

Fast-fase NMR-spektroskopi og MRI-studier av fettsyreprofiler direkte på fiskekjøtt

En sammenligning av oppdrettslaks og villaks

Lisa Tu Storhaug



Masteroppgave i NMR-spektroskopi

UNIVERSITETET I BERGEN

2018

FORKORTELSER OG SYMBOL

Forkortelser

<i>ALA</i>	<i>Alfalinolensyre</i>
<i>DHA</i>	<i>Dokosaheksaenolsyre</i>
<i>EPA</i>	<i>Eikosapentaenolsyre</i>
<i>RARE</i>	<i>«Rapid Imaging with Refocused Echos»</i>
<i>MAS</i>	<i>Magisk vinkel spinn</i>
<i>MRI</i>	<i>Magnetisk resonans avbildning</i>
<i>NMR</i>	<i>Nukleær magnetisk resonans</i>
<i>NOE</i>	<i>Nukleær overhauser effekt</i>
<i>NQC</i>	<i>Norsk kvalitetssnitt</i>
<i>ppm</i>	<i>«Parts per million» ($\times 10^{-6}$)</i>

Symbol

<i>P</i>	<i>Vinkelmoment</i>
<i>h</i>	<i>Plancks konstant ($= 6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}$)</i>
\hbar	<i>Plancks konstant delt på 2π</i>
<i>I</i>	<i>Angulært moment kvantetall</i>
μ	<i>Magnetisk moment</i>
γ	<i>Magnetogyrisk forhold</i>
<i>B₀</i>	<i>Statisk magnetfelt</i>
<i>B_{eff}</i>	<i>Effektivt statisk magnetfelt</i>
<i>m</i>	<i>Magnetisk kvantetall</i>
μ_z	<i>Magnetisk moment i z-komponenten</i>
<i>E</i>	<i>Energi</i>
α	<i>Lav energi spinntilstand ($m = \frac{1}{2}$)</i>
β	<i>Høy energi spinntilstand ($m = -\frac{1}{2}$)</i>
ΔE	<i>Energiforskjellen mellom to spinntilstander</i>
<i>N_{α}</i>	<i>Antall spinn i α-spinntilstanden</i>
<i>N_{β}</i>	<i>Antall spinn i β-spinntilstanden</i>

k_B	Boltzmann konstant ($=1,3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
T	Temperaturen (Kelvin)
ν	Frekvens
ν_L	Larmor-frekvens
σ	Skjermingskonstant
M_0	Magnetiseringsvektor
θ	Vinkel
τ_p	Pulsvarighet er
τ_c	Korrelasjonstid
T_1	Spinn-gitter relaksasjon
T_2	Spinn-spinn relaksasjon
ω	Omega
Aq	Akvisisjon
$D1$	Ventetid mellom dataopptak
B_i	Magnetfeltets posisjon
G_T	Gradientfelt
r_i	Gradientfeltets posisjonen

FORORD

Først og fremst vil jeg takke veilederen min Willy Nerdal for god veiledning og et engasjement som smitter. En stor takk til Signe Steinkopf for konstruktiv veiledning og støtte med skriveprosessen. En motivator og gledesspreder uten like.

Jeg vil takke John Georg Seland for assistanse og veiledning ved bruk av MRI. Ellers vil jeg takke resten av gjengen i NMR-gruppa for fine lunsjmøter med inspirerende presentasjoner. Takk til Henrik Sørgård som alltid gledelig hjelper til på NMR-laboratoriet.

Til slutt vil jeg gjerne takke familie og venner for støtte og fine stunder på og utenfor Realfagsbygget.

SAMMENDRAG

Formålet med dette arbeidet har vært å bestemme fettinnhold, fettfordeling og fettsammensetning i villaks og oppdrettslaks ved hjelp av fast-fase kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi og magnetisk resonans avbildning (MRI).

Hurtig vekst i oppdrettsnæringen de siste tiårene har resultert i at tilgangen til de marine råvarene i fôret er blitt begrenset på grunn av knapphet av de marine råvarene. Dette har ført til økt bruk av alternative vegetabiliske råvarer. Den økende andelen av vegetabiliske ingredienser gjør at viktige langkjedete marine ω -3-fettsyrer som EPA og DHA er byttet ut med kortere-kjedede fettsyrer fra vegetabiliske planteoljer som alfa-linolenolensyre (ALA). Sammensetningen av fettsyrer i dietten til laksen har vist seg å gjenspeiles i fettsyresammensetningen i fileten, samt påvirke fettprofilen i andre deler av fisken.

Det pågår mye forskning på bruk av alternative råvarer i fôret. For dette formålet er det nødvendig med effektive og presise analytiske verktøy for å kontrollere laksekvaliteten. Utviklingen av fôrsammensetningen forårsaker en kontinuerlig endring i kvaliteten og fettsyresammensetningen i oppdrettslaks. Derfor er hurtige og direkte teknikker for analyse av laks av stor nasjonal og internasjonal interesse. For å kvantifisere fettsyrene i laks er det viktig med en presis analytisk metode som er kvantitativ. I dette arbeidet brukes fast-fase ^1H NMR for å bestemme fettinnholdet i laks på en rask måte. Fast-fase ^{13}C NMR brukes for å verifisere en metode som nylig er utarbeidet for å kvantifisere fettsyresammensetningen i laksen. Videre brukes fast-fase ^{31}P -NMR, både statisk og spinnende for å undersøke fosforforbindelser i fosfolipider i fiskekjøttet. MRI brukes for å undersøke fettfordeling i filet og hjerte.

Resultatene viste at oppdrettslaksen hadde et totalt fettinnhold på 10%, noe som var dobbelt så høyt som i villaksen. Videre ble innholdet av EPA og DHA funnet til å være henholdsvis 9,0% og 14,5% i villaksen, sammenlignet med 3,3% og 4,7% i oppdrettslaksen. I tillegg inneholdt sistnevnte 9,1% ALA. Fosforspektrene viste ulikheter i fosforprofilene i laksene. Resultatene fra MRI viste forskjeller i fettinnhold og fordeling av fett i filetene. I tillegg viste MRI av hjertet til laksene at oppdrettslaksen lagret fett rundt hjertet.

