



KARTLEGGING AV RAFFINERT MAKRELLOLJE TIL HUMANT KONSUM

positive og negative helseeffekter ved inntak av
raffinert makrellolje

Even Fjære, Lene Secher Myrnes og Lise Madsen (HI)

Tittel (norsk og engelsk):

Kartlegging av raffinert makrellolje til humant konsum

Refined oil from mackerel processing waste for human consumption

Undertittel (norsk og engelsk):

positive og negative helseeffekter ved inntak av raffinert makrellolje

positive and negative health effects of refined mackerel oil

Rapportserie:

Rapport fra Havforskningen

Nr.-År:

X-2020

Dato:

31.01.2020

Interne forfattere:

Even Fjære, Lene Secher Myrmel og Lise Madsen

Kontaktperson(er):

Even Fjære

Distribusjon: Åpen

Prosjektnr.:

15323

Oppdragsgiver(e):

Fiskeri- og havbruksnæringens
forskningsfinansiering

Oppdragsgivers referanse:

901371

Program:

Trygg og sunn sjømat

Forskningsgruppe:

Sjømat og ernæring

Antall sider totalt:

28



Sammendrag (norsk):

Vi har i dette prosjektet undersøkt innholdet av næringsstoffer og fremmedstoffer i råolje ekstrahert fra restråstoff av makrell, og i alle fraksjoner fra raffineringsprosessen fram til ferdig raffinert makrellolje. Fettsyreprofil, vitamin-A, -D og -E, dioksiner og dioksinlignende PCB (PCDD/F+dI-PCB), ikke-dioksinlignende PCB (PCB6), multielement analyser, polycykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), oksidasjon og sensoriske analyser har blitt analysert. Analysene ble gjennomført i henhold til NS-EN ISO 17025. Andre del av prosjektet var å undersøke helseeffektene av raffinert makrellolje. Potensielle helseeffekter ved inntak av raffinert makrellolje ble undersøkt ved å gjennomføre to fôringsforsøk i mus. Makrellolje ble gitt i ulike doser (30, 60 og 90 gram per kilo diett) i totalt 13 uker. Makrellolje ble også gitt i to ulike dietter, en standard diett og en vestlig diett. Våre resultater viser at raffineringsprosessen medførte små endringer i fettsyreprofilen til makrelloljen, men at nivået av fettløselige vitaminer ble kraftig redusert. Nivået av dioksiner, dioksinlignende PCB og ikke-dioksinlignende PCB ble betydelig redusert gjennom raffineringsprosessen, og i den ferdige raffinerte oljen var nivået av tungmetaller, spormetaller og PAH-er under laveste deteksjonsgrense. Parameterne relatert til oksidasjon ble betydelig bedret gjennom raffineringsprosessen, og de sensoriske analysene viser at raffinert makrellolje tilfredsstillende Global Organization for EPA and DHA omega-3 (GOED) sine krav. Raffinert makrellolje ble videre vurdert som handelsvare for humant konsum. Fôringsforsøkene gjennomført i mus viste ingen akutt toksisk effekt av raffinert makrellolje i dietten, uavhengig av dose og diett. Alle samlede data fra forsøket hvor makrellolje ble innblandet i en standard diett viste ingen tegn til uheldige effekter sammenlignet med kontrollgruppen, uavhengig av dose. Fôringsforsøket hvor raffinert makrellolje ble innblandet i en vestlig diett viste en signifikant økning i kroppsvekt og levervekt hos musene som fikk makrellolje sammenlignet med mus som fikk en vestlig diett uten makrellolje. Makrellolje innblandet i en vestlig diett medførte en signifikant økning av fettinnholdet i leveren, økt fastende blodglukose og redusert glukosetoleranse. Våre data viser også at makrelloljen innblandet i en vestlig diett økte forinntaket og opptaket av fett fra dietten sammenlignet med kontrollgruppen.

Summary (English):

In this project we have quantified nutrients and contaminants in mackerel oil extracted from by-products. Fatty acid profile, vitamin A, -D and -E, dioxins, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs, multielement analyses, polycyclic aromatic hydrocarbons, oxidation parameters and sensory analysis have been performed. All quantitative analyses were performed using methods accredited according to NS-EO ISO 17025. The second objective of the project was to examine the health effects of refined mackerel oil in the diet. Potential positive and negative health effects of dietary mackerel oil were examined by performing two animal experiments in mice. Refined mackerel oil was given in different doses (30, 60 and 90 grams per kilo diet) for 13 weeks. Mackerel oil was also given in two diets, a standard diet and a western diet. Results demonstrate that the refinement process have small effects on the fatty acid profile in the mackerel oil, but significantly reduced the levels of fat-soluble vitamins. Levels of dioxin, dioxin like PCB and non-dioxin like PCB were reduced significantly throughout the refinement process, and levels of heavy metals, trace metals and PAHs were below the lowest level of quantification. Parameters of oxidation were reduced throughout the refinement process, and oxidation and sensory analysis show that finished refined mackerel oil satisfies the requirements of Global Organization for EPA and DHA omega 3. Thus, refined mackerel oil was considered suitable for human consumption. The dietary experiment performed in mice shows no sign of acute toxic effect from incorporation of mackerel oil in the diet, independent of doses or experimental diet. All collected data from the experiment, where mackerel oil was mixed into a standard diet, showed no sign of negative effects compared with the control group independent of dose. The experiment where mackerel oil was mixed into a western diet shows a significant increase in body weight and liver weight. Mackerel oil mixed into a western diet led to increased fat accumulation in liver tissue, increased fasted blood glucose and reduced glucose tolerance. Data shows that mackerel oil in a western diet increased feed intake and fat absorption compared to the mice fed standard western diet.

Innhold

1	Introduksjon	5
1.1	Delmål for prosjektet:	5
1.2	Raffineringsprosessen kort oppsummert:	5
2	Råolje fra makrell restråstoff til ferdig raffinert makrellolje, analyser av næringsinnhold, fremmedstoffer og oksidasjon	6
2.1	Persistente organiske miljøgifter (POP-er).....	6
2.2	Tungmetaller, spormetaller og grunnstoff	9
2.3	Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH-er)	9
2.4	Fettsyresammensetning og omega-3 fettsyrer (EPA og DHA)	10
2.5	Fettløselige vitaminer	13
2.6	Oksidasjon og sensoriske parametere.....	14
3	Næringsinnhold og helseeffekter av raffinert makrellolje i dietten	16
3.1	Fettlever- Ikke alkoholisk fettleversykdom (NAFLD).....	17
3.2	Fastende blodglukose og glukoseregulering	18
3.3	Markører for leverskade	18
3.4	Ingen endring i inflammasjonsstatus	18
3.5	Ukentlig tolerabelt inntak (TWI) av dioksin og dioksinlignende PCB.....	19
3.6	Tolerabelt daglig inntak (TDI) av erukasyre	20
3.7	Helseeffekter av omega-3 fettsyrer	21
3.8	Endret fettsyresammensetning i lever.....	21
3.9	Makrellolje medfører økt fettfri masse og redusert mengde visceralt fett.....	22
3.10	Redusert appetitt ved omega-3 fettsyrer i dietten	23
3.11	Makrellolje øker fettfordøyeligheten	23
3.12	Oppsummering: Næringsinnhold og helseeffekter av raffinert makrellolje i dietten.....	23
4	Konklusjon	25
5	Litteraturliste	26

I Introduksjon

Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) finnes hovedsakelig i Middelhavet, Svartehavet og det nordlige Atlanterhavet, og er ansett som en meget næringsrik fiskeart. Fiskearten har et naturlig høyt fettinnhold, men fettinnholdet varierer avhengig av årstid og tilgjengeligheten på mat. Makrellen lever hovedsakelig i pelagisk sone og har en høy kommersiell interesse. Pelagisk konsumindustri har i samarbeid med Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) utarbeidet en handlingsplan for bedre utnyttelse av restråstoff fra filetering av makrell. Restråstoff fra makrell, bestående av skinn, innvoller og muskelvev, er en ressurs fra fiske som kan utnyttes i enda større grad. I dette prosjektet har første ledd vært å kartlegge nivået av næringsstoffer og fremmedstoffer i makrellolje utvunnet fra restråstoff. Fettsyresammensetning, vitamininnhold, fremmedstoffer, oksidasjonsgrad og sensoriske analyser har blitt kartlagt fra råolje foredlet fra restråstoff og i alle fraksjoner fram til den ferdige raffinerte makrelloljen. Del to av prosjektet har vært en eksperimentell del hvor hovedmålet har vært å gjøre en sikkerhetsvurdering av raffinert makrellolje for humant konsum. Informasjonen fra forsøkene har gitt en oversikt over potensielle positive og negative effekter ved inntak av raffinert makrellolje i dietten. Føringforsøkene har vært gjennomført i mus hvor raffinert makrellolje ble gitt via dietten i ulike doser. Makrelloljen har blitt gitt i to ulike dietter, en standard diett (SD) og en vestlig diett (WD) for bedre å reflektere et humant kosthold.

I.1 Delmål for prosjektet:

- 1) Dokumentere nivået av relevante fremmedstoffer i fremstilte oljer.
- 2) Dokumentere næringsinnholdet i form av lipidklasser, fettsyresammensetning og vitamininnhold i rå og raffinert makrellolje.
- 3) Kartlegge eventuelle toksiske- og ugunstige effekter ved konsum av raffinert makrellolje.
- 4) Dokumentere eventuelle positive helseeffekter ved inntak av raffinert makrellolje.

Hovedmålsettingen i prosjektet vil være å dokumentere helseeffekter ved inntak av raffinert makrellolje ekstrahert fra restråstoff.

I.2 Raffineringsprosessen kort oppsummert:

Makrellolje fra restråstoff ble utvunnet hos Pelagia i Selje november 2017. Proteinrester i oljen ble fjernet ved at oljen ble varmet opp til 40°C og filtrert gjennom et 10 µm filter hos Epax desember 2017. Råoljen man da satt igjen med ble deretter raffinert videre i følgende prosesser:

- 1) **Molekylær destillasjon** (stripping) ved høy temperatur for å fjerne miljøgifter (oljen ble tørket med oppvarming og vakuum på forhånd). Frie fettsyrer ble fjernet under strippeprosessen
- 2) **Koldklaring** ble gjennomført for å gjøre oljen klar ved romtemperatur.
- 3) **Bleking** med bleikjord og aktivt kull ble gjort for å fjerne oksidasjonsprodukter og redusere nivået av tungmetaller og miljøgifter.
- 4) **Deodorisering og tilsetning av antioksidant** ble gjennomført for å fjerne lukt og forhindre oksidasjon av oljen.

