

Enzymatisk modifiering av fiskolja - jämförelse mellan olika lipaser.



LUNDS
UNIVERSITET

Lunds Tekniska Högskola

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
Bioteknik avdelning

Examensarbete:
Av Oksana Shastina
Handläggare och examinator:
Björn Sivik

© Copyright Oksana Shastina

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
Lunds Universitet
Box 882
251 08 Helsingborg

LTH School of Engineering
Lund University
Box 882
SE-251 08 Helsingborg
Sweden

Tryckt i Sverige
Media-Tryck
Biblioteksdirektionen
Lunds Universitet
Lund 2006

Sammanfattning

Enzymatisk modifiering av fiskolja - jämförelse mellan olika lipaser.

I detta arbete studerades tre olika lipaser som katalyserade en metanolysreaktion i fiskolja.

Målet med arbetet var att

- finna ett specifikt lipas för produktion av en EPA/DHA fraktioner från fiskoljan i en metanolysreaktion
- få högt utbyte av Sn-2 monoglycerider av EPA och/eller DHA och med detta kunna möjliggöra uppkoncentrering av hälsoviktiga fettsyror
- jämföra reaktionen i normal och superkritisk atmosfär

Metanolysen ägde rum i normal och superkritisk atmosfär genom att oljan, enzymet och metanol blandades i respektive reaktorn.

Sn-1,3 specifika lipaser var isolerade från *Thermomyces lanuginosa* (Lipozym TL IM från Novozymes, Danmark) och *Rhizomucor miehei* (Lipozym RM IM från Novozymes, Danmark) och ospecifik lipas från *Pseudomonas* sp. (Amano-C från Amano Enzyme Inc. Japan). Alla enzymer var immobiliserade på jonbytare.

I försöken användes "Ledins" fiskolja som var köpt i en lokal affär. Oljan var en blandning extraherad från oceanernas olika fiskklasser. Den innehöll även antioxidanter i form av vitamin E och naturlig citronolja.

Reaktionsprodukter analyserades med TLC. Mängd EPA respektive DHA bestämdes med GC.

Studier i normal atmosfär visar att Amano C är mer specifikt för omega-3 fettsyror än de andra undersökta enzymerna. Redan efter 5,5 tim reaktionstid blev utbyte i form av EPA MG 67 % och DHA MG 82 %. Efter 22h reaktionstid blev utbyte av EPA MG 94 % och DHA MG 100 %. Studier i superkritisk atmosfär visar lägre aktivitet av enzymet Amano C jämfört med normal atmosfär.

Enzymet TL IM visade lägst specificitet i normal atmosfär. Högsta utbytet beräknad för EPA MG till 2 % respektive för DHA MG till 5 %. I superkritisk atmosfär konstaterades maximalt utbytet efter reaktionstid på 4 tim. Utbyte för EPA MG blev 29 % och för DHA MG 100 %. Det innebär att enzymet är mycket specifikt för DHA produktion.

I reaktioner med enzymet RM IM blev utbytet för EPA/DHA relativt konstant jämfört med andra enzymer. I normal atmosfär efter 22 tim blev utbyte av EPA MG 60 % och DHA MG 63 %.

I superkritisk atmosfär efter 22 tim blev utbyte av EPA MG 30 % och av DHA 60 %.

Av ovanstående kan dras slutsatser att reaktioner i superkritisk atmosfär går snabbt och högt utbyte kan ibland erhållas vid kortare reaktionstider jämfört med reaktioner i normal atmosfär. Detta gäller i fall processparametrar är optimerade.

Nyckelord: Metanolys, enzymatisk modifiering, fiskolja, produktion, EPA, DHA, TLC, GC.

Abstract

Enzymatic modification of fish oil – comparison between different lipases.

This work presents three different lipases which catalyze a methanolysis reaction in fish oil.

Objectives of this thesis was

- to find a specific lipase for production of EPA/DHA rich fractions from fish oil in a methanolyses reaction
- to get a high yield of Sn-2 monoglycerides of EPA and/or DHA, and with this be able to get a high concentration of this fatty acids which are important for health
- comparing between normal and supercritical atmospheric conditions

Methanolysis has been executed in a normal condition and supercritical carbon dioxide after mixing the oil, enzyme and methanol in respective reactors.

Sn-1,3 specific lipases was isolated from *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM from Novozymes, Denmark) and *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM from Novozymes, Denmark) and non specific lipase from *Pseudomonas* sp. (Amano-C from Amano Enzyme Inc., Japan). All enzymes was immobilised on an ion exchanger.

“Ledins” fish oil which was used in this experiment has been bought from a local health food shop. The oil was mix which was extracted from oceans different fish classes. It also contains antioxidants in form of vitamin E and natural lemon oil.

Reaction products were analysed with TLC. The quantity of EPA and DHA was determined with GC.

Studies in normal condition shows that Amano-C is the more specific enzyme for EPA/DHA of all three investigated enzymes. Already after 5,5h EPA MG yield in the sample became 67% and DHA MG 82%. After 22h reactions time yield of EPA MG become 94% and DHA MG 100%.

Enzyme TL IM shows highest activity in the supercritical atmosphere.

Maximum yield established after 4h. EPA MG yield become 29% and DHA MG 100%. This shows that this enzyme very suited for DHA production.

In reaction with enzyme RM IM yield become relative constant. In normal atmosphere after about 22h yield of EPA become 60% and DHA MG 63%.

Reactions in supercritical atmosphere run more rapidly and yield become higher than reactions in normal atmosphere. This works if process parameters are optimised.

Keywords: Methanolysis, enzymatic modification, fish oil, EPA, DHA, TLC, GC.

Förord

Detta examensarbete är utfört på Campus Helsingborg vid LTH. Jag vill framför allt tacka min handledare och examinator Björn Sivik, som har introducerat mig i fiskoljans värld genom att dela med sig sina enorma kunskaper och erfarenheter. Björns positiva inställning, stora engagemang och öppenhet var till stor hjälp i arbetet.

Stor tack till Dan Johansson för labbhandledning och uppmuntring. Jag vill även tacka Margareta Sandahl och Ronny Thomasson för teoretisk analytisk handledning.

Innehållsförteckning

Inledning

1 Teori	2
1.1 Fetternas egenskaper och hälsoaspekter	2
1.1.1 Triglycerider och fettsyror	2
1.1.2 Essentiella fettsyror	2
1.1.3 Hälsa	2
1.2 Lipaser	3
2 Befintliga metoder	3
2.1 Kemisk produktion av fettsyror	3
2.1.1 Fettspaltning	3
2.2 Enzymatisk produktion av fettsyror	4
2.2.1 Metanolys i en superkritisk atmosfär	4
2.2.2 Metanolys i en normal atmosfär	5
2.3 Kromatografi	5
2.3.1 TLC	5
2.3.2 GC	6
2.3.2.1 GC; Kvalitativ och kvantitativ analys	7
2.3.2.2 Metylering av fettsyror för GC analys	7
2.3.3 HPLC	7
3 Experimentellt	7
3.1 Kemikalier	7
3.2 Metoder	8
3.2.1 Metanolys	8
3.2.1.1 Reaktion i normal atmosfär	8
3.2.1.2 Reaktion i superkritisk atmosfär	9
3.2.2 TLC	10
3.2.2.1 Analytisk TLC	10
3.2.2.2 Preparativ TLC	10
3.2.3 Metylering	11
3.2.3.1 Fasextraktion	11
3.2.4 GC	11
3.2.4.1 Kvalitativ analys	11
3.2.4.2 Kvantitativanalys	12
4 Resultat och diskussion	12
4.1 Metanolys	12
4.2 Metanolys i normal atmosfär	12
4.3 Metanolys i superkritisk atmosfär	12
4.4 Analytisk TLC	13
4.5 Preparativ TLC	13
4.6 Metylering och fasextraktion	13

4.7 GC-kvalitativ analys.....	13
4.7.1 Optimering.....	13
4.8 GC-kvantitativ analys	15
5 Slutsats.....	15

Referenser & Bilagor

Inledning

Fiskolja har högt innehåll av omega-3 fettsyror. EPA och DHA tillhör omega-3 syrorna och har dokumenterade positiva effekter på hälsa. Omega-3 fettsyror kan inte syntetiseras i kroppen. De måste därför intas i tillräckligt stora koncentrationer i samband med måltid. Industriell spaltning (hydrolys alt. metanolys) av oljor idag är lång och dyr process som kräver höga temperaturer och katalyseras ospecifikt med hjälp av kemikalier [1]. Lipaser kan spjälka fett snabbt, specifikt och vid låga temperaturer. För det krävs i första hand specifik enzym som är just anpassad för valt substrat. Därefter måste processparametrar väljas och optimeras efter enzymets aktivitet. I dagens läge pågår forskning för att hitta något lipas som är specifik och ger godtagbart utbyte av EPA/DHA.