Konklusjonen i dette arbeidet er at det er forskjeller i fettinnhold, fettfordeling og fettsammensetning i oppdrettslaks og villaks, og at fast-fase NMR-spektroskopi og MRI er pålitelige alternativer til nåværende etablerte metoder.

SUMMARY (ABSTRACT)

The purpose of this project has been to determine the fat content, fat distribution and fatty acid composition in wild and farmed salmon using solid-state Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and Magnetic Resonance Imaging (MRI).

Rapid growth in the aquaculture industry over the past decades has, due to lack of enough marine resources, resulted in limited access to marine ingredients in the salmon feed. This has led to an increased use of alternative vegetable ingredients causing important long-chain marine ω -3-fatty acids like EPA and DHA to be replaced by shorter acyl chain fatty acids from vegetable oils like ALA. The composition of fatty acids in the salmon diet has shown to be reflected in the fatty acid composition of the fillet, as well as affecting the fat profile in other parts of the fish.

There is a lot of ongoing research on the use of alternative ingredients in the feed. For this purpose, effective and accurate analytical tools for control of salmon fillet quality are required. The development of the feed composition causes a continuous change in quality and fatty acid composition in farmed salmon. Therefore, fast and direct techniques for analyzing salmon is of national and international interest. To quantify the fatty acids in salmon, it is important to have a precise analytical and quantitative method. In this project, solid-state ^{13}C NMR is used to verify a method that has recently been prepared to quantify the fatty acid composition in salmon. Further, solid-state ^{31}P NMR, both static and magic angle spinning, is used to investigate the phosphorous compounds in phospholipids in the salmon meat. MRI is used to investigate the fat distribution in the fillet and heart.

Results showed that farmed salmon had a total fat content of 10%, twice the amount as in the wild salmon. Furthermore, the content of EPA and DHA is found to be 9.0% and 14.5% in the wild salmon, compared to 3.3% and 4.7% in farmed salmon, respectively. In addition, the farmed salmon contained 9,1% ALA. The phosphorus spectra showed differences in the phosphorous profiles of the salmons. The results from MRI showed differences in fat content and fat distribution in the fillets. In addition, MRI of the hearts of the salmons showed that the farmed salmon stored fat around the heart.

The conclusion of this research is that there are significant differences in fat content, fat distribution and fat composition in farmed and wild salmon, and that solid-state NMR spectroscopy and MRI are reliable alternatives to current established methods.

INNHALDSFORTEGNELSE

Forkortelser og symbol	I
Forord	III
Sammendrag	V
Summary (Abstract)	VII
1. Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Mål for oppgaven	3
2. Teori	5
2.1 Generell teori	5
2.2 Energinivåer	7
2.3 Populasjoner, resonans og skjerming	8
2.4 Puls	11
2.5 Relaksasjon	12
2.5.1 Spinn-gitter relaksasjon (T_1)	12
2.5.2 Spinn-spinn relaksasjon (T_2)	14
2.6 1D 1H	15
2.7 ^{13}C MAS	15
2.8 Nukleær Overhauser Effekt (NOE)	16
2.9 Magnetisk resonans avbildning (MRI)	17
2.10 Fettsyrer	20
3. Material og metoder	21
3.1 Prøver	21
3.1.1 NMR	23
3.1.2 MRI	24
3.2 Eksperimentelt	25
3.2.1 NMR	25
3.2.2 MRI	27
3.3 Kvantifisering av fettsyrer	29
4. Resultat	33
4.1 NMR av det norske kvalitetssnittet (NQC)	33
4.2 Fosfor	42
4.3 MRI av det norske kvalitetssnittet (NQC)	45
4.4 MRI av hjerte	47
5. Diskusjon	50
5.1 NMR av det norske kvalitetssnittet (NQC)	51
5.2 Fosfor	56
4.3 MRI	57
6. Konklusjon	60
7. Litteraturliste	61
8. Vedlegg A	63

1. INTRODUKSJON

1.1 Bakgrunn

Det har vært drevet oppdrett av laks i Norge siden 1970-tallet. Den norske fiskeoppdrettsnæringen har vokst kraftig siden dette, og laks er i dag den viktigste fisken for oppdrett i Norge. Tradisjonelt ble oppdrettslaksen fôret med et fôr basert på marint råstoff som fiskemel og fiskeolje. Dette fôret inneholder naturlige mengder av marine fettsyrer. Grunnet stor etterspørsel og hurtig vekst i næringen de siste tiårene har disse råvarene blitt begrensede ressurser. Mangelen på marine fettsyrer har gjort at fôrproducentene har tatt i bruk alternative råstoff som planteproteiner og planteoljer for å holde tritt med veksten i oppdrettsnæringen. Dette har ført til bruk av økende mengde vegetabiliske ingredienser i laksefôr i løpet av de siste to tiårene.²⁻³ I dag inneholder dietten til oppdrettslaksen om lag 70% vegetabiliske råvarer. Den store andelen av vegetabiliske ingredienser gjør at viktige langkjedete marine ω -3-fettsyrer er byttet ut med vegetabiliske planteoljer. Sammensetningen av fettsyrer i dietten har vist seg å gjenspeiles i fettsyresammensetningen i fileten.⁴⁻⁷ Fettsyresammensetningen i laks er av stor betydning for forbrukeren da de ulike typer fettsyrene i laks er viktig for kvalitet og er avgjørende for den gunstige helseeffekten av å spise laks.