Makrellolje fra alle raffineringsprosessen ble tappet på mørke glassflasker og toppet med flytende nitrogen. Prøvene ble deretter lagret på -30°C fram til videre analyser.

2 Råolje fra makrell restråstoff til ferdig raffinert makrellolje, analyser av næringsinnhold, fremmedstoffer og oksidasjon

2.1 Persistente organiske miljøgifter (POP-er)

POP-er er en gruppe fettløselige miljøgifter som kan medføre toksiske effekter. Disse forbindelsene transporteres i luft og havstrømmer og oppkonsentreres i organismer og dyr ved eksponering. POP-er lagres hovedsakelig i fett og fettdepoter. POP-er har en rekke bruksområder, som blant annet omfatter industrijemikalier og plantevernmidler, og har lang halveringstid. Når det gjelder marine oljer (kosttilskudd) til humant konsum er det først og fremst innholdet av polyklorerte dibenzodioksiner (PCDD) og polyklorerte dibenzofuraner (PCDF), dioksinlignende PCB (dl-PCB) og ikke-dioksinlignende PCB (PCB6) som kan være et problem. Ikke alle dioksinene og furanene er like giftige, og hver enkelt forbindelse har en toksisk ekvivalent faktor (TEF). Når giftigheten til en blanding av miljøgifter skal vurderes blir TEF-verdiene multiplisert med konsentrasjon av hver enkelt kongener. Den sammenlagte verdien kalles toksisk ekvivalent (TEQ) og brukes som et mål på hvor giftig blandingen er.

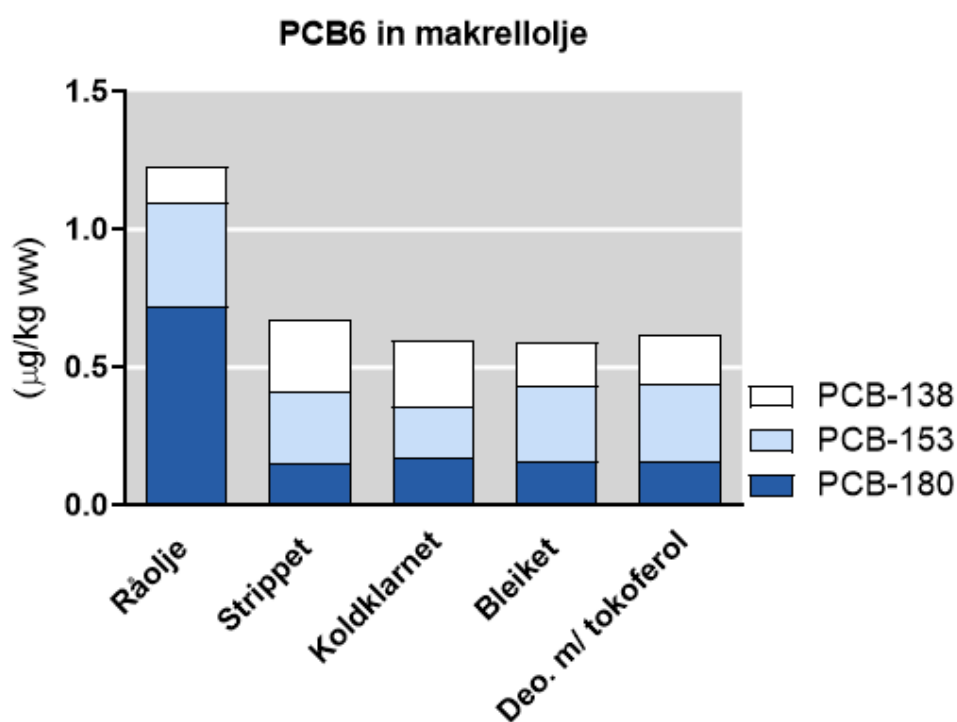
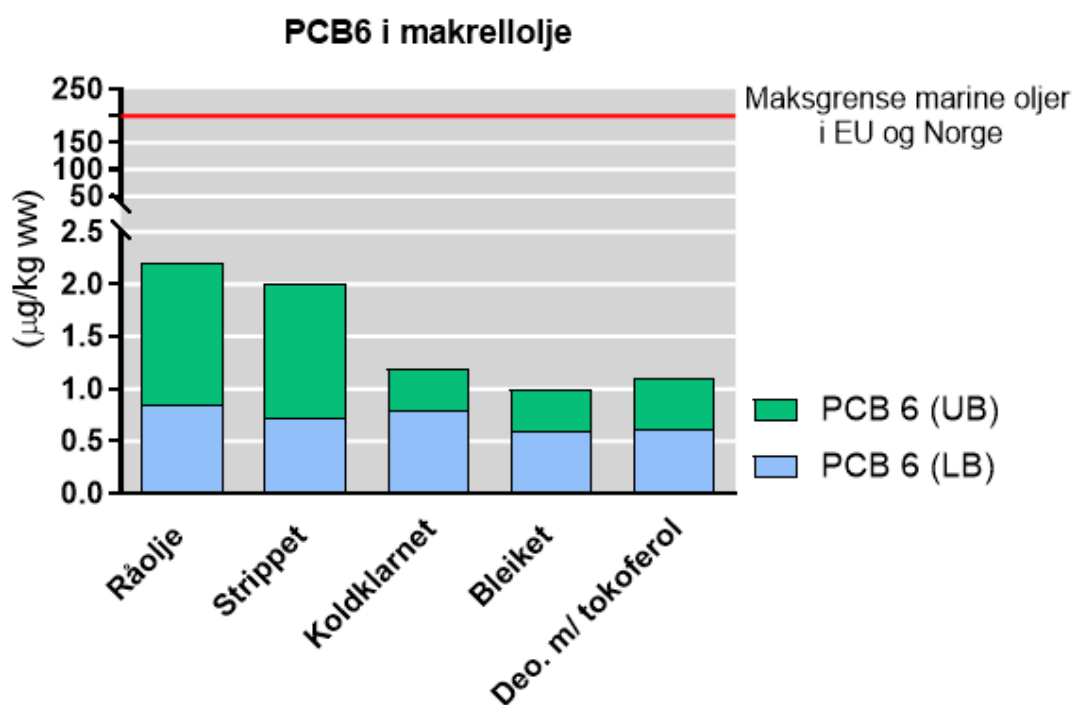
Tabell 1 viser konsentrasjonene av PCDD, PCDF, sum PCDD/F, non-orto PCB, mono-orto PCB, sum dl-PCB, samt totalsummen av PCDD/F+dl-PCB i råolje og alle fraksjoner fram til ferdig raffinert makrellolje. Sum dioksiner og furaner (PCDD/F) i råolje (1,95 ng TE/kg) var over maksgrensen for marine oljer i EU og Norge. Molekylær destillasjon (stripping) medførte en kraftig reduksjon i mengden PCDD/F og nivået ble gradvis lavere videre i raffineringsprosessen. Ferdig raffinert makrellolje (deodorisert olje med tokoferol) ble analysert til 0,15 ng/kg og var betydelig under maksgrensen for marine oljer til humant konsum. Ved bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB (PCDD/F+dl-PCB) ble det kvantifisert sju kongenere av dioksiner (PCDD), ti kongenere av furaner (PCDF), fire kongenere av non-orto PCB (PCB-77, -81, -126 og -169) og åtte kongenere av mono-orto PCB (PCB-105, -114, -118, -123, -156, -157, -167 og -189). Maksgrensen for PCDD/F+dl-PCB i marine oljer er satt til 6 ng TE/kg fett i EU, mens maksgrensen i Norge er 4 ng TE/kg. Råoljen hadde konsentrasjon av sum PCDD/F+dl-PCB nær den norske maksgrensen for marine oljer, men etter strippeprosessen var verdien betydelig lavere. I den ferdige raffinerte makrelloljen var konsentrasjon av sum PCDD/F+dl-PCB 0,19 ng TE/kg fett og dermed betydelig lavere enn maksgrensen i EU og Norge.

Kartlegging av raffinert makrellolje til human konsum

Tabell 1: Konsentrasjoner av dioksiner (PCDD), furaner (PCDF), sum dioksiner og furaner (PCDD/F), non-orto PCB, mono-orto PCB, sum dioksinlignende (dl)-PCB, og sum PCDD/F+dl-PCB i raffinert makrellolje og alle fraksjoner fra råoljen ekstrahert fra restråstoff.

Produkt	Sum PCDD	Sum PCDF	Sum PCDD/F	Non-orto PCB	Mono-orto PCB	Sum dl-PCB	Sum PCDD/F+dl-PCB
-----ng TEQ/kg fett-----							
Råolje	1,32	0,639	1,95	1,54	0,020	1,55	3,5
Strippet	0,66	0,051	0,71	0,1375	0,009	0,14	0,85
Koldklarnet	0,23	0,047	0,28	0,0664	0,007	0,087	0,37
Bleiket	0,19	0,032	0,22	0,0292	0,007	0,036	0,26
Deodorisert m/ tokoferol	0,12	0,032	0,15	0,0292	0,007	0,036	0,19
Maksgrense for marine oljer, EU			1,75				6,0
Maksgrense for marine oljer, Norge			1,75				4,0

Ved bestemmelse av ikke-dioksinlignende PCB (PCB6) ble følgende seks kongenere kvantifisert: PCB-28, -52, -101, -138, -153 og -180. Sum PCB6 ble beregnet med upperbound LOQ slik regelverket krever for sammenligning mot EUs grenseverdier, men i figur 1 vises også lowerbound LOQ. Figur 1 viser at PCB6 nivået i råolje er betydelig under maksimal grenseverdi på 200 µg/ kg fett for marine oljer i EU og Norge. PCB6 nivået ble ytterligere redusert av raffineringprosessen. I den ferdige raffinerte olje var det kun PCB-138, PCB-153 og PCB-180 som var over LOQ. Nivået av PCB-138 og PCB-153 var relativt stabile gjennom raffineringprosessen, men nivået av PCB-180 ble redusert fra 0,7 til 0,2 µg/kg fett fra råoljen til den ferdige raffinerte makrelloljen.