1 Teori

1.1 Fetternas egenskaper och hälsoaspekter

1.1.1 Triglycerider och fettsyror

Fettsyror lagras i form av triglycerider i fiskens fettvävnad. En triglycerid (TG) innehåller tre fettsyror som är bundna med esterbindningar till en glycerolmolekyl. Om en fettsyra innehåller fler antal dubbelbindningar kallas den fleromättad. EPA har 20 kolatomer och 5 dubbelbindningar, C20: 5 cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaensyra. DHA har 22 kolatomer och 6 dubbelbindningar, C22: 6 cis-4,7,10,13,16,19-Dokosahexensyra. De långa fettsyrorerna ligger oftast i mitten av en triglycerid [2]. Om numrering på en fettsyra börjar från metylgruppens ända betecknas då den sista kolatomen som ”omega”, eftersom det är sista bokstaven i grekiska alfabetet [3]. Därifrån kommer namn som omega-3/omega-6. Både EPA och DHA förekommer naturligt som cis- isomerer. Dubbelbindningarnas cis- orientering har betydelse för bl.a. fettsyrorernas funktion och upptag i kroppen. Cis- formen kan passera genom cellmembran för att utgöra olika funktioner i cellen [4].

1.1.2 Essentiella fettsyror

Teoretiskt finns det två fettsyror som är essentiell för människan, alfa-linolensyra (18:3, n-3) som tillhör omega-3 serien och linolsyra (18:2, n-6) som tillhör omega-6 serien [5]. Från alfa-linolensyra kan bildas både EPA och DHA som har fler dubbelbindningar och längre kolkedjor. Det fungerar långsamt i praktiken. Elongeringen är bl.a. beroende av förhållandet mellan omega-6 och omega-3 fettsyror i kosten[6]. Studier visar att elongering till EPA/DHA varierar bl.a. mellan olika grupper. Kön och ålder kan bestämma mängd bildat EPA/DHA [7]. Vid andra studier har undersökts mängd bildat EPA respektive DHA hos 30 friska personer. I den dagliga kosten ingick 7 % energi från linolsyra och 0,4 % från alfa-linolen syra. Efter ca 28 dagar har det konstaterats att halten bildat EPA blev mycket hög, 99 %. Däremot blev DHA halten bara 1 % [8]. Det innebär att kvoten av linol/alfa- linolensyror spelar viktig roll för EPA/DHA-syntes. Antagligen finns det fler metabola vägar eller andra faktorer som kan hämma elongeringen och är okända idag. Forskning pågår fortfarande i det område.

1.1.3 Hälsa

De hälsoeffekterna av de långkedjiga omega-3 fettsyrorerna i fisk har påvisats i olika studier.

DHA är en predominant fettsyra som spelar avgörande roll för normal funktion i CNS och näthinna (den innersta hinnan i ögonglobens vägg), och

normal utveckling av hjärnan [9]. DHA/EPA minskar risk för hjärt-kärlsjukdom t.ex. risken att avlida i hjärt-kärlsjukdom minskas med 20 %[10]. Tillräckligt mängd EPA/DHA kan intas med kosten idag genom fisk eller fiskolja koncentrat. Tyvärr finns i fiskens fettvävnader inte bara de nyttiga fettsyror, där finns också organiska gifter som PCB, DDT och dimetylkviksilver [11]. Därför kan renat oljakoncentrat vara mer att föredra istället för fisk.

1.2 Lipaser

Enzymer som nedbryter fetter kallas lipaser. Lipaser hydrolyserar esterbildningarna mellan glycerol och fettsyror.

En del lipaser kan hydrolysera av alla tre fettsyror i en TG och kallas då ospecifika. Produkterna blir fria fettsyror och glycerol. Andra lipaser är mer specifika och föredrar vissa t.ex. mättade fettsyror och lämnar kvar t.ex. fleromättade. Om reaktionen avbryts när två av fettsyrorerna i sn-3 position har kopplats bort får vi kvar en sn-2 monoglycerid.

2 Befintliga metoder

2.1 Kemisk produktion av fettsyror

2.1.1 Fettspaltning

Idag framställs fettsyror genom fettspaltning. Fettspaltning är en industriell process där fettsyror och glycerol framställs ur fetter. Vanligen används vatten (hydrolys), metanol (metanolys), lut (förtvålning), eller aminer (aminolys) för spaltning. Hydrolys och metanolys är i princip samma reaktion eftersom samma produkter bildas. Skillnaden är att olika reaktanter används.

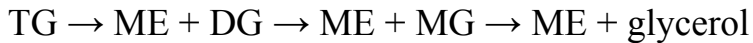
Den hydrolytiska spaltningen går mycket långsamt. Vid 100°C och 10 dagars hydrolys produceras 20 % FFA [12]. Vid temperatur över 225°C och tryck 2MPa tar reaktionen ca 3 timmar för kokosfett. Om en katalysator, t.ex. basiska oxider tillsätts kan temperatur sänkas till 150-190°C[13]. Triglycerider som innehåller mättade fettsyror är mer lösliga än fleromättade. Löslighet minskar och viskositet ökar då antal kolatomer och dubbelbildningar ökar. Kokosfett innehåller 90 % av mättade fettsyror jämfört med t.ex. lax som innehåller 24%[14]. När reaktionen katalyseras med kemikalier bildas många olika biprodukter t.ex. tvålar, steroler och glycerider[15].

Hög reaktionstemperatur och kemikaliernas ospecifik nedbrytning av fetter kan resulteras i olika reaktioner och reaktionsprodukter.

Framställning av fleromättade fettsyror som EPA och DHA kräver mycket högre temperaturer, tryck och längre tider jämfört med framställning av mättade fettsyror.

2.2 Enzymatisk produktion av fettsyror

I en metanolysreaktion hydrolyserar lipaser esterbildningar mellan glycerol och fettsyror. Enzymet katalyserar substratnedbrytning med hjälp av metanol. Fettet bryts ner stegvis:



TG är förkortning för triglycerider, ME är förkortning för metylestrar, DG och MG är förkortning för di-, respektive monoglycerider.

Slutprodukter kan variera beroende på enzymets specificitet.

Andra reaktioner som kan katalyseras med lipaser är en direkt esterifikation och en transesterifikation. Produktbildningen beror på b.l.a. vattenaktivitet i systemet.

Eftersom enzymer tillhör till proteinklassen tål de inte höga temperaturer.

Reaktionsoptimum är därför mycket lägre jämfört med den kemiska fettspaltningen. Reaktionshastighet där TG fullständigt bryts ner till glycerol och fettsyror varierar beroende på enzymets specificitet.

2.2.1 Metanolys i en superkritisk atmosfär

Att utföra enzymatisk metanolys i superkritisk koldioxid med ett fluid i överkritiskt tillstånd kan vara mycket användbar för industriell produktion av fettsyror.

Alla ämnen har ett så kallad kritisk punkt. Superkritiskt tillstånd inträffar över ett visst temperatur och tryck. Ämnen som är i flytande form över denna punkt har densitet mellan vätska och gas. Vid den superkritiska punkten är fluidets tillstånd oberoende av trycket.

Principen för extraktionen i superkritisk atmosfär är följande.

Processparametrar som temperatur, tryck och flöde ställs in. Ett fluid i gastillstånd pumpas igenom systemet in till reaktorn som innehåller substrat, katalysator och lösningsmedel. Därefter startar nedbrytning av oljan.

Metanolys i en superkritisk atmosfär möjliggör [16]:

- Enkel inställning av processparametrar som temperatur och tryck.
- Sänkning av oljans och fettsyornas viskositet och därmed ökning av reaktionshastigheten. Det underlättar masstransport i systemet och gör substratet mer tillgängligt för enzymet. Följden är korta reaktionstider.
- Produkterna i form av metylestrar kan extraheras selektivt från andra produkter. Normalt är löslighet av metylestrar högre än lösligheten av tri-, di- och monoglycerider.

- Produkterna i extraktet kan insamlas genom enkel reduktion av trycket eller extraktion, då produkter skiljs från koldioxiden.
- Låg vattenaktivitet i systemet gynnar enzymatisk bildandet av fettsyrametylestrar, mono- och diglycerider.
- Enzymer löses inte i superkritiska fluider. Det möjliggör återanvändning av enzymer.

För metanolys i superkritisk miljö kan användas koldioxid i form av gas. Fördelar med koldioxid är många. Den är billig, inte toxisk och det är lätt att uppnå gasens kritiska punkt som är 31,3 °C och 72,9 atm. I en studie undersöktes påverkan av trycket på en etanolys i superkritisk koldioxid med enzymet (Novozym 435 IM) isolerad från *Candida antarctica* [17]. Hög utbyte av DHA, 52 % kunde uppnås genom att använda tryck i systemet på 9 MPa.

2.2.2 Metanolys i en normal atmosfär

Principen för metanolys i normal atmosfär är följande. Önskad temperatur i systemet ställs in. Substrat, katalysator och lösningsmedel blandas in i en reaktor och reaktionen startas. Tidigare studier visar att immobiliserade lipaser isolerade från *Pseudomonas sp. (Amano-C)* gav hög utbyte (80%) av 2-MG som innehåller EPA och DHA. Alkoholysen ägde rum vid 40°C i acetone, med tonfiskolja som substrat [18].

I en annan studie [24] undersöktes etanolys av tonfiskolja med enzymet isolerad från *Candida antarctica*. Studien visar att 95 % av alla tillgängliga fettsyror i oljan omvandlas till motsvarande etylestrar efter den totala reaktionstiden på 48 timmar. Studien visar bra utbyte av etylestrar men det är oklart om enzymet är specifikt för produktion av EPA/DHA 2-MG.

