøgskolen i Tromsø for verdifull hjelp til å vurdere resultat fra de kliniske analysene.

Referanser

- Albert, M.L., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Ajani, U.M., Carey, V.J., Willett, W.C., Ruskin, J.N., and Manson, JA, E. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death, *JAMA* 279, 23-78.
- Dunford, T.D. (2001), Health benefits and processing of lipid-based nutritionals, *Food Technology* 55 (119), 38-44.
- del Valle, J.M.; Aguilera, J.M. (1991): Physiochemical characterisation of raw fish and stickwater from raw fish-meal production. *J. Sci. Food Agric.* 54 (3), 429-441.
- Elvevoll, E.O., and Österud, B. (2003) Impact of processing on nutritional quality of marine food items. In: *Modern aspects of marine food items – present knowledge and future perspectives*, p. 337-341 (eds. ElmadfaIAE, Konig JS, Basel: Karger).
- Hoie, L.H. (1998) Composition and its use as a food supplement or for lowering lipids in serum. Patent number 6136367 (U.S. Classification 426/634; 426/656).
- Jia, T. D.; Kelleher, S. D.; Hultin, H. O.; Petillo, D.; Maney, R., and Krzynowek, J. Comparison of Quality Loss and Changes in the Glutathione Antioxidant (1996), System in Stored Mackerel and Bluefish Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44 (5):1195-1201
- Pettersen, J.; Oterhals, Å and Opstvedt, J. (1997): Unhydrogenated fish oil in food products. Lipid Technology - Oils and Fats in Food Applications, Chapter 5 (Proceedings of the 22nd World Congress in ISF, Kuala Lumpur 7.-12. Sept. 1997, ed. Kurt G. Berger).
- Petillo, D.; Hultin, H. O.; Krzynowek, J., and Autio, W. R (1998), Kinetics of Antioxidant Loss in Mackerel Light and Dark Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46 (10):4128-4137.
- Potter, S.M. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolic effect of soy. *J. Nutr.* 125 (3). S606-S611.
- Toyoshima, K., Noguchi, R., Hosokawa, M., Fukunaga, K., Nishiyama, T., Takahishi, R., and Miyashita, K. (2004) Separation of sardine oil without heating from surimi wast and itys effect on lipid metabolism in rats, *J. Agric. Food Chem.* 52, 2372-2375.
- Young F.V.K. (1982) *The production and use of fish oils. Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil*, pp. 1-23 (eds.: Barlow, S.M., and Stansby, M.E.; Academic Press London, ISBN 0-12-078920-5).
- van Nieuwenhuyzen, W. (2006) Soy & health. Europe calls for scientific substantiation. *INFORM* 17 (12), 783-784.