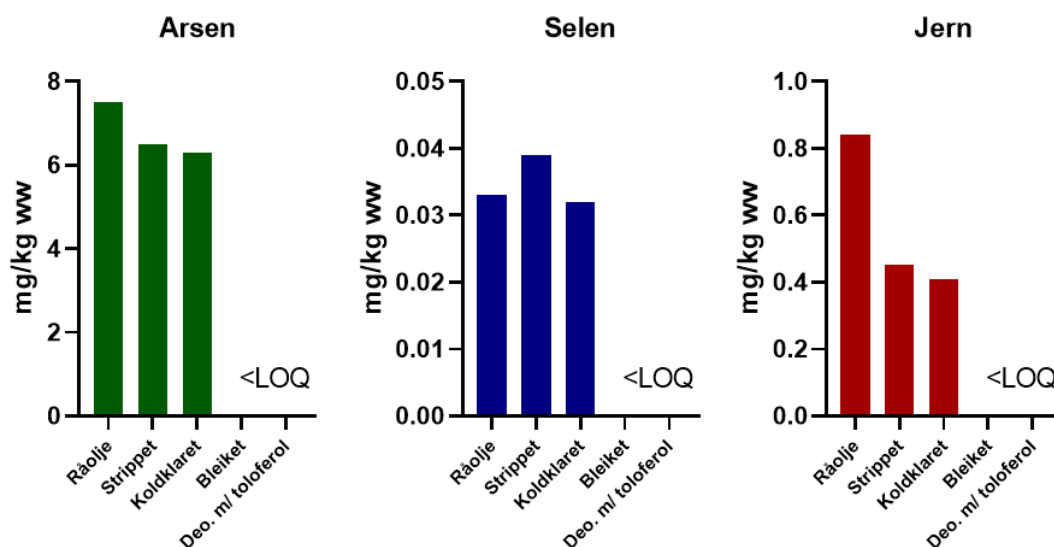


*PCB-28, PCB-52 and PCB-101 <LOQ.

Figur 1: Konsentrasjoner av sum PCB6 (PCB-28, 52, 101, 138, 153 og 180) i råolje ekstrahert fra makrell restråstoff og i alle fraksjoner frem til ferdig raffinert makrellolje. Sum PCB6 ble kalkulert ved bruk av upperbound og lowerbound LOQ.

2.2 Tungmetaller, spormetaller og grunnstoff

Marine oljer til humant konsum har etablerte grenseverdier for kvikksølv, kadmium og bly. Nivået av utvalgte tungmetaller, i tillegg til en rekke grunnstoff og spormetaller ble målt med induktivt koblet plasma- massespektrofotometri (ICP-MS). Det er ikke vanlig å finne verdier over grenseverdiene for disse tungmetallene i marine oljer til humant konsum. Nivået av kvikksølv, kadmium og bly var under LOQ i alle fraksjonene av makrelloljen. Det samme var tilfellet for kobber, sink, kobolt, mangan, vanadium, molybden, tinn, krom, nikkel, barium, strontium og yttrium. Figur 2 viser konsentrasjonene av arsen, selen og jern i råoljen, strippet olje og koldklartet olje. Blekeprosessen medførte en kraftig reduksjon i konsentrasjonen av arsen, selen og jern, og var under LOQ i alle fraksjonene etter dette.



Figur 2: Konsentrasjonen av arsen, selen og jern målt i råolje og alle fraksjonene frem til ferdig raffinert makrellolje. Konsentrasjonen av tungmetallene kvikksølv, kadmium og bly var under LOQ i alle fraksjonene av oljene.

2.3 Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH-er)

PAH-er forekommer i miljøet og er et resultat av utslipp fra industrien og ulike forbrenningsprosesser. Utslipp fra industrien i fjordområder har resultert i at marine organismer har bli forurenset. Det er hovedsakelig skjell som er mest utsatt, siden skjell har liten evne til å bryte ned og skille ut PAH-er. PAH-er kan også oppstå ved prosessering av mat ved høye temperaturer. Et høyt inntak av PAH-er kan være toksisk, kreftfremkallende og forårsake ulike biokjemiske forstyrrelser. Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA) har beregnet PAH inntaket i ulike land i Europa, inkludert Norge. Beregningen til EFSA viser at gjennomsnittlig inntak i Norge var høyere en medianen sammenlignet med de andre 16 andre europeiske landene. Matvaren som hadde størst bidrag i Norge var kornvarer og sjømat. Sjømat hadde et høyt bidrag basert på Norges høye fiskekonsum.

EU har fastsatt en grenseverdi for PAH4 (sum av benz[a]anthracen, benzo[a]pyren, benzo[b]fluoranten og krysene). Tabell 2 viser konsentrasjonene av PAH4 i råolje og alle fraksjonene fram til ferdig raffinert makrellolje. Våre data viser at alle kvantifiserte PAH4 var under deteksjonsgrensen i alle fraksjoner av makrelloljen.

Tabell 2. Konsentrasjonen av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) i råolje og alle fraksjonene frem til ferdig raffinert makrellolje.

PAH ($\mu\text{g}/\text{kg ww}$)	Råolje	Strippet	Koldklaret	Bleiket	Deo. m/tokoferol
Benz(a)anthracene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(a)pyrene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(b)fluoranthene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(c)fluorene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(ghi)perylene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(j)fluoranthene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Benzo(k)fluoranthene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Chrysene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Cyclopenta(cd)pyrene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Dibenz(ah)anthracene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Dibenzo(a,e)pyrene	< 3,3	< 3,3	< 3,6	< 3,7	< 3,6
Dibenzo(a,h)pyrene	< 3,3	< 3,3	< 3,6	< 3,7	< 3,6
Dibenzo(a,i)pyrene	< 3,3	< 3,3	< 3,6	< 3,7	< 3,6
Dibenzo(a,l)pyrene	< 3,3	< 3,3	< 3,6	< 3,7	< 3,6
Indeno(1,2,3,-cd)pyrene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
5-methylchrysene	< 0,67	< 0,66	< 0,73	< 0,75	< 0,71
Sum PAH4 (UB)	2,7	2,6	2,9	3,0	2,8
Sum PAH4 (MB)	1,3	1,3	1,5	1,5	1,4
Sum PAH4 (LB)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

2.4 Fettsyresammensetning og omega-3 fettsyrer (EPA og DHA)

Makrell fiskes mange steder i verden og fettsyresammensetningen varierer med lokalisasjon, hvor og data tyder på at kaldt vann øker mengden flerumettede fettsyrer. Tabell 3 viser fettsyresammensetningen (mg/g) i råolje og i alle fraksjoner gjennom raffineringprosessen til ferdig raffinert makrellolje.

Fettsyresammensetningen i oljen endres marginalt gjennom raffineringprosessen. Molekylær destillasjon (stripping) reduserer mengden mettet fett fra 203 til 185 mg/g, og fettsyrene som reduseres mest er 14:0, 16:0 og 18:0. Et resultat av lavere nivå mettet fett er at mengden flerumettet fettsyrer oppkonsentreres fra 285 til 297 mg/g. Fettsyrene som oppkonsentreres mest er omega-3 (n-3) fettsyrene eicosapentaensyre (EPA) 20:5n-3 og docosaheksaensyre (DHA) 22:6n-3. Dette gjenspeiles også i n-3:n-6 ratioen som øker fra 11,6 to 12,1 gjennom raffineringprosessen. Mengden erukasyre 22:1 n-9 og ketolinsyre 22:1n-11 er forholdsvis stabil gjennom raffineringprosessen.

Tabell 3: Fettsyresammensetning i råolje og alle fraksjonene frem til ferdig raffinert makrellolje.

Fettsyrer (mg/g ww)	Råolje	Strippet	Koldklaret	Bleiket	Deo. m/ tokoferol
14:0	63,9	57,1	57,4	60,8	57,9
15:0	3,7	3,0	3,5	3,3	3,4
16:0	114,1	101,3	101,9	105,9	102,8
17:0	2,3	6,2	2,3	2,1	2,1
18:0	17,4	15,6	15,59	15,8	15,6
20:0	1,4	1,4	1,5	1,5	1,3
16:1n-7	33,4	34,3	34,9	36,1	35,3
16:1n-9	2,9	2,8	2,9	2,8	2,8
16:2n-4	2,5	2,5	2,3	2,8	2,5
16:4n-3	8,9	8,5	10,7	9,6	10,5
18:1n-11	3,0	3,0	3,4	3,0	3,1
18:1n-9	86,7	88,1	87,3	91,1	89,7
18:2n-6	13,6	13,4	13,5	13,9	14,0
18:3n-3	11,0	11,5	11,3	11,7	11,4
18:4n-3	35,3	38,5	37,6	38,6	37,1
20:1n-9	76,0	77,1	76,7	78,4	78,1
20:1n-11	5,6	5,0	6,0	5,9	6,1
20:2n-6	2,0	2,0	1,8	1,8	1,6
20:4n-3	8,8	9,7	8,7	9,7	9,3
20:4n-6 (ARA)	5,3	5,4	5,6	5,6	5,4
20:5n-3(EPA)	73	76	77	77	77,1
22:1n-9	13,2	12,0	12,5	12,6	14,1
22:1n-11	135,1	132,1	132,3	132,1	133,4
22:5n-3 (DPA)	10,9	11,5	12,6	12,2	12,0
22:5n-6	1,4	1,8	1,8	1,6	1,7
22:6n-3 (DHA)	105,0	109,0	109,0	109,0	110,4
24:1n-9	8,0	6,9	7,5	6,7	7,1
24:5n-3	2,9	3,3	3,1	3,2	3,0
24:6n-3	1,0	1,2	1,1	1,2	1,2
Sum mettet	203	185	182	184	183
Sum enumettet	385	380	381	391	391
Sum flerumettet	285	297	297	303	301
Sum EPA + DHA	178	186	186	188	187
Sum n-3	260	272	272	277	275
Sum n-6	22,4	22,5	22,7	22,9	22,7
n3/n-6	11,6	12,1	12,0	12,1	12,1
Sum fettsyrer	896	881	884	906	900

Triglyserider og fosfolipider har små forskjeller i form og struktur. Mennesker og de fleste dyr kan syntetisere nok fosfolipider selv og vi er derfor ikke avhengige av at dette blir inntatt via kosten. Innholdet av fosfolipider i fisk varierer betydelig avhengig av fiskeart og hvilket organ man undersøker. Vi har her kartlagt hvor stor andel av n-3 fettsyrene som foreligger som nøytral fraksjon (triglyserid) og fosfolipid fraksjon. Tabell 4 og tabell 5 viser fettsyresammensetning i nøytral- og fosfolipid fraksjon fra råolje og alle fraksjoner fram til ferdig raffinert makrellolje. n-3 andelen fra nøytral fraksjon utgjør størstedelen av det totale fettene i oljene, og fettsyrene i både nøytral og fosfolipid fraksjon holder seg forholdsvis stabilt gjennom raffineringprosessen. Andelen av n-3 fettsyrer i fosfolipid fraksjonen utgjør kun 0,68 % i den ferdige raffinert makrelloljen, noe som er forholdsvis lavt.