Det er også flere forskjellige typer ω -3-fettsyrer. Kilden til ω -3-fettsyren avgjør type ω -3-fettsyre. Alfalinolensyre (ALA) finnes i vegetabiliske oljer, mens eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaenolsyre (DHA) finnes i marine oljer. De marine ω -3-fettsyrene har vist seg å ha langt flere helsefordeler enn de vegetabiliske, blant annet for hjerte- og karsykdommer og hjerne- og synsfunksjoner.⁸ I tillegg har de vist seg å være viktige for utviklingen vår.⁹⁻¹⁰ De samme helsefordelene er ikke funnet for vegetabiliske oljer som ALA¹¹, hvor et høyt inntak kan relateres til visse negative helseeffekter.¹²

Laks er en av hovedkildene til marine ω -3-fettsyrer. Helsedirektoratet anbefaler å spise minst 200g fet fisk som laks, ørret, makrell eller sild i uken.¹³ Grunnen til dette er høy forekomst av de marine ω -3-fettsyrene (EPA og DHA) i laks.¹⁴ Problemet for

forbrukeren er at ulike typer laks inneholder ulike typer ω -3-fettsyrer og mengder, avhengig av dietten til laksen. Villaksen har en diett som gir den en naturlig sammensetning av marine fettsyrer, og naturligvis ingen vegetabiliske fettsyrer. I motsetning blir oppdrettslaksen fôret med en diett bestående av et høyt innhold av planteoljer.

Det pågår mye forskning på bruk av alternative råvarer i fôret for å dekke behovet for ω -3-fettsyrene på en bærekraftig måte. For dette formålet er det nødvendig med effektive og presise analytiske verktøy. Utviklingen av fôrsammensetningen forårsaker en kontinuerlig endring i kvaliteten og fettsyresammensetningen i oppdrettslaks. Derfor er hurtige og direkte teknikker for analyse av laks av stor interesse. Videre har kvalitetssikringen fått økende oppmerksomhet fra både produsenter og forbrukere, hvor fettinnhold, sammensetningen og fordelingen er viktige kvalitetsegenskaper.

For å mengdebestemme disse fettsyrene i oppdrettslaks og villaks er det viktig med en presis analytisk metode som er kvantitativ. Da dette er et område av stor interesse er det utarbeidet mange ulike analysemetoder. For å bestemme innhold av umettede fettsyrer involverer nåværende metoder typisk lipidekstraksjon med kloroform/metanol etterfulgt av filtrering, forsåpning og metylering før separasjon ved gasskromatografi.¹⁵ For hvert trinn i en prøveopparbeiding introduseres det mulige feil, spesielt i trinn som ekstraksjon og kjemisk modifisering av prøven. Dette er kritisk ved kvantifisering av en komponent.

Spesielt er ekstraksjon et kritisk trinn i prøveopparbeidelsen. Dette har ført til at det gjennom historien er utarbeidet flere ekstraksjonsprosedyrer med mål om lipidutvinning fra organismer, vev eller celletyper. De første kjente studiene ble gjort av Chevreul på oppløsning av lipidmaterialer i forskjellige løsemidler. Etter dette, i 1879 beskrev Franz von Soxhlet den første metoden basert på en automatisk løsemiddelekstraksjon av melkelipider med dietyleter.¹⁶ En ytterligere forbedring ble gjort i 1914 da en blanding av etanol og eter ble anvendt for lipidekstraksjon.¹⁷

Til tross for tidlig bruk av kloroform i ekstraksjon av lipider¹⁸ ble den største forbedringen av ekstraksjonen av amfile lipider fra animalsk vev gjort da Folch

beskrev sin klassiske ekstraksjonsprosedyre i 1957. Denne prosedyren er fortsatt den mest brukte over hele verden. Standardmetoden for ekstraksjon av fettsyrer ved NIFES¹⁹ er en modifisering av denne klassiske Folch-metoden.²⁰

En metode som er mindre brukt, men komplementær til gasskromatografi, er væskefase ¹H og ¹³C NMR-spektroskopi.²¹ Dette er en etablert metode for å kvantifisere fettsyresammensetningen av fettekstrakter fra fisk.^{4, 22-27} I tillegg til at andre bestanddeler og metabolitter kan bli identifisert ved hjelp av NMR.²⁸⁻²⁹ Væskefase NMR krever at prøven er i væskeform. Dette innebærer prøveoppbeiring som ekstraksjon³⁰ på samme måte som ved gasskromatografi. Ved tidkrevende prøveoppbeiring kan fettsyrene og fett oksidere, som gir tap av prøve.

Sett i sammenheng med gasskromatografi er NMR-spektroskopi et nytt verktøy, da spesielt fast-fase NMR. Ved fast-fase NMR-spektroskopi blir målingene gjort direkte på vevet uten noen form for behandling eller ekstraksjonsprosedyre med organiske løsemidler. Det at målingene gjøres direkte på prøven eliminerer usikkerhet og degradering av prøven ved oppbeiring. Fast-fase NMR-spektroskopi har stort potensial på flere områder hvor det i dag benyttes kjemisk ekstraksjon. Det er i et tidligere arbeid blitt brukt fast-fase ¹³C NMR til kvantifisering av fettsyrer.³¹ Det er denne metoden som skal verifiseres i dette arbeidet.

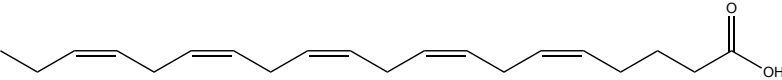
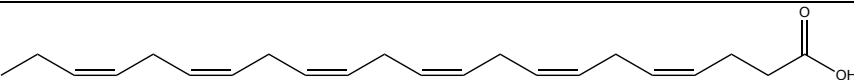
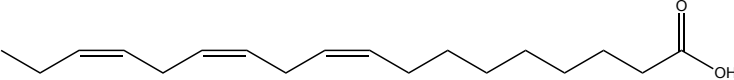
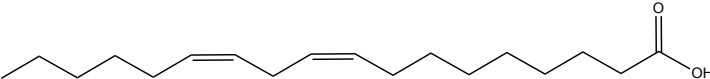
En annen magnetisk resonansteknikk som tillater direkte analyse av prøven, er magnetisk resonans-avbildning (MRI). Denne teknikken gir et bilde av prøven, i tillegg til at den tillater å måle T₂-verdier på bestemte områder av interesse i prøven såkalt lokalisert spektroskopi. T₂-verdiene indikerer hva prøven består av og kan relateres til egenskapene til fett, muskel og bindevev.

1.2 Mål for oppgaven

I dette arbeidet analyseres fettinnholdet og fettsyresammensetningen av oppdrettslaks og villaks, hvor målet er å verifisere ¹³C MAS NMR og MRI som pålitelige metoder for å kvantifisere fettsyresammensetningen, fettinnhold og distribusjon av fett i oppdrettslaks sammenlignet med villaks. Det er blitt fokusert på ulike typer

ω -3-fettsyrer og hvordan dette påvirker kvaliteten av laksen. Fettsyrene som studeres i dette arbeidet er vist i **Tabell 1-1**.