2.3 Kromatografi

Kromatografi innefattar en grupp av metoder som används för att separera närbesläktade ämnen ifrån varandra i komplexa provblandningar. Här används två faser; en stationär fas som sitter fast i en kolonn eller på en fast yta och en mobil fas.

2.3.1 TLC

Tunnskikt-kromatografi (TLC) är en analytisk vätskekromatografisk metod som ger snabb och effektiv separationsteknik för organiska föreningar av liknade polaritet. Kromatografen utförs på en platta, i regel av glas, bestruken med stationärfasen vanligen silika (SiO_2), många gånger tillsatt ett fluoriserande ämne som absorberar UV-ljus vid 254 nm, och av en tjocklek på

0.1–0.25 mm. På plattan appliceras vid nedersta kanten en liten prick av provlösning, varpå den nedsänks i en bägare (vanna) innehållande mobilfasen på botten. Vätskan får sedan vandra, med hjälp av kapillärkraften, uppför plattan och tar då med sig de i den applicerade pricken innehållande analyterna. Härvid kan separation av de olika analyterna åstadkommas genom deras olika interaktioner med den polära stationärfasen och den opolära mobilfasen. Vilket leder till att analyterna vandrar olika långt på plattan. När vätskefronten börjar nå plattans övre kant avbryts kromatografen. De olika analyternas läge på plattan visualiseras med UV-ljus, jodånga eller någon annan framkallningsmetod.

Vanliga mobilfaser är blandningar av petroleumeter/etylacetat, toluen/etylacetat, metylenklorid/metanol etc. ofta med tillsatts av baser eller syror såsom trietylamin och ättiksyra beroende på analytens egenskaper. Det finns även tjockare plattor (ofta 1-2 mm) för preparativ tunnskikt-kromatografi där prickarna dvs. de olika analyterna kan skrapas av och extraheras[19].

2.3.2 GC

GC (gaskromatografi) används vid separation av olika flyktiga organiska ämnen.

I gaskromatografi (GC) utgörs den mobila fasen av en gas. Stationärfasens polaritet måste matcha analyternas polaritet. Separationen är endast beroende av analyternas interaktion med den stationära fasen. Separations-, och effektivitetsgrad ökar med analyternas flyktighet.

Mobilfasen är en inert gas som även kallas bärgas. Analyterna injiceras med split injektion i en kolonn där man först injicerar genom ett septum till injektorn. Bärgasen sveper sedan med analyterna till splittpunkt där endast en liten del går in på kolonnen. I kolonnen fördelas analyterna mellan den stationära och den mobila fasen. Både analyternas kokpunkter och deras polaritet inverkar på hur länge de binder till den stationära fasen. När analyterna passerat genom kolonnen når de en detektor t ex. en flamjonisationsdetektor (FID). I FID blandas bärgasen med vätgas och luft som tillsammans brinner i en flamma. När analyterna passerar flaman joniseras dessa och ger upphov till en ström som registreras. Den homologa seriens retentionsbeteende beskriver hur retentionstiderna förhåller sig till antalet kolatomer.

Teoretiskt ökar kokpunkten med antalet kolatomer i serien, och med kokpunkten ökar också retentionen [20-21].

För analys av organiska föreningar som t.ex. fettsyror kan användas både gas-, och vätskekromatografi(HPLC). GC ger bättre separationseffektivitet och lägre detektionsgränser jämfört med HPLC.

2.3.2.1 GC; Kvalitativ och kvantitativ analys

Kvalitativ analys, identifikation sker vid jämförelse av provanalytens retentionstider, d.v.s. den tid det tar att eluera ämnet ur kolonnen, med standarder vid identiska separationsförhållanden. Exempel på olika separationsförhållanden är typen stationär- och mobilfas som används, temperatur, flöde, m.m.

För kvantitativ analys används toppens höjd eller area. Topphöjds mätningar i jämförelse med toppareamätningar görs i regel med högre precision, vilket leder till noggrannare analysresultat, under förutsättningar att toppbredden för ett och samma ämne är konstant från analys till analys. Vid kvantifiering bereds en kalibreringskurva med ett antal standarder i ett koncentrationsområde där provet förväntas ligga. Prov och standarder analyseras där identiska separationsparametrar används. Toppstorleken för standarder avsätts mot koncentrationen varefter provtoppen jämförs med erhållen kalibreringskurva [20].

2.3.2.2 Metylering av fettsyror för GC analys

För en effektivare separation i GC krävs flyktiga föreningar. Fettklassers polaritet, i detta fall monoglycerider (MG) kan reduceras genom en metyleringsreaktion. Vid metylering bryts esterbindningen mellan en fettsyra och en glycerolmolekyl. Fettsyrans polaritet reduceras och flyktighet ökar. Det ger en förbättrad detektorkänslighet och en minskad svansning på topparna. Det finns både syra- och baskatalyserade metyleringsmetoder, där några av de vanligaste syrakatalyserade metoderna är saltsyra i metanol och borttrifluorid i metanol [22].

2.3.3 HPLC

HPLC kan klara av olika typer av komplexa separationer som t.ex. separation av aminosyror, proteiner och oorganiska substanser. [20]. I vätskekromatografi (HPLC) utgörs mobila fasen av en vätska, oftast två olika vätskor med olika polaritet. Genom att variera proportioner mellan vätskorna kan separations-, och effektivitetsgrad för analyten påverkas. Förutsättning för separationen är att analyten måste vara löslig i den mobila fasen.

3 Experimentellt

3.1 Kemikalier

”Ledins” fiskolja var en blandning extraherad av oceanernas olika fiskklasser. Oljan var köpt i lokal livsmedelsaffär och innehöll även antioxidanter som vitamin E och naturlig citronolja.

Sn-1,3 specifika lipaser var isolerade från *Thermomyces lanuginosa* (Lipozym TL IM från Novozymes, Danmark) och *Rhizomucor miehei* (Lypozym RM IM från Novozymes, Danmark) och ospecifik lipas från *Pseudomonas*

sp.(Amano-C från Amano Enzyme Inc. Japan). Alla enzymer var immobiliserade på jonbytare.

Koldioxid hade 99,99 % renhet och var köpt från Air Liquide Gas, Sverige.

Rena referenskemikalier (MG, DG, TG och FF), metylheptadecanoate och metyltricosanoate var köpta på Larodan Fine Chemicals AB, Sverige.

Natrium metoxid (30 % lösning i metanol) hade märke ”Merck”, Tyskland.

2',7'-dikloroflourescein var märke ”Sigma”, Tyskland

Metanol, kloroform, hexan, dietyleter, isättiksyra hade märke ”Merck” med 95-99,8 % renhet.

3.2 Metoder

3.2.1 Metanolys

Metanolys av fiskoljan med hjälp av olika lipaser utfördes i normal och superkritisk atmosfär. Reaktionsmängder enzymet/olja/metanol var teoretisk enligt [17]. Proportioner olja/metanol anpassades efterhand, där mängd metanol i försöken var ¼ del högre än motsvarande mängd etanol som föreslogs i artikeln [17].

Extra metanol tillsattes till reaktorn vid provtagningar som kompensation för bortextraherad metanol. Reaktionsmängder enzymet/olja/metanol var lika stor både för normal och superkritisk reaktion enligt tabell 1.

<i>Enzymklass</i>	<i>Enzymmängd (mg resp. ml)</i>	<i>Olja (mg)</i>	<i>Metanol (mg)</i>
TL IM	1800mg	4500	790
RM IM	3,9 ml	4500	790
Amano-C IM	200mg	552	273

Tabell 1. Mängd enzym/olja/metanol för försöken

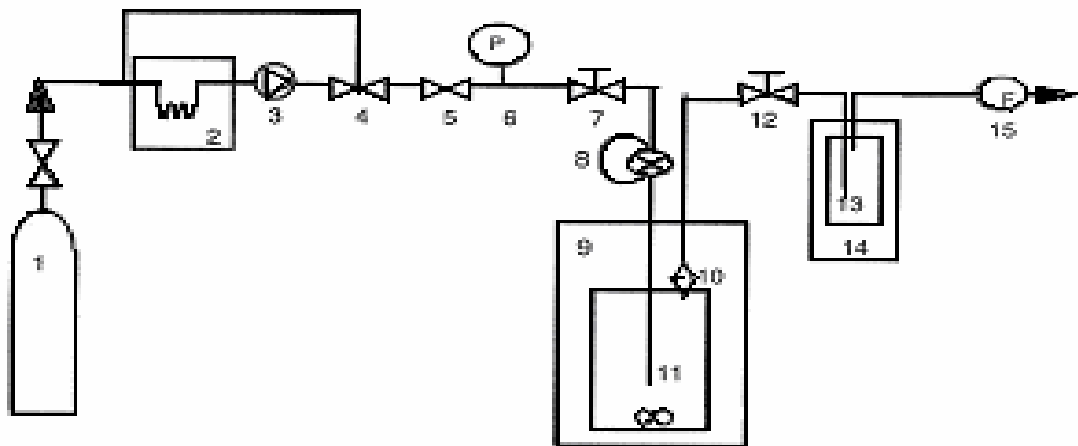
3.2.1.1 Reaktion i normal atmosfär

För extraktionen i normal atmosfär användes en bathreaktor av glas med lock på. De immobiliserade enzymerna och olja blandades i en rundkolv. Kolven kopplades till en vattenslang för borttagning av löst luft. Därefter enzym/olja blandning överfördes till reaktorn till vilken tillsattes metanol.