Tabell 4. Fettsyresammensetning i nøytrale lipider i råolje og alle fraksjonene frem til ferdig raffinert makrellolje.

Fettsyrer (mg/g ww) Nøytrale lipider	Råolje	Strippet	Koldklarnet	Bleiket	Deo. m/ tokoferol
14:0	69,39	63,58	63,83	64,15	62,56
15:0	3,73	3,24	3,43	3,50	3,06
16:0	124,15	110,94	113,15	115,54	110,62
17:0	2,40	1,81	2,29	1,76	1,72
18:0	17,35	16,30	15,36	15,88	14,56
20:0	1,44	1,59	1,34	1,57	1,48
16:1n-7	34,91	37,10	37,01	36,47	35,95
16:1n-9	2,61	2,53	2,47	1,97	2,24
16:2n-4	1,09	1,52	1,20	1,37	1,43
16:4n-3	15,26	20,52	17,56	20,14	14,30
18:1n-11	2,78	2,86	2,95	3,03	2,44
18:1n-9	93,97	98,40	97,81	101,55	97,01
18:1n-7	21,81	21,79	24,16	23,28	20,09
18:2n-6	15,12	16,00	15,37	16,41	15,93
18:3n-6	1,23	1,32	1,22	1,27	1,16
18:3n-3	12,63	12,31	13,28	13,94	13,15
18:4n-3	42,52	44,74	43,73	47,79	43,96
20:1n-11	4,94	4,95	5,13	5,08	5,06
20:1n-9	88,73	88,53	89,17	92,55	89,86
20:1n-7	3,69	3,55	3,79	4,43	3,21
20:2n-6	1,93	2,26	1,70	2,24	2,08
20:3n-6	1,03	0,90	1,05	1,14	1,19
20:4n-6 (ARA)	5,76	6,07	5,94	6,33	5,85
20:4n-3	10,31	10,48	10,61	11,17	10,57
20:5n-3 (EPA)	77,34	81,16	79,11	86,07	79,80
21:5n-3	5,56	5,62	5,70	5,92	5,71
22:1n-11	133,30	124,55	126,85	126,45	126,60
22:1n-9	20,40	34,06	23,13	30,30	24,45
22:5n-6	2,19	1,35	2,49	2,40	1,93
22:5n-3	12,79	13,83	13,65	14,75	13,96
22:6n-3 (DHA)	110,10	118,27	112,43	127,95	116,83
24:1n-9	6,85	4,91	5,20	6,14	6,40
24:5n-3	3,38	3,44	3,38	3,52	3,44
24:6n-3	1,32	1,37	1,32	1,51	1,45
Sum mettet	220	198	200	203	195
Sum enumettet	415	424	418	432	414
Sum flerumettet	321	343	331	365	334
Sum EPA + DHA	187	199	192	214	197
Sum n-3	292	312	301	333	304
Sum n-6	27,5	27,9	28,1	30,0	28,5
n-3/n-6	10,6	11,2	10,7	11,1	10,7
Sum fettsyrer	972	988	965	961	967

Tabell 5. Fettsyresammensetning i polare lipider i råolje og alle fraksjonene fram til ferdig raffinert makrellolje.

Fettsyrer (mg/g ww) Polare lipider	Råolje	Strippet	Koldklarnet	Bleiket	Deo. m/ tokoferol
14:0	0,56	0,46	0,47	0,48	0,47
15:0	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
16:0	1,06	0,84	0,82	0,87	0,84
17:0	0,03	0,06	0,06	0,07	0,05
18:0	0,17	0,16	0,13	0,16	0,12
16:1n-9	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
16:1n-7	0,29	0,28	0,27	0,29	0,27
16:2n-4	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03
18:1n-11	0,04	0,03	0,05	0,04	0,03
18:1n-9	0,75	0,74	0,66	0,73	0,74
18:1n-7	0,20	0,17	0,17	0,17	0,17
18:2n-6	0,11	0,11	0,09	0,10	0,09
18:3n-3	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11
20:1n-11	0,07	0,06	0,01	0,04	0,05
20:1n-9	0,71	0,63	0,49	0,61	0,60
20:1n-7	0,11	0,08	0,07	0,09	0,06
18:4n-3	0,36	0,39	0,36	0,36	0,32
20:4n-6	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
22:1n-11	1,07	0,90	0,75	0,92	0,89
22:1n-9	0,24	0,20	0,20	0,20	0,28
20:4n-3	0,10	0,09	0,08	0,08	0,09
20:5n-3 EPA	0,64	0,59	0,47	0,61	0,57
21:5n-3	0,05	0,09	0,05	0,05	0,04
24:1n-9	0,06	0,06	0,05	0,05	0,03
22:5n-6	0,03	0,02	<0,01	<0,01	<0,01
22:5n-3	0,13	0,12	0,07	0,10	0,10
22:6n-3 DHA	0,95	0,92	0,65	0,80	0,84
Sum mettet	1,98	1,71	1,64	1,79	1,67
Sum enumettet	3,62	3,22	2,60	3,16	3,17
Sum flerumettet	2,61	2,53	1,95	2,31	2,24
Sum EPA + DHA	1,59	1,51	1,12	1,40	1,41
Sum n-3	2,36	2,31	1,78	2,11	2,08
Sum n-6	0,204	0,183	0,142	0,156	0,138
n-3/n-6	11,6	12,6	12,5	13,5	15,0
Sum fettsyrer	8,37	7,55	7,62	7,14	7,40

2.5 Fettløselige vitaminer

De fettløselige vitaminene A, D og E ble analysert i alle fraksjoner av makrelloljen. Tabell 6 viser konsentrasjonen av vitaminene i de ulike fraksjonene av oljen. Vitamin A1 og A2 innholdet i råolje var 45 og 6 mg/g og holdt seg stabilt til blekeprosessen. I bleiket og den ferdig raffinerte makrelloljen var vitamin A1 og A2 nivået under LOQ.

Innholdet av vitamin D er 0,41 mg/kg i råolje og ble noe oppkonsentrert i strippeprosessen. Etter blekeprosessen reduseres nivået til 0,04 mg/kg og i den ferdige raffinerte oljen er nivået 0,02 mg/kg.

Tokoferoler og tokotrienoler klassifiseres inn under vitamin E. Åtte ulike former av vitamin E ble kvantifisert i alle fraksjonene av oljen. I råoljen ble alle 4 variantene av tokoferol detektert. Strippeprosessen reduserte nivået av alle tokoferolene, hvor beta-, gamma- og delta-tokoferol var under LOQ. I ferdig raffinert makrellolje tilsettes tokoferol og nivåene var 210, 21, 750 og 310 mg/g av henholdsvis alfa-, beta-, gamma- og delta-tokoferol. Tokoferol tilsettes som antioksidant i den ferdige oljen for å forhindre harskning og gjør at oljen holder seg fersk lenger.

Tabell 6: Konsentrasjonen av fettløselige vitaminer målt i råolje og alle fraksjonene fram til ferdig raffinert makrellolje. Konsentrasjonene er oppgitt i mg/kg ww.

Vitaminer (mg/kg)	Råolje	Strippet	Koldklaret	Bleiket	Deo. m/tokoferol
Vitamin A1	45	47	51	<0,003	<0,003
Vitamin A2	6	6	7	<0,005	<0,005
Vitamin D	0,41	0,52	0,56	0,04	0,02
Vitamin E	199	72	64	94	210
(α -tokoferol)					
Vitamin E	15,2	<0,04	<0,04	<0,04	21
(β -tokoferol)					
Vitamin E	540	<0,04	<0,04	<0,04	750
(γ -tokoferol)					
Vitamin E	220	<0,04	<0,04	<0,04	310
(δ -tokoferol)					

*Vitamin E (alfa, beta, gamma og delta-tokotrienol) var under deteksjonsgrensen i alle oljene.

2.6 Oksidasjon og sensoriske parametere

Fiskeoljer har et høyt innhold av lange n-3 fettsyrer og er derfor utsatt for oksidasjon. Oksidasjonsgraden av oljene ble kartlagt ved å måle mengden frie fettsyrer (FFA), peroksidtall (PV) og anisidintall (AnT). Fettet forekommer hovedsakelig i form av triglyserider som er lagringsformen for fett. Ved enzymatisk oksidasjon (hydrolyse) av disse triglyseridene dannes frie fettsyrer. Ved å analysere innholdet av frie fettsyrer kan en få et mål på hvor langt hydrolysen er kommet og få en indikasjon på hvor mye oljen er oksidert. PV er en parameter for primære oksidasjonsprodukt i fett og oljer (harskning) [1]. AnT er en harskningsparameter for sekundære oksidasjonsprodukt i fett og oljer [2]. AnT bestemmes ved at aldehyder løst i eddiksyre reagerer med p-Anisidin og danner et farget kompleks som lar seg måles med spektrofotometri.