Tabell 1-1. Oversikt over fettsyrene med tilhørende molekylstruktur som studeres i dette arbeidet.

Fettsyre	Molekylstruktur
ω -3 (EPA) <i>Eikosapentaenolsyre</i> (C20:5)	
ω -3 (DHA) <i>Dokosaheksaenolsyre</i> (C22:6)	
ω -3 (ALA) <i>Alfalinolensyre</i> (C18:3)	
ω -6 <i>Linolsyre</i> (C18:2)	

^1H NMR ble benyttet for å bestemme fettprosent på en effektiv måte. Fast-fase ^{31}P NMR ble brukt for å undersøke om den ulike dietten hos oppdrettslaks og villaks kan påvirke sammensetningen av cellemembranene til laksen. Etter mitt kjennskap er det første gang det er studert ^{31}P NMR både spinnende og statisk for å identifisere fosfor-holdige energibærere og fosfolipider i cellemembraner. For å undersøke om og hvordan andre organ kan påvirkes av diett ble det tatt MRI av hjertet av både oppdrettslaksen og villaksen.

2. TEORI

Innen vitenskapen er kjernemagnetisk resonans (NMR) en relativt ny teknikk. I 1946 oppdaget og utviklet to uavhengige forskergrupper, ledet av Felix Bloch og Edvar Purcell, kjernemagnetisk resonanssignaler for første gang. For dette arbeidet ble de sammen tildelt Nobel prisen i fysikk i 1952.³²

I begynnelsen var NMR en metode som i hovedsak ble brukt av fysikere. Senere har flere faggrupper oppdaget fordelene med NMR. I dag er NMR en viktig metode for kjemikere, biokjemikere, fysikere og innen medisin. Fremskritt i utnyttelse av instrumentet, programvare og teknikker i tillegg til den stadige forbedringen av datastyrken driver kunnskapen på feltet stadig videre.

2.1 Generell teori

Det fysiske grunnlaget for NMR-eksperimentet er kjernefysisk vinkelmoment; P . Det vil si at de fleste kjerner antas å være sfæriske og roterende om sin egen akse og derved produserer et vinkelmoment. Dette vinkelmomentet kan kvantifiseres som:

$$(2-1) \quad P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar$$

I ligningen er P vinkelmomentet og $\hbar = h/2\pi$, der h er Plancks konstant ($=6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}$). I er det angulære moment kvantetallet, kalt kjernespin. Kjernespinnet kan ha verdiene $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2 \dots$ opp til 6. Vinkelmomentet P er forbundet med det magnetiske momentet μ , der begge er vektorstørrelser proporsjonale med hverandre:

$$(2-2) \quad \mu = \gamma P$$

Proporsjonalitetsfaktoren, γ er en konstant for isotopen av hvert element og kalles det magnetogyriske forholdet. Kjerner med lavt magnetogyrisk forhold er lite sensitive, mens kjerner med høyt magnetogyrisk forhold kan observeres. Ved å kombinere ligningene (2-1) og (2-2) får vi et nytt uttrykk for det magnetiske momentet, μ :

$$(2-3) \quad \mu = \gamma \sqrt{I(I+1)} \hbar$$

Kjerner med $I = 0$ har ikke et kjernemagnetisk moment og kan ikke observeres i NMR-spektre. Viktige eksempler på dette er hovedbyggesteinene i organiske forbindelser; ^{12}C og ^{16}O . Kjerner med spinn har en ikke-sfærisk formet ladningsfordeling som gjør at de oppfører seg som barmagneter i et eksternt magnetfelt. Disse barmagnetene vil da ha $2I+1$ mulige orienteringer i magnetfeltet. Kjerner med et oddetallnummer har I verdier $1/2, 3/2, 5/2$ og så videre.

Tabell 2-1: Tabellen viser en oversikt av kjerner med deres tilhørende kjernespinn og den naturlige forekomsten av kjernene i prosent. Verdier i tabellen er hentet fra Horst Friebolin.¹[s.3]

Kjerne	Spinn, I	Naturlig forekomst [%]
^1H	$1/2$	99,9885
^2H	1	0,0115
^{12}C	0	98,9
^{13}C	$1/2$	1,07
^{15}N	$1/2$	0,368
^{16}O	0	99,96
^{17}O	$5/2$	0,038
^{19}F	$1/2$	100
^{31}P	$1/2$	100

For de fleste kjerner peker vektoren for det angulære momentet, P og vektoren for magnetisk moment, μ i samme retning. Imidlertid er de i noen tilfeller antiparallele som i ^{15}N og ^{31}P , og til og med i elektronet.

2.2 Energinivåer

Dersom en kjerne med $I > 0$ er plassert i et statisk magnetfelt B_0 , vil z-komponenten av vinkelmomentet få en retning gitt av:

$$(2-4) \quad P_z = m \hbar$$

Hvor m er det magnetiske kvantetallet definert av I , og kan ha verdiene $m = I, I-1 \dots -I+1, -I$ og dermed $2I+1$ mulige orienteringer. Fra ligningene (2-2) og (2-4) får vi z-komponentene av μ i feltet:

$$(2-5) \quad \mu_z = m \gamma \hbar$$

Energien av det magnetiske momentet i feltet er gitt av:

$$(2-6) \quad E = -\mu_z B_0$$

Hvor B_0 er flukstettheten til det påførte magnetfeltet. For en kjerne med $2I+1$ mulige orienteringer vil det da være $2I+1$ energitilstander kalt nukleære Zeeman-nivåer. Ved å kombinere ligningene (2-5) og (2-6) kan energien uttrykkes som:

$$(2-7) \quad E = -m \gamma \hbar B_0$$

For kjerner med $I = \frac{1}{2}$ som ^1H og ^{13}C eksisterer det to mulige orientering ($2I+1 = 2$) og to nukleære Zeeman-nivåer:

$$(2-8) \quad E_{m=+1/2} = -\left(\frac{1}{2} \gamma \hbar\right) B_0$$

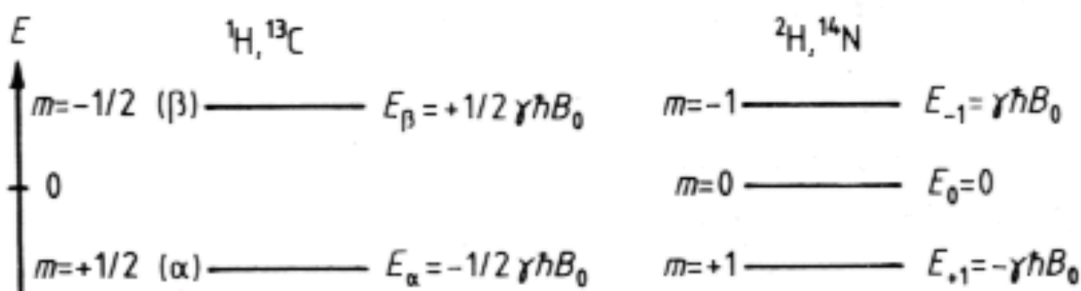
og

$$(2-9) \quad E_{m=-1/2} = \left(\frac{1}{2} \gamma \hbar\right) B_0$$

I kvantemekanikk er tilstanden hvor $m = +\frac{1}{2}$ beskrevet av spinn-funksjonen α og tilstanden hvor $m = -\frac{1}{2}$ beskrevet av spinn-funksjonen β . For å beskrive tilstandene benyttes α og β .

A) $I = 1/2$

B) $I = 1$



Figur 2.1: Energinivåer for kjerner med A) $I = 1/2$ og B) $I = 1$. Figuren er hentet fra Horst Friebolin. ¹ [s.5]

Energiforskjellen mellom to nukleære Zeeman-nivåer er:

$$(2-10) \quad \Delta E = \gamma \hbar B_0$$

2.3 Populasjoner, resonans og skjerming

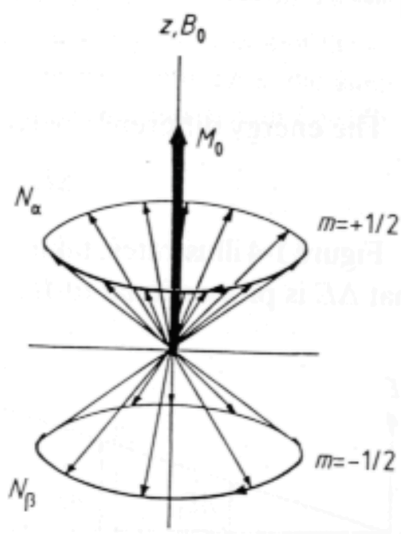
Man ser aldri på enkle kjerner, men på populasjoner av en kjerne. Det er alltid en fordeling av populasjonen langs energinivåene, og det laveste energinivået har en litt høyere populasjon. Ved undersøkelse av en kjerne med $I = \frac{1}{2}$ er det to forskjellige energinivåer og dermed to populasjoner; N_α og N_β . Fordelingen av kjerner mellom energinivåene følger Boltzmann distribusjonen gitt ved følgende:

$$(2-11) \quad \frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}$$

som kan forenkles til:

$$(2-12) \quad \frac{N_\beta}{N_\alpha} \approx 1 - \left(\frac{\Delta E}{k_B T} \right) = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T}$$

hvor k_B er Boltzmann konstanten ($= 1,3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) og T den absolutte temperaturen i Kelvin. For alle kjerner vil energiforskjellen, ΔE være liten sammenlignet med energien av de termiske forholdene $k_B T$, og forskjellen mellom populasjonene i N_α og N_β er i deler per million. Dette er en av grunnene til at NMR er en relativt ufølsom metode. En måte for å øke følsomheten på er å bruke et høyt magnetfelt for å øke forskjellen mellom energinivåene.



Figur 2.2: Fordeling av magnetiseringsvektorer rundt en dobbel kjegle. Totalt antall $N = N_\alpha + N_\beta$. Når $N_\alpha > N_\beta$ resulterer det i en makroskopisk magnetisering. Figuren er hentet fra Horst Friebolin. ¹ [s.6]

Prosesseringsfrekvensen, også kalt Larmor-frekvensen, ν_L er proporsjonal til den magnetiske flukstettheten B_0 :

$$(2-13) \quad \nu_L = \nu_1 = \left| \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) \right| B_0$$

Her er ν_1 frekvensen til det påførte radiofrekvenssignalet. Dersom et radiofrekvenssignal påføres systemet vil forholdet mellom populasjonene kunne endres. For at dette skal skje må frekvensen til det påførte radiosignalet samsvare med frekvensen som den nukleære magneten naturlig prosesserer i magnetfeltet. Dette er kalt resonans. I følge kvantemekanikken er det kun de energinivåovergangene hvor det magnetiske kvantetallet m øker eller avtar med en som er tillatt:

$$(2-14) \quad \Delta m = \pm 1$$

Derfor er de eneste tillatte overgangene mellom energinivåer de som er ved siden av hverandre. Energien til et radiosignal kan uttrykkes som:

$$(2-15) \quad E = h\nu$$

Ligning (2-10) gir energiforskjellen mellom to energinivåer. Ved å kombinere ligningene (2-15) og (2-10) vil en få resonanstilstanden:

$$(2-16) \quad \nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

som også er lik Larmor frekvensen (ligning 2-13). Resonansen som oppstår fra hver kjerne påvirkes av kjernens kjemiske miljø slik at en kan få separate observasjoner. Elektronene som omgir kjernen vil på grunn av det påførte magnetfeltet, B_0 fremkalle en strøm som setter opp et magnetfelt, B i motsatt retning av B_0 og reduserer feltet rundt kjernen. Dette kalles skjerming. Det effektive feltet rundt kjernen, B_{eff} er gitt av:

$$(2-17) \quad B_{eff} = B_0 - B = B(1 - \sigma)$$

Her er σ skjermingskonstanten. Denne konstanten vil være høyere for større atom da skjermingen øker med antall elektroner.