Reaktionsblandning omrördes kontinuerligt med en magnetloppa. Ca 200-300µl prov togs med relativt jämna mellanrum. Reaktionen pågick under omrörning i ca 22 h vid 40°C. Därefter extraktets innehåll gick igenom en TLC analys.

3.2.1.2 Reaktion i superkritisk atmosfär

För reaktionen i superkritisk atmosfär användes anläggning enligt figur 1.



Figur 1 [adopterat från 17]. Schemat över anläggningen för reaktionen i superkritisk miljö.

1. Gastub, 2. Kylare (-10°C), 3. Membranpump, 4. Hjälpventil, 5. Stoppventil, 6. Tryckmätare, 7. Avstängningsventil, 8. Provtagningsanordning 10. Filter; 3,2mm OD* 0,8mm tjock, 0,25mm 11. Reaktor, 12. Mikromätning, 13. Kylningsfälla, 14. Kylbad (0°C), 15. Flödesmätare

Till batchreaktor av stål tillsattes enzymet, olja och metanol. Mängden var enligt tabell 1. Därefter kopplades allt till anläggningen enligt figur 1.

För test med TL IM och RM IM användes anläggning enligt figur 1 i vilken reaktorn var utrustad med en provtagningsanordning.

För test med enzymet Amano användes samma anläggning (figur 1) men med en mindre reaktor utan en provtagningsanordning. Provtagningar (10 µl prov) skedde med en pipett genom öppning av reaktorn.

Koldioxid började pumpas igenom systemet in till reaktorn. Komponenter i reaktorn omrördes kontinuerligt med en magnetloppa. Efter att trycket i systemet stabiliserades pågick den statiska extraktionen i ca 60 min. Sedan öppnades den variabla ventilen som ledde till att utgående koldioxidens tryck sjönk till atmosfärstryck och den dynamiska extraktionen påbörjades. Under den dynamiska extraktionen insamlades två typer av prov. Provtogs i form av extrakt och i form av rent olja.

Det tog ca 1h att samla extrakt i form av ME. Provet som bestod av andra fettklasser togs från reaktorn med hjälp av provtagningsanordning (för test TL IM och RM IM) respektive genom öppning av reaktorn (för test med Amano). Metanol som fanns delvis i båda prov förångades med hjälp av rullindunstare ("Laborota 4000", Heidolph) där provmassa bestämdes gravimetrisk.

Extraktionen i superkritisk miljö pågick under ca 22h vid 40°C, 90 Bar.

Koldioxid flöde var 0,1-0,2 l/min för TL IM; 0,3-0,4 l/min för RM IM; och 0,04-0,07 l/min för Amano-C. Provtogs insamlades med relativt jämna mellanrum.

Därefter provet med olika fettklasser gick igenom en TLC analys. ME studerades direkt med GC.

3.2.2 TLC

Insamlade prov från olika enzymreaktioner i form av extraktet separerades med två olika metoder, analytisk och preparativ TLC [17,23]. Mobilfasen från början var enligt Kates [23]. Proportionerna hexan/dietyleter/koncentrerad isättiksyra i mobilfasen optimerades efter hand och blev slutligen 70/30/1. Fettklasser som fanns i fiskoljan i början av försöken analyserades med analytisk TLC.

3.2.2.1 Analytisk TLC

För analytisk TLC användes aluminium plattor (Merck; 60F254; nr1.05554) med silika som stationärfas. Analyten applicerades på plattan med en 50µl mikrodosator (Drummond, nr.3-606-086).

För identifikation av olika fettklasser i prover användes analytisk TLC. Olika standarder monolaurin (1-MG), 1-3 dipalmitin (1-3 DG), tripalmitin (TG), palmitinsyra (FFA) och en etylester av palmitinsyra (EE) användes för detektion av specifika fettklasser. Efter framkallningen relaterades vandringssträckan för standarden till vandringsträckan för analyten och position av en specifik fettklass kunde bestämmas.

5µl prov/standard späddes med 750µl kloroform därefter applicerades 10µl/prick på en platta (10*10cm). När kloroform avdunstade nedsänktes plattan i en TLC behållare med mobilfasen. Kromatografi avbröts efter ca 20 min. Plattan togs ut och torkades med en varmluftspistol. Plattan besprutades med 20 % ammoniumsulfatlösning i vatten, torkades med en varmluftspistol och olika fettklasser framkallades genom uppvärmning i en ugn i 20min, 180°C.

3.2.2.2 Preparativ TLC

För preparativ TLC användes Pre-Coated glasplattor med silika som stationärfas (Merck, 60F-254; nr.143517). För applikation av analyten användes en glaspipett

MG separerades från övriga fettklasser och förbereddes inför kvantitativt analys med preparativ TLC [17].

100µl för TL IM och RM IM (alternativ 50µl för Amano-C) av varje prov späddes i var sin behållare med 1000µl för TL IM och RM IM(alternativ 500µl för Amano-C) kloroform därefter applicerades hela blandningen som ett band på en platta (20*20cm). När kloroform avdunstade nedsänktes plattan i en TLC behållare som innehöll mobilfasen. Efter ca 50 min avbröts kromatografin. Efter att vätskan avdunstade framkallades fettklasser på plattan genom besprutning av 0,1 % dikloroflourescein i metanol. Band av MG kunde identifieras utan någon UV detektor. Banden skrapades av i glasprovrör för förestring inför GC.

3.2.3 Metylering

ME preparerades från MG genom en metyleringsreaktion [17].

Till den uppskrapade blandningen av MG och silika partiklar adderades 2ml, 0,5 M natriummetoxid i metanol. Reaktionen flashades med kvävgas.

Blandningen omskakades med hjälp av vortex och värmdes i ett vattenbad i 10 min, 50°C.

3.2.3.1 Fasextraktion

ME extraherades i hexan från övriga partiklar. Till blandningen från metyleringsreaktionen tillsattes 1ml hexan och 2ml mättad natriumkloridvattenlösning. Blandningen omskakades med hjälp av vortex och centrifugerades i 5 min, 2000rpm. Övre skiktet uppsamlades för kvalitativ och kvantitativ analys i GC.

3.2.4 GC

ME som var uppsamlade under en superkritisk extraktion och ME som var förestrade från MG analyserades kvalitativt och kvantitativt med GC. För kvalitativ analys av EPA/DHA metylestrar användes GCn, ”Varian 3380” (ISO 9001). Som stationär fas användes en DB-WAX kolonn (30m*0,25mm i.d, fastjocklek 0,25µm,nr.Va-122103-20).För injektionen i GC användes en 50µl injektionsspruta(Hamilton-Bonadus,nr 84810100).

3.2.4.1 Kvalitativ analys

Retentionstider för EPA/DHA säkerhetsställdes medhjälp av interna standarder av metyltricosanoat (23:0) och metylheptadecanoat (17:0) [17].

Retentionstider för EPA/DHA ME bestämdes med standarden i form av fettsyrametylestermix.

Standard i form av fettsyrametylestermix var utspädda med trimetylpentan.

Metyltricosanoat och metylheptadecanoat var utspädda med tetrahydrofuran.

Processparametrar var från början enligt [17] med följande inställningar:

Spliten var 1:100, kvävgas användes som bärgas med flöde 1ml/min, injektionsvolym 1µl, injektor/detektortemperaturer var 240°C.

Kolontemperatur var programmerat från 140°C som höjdes med 3°C/min. Den slutliga temperaturen var 220°C med hold i 8 min.

Processparametrar optimerades enligt tabell 2.

Försök	Analystid (min)	Kolonntemperatur (°C)	Temperaturgradient (°C/min)
1-2	40	180-240	3 resp.8
3-4	40	180-230	3 resp.8
5-6	40 resp.25	200-240	8

Tabell 2. Optimering av GC parametrar

3.2.4.2 *Kvantitativanalys*

För kvantitativ bestämning av EPA/DHA ME mängder i prover bereddes en kalibreringskurva.

Kalibreringskurvan bereddes av standarden metyltricosanoat (23:0) i området 0,05-0,2 mg/ml. 20mg metyltricosanoat var spädd med tetrahydrofuranlösning i en 2ml mätkolv. Därefter togs 10, 20, 30 μ l och späddes upp till märket med tetrahydrofuran i var sitt 2ml mätkolv. Vid varje försök injicerades 1 μ l av respektive lösning/prov.

4 Resultat och diskussion

4.1 Metanolys

Proportioner mellan enzym/olja/metanol från början planerades enligt [17]. Först vägdes enzymet TL IM, där mängder enzym/olja/metanol kunde anpassas efter artikeln. Vid vägning av enzymet RM IM kunde inte enzymproportion anpassas efter artikeln eftersom RM IM antog förstor volym i förhållandet till oljan, se tabell 1. Det skulle omöjliggöra provtagningar.