I henhold til The global organization for EPA & DHA Omega-3 (GOED) sine anbefalinger for marine oljer til konsum skal Pv-verdien ikke overstige 5 og AnT ikke overstige 20. Tabell 7 viser FFA, PV, AnT og smaksegenskaper i alle fraksjoner av makrelloljen. Råoljen hadde Pv-verdi på 13,74 noe over GOED sin anbefaling. Strippet-, koldklaret-, bleiket- og deodorisert makrellolje med antioksidant har alle Pv og AnT verdier innenfor GOED sine anbefalinger.

Tabell 7: Frie fettsyrer (FFA), peroksidtall (Pv), anisidintall (AnT), kvalitetskontroll (QCT) og smaksegenskaper i råolje og fraksjonene fram til ferdig raffinert makrellolje.

Produkt	FFA	Pv	AnT	Smaksegenskaper
Råolje	0,71+/- 0,00	13,74+/- 0,02	10,23+/- 0,31	Harsk, fermentert smak
Strippet	0,08+/- 0,00	3,55+/- 0,03	7,04+/- 0,09	
Koldklaret	0,09+/- 0,01	3,35+/- 0,04	7,47+/- 0,09	
Bleiket	0,07+/- 0,00	1,75+/- 0,06	1,31+/- 0,00	
Deo. m/tokoferol	0,07+/- 0,00	1,40+/- 0,12	3,00+/- 0,07	Kjemisk avvikende smak

Råoljen var blakket på farge og hadde en ganske tyktflytende konsistens sammenlignet med de raffinerte oljene. Oljen hadde en kraftig harsk og fermentert smak og ble av enkelte av dommerne beskrevet som rått fisk. De resterende dommerne i panelet ga ingen beskrivelse av oljen. Sensorisk ble deodorisert makrellolje tilsatt tokoferol (ferdig raffinert makrellolje) vurdert med noe mer avvikende smak enn en tradisjonell torskeleverolje. Smaksbildet på makrelloljen var annerledes og panelet syntes det minnet om en olje fra planterike, men med en kjemisk smak i bunn som trakk ned. Raffinert makrellolje fikk en totalsum på $3,16 \pm 0,6$ av totalt 5, og oljen ble derfor vurdert som handelsvare av panelet basert på GOED sine anbefalinger for marine oljer.

3 Næringsinnhold og helseeffekter av raffinert makrellolje i dietten

Organisasjonen for økonomisk samarbeid og utvikling (OECD) har utarbeidet egne retningslinjer for å test kjemikalier og produkter i forsøksdyr [3]. Retningslinjene tar utgangspunkt i 90 dagers oral eksponering. Produktet som skal testes skal gis i flere doser og skal gi informasjon om toksiske effekter, og vil i tillegg gi informasjon om estimert nivå for høyeste eksponeringsnivå uten observerte negative effekter. Det er ønskelig at dyrene skal være i et stadium før de er fullvoksne og i vekst. Vi benyttet oss av dyremodellen C57BL/6N mus. Dyrene var åtte uker ved ankomst og de ble gitt makrellolje i en standard diett (SD) og vestlig diett (WD) i 13 uker. Raffinert makrellolje ble gitt i tre doser til dyrene som fikk en SD, 30, 60 eller 90 gram per kilo diett. Dyrene som ble gitt en WD fikk 30 eller 60 gram raffinert makrellolje per kilo diett. Alle diettene var balanserte med hensyn til fett, protein, karbohydrat og energiinnhold. Underveis i forsøket ble kroppsvekt og fôrintak registrert, og etter 12 uker på diett ble det gjennomført en glukosetoleransetest. Ved avlivning ble lever, nyre, milt, fettvev og muskelvev dissekert ut og veid. I tillegg ble det tatt blodprøver for videre analyser. Tabell 8 og tabell 9 viser de viktigste fysiologiske dataene fra dyreforsøket med raffinert makrellolje innblandet i en SD og en WD.

Tabell 8: Fysiologisk data fra dyreforsøk hvor mus ble gitt en standard diett (SD) eller en SD med makrellolje (MO) innblandet.

Fysiologiske data	Standard diett (SD)	SD 30g (MO) makrellolje	SD 60g MO	SD 90g MO
Makrellolje tilsatt (g per kg diet)	-	30	60	90
Kroppsvekt ved terminering (g)	44,9 ± 0,7	45 ± 0,6	45,7 ± 0,8	45 ± 2
Vektøkning (g)	19,5 ± 0,7	19,4 ± 0,7	20 ± 0,9	20 ± 0,6
Energiinntak (kcal/uke)	108 ± 1	107 ± 2	108 ± 4	107 ± 2
Levervekt (g)	2 ± 0,2	2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2 ± 0,1
Lever-skår	2	2,4	2,22	2,10
ALAT (U/L) - plasma	115 ± 21	130 ± 16	142 ± 38	102 ± 25
ASAT (U/L) - plasma	216 ± 30	242 ± 22	214 ± 33	185 ± 24
Vekt nyrer (g)	0,35 ± 0,08	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,02 (#)
Kreatinin (mg/dl) - plasma	7 ± 0,6	6,8 ± 0,8	6 ± 0,5	5,8 ± 0,7
Milt (g)	0,091 ± 0,004	0,097 ± 0,002	0,116 ± 0,01(#)	0,121 ± 0,009(#)
eWAT (g)	2,547 ± 0,05	1,962 ± 0,1	1,849 ± 0,1(#)	1,712 ± 0,1(#)
Fastene blodglukose (mmol/l)	8 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,4 ± 0,4	7,8 ± 0,4
AUC glukosetoleranse	1505 ± 57	1590 ± 57	1520 ± 58	1633 ± 115

(#) markerer statistikk signifikant forskjell fra gruppen gitt standard diett (SD).

Tabell 9: Fysiologisk data fra dyreforsøk hvor mus ble gitt en vestlig diett (WD) eller en WD med makrellolje (MO) innblandet.

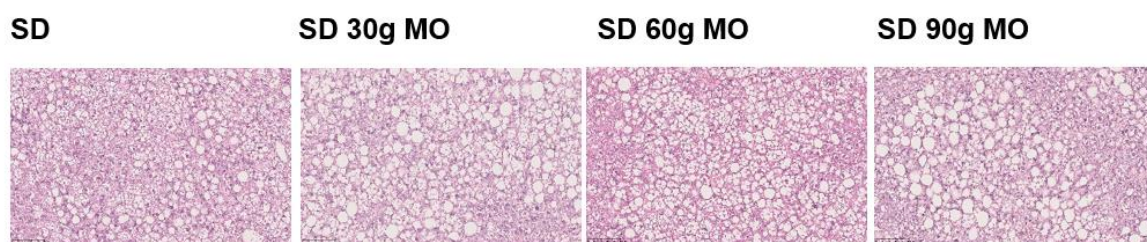
Fysiologiske data	Vestlig diett (WD)	WD 30g (MO) makrellolje	WD 60g MO
Makrellolje tilsatt (g per kg diet)	-	30	60
Kroppsvekt ved terminering (g)	45,6 ± 0,9	48,8 ± 0,7(#)	48,4 ± 0,7(#)
Vektøkning (g)	20 ± 1	22 ± 0,8	22,6 ± 0,7
Energiinntak (kcal/uke)	111 ± 2	114 ± 1	119 ± 2(#)
Levervekt (g)	2,4 ± 0,3	3,3 ± 0,2 (#)	3,1 ± 0,2
Lever-skår	2,22	2,47	2,73
ALAT (U/L) - plasma	160 ± 44	231 ± 56	193 ± 35
ASAT (U/L) - plasma	261 ± 51	248 ± 21	251 ± 41
Vekt nyrer (g)	0,38 ± 0,004	0,392 ± 0,009	0,378 ± 0,007
Kreatinin (mg/dl) -plasma	7,4 ± 0,9	7,0 ± 0,4	6,83 ± 0,5
Milt (g)	0,095 ± 0,004	0,104 ± 0,006	0,119 ± 0,008(#)
eWAT (g)	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,9 (#)	2,1 ± 0,08
Fastene blodglukose (mmol/l)	7,9 ± 0,7	8,9 ± 0,3(#)	9,1 ± 0,4(#)
AUC glukosetoleranse	1605 ± 58	1836 ± 120(#)	1776 ± 115(#)

(#) markerer statistikk signifikant forskjell fra gruppen gitt vestlig diett (WD).

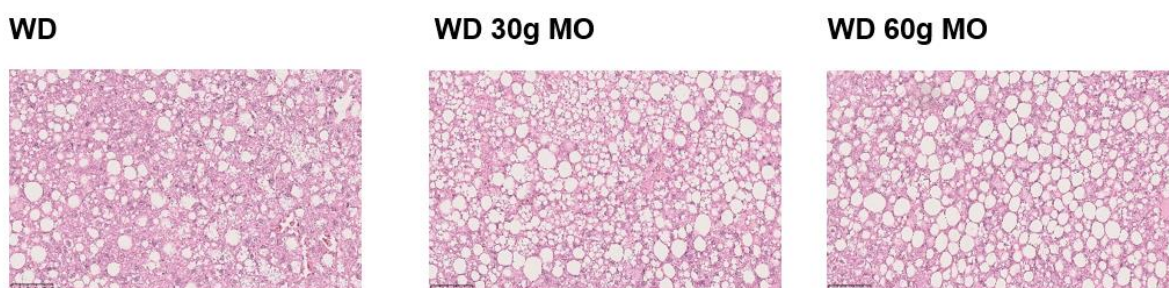
3.1 Fettlever- Ikke alkoholisk fettleversykdom (NAFLD)

Ikke-alkoholisk fettleversykdom (NAFLD) er en tilstand hvor mengden fett i leveren er økt, og det er lite sannsynlig at alkohol er årsaken [4]. NAFLD har tidligere blitt vist å ha en tydelig sammenheng med overvekt og fedme både i dyrestudier og humane studier. Flere studier har vist en sterk sammenheng mellom NAFLD og forhøyet fastende blodglukose og redusert insulinsensitivitet [5, 6].