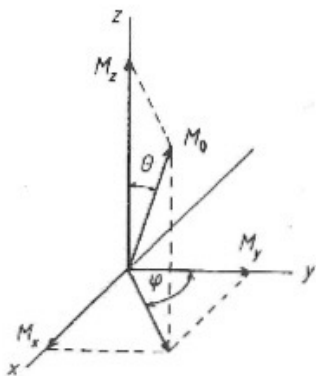
2.4 Puls

Det er flere måter å oppnå resonans og dermed et NMR-spekter. I de tidlige stadiene av NMR var det to måter å få et NMR-spekter på. Enten ved å variere feltet med bestråling med en konstant frekvens eller ved å variere pulsen i et statisk magnetfelt. I begge tilfeller er opptakerstasjonen koblet direkte til feltet eller frekvensen, slik at spekteret tas opp kontinuerlig. Dette blir kalt kontinuerlig bølge (CW) metode. Metoden krever en sensitiv kjerne og høy prøvekonsentrasjon. Den første metoden krever også at magnetfeltet kan varieres. Den vanligste metoden i dag er puls fourier transformasjon (PFT) spektroskopi ved bruk av et statisk magnetfelt.

Ved denne metoden blir alle de aktuelle kjernene av samme type i prøven bestrålt samtidig med en radiofrekvenspuls. Pulsen holdes konstant med en bestemt frekvens. Ettersom ikke alle kjernene når resonanstilstand ved samme frekvens vil ikke alle kjernene resonere ved den bestemte frekvensen. Dette løses ved å slå av og på pulsen en kort tidsperiode, hvor frekvensen ikke er konstant. Når pulsen slås på bare i en kort periode resulterer det i en puls med et kontinuerlig bånd av frekvenser som er symmetriske om den midterste frekvensen, i stedet for bare den faste frekvensen. Valg av frekvens bestemmes av B_0 og kjernen som observeres. Pulsens varighet bestemmes av bredden på spekteret. Korte pulser med høy styrke brukes til å bestråle alle kjernene samtidig. Deretter velges pulsens varighet slik at frekvensbåndbredden overskrider bredden på spekteret.

2.5 Relaksasjon

Pulsen roterer magnetiseringsvektoren bort fra likevekt. M_0 svinger rundt z-aksen definert av komponentene M_x , M_y og M_z , og som varierer med tiden t .



Figur 2.3: Magnetiseringsvektoren, M_0 etter den har blitt vendt bort fra likevekt gjennom en vinkel θ . Figuren er hentet fra Horst Friebolin. ¹ [s.13]

Etter at pulsen er slått av, vil spinsystemet gå tilbake til sin opprinnelige likevekt gjennom relaksasjon. Det finnes to forskjellige relaksasjonsprosesser: Spinn-gitter relaksasjon langs retningen av det påførte magnetfeltet og spinn-spinn relaksasjon vinkelrett på det påførte magnetfeltet.

2.5.1 Spinn-gitter relaksasjon (T_1)

Graden av relaksasjon langs retningen av det påførte magnetfeltet bestemmes av spinn-gitter relaksasjonstiden, gitt av tidskonstanten, T_1 . Felix Bloch beskrev denne prosessen med en ligning for spinn-gitter relaksasjon:

$$(2-22) \quad \frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}$$

Dette anses å være en førsteordensprosess slik at hastighetskonstanten for relaksasjonen er gitt av T_1^{-1} . Spinn-gitter-relaksasjon er forbundet med en energiendring i spinsystemet ettersom energien absorbert fra pulsen må fragis.

Energien overføres til omgivelsene, som vil være nærliggende molekyler i tillegg til veggene av beholderen, gitteret. Dermed øker omgivelsenes termiske energi.

Ulike intra- og intermolekylære interaksjoner bidrar til spinn-gitter-relaksasjon og mekanismene kan klassifiseres som:

- Dipol-dipol relaksasjon
- Spinn-rotasjon relaksasjon
- Relaksasjon gjennom kjemisk skift anisotropi
- Relaksasjon gjennom skalarkobling
- Elektrisk quadropolar relaksasjon
- Relaksasjon gjennom interaksjoner mellom uparede elektroner i paramagnetiske forbindelser

Selv om det er flere ulike kilder til relaksasjon er hovedkilden til spinn-gitter relaksasjon, og den absolutt viktigste, dipol-dipolkobling. Denne kan også måles direkte gjennom den nukleære overhauser effekten. Interaksjoner mellom nukleære dipoler stammer fra det faktum at hver kjerne er omgitt av andre bevegelige magnetiske kjerner, i samme eller fra andre molekyler. Denne bevegelsen forårsaker fluktuerende magnetfelt rundt kjernen. Frekvensbåndet er relativt bredt og er stort sett avhengig av viskositeten til løsningen. Disse fluktuerende magnetfeltene er i stand til å indusere nukleære spinn-overganger dersom de har den riktige frekvensen.

Den teoretiske beskrivelsen av dipolar relaksasjon for en samling av molekyler fører til det proporsjonale forholdet mellom T_1 og τ_c . Jo raskere et molekyl beveger seg, desto større er T_1 . Her er τ_c korrelasjonstiden, som svarer omtrent til intervallet mellom to påfølgende reorienteringer eller posisjonsendringer av molekylet enten i form av vibrasjon, rotasjon eller translasjon. Dipol-dipol-relaksasjonsmekanismen er spesielt effektiv når den aktuelle karbonkjernen er direkte bundet til ett eller flere hydrogenatomer.

2.5.2 Spinn-spinn relaksasjon (T_2)

Umiddelbart etter en $90^\circ_{x'}$ puls oppstår komponenter av magnetiseringsvektoren i x- og y-retningene, $M_{x'}$ og $M_{y'}$. Disse magnetiseringsvektorene skyldes at magnetiseringsvektorene i kjernen ikke er jevnt fordelt langs z-aksen. Dette kalles fasekoherens (som vist i Figur 2.2). Ettersom M_x og M_y vektorene spres ut, fører det til at magnetiseringen i x-y-planet blir borte. Denne prosessen er beskrevet av Bloch-ligningen for spinn-spinn relaksasjon:

$$(2-23) \quad \frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2}$$

og

$$(2-24) \quad \frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2}$$

Tidskonstanten T_2 bestemmer hvor raskt de transverselle magnetiseringskomponentene $M_{x'}$ og $M_{y'}$ avtar. Energien til spinnsystemet er ikke påvirket av spinn-spinn-relaksasjon, ettersom populasjonene i nivåene ikke påvirkes. Bare fasekoherensen mellom de presesserende spinnene går tapt. Denne type relaksasjon kan derfor beskrives som en entropi prosess.