4.2 Metanolys i normal atmosfär

Reaktioner i normal atmosfär pågick under omrörning i ca 22 h. Reaktionsgång för varje enzymreaktion kan ses från bilaga 1-7. Fullständigt metanolysreaktion kunde inte påvisas för enzymer TL IM och RM IM, eftersom TG som fanns i fiskoljan från början har aldrig fullständigt förbrukats under reaktionsgång, se bilaga 5. Det kan innebära att reaktionsparametrar inte är optimerade. Mängd tillsatt metanol vid borttagning av luft och provtagningar kunde begränsa enzymreaktionen. Alternativt kan det innebära att enzymerna är ospecifika just för fiskoljan. Genomförd reaktion med Amano-C utvecklades mycket bättre, se bilaga 5. Efter ca 5,5 h började bildningen av MG. Efter ca 7 h har alla TG har förbrukats. Efter ca 24 h har även alla DG förbrukats.

4.3 Metanolys i superkritisk atmosfär

Reaktionsgång för varje enzymreaktion framgår i bilaga 1-7. En helt genomförd metanolysreaktion kunde inte påvisas för enzymer RM IM och Amano-C, eftersom TG som fanns i fiskoljan från början har aldrig fullständigt förbrukats, se bilaga 4. Prover som togs i reaktionen med Amano-C var grumligare och mer viskösa än andra prov. Det kunde tyda på att immobilisationsmaterial inte klarade av höga tryck. När immobilisationsmaterial krossas frigörs enzymet. Det kan innebära att

enzymmängd i reaktorn minskades vid varje provtagning och jämviktstillstånd för reaktionen uppnås inte.

Triglycerider i reaktionen med TL IM var förbrukade efter ca 4,2 h, se bilaga 1.

4.4 Analytisk TLC

Mobilfasens sammansättning från början var 40/60/1, enligt Kates [23]. Proportionerna hexan/dietyler/isättiksyra i mobilfasen optimerades efter hand eftersom fettklasserna i form av DG och MG låg för nära varandra efter framkallningen. Efter en optimering till proportioner 70/30/1 blev separationen mellan DG och MG bättre.

Fiskoljan i början av försöken var av bra kvalitet eftersom majoriteten av de påvisade fettklasserna var i form av TG. Mycket svaga fläckar av DG kunde ses på plattan.

Vandringssträckan för olika fettklasser kunde bestämmas med hjälp av standarder i form av TG, FFA, 1-3 DG och 1-MG. Efter framkallning hade fettklasser ett gråaktig utseende i form av att avrunda fläckar.

EE vandrade mest på plattan, därefter kom FFA, 1-3DG och slutligen 1-MG. Efter att position bestämdes för TG, FFA, 1-3DG och 1-MG kunde vandringssträckan uppskattas för ME och 1-2DG. Vandringssträckan för fettklasserna tagna vid olika reaktionstidpunkter i prov finns i bilaga 4-5.

4.5 Preparativ TLC

MG separerades från övriga fettklasser och visualiserades genom framkallning. Bandet var gult och kunde ses klart utan hjälp av UV-detektor.

4.6 Metylering och fasextraktion

Metoden för preparation av ME var adopterad från [17].

Metylering antas vara fullständig och inga undersökningar av metodens metyleringsgrad gjordes.

Blandningen av hexan och ME med volym på ca 1ml var kunde extraherades under fasextraktioner.

4.7 GC-kvalitativ analys

Utgångsmetod av [17] detekterade olika fettsyrametylestrar med upp till 17 kolatomer i kedjan och standarden i form av metylheptadecanoat. Topparna var baslinjeseparerade.

4.7.1 Optimering

Försök 1-2

Vid försök 1-2 ökades starttemperatur i kolonnen med 40°C och slutlig kolonntemperatur med 20°C inklusive en temperaturgradientförändring på 3 respektive 8°C. Detektion av EPA/DHA metylfettsyraestrar påvisades inte.

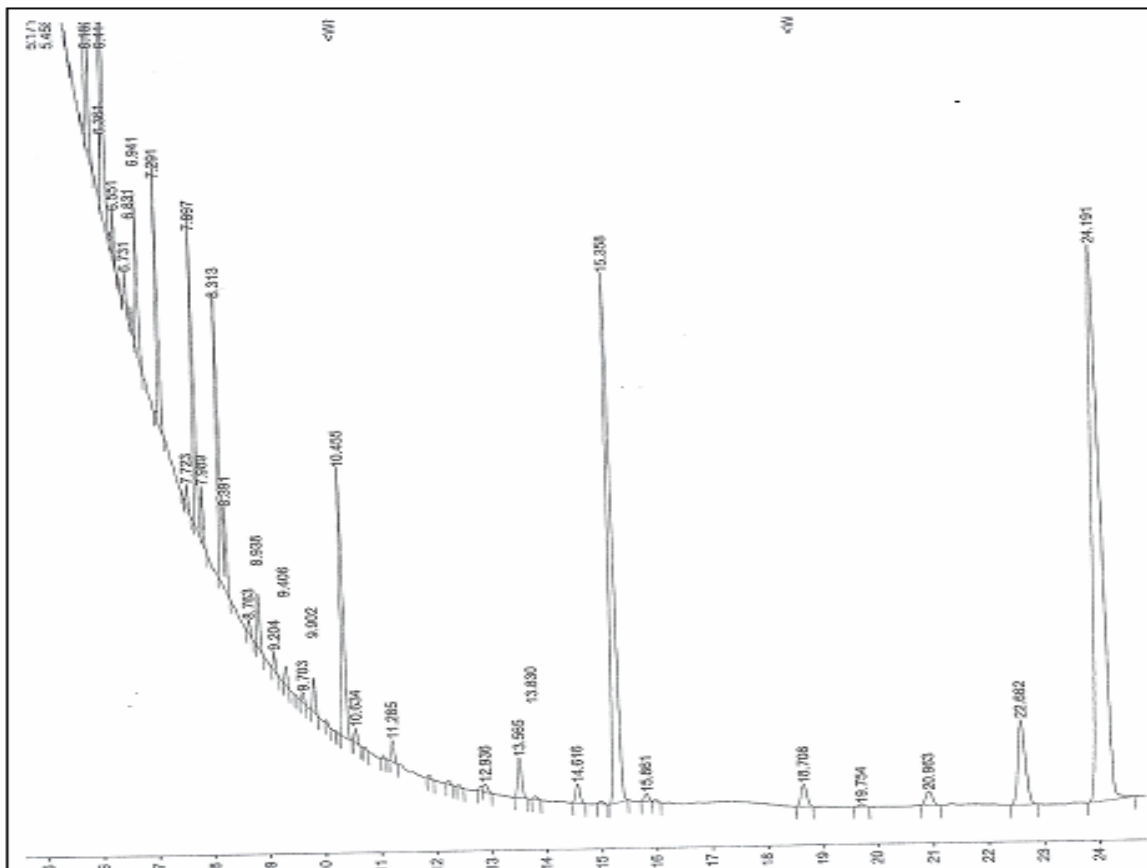
Försök 3-4

En ökning av den slutliga kolonntemperaturen med 10°C och en variation av temperaturgradient med 3 respektive 8°C gav inga skillnader i analysresultat jämfört med försök ett och två.

Försök 5-6

Vid en ökning av slutlig kolonntemperatur med ytterligare 10°C kunde både standarder och provanalyser detekteras. Total analysstid förkortades från 40 till 25 min. Topparna var baslinjeseparerade men breda.

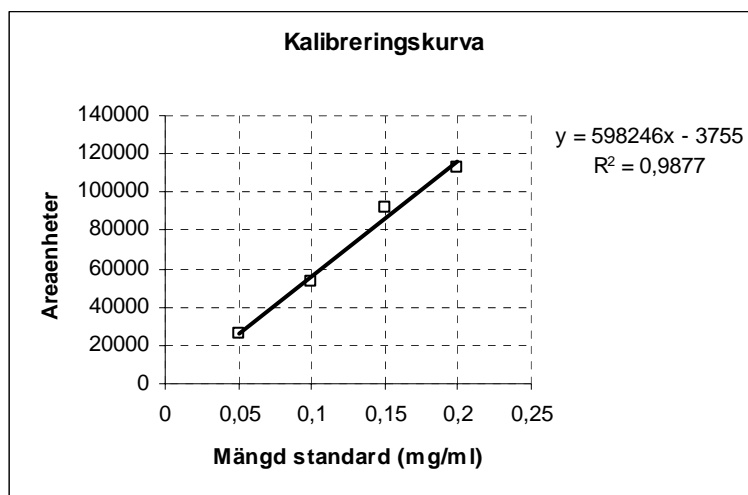
Retentionstider för EPA ME blev slutligen ca 15,3 min och för DHA ME ca 24,2 min, se figur 2.



Figur 2. Retentionstider för EPA ME/DHA ME. EPA ME kan ses vid 15,3 min och DHA ME vid 24,2 min.

4.8 GC-kvantitativ analys

Koncentrationen av varje detekterad analyt i olja och i varje prov beräknades med hjälp av gemensam kalibreringskurva. Kalibreringskurva och dens ekvation presenteras i figur 3.



Figur 3. Kalibreringskurva med areaenheter avsatt som funktion av trimetylpentankoncentration.

Koncentration av EPA i oljan före metanolysreaktion beräknades till 13 %.
Koncentration av DHA beräknades till 8 %.

Maximalt beräknat utbyte av varje målfettsyra som insamlades efter enzymreaktioner kan ses i tabell 3 och exempel på beräkning av utbytet framgår från bilaga 8.