Figur 3 viser representative histologisnitt fra mus gitt raffinert makrellolje i en SD. En SD medførte liten grad av lipidakkumulering i lever, og mus gitt raffinert makrellolje (30, 60 eller 90 gram per kilo diett) viste ingen signifikant økning i lipidakkumulering i lever. Levervev fra alle mus i hver gruppe ble vurdert etter et poengbasert system og en lever-skår for hver gruppe ble utregnet, tabell 9. Det var en tendens at mus gitt 30 eller 60 gram raffinert makrellolje i dietten hadde noe høyere gjennomsnittlig lipidakkumulering evaluert fra histologibilder og sum fettsyrer. Figur 4 viser histologisnitt fra lever i mus gitt raffinert makrellolje i en WD. En WD medførte økt lipidakkumulering i lever, og innblanding av raffinert makrellolje (30 eller 60 gram per kilo diett) medførte en ytterligere økning i levervekt og lipidansamling. Årsaken til denne forsterkende effekten på lipidakkumulering i lever av raffinert makrellolje i dietten er ennå ikke kartlagt.



Figur 3: Histologisnitt fra lever i mus gitt en standard diett (SD) eller en SD med 30, 60 eller 90 gram raffinert makrellolje innblandet per kilo diett. Histologibilder fra alle mus ble vurdert og gitt poeng etter en standardisert protokoll.



Figur 4: Histologisnitt fra lever i mus gitt en vestlig diett (WD) eller en WD med 30 eller 60 gram raffinert makrellolje (MO) innblandet per kilo diett. Histologibilder fra alle mus ble vurdert og gitt poeng etter en standardisert protokoll.

3.2 Fastende blodglukose og glukoseregulering

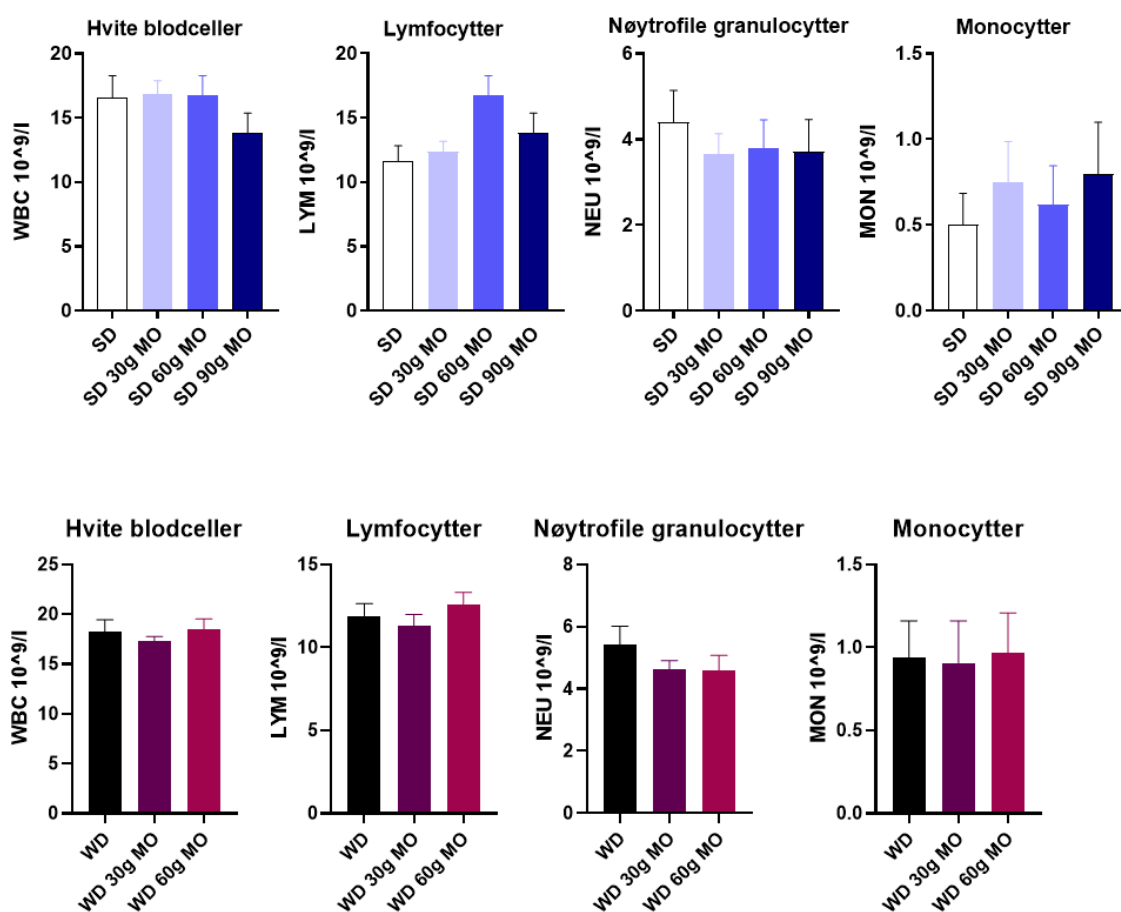
Fastende blodglukose ble målt i alle forsøksdyr før det ble gjort en glukosetoleranse test. Ingen signifikant endring i fastende blodglukose eller blodglukoseregulering, ved en glukosetoleranse test, ble observert i mus gitt raffinert makrellolje i en SD, tabell 8. Mus gitt raffinert makrellolje i en WD viste signifikant høyere fastende blodglukose og areal under kurve (AUC) på glukosetoleranse test sammenlignet med WD kontrollgruppen, tabell 9.

3.3 Markører for leverskade

Alanin aminotransferase (ALAT) er en transaminase som frigjøres fra levercellene ved inflammasjon eller celledskade. Lett forhøyede verdier sees ved mindre leverskader, mens kraftig forhøyede verdier sees ved toksiske og akutte effekter. Aspartat aminotransferase (ASAT) kan stamme fra hjertemuskel og skjelettmuskel, og måles ofte sammen med ALAT. Våre data viser ingen signifikant økning i plasma ALAT og ASAT verdier etter 13 uker med raffinert makrellolje i dietten (tabell 8 og 9) og indikerer at det ikke er noe levertoksisk effekt av raffinert makrellolje i dietten.

3.4 Ingen endring i inflammasjonsstatus

Det er tidligere vist at langkjedede n-3 fettsyrer kan ha en antiinflammatorisk og triglyserid reduserende effekt [7, 8]. Det er mindre kartlagt om langkjedede n-3 fettsyrer har en effekt mot lavgradig inflammasjon som ofte sees ved metabolsk syndrom og fedme. Tidligere studier viser små forskjeller i lavgradig inflammasjonsstatus ved inntak av langkjedede n-3 fettsyrer, og flere studier viser en større sammenheng mellom inflammasjonsstatus og kroppsmasseindeks (KMI) enn effekten av inntak av n-3 fettsyrer. Data fra dette forsøket viser ingen endring i inflammasjonsstatus ved inntak av raffinert makrellolje. Vi stimulerte en inflammatorisk respons i halvparten av musene gitt en WD med lipopolysakkarid (LPS), men ingen effekt på inflammasjonsmarkører i plasma ble observert (figur 5).



Figur 5: Hematologiske analyser i fullblod etter 13 uker med makrellolje i en standard diett (SD) og vestlig diett (WD). Alle resultater er oppgitt som gjennomsnitt ± standardfeil.

3.5 Ukentlig tolerabelt inntak (TWI) av dioksin og dioksinlignende PCB

Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA) sin nye risikovurdering fra 2018 senket TWI for dioksin og dioksinlignende-PCB fra 14 til 2 pg TEQ/kg kroppsvekt/uke. Fisk, sjømat, kjøtt, egg og meieriprodukter utgjør de største kildene til den totale eksponeringen av dioksin og dioksinlignende-PCB fra mat ifølge EFSA [9]. Makrellfilet har forholdsvis høyt nivå av dioksin og dioksinlignende-PCB, og mattilsynet har bedt vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM) om en risikovurdering for inntak av dioksiner og dioksinlignende PCB fra marine oljer. Eksponering av dioksin og dioksinlignende PCB ble i vårt fôringsforsøk regnet ut etter forsøkets slutt og er oppsummert i tabell 9. Inntak av 90 g makrellolje per kilo fôr ga en gjennomsnittlig eksponering på 2,22 pg per kilo kroppsvekt per dag. Det er noe over EFSA sin nye anbefaling, men det anses som meget lite sannsynlig at 9 prosent av kostholdet til en voksen person skal komme fra raffinert makrellolje. Diettene tilsatt 30 og 60 g makrellolje per kilo diett medførte en eksponering lavere enn TWI.

Tabell 10: Dioksin og dioksinlignende PCB eksponering fra raffinert makrellolje gjennom føringsforsøket.

Diettgruppe:	Standard diett (SD)	SD 30g makrellolje (MO)	SD 60g MO	SD 90g MO
Ukentlig inntak av dioksin og dioksin-lignende PCB pg/kg kroppsvekt/uke	-	0,74	1,48	2,22
# Tolerabelt ukentlig inntak (TWI) 2 pg/kg kroppsvekt/uke				
Diettgruppe:	(Vestlig diett) WD	WD 30g MO	WD 60g MO	
Ukentlig inntak av dioksin og dioksin-lignende PCB pg/kg kroppsvekt/uke	-	0,72	1,45	
# Tolerabelt ukentlig inntak (TWI) 2 pg/kg kroppsvekt/uke				

3.6 Tolerabelt daglig inntak (TDI) av erukasyre

Erukasyre (22:1n-9) er en langkjedet flerumettet fettsyre som finnes naturlig i ulike matvarer. Høyeste innhold av erukasyre finner man i matvarer tilsatt store mengder rapsolje, og undersøkelser humant viser at matvarene med det høyest bidraget til erukasyre er kjeks og bakerverer [10]. Fisk og sjømat er også en naturlig kilde til erukasyre, men det totale bidraget er ansett å være betydelig lavere. Innholdet av erukasyre i ulike fiskearter har blitt kvantifisert, og innholdet i makrellfilet er en av fiskeartene med høyest innhold av erukasyre. Det høyeste innholdet av erukasyre ble funnet i lever fra torsk og sei [11].

EFSA har evaluert inntak av erukasyre i forhold til helseeffekter i dyr og mennesker. Det er spesielt myocardial lipidose (økt fettakkumulering rundt hjertet) som er ansett som den mest kritiske effekten av erukasyre inntak. EFSA sin vurdering baserer seg på ulike dyrestudier og har etablert et tolerabelt daglig inntak på 7 mg/kg kroppsvekt.