Hovedbidraget til spinn-spinn-relaksasjonen kommer fra inhomogeniteter i B_0 som gjør at ikke alle kjernene opplever det samme magnetiske feltet. Disse inhomogenitetene gjør at kjerner med samme kjemiske miljø kan pressere med litt forskjellige Larmor-frekvenser. Noen presesserer litt seinere og noen litt raskere enn den resulterende transverselle magnetiseringen $M_{y'}$. Dette fører til utfasing.

T_2 -verdier er relatert til linjebredden til det observerte NMR-signalet, noe som har stor praktisk betydning. Forholdet er gitt av:

$$(2-25) \quad \frac{1}{T_2} = \pi \Delta \nu_{1/2}$$

Det er mulig for den transverselle magnetiseringen M_y å avta helt før den langsgående magnetiseringen M_z har nådd likevekt, men det er ikke mulig for den langsgående magnetiseringen å nå likevekt før den transverselle magnetiseringen har forsvunnet helt. Dermed vil alltid T_1 være større eller lik T_2 .

2.6 1D ^1H

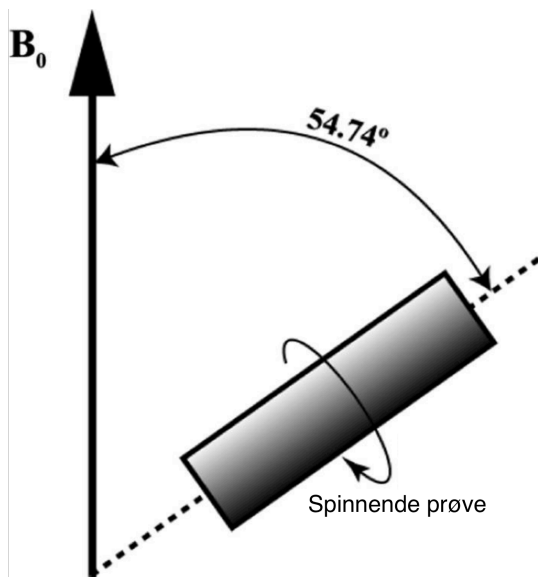
En-dimensjonale proton-eksperiment er det vanligste NMR-eksperimentet. Proton er en sensitiv kjerne og gir sterke signaler, noe som gjør at det tar kort tid å utføre eksperimenter og det er ofte mye informasjon i denne typer NMR-analyser.

Gitt den høye konsentrasjonen av ^1H i vann, er det et relativt sterkt signal av proton fra vann. Dette gjør det vanskelig å observere andre signaler i nærhet av vannsignalet, i tillegg til at det ikke blir like god oppløsning på resten av signalene da datamaskinen finner det vanskelig å behandle svake signaler sammen med svært sterke signaler.

Vann er et mye brukt løsemiddel. I tillegg finnes det ofte i høye konsentrasjoner i organisk materiale, og er dermed tilstede i fast-fase NMR-spektroskopi. Problemene som oppstår ved mye vann i prøven kan løses ved å undertrykke vannsignalet. Dette gjøres enten ved presaturering før akvisisjon eller ved å manipulere magnetiseringsvektorer for å minimere vannsignalet.

2.7 ^{13}C MAS

^{13}C NMR er mye mindre sensitiv enn proton. Dette skyldes at det bare er rundt 1,1% av karbon som naturlig er av denne isotopen. Interaksjoner mellom kjerner inneholder en anisotrop komponent som resulterer i orienteringsavhengighet i spinnsystem som i utgangspunktet er like. I væsker vil raske molekylbevegelser nulle ut disse interaksjonene. For faste stoffer hvor kjernene er nærme hverandre i en stiv konfigurasjon vil ikke det samme skje. Dette resulterer i brede, overlappende signal i NMR spekter. Dette kan løses med en rotasjonsteknikk som kalles «Magic Angle Spinning», MAS som er vist i **Figur 2.4**.



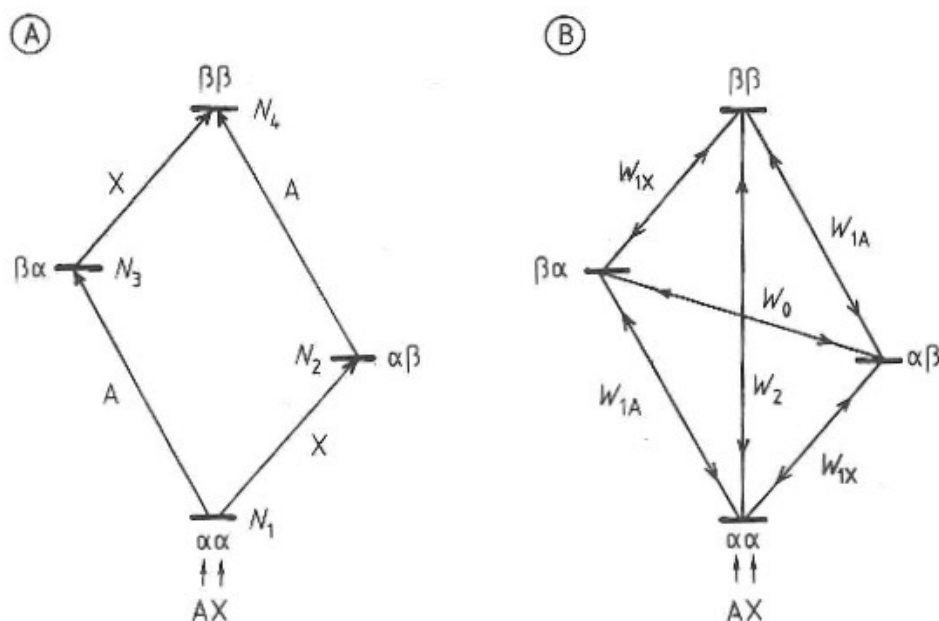
Figur 2.4: Viser hvordan prøven spinner $54,74^\circ$ fra magnetfeltet, B_0 . Figuren er hentet fra Alia, A.³³

Prøven roteres i en vinkel på $54,74^\circ$ fra magnetfeltet. Dette etterligner bevegelsene som oppstår i væske fase og gjør at NMR også er et egnet verktøy for å studere faste stoffer.