Enzym	Maximalt utbyte av MG EPA i %				Maximalt utbyte av MG DHA i %			
	Normal atm.	Tid / tim	Superkr. atm.	Tid / tim	Normal atm.	Tid / tim	Superkr. atm.	Tid / tim
TL IM	2	22	29	4	5	22	100	4
RM IM	60	22	30	22	63	22	56	22
Amano C	94	22	13	22	100	22	15	22

Tabell 3. Maximalt utbyte (experimentellt/teoretiskt) av varje målfettsyra efter reaktionstid i tim

5 Slutsats

I oljan fanns från början 13 % EPA och 8 % DHA.

Maximal teoretiskt utbyte beräknades till 57mg EPA MG/1g olja respektive 38mg DHA MG/1g olja, se bilaga 8.

I studierna undersöktes ej eventuella förluster i metyleringsreaktion. Det kan vara till fördel att undersöka det i framtiden.

Av nedanstående kan dras slutsatser att reaktioner i superkritisk atmosfär går snabbt och högt utbyte kan erhållas vid kortare reaktionstider jämfört med

reaktioner i normal atmosfär. Detta gäller i fall processparametrar är optimerade.

Amano-C

Studier i normal atmosfär visar att Amano C är mer specifikt för fiskoljan än andra undersökta enzymer, se bilaga 5. Redan efter 5,5 tim reaktionstid blev alla TG fullständigt förbrukade. Utbytet blev 67 % EPA MG och 82 % DHA MG, se bilaga 3. Efter 22h reaktionstid blev utbyte av EPA MG 94 % och DHA MG 100 %. Det innebär att enzymet är mycket specifikt både för EPA och för DHA produktion.

Studier i superkritisk atmosfär visar lägre aktivitet av enzymet Amano C jämfört med normal atmosfär, se bilaga 3. Maximalt utbyte blev erhållet efter 22 tim. Utbyte av EPA MG blev 13 % och DHA MG 15 %. TG har aldrig fullständig förbrukats, se bilaga 4. Det innebär att processparametrar för superkritisk atmosfär måste optimeras. Sänkning av trycket kan vara till fördel eftersom vid provtagningar var lösningen i reaktorn grumlig. En grumlig lösning kan tyda på att immobilisationsmaterial krossas i processen och enzymaktivitet hämmas.

TL IM

I normal atmosfär visade enzymet TL IM lägst specificitet, se tabell 3. Högsta utbytet beräknad för EPA MG till 2 % respektive för DHA MG till 5 %. Det kan innebära att enzymatisk nedbrytning påverkas av omgivande miljö. Det kan vara luft som kommer in i systemet vid reaktionsgång.

I superkritisk atmosfär maximalt utbytet konstaterades efter reaktionstid på 4 tim. Utbyte för EPA MG blev 29 % och för DHA MG 100 %. Det innebär att enzymet är mycket specifikt för DHA produktion.

Reaktionen i superkritisk atmosfär gav högre resultat än reaktion i normal atmosfär, se bilaga 1. I superkritisk atmosfär har max utbyte kunde fås efter 4 tim. I normal atmosfär har TG aldrig fullständig förbrukats och det har bildats bara små mängder av respektive EPA MG/DHA MG. Det innebär att fullständig reaktion i superkritisk atmosfär kan uppnås snabbt och specifikt jämfört med andra enzymer, se bilaga 4. Det är svårt att få högt utbyte med enzymet TL IM i normal atmosfär.

RM IM

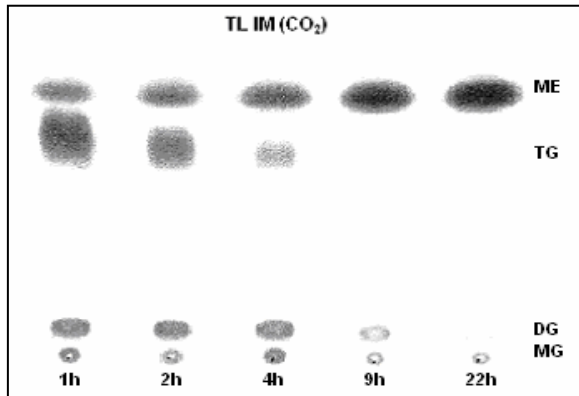
I normal atmosfär efter 22 tim blev utbyte av EPA MG 60 % och DHA MG 63 %, se bilaga 2.

TG har aldrig fullständig förbrukats, men det har bildats relativt stora mängder EPA MG/DHA MG.

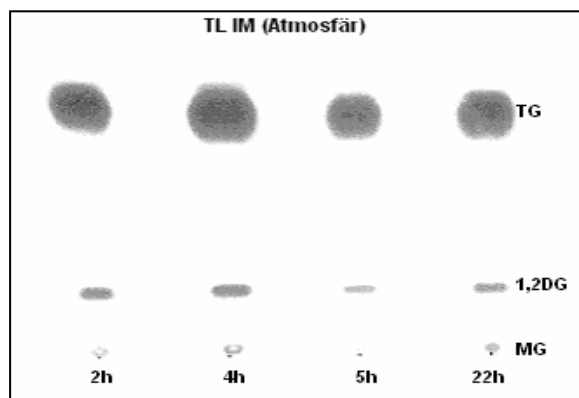
I superkritisk atmosfär efter 22 tim blev utbyte av EPA MG 30 % och av DHA 60 %, se bilaga 2. TG har aldrig fullständigt förbrukats. Mängd DG under reaktionen var relativt konstant, se bilaga 4.

Bilaga 1

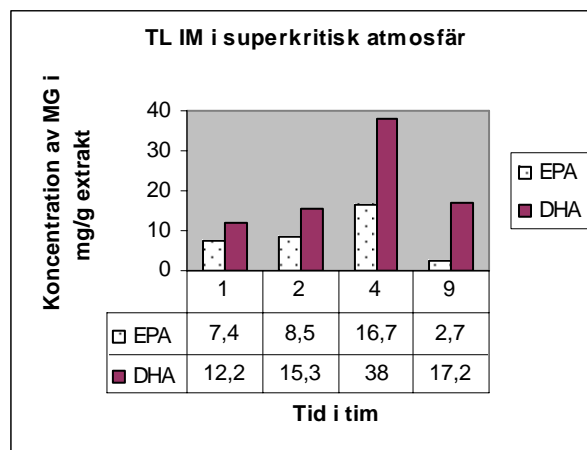
1. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet TL IM i superkritisk atmosfär.



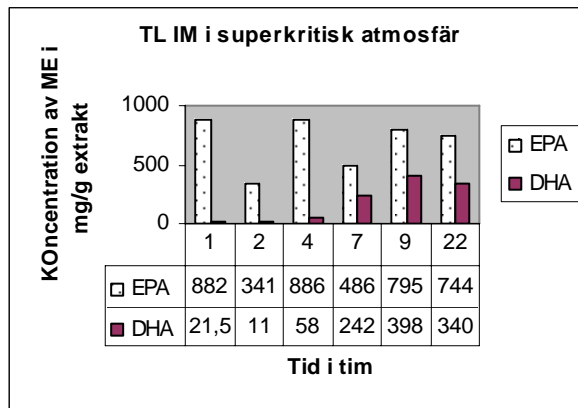
2. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet TL IM i normal atmosfär.



3. Beräknad koncentration av MG EPA/DHA efter reaktion med TL IM i superkritisk atmosfär.

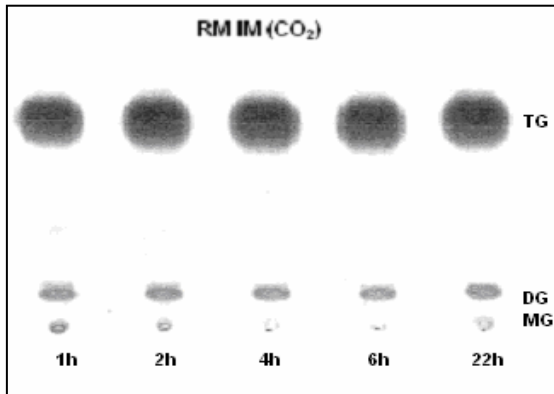


4. Beräknad koncentration av ME EPA/DHA efter reaktion med TL IM i superkritisk atmosfär.

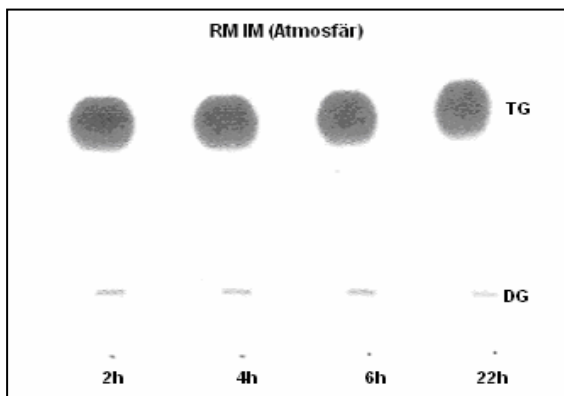


Bilaga 2

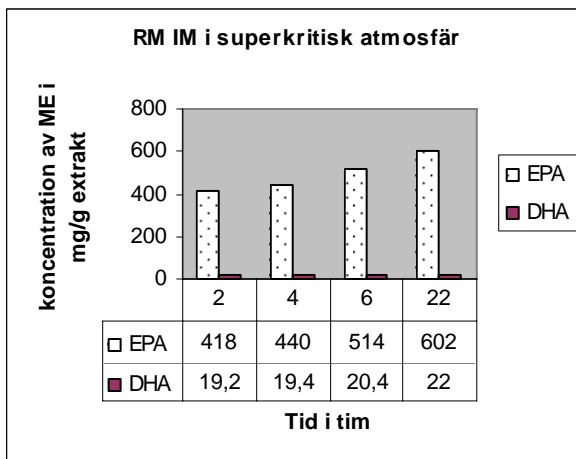
1. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet RM IM i superkritisk atmosfär.



2. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet RM IM i normal atmosfär.

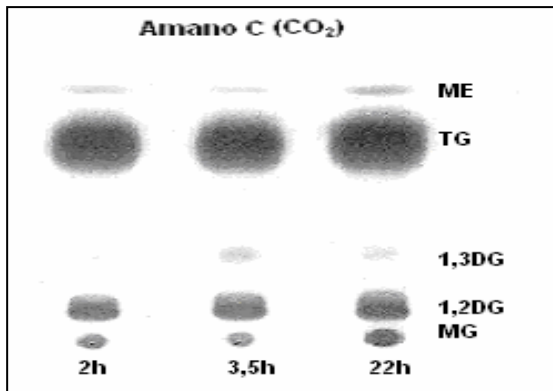


3. Beräknad koncentration av ME EPA/DHA efter reaktion med RM IM i superkritisk atmosfär.

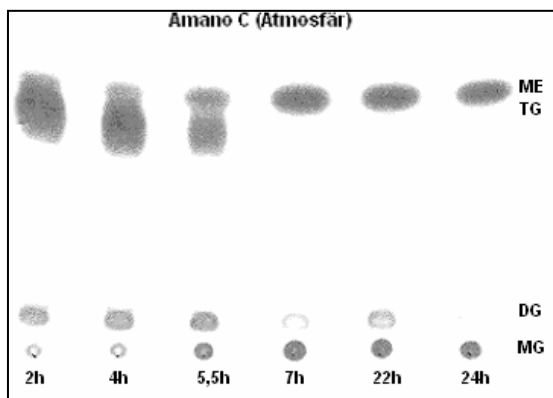


Bilaga 3

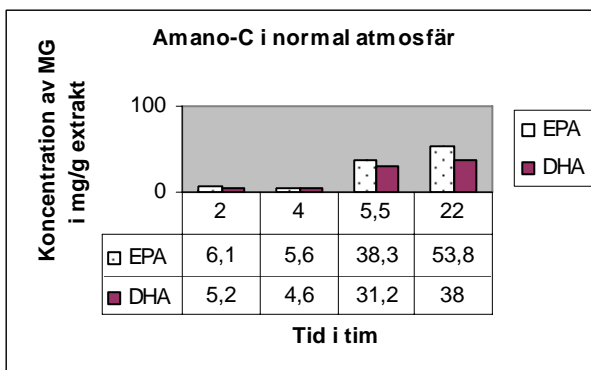
1. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet Amano-C i superkritisk atmosfär.



2. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet Amano-C i normal atmosfär.

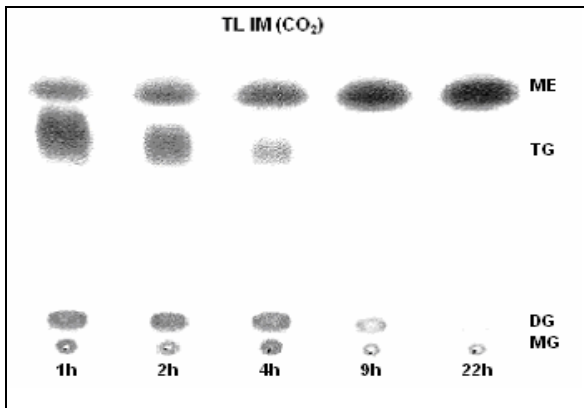


3. Beräknad koncentration av MG EPA/DHA efter reaktion med RM IM i normal atmosfär.

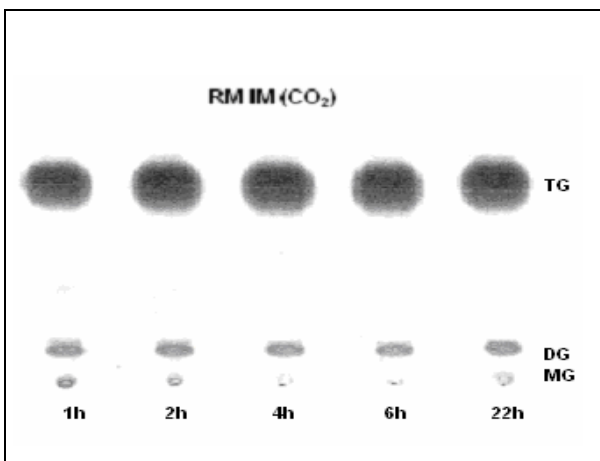


Bilaga 4

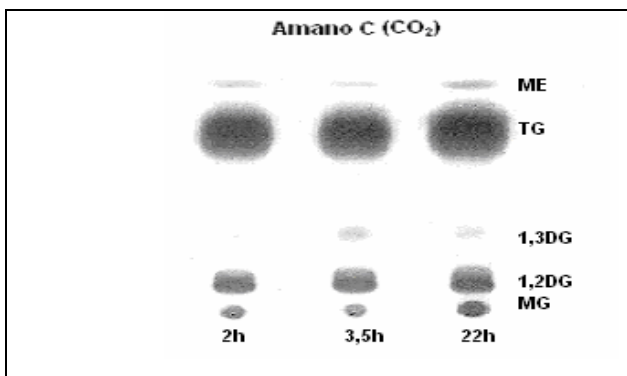
1. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet TL IM i superkritisk atmosfär.



2. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet RM IM i superkritisk atmosfär.

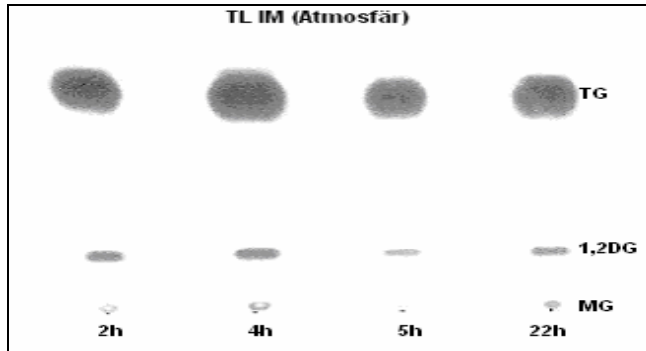


3. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet Amano-C i superkritisk atmosfär.

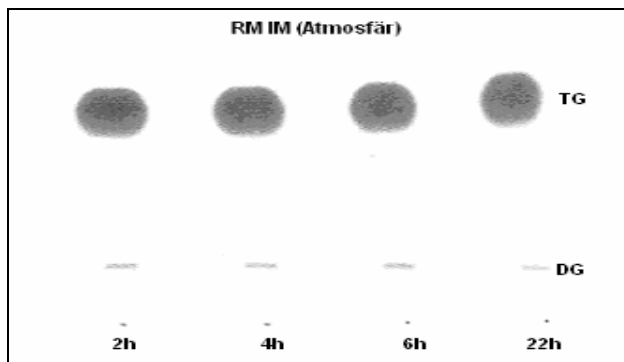


Bilaga 5

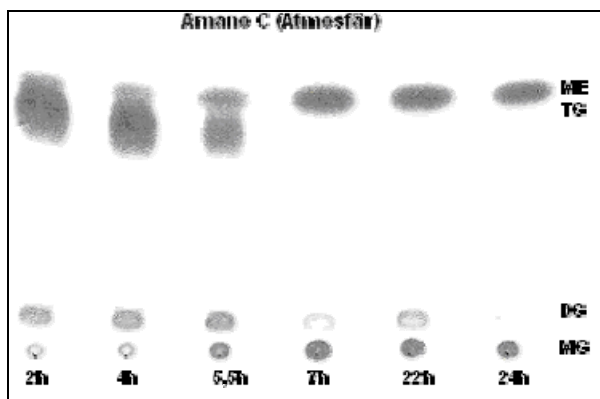
1. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet TL IM i normal atmosfär.



2. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet RM IM i normal atmosfär.



3. Extraktets innehåll (vid analytisk TLC analys) efter reaktionstid (i tim) med Enzymet Amano-C i normal atmosfär.



Bilaga 6

Tabeller i bilaga 6 (1-3) representerar massa uppsamlad extrakt under reaktionens gång och i slutet av reaktion.

1. Enzym TL IM

Superkritisk atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG1	0,3	1
MG2	0,3	2
MG3	0,3	4
MG4	0,4	7
MG5	0,2	9
MG6	0,1	22
ME1	0,1	1
ME2	0,28	2
ME3	0,14	4
ME4	0,38	7
ME5	0,31	9
ME6	0,19	22
Normal atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG	Data saknas	22

2. Enzym RM IM

Superkritisk atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG1	0,15	2
MG2	0,14	4
MG3	0,41	6
MG4	1,44	22
ME1	0,05	2
ME2	0,05	4
ME3	Data saknas	6
ME4	Data saknas	22
Normal atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG	Data saknas	22

3. Enzym Amano-C

Superkritisk atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG1	0,13	22
ME1	0,11	3,5
ME2	0,06	22
Normal atmosfär	Massa uppsamlad extrakt i g	Reaktionstid i timmar
MG1	0,1	1
MG2	0,18	2
MG3	0,06	4
MG4	0,05	5,5
MG5	0,1	22

Bilaga 7

Tabeller i bilaga 7 representerar beräknad data från olika enzymreaktioner efter en viss reaktionstid.