Tidligere studier har vist at rotter gitt en diett med høyt innhold av erukasyre utviklet økt lipidakkumulering i lever [10]. Eksponering av erukasyre ble i vårt føringsforsøk regnet ut etter forsøkets slutt og er oppsummert i tabell 11. Basert på våre utregninger er det gjennomsnittlig daglige inntaket av erukasyre betydelig høyere enn anbefalingen fra EFSA på 7 mg/kg kroppsvekt/dag i alle de eksperimentelle gruppene gitt makrellolje i dietten.

Tabell 11: Inntak av erukasyre fra raffinert makrellolje i dietten gjennom føringsforsøket.

Diettgruppe:	Standard diett (SD)	SD 30g makrellolje (MO)	SD 60g MO	SD 90g MO
Daglig inntak av erukasyre mg/kg kroppsvekt/dag	0	39,4	79,3	117,7
# Tolerabelt daglig inntak (TDI) 7 mg/kg kroppsvekt/dag				
Diettgruppe:	(Vestlig diett) WD	WD 30g MO	WD 60g MO	
Daglig inntak av erukasyre mg/kg kroppsvekt/dag	0	39,3	82,2	
# Tolerabelt daglig inntak (TDI) 7 mg/kg kroppsvekt/dag				

3.7 Helseeffekter av omega-3 fettsyrer

Fisk og sjømat er en god kilde til mange viktige næringsstoffer, deriblant marine n-3 fettsyrer, proteiner, vitamin D, vitamin B12, selen og jod. De fleste dokumenterte positive helseeffektene av å spise sjømat blir relatert til innholdet av de marine n-3 fettsyrene EPA, dokosapentaensyre (DPA) og DHA. Fet fisk og fiskeoljer er hovedkilden til marine n-3 fettsyrer i kosten til den norske befolkningen. Mager fisk og magre fiskeprodukter bidrar også med n-3 fettsyrer, men i betydelig mindre grad enn fet fisk. Helsedirektoratet sitt kostråd tilsvarer et inntak på totalt 300–450 gram ren fisk i uken, hvor minst 200 gram bør være fet fisk [12]. Det har vært en stor nedgang i fiskeinntaket over tid, og forbruket er redusert med 10 prosent fra 2016–2017 [13]. Helsedirektoratet mener fiskeinntaket er lavere enn ønskelig. Nasjonale undersøkelser viser at inntaket av fisk er svært lavt i de yngre aldersgruppene. I nasjonal handlingsplan for bedre kosthold er det et overordnet mål om 20 prosent økning i andelen unge som spiser fisk til middag minst en gang i uken og i andelen unge som spiser fiskepålegg minst tre ganger i uken.

3.8 Endret fettsyresammensetning i lever

Konsentrasjonen av n-3 fettsyrer i plasma, røde blodceller og vev reflekterer i stor grad mengden n-3 fettsyrer inntatt. Plasmanivået refererer i større grad nylig inntak, mens vevsnivåene av fettsyrene reflekterer mer langsiktig inntak [14, 15]. Nivået i de røde blodcellene gjenspeiler i størst grad nivået man finner i vev, og reflekterer derfor langsiktig inntak [16].

Tabell 12 viser innholdet av EPA og DHA i de eksperimentelle diettene og innholdet av omega-3 fettsyrer presentert som prosentandel av energiinntaket. Det foreligger ikke en norsk anbefaling i forhold mengde marine omega-3 fettsyrer man bør innta, men nordiske anbefalinger om fett og fettsyrer (NNR 2012) anbefaler at omega-3 fettsyrer bør utgjøre minst 1% av det totale energiinntaket.

Tabell 12: EPA og DHA innhold i de eksperimentelle diettene og innholdet av omega-3 fettsyrer presentert som energiprosent (E%).

Diettgruppe:	Standard diett (SD)	SD 30g makrellolje (MO)	SD 60g MO	SD 90g MO
EPA	<0,01	2,07	3,88	5,54
DHA	<0,01	0,37	0,71	1,0
Omega-3 innhold (E%)	0,43	2,00	3,41	4,75

Diettgruppe:	(Vestlig diett) WD	WD 30g MO	WD 60g MO
EPA	<0,01	2,07	4,36
DHA	<0,01	0,43	0,82
Omega-3 innhold (E%)	0,63	2,01	3,68

Tabell 13 og 14 oppsummerer fettsyresammensetningen i leveren til mus gitt raffinert makrellolje i dietten. Som forventet økte mengden EPA og DHA i leveren hos dyrene gitt raffinert makrellolje. En standard diett tilsatt høyeste mengde makrellolje (90 g per kilo diett) medførte en økning til 19,8 mg EPA og DHA per gram lever. Vi så en gradvis økning i EPA og DHA nivåer i leveren ved høyere mengde makrellolje innblandet i dietten. Dette er i samsvar med tidligere studier og viser en tydelig endret fettsyresammensetning selv ved laveste innhold av makrellolje i dietten (30 gram per kilo diett). Tabell 13 oppsummerer fettsyresammensetningen i leveren til dyrene gitt raffinert makrellolje i en SD. En lav dose makrellolje i en SD (30 g/kg diett) medførte signifikant høyere nivåer av mettet og enumettet fett i leveren. Fettsyresammensetningen i dyrene gitt 60 g makrellolje per kg diett medførte ingen endring i nivå av mettede, enumettede eller flerumettede fettsyrer sammenlignet med SD kontrollgruppen. Den høyeste dosen raffinert makrellolje (90 g per kg diett) viste signifikant lavere nivåer av mettet, enumettet og flerumettet fett i leveren sammenlignet med kontrollgruppen.

Tabell 14 oppsummerer fettsyresammensetningen i leveren til dyrene gitt raffinert makrellolje i en WD. Raffinert makrellolje i en WD medførte en signifikant økning i mengden EPA og DHA per gram levervev. En lav dose makrellolje i en WD (30 g/kg diett) medførte signifikant høyere nivåer av enumettet og flerumettet fett i leveren. I dyrene gitt 60 g makrellolje så vi en signifikant økning i mengden mettet og enumettet fettsyrer i lever, i tillegg til en økning i mengden EPA og DHA.

Tabell 13: Fettsyresammensetning i lever hos mus gitt standard diett (SD) eller en SD med 30, 60 eller 90 gram raffinert makrellolje (MO) per kilo diett.

Fettsyresammensetning (mg/g)	Standard diett (SD)	SD 30g MO	SD 60g MO	SD 90g MO
Mettet fett	53,3 ± 5,0	67,33 ± 4,4	56,4 ± 8,7	30,45 ± 6,8(#)
Enumettet fett	118,8 ± 12,9	151,0 ± 15,1	121,2 ± 25,5	57,23 ± 8,5(#)
Flerumettet fett	48,13 ± 2,3	53,08 ± 3,1	46,3 ± 3,8	38,37 ± 2,6
EPA+DHA	1,547 ± 0,1	8,875 ± 0,51(#)	14,93 ± 0,8(#)	19,87 ± 0,9(#)

(#) markerer statistikk signifikant forskjell fra gruppen gitt standard diett (SD).

Tabell 14: Fettsyresammensetning i lever hos mus gitt en vestlig diett (WD) eller en WD med 30 eller 60 gram raffinert makrellolje (MO) per kilo diett.

Fettsyresammensetning (mg/g)	Vestlig diett (WD)	WD 30g MO	WD 60g MO
Mettet fett	41,98 ± 1,5	55,78 ± 13,5	59,75 ± 10(#)
Enumettet fett	105,2 ± 11,3	144,2 ± 40,7(#)	119 ± 25,4
Flerumettet fett	27,8 ± 1,7	37,55 ± 3,1(#)	46,55 ± 4,8(#)
EPA+DHA	3,58 ± 0,2	10,65 ± 0,2(#)	19,53 ± 2,0(#)

(#) markerer statistikk signifikant forskjell fra gruppen gitt vestlig diett (WD).

3.9 Makrellolje medfører økt fettfri masse og redusert mengde visceralt fett

Tidligere studier i gnagere har vist at fiskeolje i en høy-fett diett forhindrer en diett påvirket økning i kroppsvekt, fettmasse og levervekt sammenlignet med tradisjonelle oljer og fettkilder [17-19]. Oljer fra ulike fiskearter er benyttet, men ikke alle studiene har spesifisert hvilken fiskeart oljen kommer fra. Generelt er det få studier som har benyttet makrellolje, og vi finner ingen publiserte studier hvor det er benyttet raffinert makrellolje.

Studier i mus har vist at omega-3 fettsyrer i dietten kan påvirke muskelmassen. Den totale muskelmassen påvirkes både av endret proteinnedbrytning [20] og proteinsyntese [21]. Våre data viser ingen signifikant vektøkning i fettfri masse eller tibialis anterior i mus gitt en SD med eller uten raffinert makrellolje. I musene gitt en WD hadde gruppen som fikk høyeste dose makrellolje (60 g per kg diett) signifikant høyere vekt av tibialis anterior. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier som viser at n-3 fettsyrer i dietten kan påvirke muskelmassen, men det er ikke videre kartlagt hva denne økningen skyldes og mekanismen som ligger bak. Det må også undersøkes om denne økning kan skyldes økt lipidakkumulering, som vi ser i lever.

Når det gjelder den totale fettmassen ble det ikke detektert signifikante forskjeller mellom dyrene som fikk raffinert makrellolje og kontrollgruppen. På tross av dette, hadde musene gitt raffinert makrellolje i dietten (60g per kilo diett) en signifikant reduksjon i mengde eWAT, som er et stort visceralt fettdepot (tabell 9).

3.10 Redusert appetitt ved omega-3 fettsyrer i dietten

Tidligere publikasjoner er ikke konkluderende i forhold til om inntak av n-3 fettsyrer i dietten påvirker appetittregulering. Et flertall av studiene konkluderer med at det ikke er noen endring i energiinntaket ved inntak av n-3 supplement i dietten til gnagere [19, 22-27]. Det finnes enkeltstudier som ser noe redusert energiinntak, men også studier der man ser økt energiinntak.

Våre data viser ingen endring i energiinntaket ved inntak av raffinert makrellolje i en SD, uavhengig av mengde makrellolje tilsatt i dietten (tabell 8). Dette er i overensstemmelse med flertallet av studiene gjort med n-3 fettsyrer i gnagere.