- Koncentrationen av EPA/DHA i mg/ml hexan beräknad (med hjälp av kalibreringskurva, inklusive antal spädningar) genom erhållna areaenheter för varje prov i GC analys.
- Därefter beräknas koncentration av EPA/DHA i extraktet

1. Enzym TL IM

Superkritisk atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Koncentration EPA i mg/g extrakt	Koncentration DHA i mg/g extrakt	Reaktionstid i timmar
MG1	0,26	0,46	7,4	12,2	1
MG2	0,30	0,58	8,5	15,3	2
MG3	0,59	1,5	16,7	38,0	4
MG4	0,08	0,65	2,7	17,2	9
ME1	88,23	2,15	882,3	21,5	1
ME2	95,6	3,06	341,4	11,0	2
ME3	124,01	8,1	886,0	58,0	4
ME4	184,5	91,8	485,5	242,0	7
ME5	246,5	123,5	795,2	398,4	9
ME6	141,3	74	744,0	340,0	22
Normal atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Koncentration EPA i mg/g extrakt	Koncentration DHA i mg/g extrakt	Reaktionstid i timmar
MG	0,043	0,065	1,2	1,7	22

2. Enzym RM IM

Superkritisk atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Koncentration EPA i mg/g extrakt	Koncentration DHA i mg/g extrakt	Reaktio nstimid i timmar
MG	0,6	0,8	17,0	21,2	22
ME1	20,9	0,96	418	19,2	2
ME2	22,0	0,97	440	19,4	4
ME3	25,7	1,02	514	20,4	6
ME4	30,1	1,1	602	22	22
Normal atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Utbyte EPA mg/g extrakt	Utbyte DHA i mg/g extrakt	Reaktio nstimid i timmar
MG	1,2	0,9	34,0	23,8	22

3. Enzym Amano-C

Superkritisk atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Koncentration EPA i mg/g extrakt	Koncentration DHA i mg/g extrakt	Reaktio nstimid i timmar
MG	0,13	0,096	7,4	5,5	22
ME1	16,3	16,0	148,2	146,0	3,5
ME2	18,2	14,1	303,3	235,0	22
Normal atmosfär	Koncentration EPA i mg/ml hexan	Koncentration DHA mg/ml hexan	Koncentration EPA i mg/g extrakt	Koncentration DHA i mg/g extrakt	Reaktio nstimid i timmar
MG1	0,108	0,094	6,1	5,2	2
MG2	0,098	0,087	5,6	4,6	4
MG3	0,67	0,59	38,3	31,2	5,5
MG4	0,95	0,72	53,8	38,0	22

Bilaga 8

1. Beräkning av teoretiskt utbyte av EPA/DHA

Antar att i oljan från början finns TG i form av tripalmitin ($C_{51}H_{98}O_6$)

$$M_{TG} = 807,35 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ g olja innehåller } 1 \text{ g} / 807,35 \text{ g/mol} = 0,00124 \text{ mol TG}$$

Från början

Oljan innehåller 13 % EPA

$$\text{i 1 g olja finns } n = 0,00124 * 0,13 = 1,612 * 10^{-4} \text{ mol EPA}$$

Efter reaktion

Antar att vi får max utbyte dvs.

antal mol EPA innan reaktion i oljan = antal mol EPA efter reaktionen i extraktet

en EPA monoglycerid har molmassa = 352,5 g/mol

$$m = n * M$$

$$\text{max teoretisk massa EPA i 1 g olja} = 352,5 \text{ g/mol} * 1,612 * 10^{-4} \text{ mol} = 57 \text{ mg EPA MG/g olja}$$

teoretisk utbyte av EPA = 57 mg EPA MG/g olja

Från början

Oljan innehåller 8 % DHA

$$\text{i 1 g olja finns } n = 0,00124 \text{ mol} * 0,08 = 9,9 * 10^{-5} \text{ mol DHA}$$

Efter reaktion

Antar att vi får max utbyte dvs.

antal mol DHA innan reaktion = antal mol DHA efter reaktionen

En DHA monoglycerid har molmassa = 378,5 g/mol

$$m = n * M$$

$$\text{max teoretisk massa DHA i 1 g olja} = 378,5 \text{ g/mol} * 9,9 * 10^{-5} \text{ mol} = 38 \text{ mg DHA MG/g olja}$$

teoretisk utbyte av DHA = 38 mg DHA MG/g olja

2. Exempel på beräkningar av experimentellt utbyte av MG EPA/DHA

Beräkningar avser reaktion med enzymet TL IM i superkritisk koldioxid, efter reaktionstid

4h

Koncentration med hänsyn till antal spädningar erhålls från kalibreringskurva = 0,59 mg

EPA/ml hexan

Hexan och trimetylpentan (lösningsmedel i kalibreringskurvan) har samma densitet

Utbyte för EPA: $n=m/M = 0,59\text{mg}/353\text{g/mol MG EPA} = 1,67\ \mu\text{mol}$

Vid TLC analys var injicerad 100 μl extraktet på plattan. Volymen fanns slutligen i 1ml uppsamlad efter metylering hexan

$\rightarrow 1,67\ \mu\text{mol}/100\mu\text{l} = 16,7\ \text{mg}/1\ \text{g olja}$

Utbyte för DHA beräknas på samma sätt där $M_{\text{DHA}} = 378\text{g/mol}$

3. Max Utbyte i % (för tabell 3)

Exempelvis för EPA i koldioxid efter 4 h

Experimentellt utbyte/teoretiskt = $16,7/57 * 100\ \% = 29,3\ \%$

Referenser:

- [1] R. Brockman et al., DOI:10.1002/14356007.a10_245, Fatty Acids, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000, p.13
- [2] A. Halldorsson, Lipase selectivity in lipid modification, Ph.D.Thesis, University of Iceland, Reykjavik, 2003, p.27
- [3] B. Furugren, Matens kemi, Kompendium, Campus Helsingborg, Lunds universitet, Version 2005, s.142
- [4] A. Halldorsson, Lipase selectivity in lipid modification, Ph.D.Thesis, University of Iceland, Reykjavik, 2003, p.27
- [5] U. Johansson, Näring och Hälsa, Studentlitteratur, 2004, s.63
- [6] Livsmedelverket, Vad är omega-3 fettsyror, Avdelningen för information och nutrition, 2004
- [7] G. Burge et al., Alpha-Linolenic acid metabolism I adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids, European Journal of Lipid Science and Technology, volym 107, 2005, p.426-439
- [8] P.Goyens et al., Compartmental modelling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses, Journal of Lipid Research, volym 46, 2005, p.1474-1483
- [9] Meharban Singh, Essential fatty acids, DHA and human brain, Indian Journal of Pediatrics, volym 72, 2005, p.239-242
- [10] S. Lindeberg, Maten och folksjukdomarna, Studentlitteratur, 2003, s.71 [221, Bucher, HC, Hengstler, P, Schindler, C, and Meier, G, N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med*, 2002; 112: 298-304].
- [11] B. Furugren, Matens kemi, Kompendium, Campus Helsingborg, Lunds universitet, Version 2005, s.152-156
- [12] A. Brockman et al., Fatty Acids, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000, p.13 [25, M. Loncin, Fette Seifen, 55, 1953, 7-9]
- [13] A. Brockman et al., Fatty Acids, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000, p.14 [V. Mills, H.K. Mc Clain, Ind. Eng. Chem. 41 1949, 1982-1985)
- [14] U. Johansson, Näring och Hälsa, Studentlitteratur, 2004, s.69
- [15] A. Brockman et al., Fatty Acids, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000, p.16

- [16] H. Gunnlaugsdottir, Lipase-Catalysed Lipid Modificatiois in Supercritical Carbon Dioxide, Disseration ,Department of Food technologi, Lund University, Sweden, 1997, p.27-28
- [17] Helga Gunnlaugsdottir and Björn Sivik,Lipase-Catalysed Alcoholysis of Cod Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide, Publication,Department of Food technologi, Chemical Center, Lund Sweden, **72**:399-405, 1995, p.399-401
- [18] S. Wongsakul et.al.,Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna using immobilized lipases, European Journal of Lipid Science and Technology, volym 105,2003, p.68-73
- [19] <http://sv.wikipedia.org/>, TLC
- [20] Margareta Sandahl, labbhandledning inför kromatografi laborationer, Lunds Universitet, Sweden
- [21] D.C. Harris, Quantitative chemical analysis, International student edition,1991, p.678
- [22] Caroline Granqvist, GC/MS-metod för analys av fri fettsyra I pulvermetallurgiska smörjmedel, Examensarbete/Lunds tekniska högskola Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg, ISSN: 1651-2197, 2003, s.3-5 Lunds tekniska högskola Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
- [23] Kates, 1972
- [24] Y.Watanabe et.al, Stepwise Ethanolysis of Tuna Oil Using Immobilized Candida antarctica Lip