Raffinert makrellolje innblandet i en WD viser derimot at musene gitt høyeste dose makrellolje (60 g per kg diett) hadde et signifikant høyere energiinntak sammenlignet med kontrollgruppen. Data fra disse forsøkene viser et økt energiinntak ved å inkludere makrellolje i en WD (tabell 9), men at dette ikke skjer ved en SD. Det kan bety at bakgrunnsdiett kan være noe av forklaringen på de forskjellige resultatene funnet i andre tidligere studier.

3.11 Makrellolje øker fettfordøyeligheten

Tidligere studier har vist at rotter gitt fiskeolje i dietten øker uttrykket av CYP7A1 i lever [28]. CYP7A1 påvirker gallesyre produksjonen som igjen påvirker effektiviteten av fettabsorpsjonen. Raffineringsprosessen reduserer mengden frie fettsyrer, fosfolipider og stearinsyre i makrelloljen. Tabell 15 viser estimert fettutskillelse i feces hos mus gitt en WD og WD med raffinert makrellolje. Økende mengde raffinert makrellolje i dietten medførte en signifikant reduksjon i mengden fett i avføringen til dyrene. At en reduksjon av mengden frie fettsyrer og stearinsyre i makrelloljen redusert ekskresjonen av fett i avføringen er sannsynlig. Om raffinert makrellolje også påvirket gallsyreproduksjonen er ikke undersøkt i denne studien.

Tabell 15: Estimert fettutskillelse (mg/g) i feces hos mus gitt en vestlig diett (WD) eller en WD med 30 eller 60 gram raffinert makrellolje (MO) per kilo diett.

Diettgruppe:	WD	WD 30g MO	WD 60g MO
Estimert fettutskillelse (mg) per gram feces	5,9 ± 0,3	4,1 ± 0,2 (#)	2,6 ± 0,4(#)

(#) markerer statistikk signifikant forskjell fra gruppen gitt vestlig diett (WD).

3.12 Oppsummering: Næringsinnhold og helseeffekter av raffinert makrellolje i dietten

Vi har gjennom våre dyreforsøk ikke sett tegn til akutte toksiske effekter av å gi raffinert makrellolje i en SD eller WD. Selv om vi ikke ser en akutt toksisk effekt, viser våre data at makrellolje i en WD medfører en signifikant økning i kroppsvekt og levervekt. Raffinert makrellolje i diettene medførte også høyere fastende blodglukose og redusert glukosetoleranse sammenlignet med kontrollgruppen. Dette anses som lite hensiktsmessig, og årsaken til denne effekten av raffinert makrellolje i en WD er ikke kartlagt. Selv om mus gitt makrellolje i en vestlig diett har økt levervekt, viser våre biokjemiske data ingen tegn til leverskade (ALAT) eller skade på hjerte- skjelettmuskulatur (ASAT). Vårt datamateriale er begrenset, så flere undersøkelser vil være nødvendig for å kartlegge hvorfor raffinert makrellolje medfører økt levervekt, økt lipidakkumulering i lever og redusert glukosetoleranse i en WD.

Våre data viser at EPA og DHA fettsyrene i makrelloljen påvirker fettsyresammensetning i lever hos forsøksdyrene. Økt EPA og DHA konsentrasjon i levervevet sees i forsøksdyrene i alle grupper gitt raffinert makrellolje i dietten (Tabell 13-14). Generelt viser dataene fra dyrene gitt raffinert makrellolje i en SD ingen endret helseeffekt sammenlignet med kontrollgruppen. Men i motsetning til tidligere studier av fiskeoljer i gnagere ser vi ingen reduksjon i plasmalipid nivå eller lipidinnhold i lever. Hva som er årsaken til disse motstridende resultatene er ikke kartlagt, men mulige årsaker kan være et høyt

innhold av langkjedede enumettede fettsyrer deriblant erukasyre, økt tilgjengelighet av fettsyrene i dietten på grunn av raffineringsprosessen eller den generelle fettsyresammensetningen i makrelloljen. Vi ser heller ingen reduksjon i energiinntak ved inntak av makrellolje i dietten, som tidligere er sett i gnagere gitt en diett tilsatt omega-3 fettsyrer. Forsøket viser også økt vekt av tibialis anterior i musene gitt makrellolje i en WD. Det gjenstår fortsatt å kartlegge om denne økningen i muskelmasse er et resultat av økt lipidinnhold i skjelettmuskulaturen og hva som er virkningsmekanismen bak.

4 Konklusjon

Råolje basert på reststoff fra makrell har et høyt innhold av flerumettede fettsyrer, deriblant n-3 fettsyrene EPA and DHA. Våre analyser viser at EPA og DHA nivået bevares gjennom raffineringsprosessen, og at raffinert makrellolje har betydelig lavere nivå av dioksiner og dioksinlignende PCB sammenlignet med råoljen ekstrahert fra restråstoff. Videre viser våre data at analysene av oksidasjon og sensoriske parametere er innenfor det som anbefales til humant konsum.

Dyrestudiet hvor raffinert makrellolje ble innblandet (3-9%) i en standard diett viste ingen toksiske effekter basert på våre endepunkt i studien. Fôringforsøket hvor makrellolje ble innblandet i en vestlig diett (3-6%) medførte en signifikant økning i kroppsvekt, levervekt og lipidakkumulering i lever sammenlignet med mus gitt kontrolldietten. Vi observerte også at makrellolje innblandet i en vestlig diett medførte et signifikant høyere fôrinntak og økt fettfordøyelighet sammenlignet med mus som fikk kontrolldietten, men årsaken til disse effektene er ikke kartlagt. Det ble ikke observert noe økning i nivåene av markører for lever- eller nyreskade, uavhengig av dose eller diett.

Basert på den raffinerte makrelloljen sitt lave innhold av dioksiner, dioksinlignende PCB og PCB6 er det meget lite sannsynlig at effektene observert i våre studier skyldes dette. Våre beregninger viser derimot at mus gitt raffinert makrellolje (3-9%) i dietten får i seg langt høyere nivå av erukasyre enn anbefalt tolerabelt daglig inntak. Om effektene observert ved innblanding av raffinert makrellolje skyldes et høyt inntak av erukasyre er ikke kartlagt i disse studiene, og bør undersøkes i fremtidige studier.

5 Litteraturliste

1. AOCS, Official Method Cd 8-53. Surplus 2003. Peroxide Value. Official methods and recommended practices of the AOCS. 1997, American Oil Chemists Society (Champaign, IL, USA).
2. AOCS, Official method Cd 18-90. p-Anisidine Value. Reapproved 1997. Official methods and recommended practices of the AOCS. 2003: American Oil Chemists Society (Champaign, IL, USA).
3. OECD. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 2018 [cited 2019 12th August]; Available from: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070707en.pdf?expires=1568808798&id=id&accname=guest&checksum=7022FC4862D59F3292702ED6DED9ADB9>.
4. Petaja, E.M. and H. Yki-Jarvinen, Definitions of Normal Liver Fat and the Association of Insulin Sensitivity with Acquired and Genetic NAFLD-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(5).
5. Dietrich, P. and C. Hellerbrand, Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2014. **28**(4): p. 637-653.
6. Milic, S., D. Lulic, and D. Stimac, Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(28): p. 9330-7.
7. Siriwardhana, N., N.S. Kalupahana, and N. Moustaid-Moussa, Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*, 2012. **65**: p. 211-22.
8. Kris-Etherton, P.M., et al., Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(2): p. 151-2.
9. Chain, E. Panel o.C.i.t.F., et al., Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA Journal*, 2018. **16**(11): p. e05333.
10. Knutsen, H.K., et al., Erucic acid in feed and food. *Efsa Journal*, 2016. **14**(11).
11. Sissener, N.H., et al., Erucic Acid (22:1n-9) in Fish Feed, Farmed, and Wild Fish and Seafood Products. *Nutrients*, 2018. **10**(10).
12. Kostråd om fisk og sjømat - helsenorge.no. [cited 2019 12th August]; Available from: <https://helsenorge.no/kosthold-og-ernaring/kostrad/spis-fisk-oftere>.
13. Helsedirektoratet. Utviklingen i norsk kosthold - Helsedirektoratet. [cited 2019 12th August]; Available from: <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/utviklingen-i-norsk-kosthold>.
14. Knutsen, S.F., et al., Comparison of adipose tissue fatty acids with dietary fatty acids as measured by 24-hour recall and food frequency questionnaire in black and white adventists: The Adventist Health Study. *Annals of Epidemiology*, 2003. **13**(2): p. 119-127.
15. Hodge, A.M., et al., Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2007. **17**(6): p. 415-426.

16. Harris, W.S. and C. Von Schacky, The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*, 2004. **39**(1): p. 212-20.
17. Raclot, T., et al., Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *Journal of Lipid Research*, 1997. **38**(10): p. 1963-1972.
18. Flachs, P., et al., Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, 2005. **48**(11): p. 2365-2375.
19. Duivenvoorde, L.P., et al., A Difference in Fatty Acid Composition of Isocaloric High-Fat Diets Alters Metabolic Flexibility in Male C57BL/6J OlaHsd Mice. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128515.
20. Whitehouse, A.S., et al., Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3604-9.
21. Smith, G.I., et al., Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(2): p. 402-12.
22. Peyron-Caso, E., et al., Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids up-regulate plasma leptin in insulin-resistant rats. *J Nutr*, 2002. **132**(8): p. 2235-40.
23. Minami, A., et al., Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. *British Journal of Nutrition*, 2002. **87**(2): p. 157-162.
24. Hainault, I., et al., Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. **683**: p. 98-101.
25. Sato, A., et al., Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2495-504.
26. Belzung, F., T. Raclot, and R. Groscolas, Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol*, 1993. **264**(6 Pt 2): p. R1111-8.
27. Benhizia, F., et al., Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. *Am J Physiol*, 1994. **267**(6 Pt 1): p. E975-82.
28. Li, H., et al., Fish oil, lard and soybean oil differentially shape gut microbiota of middle-aged rats. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 826.



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

Postboks 1870 Nordnes

5817 Bergen

Tlf: 55 23 85 00

E-post: post@hi.no

www.hi.no