2.8 Nukleær Overhauser Effekt (NOE)

^{13}C NMR-spekter er normalt tatt opp med ^1H -bredbånd-dekobling. Under disse forholdene kan signalene forsterkes med opp til 200% av den nukleære overhauser effekten (NOE). NOE er en effekt hvor to kjerner som er i nærheten av hverandre i rom med en dipolar kobling vil påvirke hverandre ved relaksasjon.

Dersom magnetfeltet rundt kjernen til for eksempel hydrogen overlapper med magnetfeltet til karbon vil dette påvirke signalet til karbon. Dette gjør at signalstyrken til karbonet blir høyere enn opprinnelig signal. Denne effekten virker gjennom rom, og er ikke avhengig av skalarkoblinger.



Figur 2.5: A) Opprinnelig situasjon og B) situasjonen etter at den vanlige relaksasjonsovergangen, A er blitt bestrålt. Tykkelsen på platene representerer populasjoner. Figuren er hentet fra Horst Friebolin.¹ [s. 300]

Figur 2.5 viser de mulige overgangene ved relaksasjon. W_2 og W_0 bestemmes i hovedsak av dipol-dipol relaksasjon. Ved bestråling av prøven med resonansfrekvensen blir populasjonen i N_1 - N_3 og N_2 - N_4 like, altså mettet. Det er ingen endringer i populasjonene i X-overgangene. Ved bestråling tas systemet ut av likevekt. Etersom A-overgangene bestråles, og X-overgangene ikke har endret seg fra likevekt er de eneste mulige relaksasjonsovergangene W_0 og W_2 . Ved relaksasjon ved W_2 økes populasjonen i N_2 , og populasjonen i N_3 avtar. Dette gjør at populasjonsforskjellen mellom N_1 - N_2 og N_3 - N_4 blir mindre, noe som gjør at signalintensiteten fra X vil reduseres. Relaksasjon langs W_2 vil derimot føre til at populasjonsforskjellen mellom N_1 - N_2 og N_3 - N_4 øker som gjør at signalintensiteten fra X vil øke. Da NOE er en relaksasjonsprosess trenger den tid for å bygge seg opp. Denne effekten er en grunn til at ^{13}C -NMR blir regnet som en mindre egnet kvantiseringsmetode.

2.9 Magnetisk resonans avbildning (MRI)

På midten av 1970-tallet ble det oppdaget hvordan fenomenet kjernemagnetisk resonans også kunne benyttes til billeddannelse. Magnetisk resonans avbildning (MRI)

er en metode som anvender NMR for fremstilling av snittbilder. Fysikeren Peter Mansfield, kjemikeren Paul C. Lauterbur og legen Raymond Damadian var de første og største pionerene. De to førstnevnte fikk i 2003 Nobelprisen for å ha lagt grunnlaget for billedannelse med MR. I 1986 kom den første magnettomografen i drift i Norge ved Sentralsjukehuset i Rogaland. I dag finnes MR ved alle region- og sentralsjukehus, mange lokalsykehus samt ved mange institutt i hele landet. Siden begynnelsen på midten av 1980-tallet har den teknologiske utviklingen av MR vært enorm.

Teknologien er basert på molekylers egensvingetid og hvordan disse oppfører seg i et sterkt magnetfelt. Egensvingetid er uregelmessige bevegelser av partikler i prøven som skyldes kollisjoner mellom partiklene og molekylene. Et sterkt magnetfelt kan enten komme fra en permanent magnet, eller det kan genereres et magnetfelt ved å sende strøm gjennom en spole. Til vanlig MR avbildning benyttes utelukkende hydrogenkjernen.

I tillegg til spolene som lager hovedmagnetfeltet er det andre spoler som lager noen mindre magnetfelt. Feltstyrken til disse magnetfeltene er avhengig av posisjonen, og kalles "gradientfelt". Magnetfeltets posisjon, B_i , avhenger av styrken på magnetfeltet, B_0 , og posisjonen, r_i til gradientfeltet, G_T . Dette er gitt ved:

$$(2-26) \quad B_i = B_0 + G_T \cdot r_i$$

Gradientfeltene går i alle tre ortogonale retninger og er nødvendig for å bestemme posisjonen på hvor prøven skal tas. Disse gradientfeltene gjør det mulig å generere et MR-bilde ut fra en serie av NMR-signaler. Ved tilstedeværelse av gradienter må Larmor ligningen (*Ligning 2-13*) utvides:

$$(2-27) \quad \omega_i = \gamma \times B_i$$

Her er ω_i frekvensen til protonet, som påvirkes av magnetfeltets posisjon, B_i . Dette vil si at hvert proton vil ha en egen frekvens etter hvor det er i forhold til gradienten.

MR pulssekvenser beskriver fremgangsmåten for å ta MR-bilder. I prinsippet består enhver MR pulssekvens av fire trinn:

Trinn 1: Protoner i vevet som skal avbildes blir eksitert.

Trinn 2: Protoner manipuleres for å gi ønsket bildekontrast

Trinn 3: Signal mottas fra protoner når de går tilbake til utgangspunktet (relaksasjon)

Trinn 4: Signalene blir behandlet og omdannet til bilde.

MR er en teknikk som avbilder vevsskiver bestående av volumelementer, voxler. Når prøven er plassert i magneten vil hvert volumelement være magnetisk. Styrken på vevsmagnetismen i hver voxel er i utgangspunktet proporsjonal med antall hydrogenkjerner i voxelen. Prinsippet i MR avbildning er altså at magnetismen i hver voxel måles og omsettes til gråtonebilder.

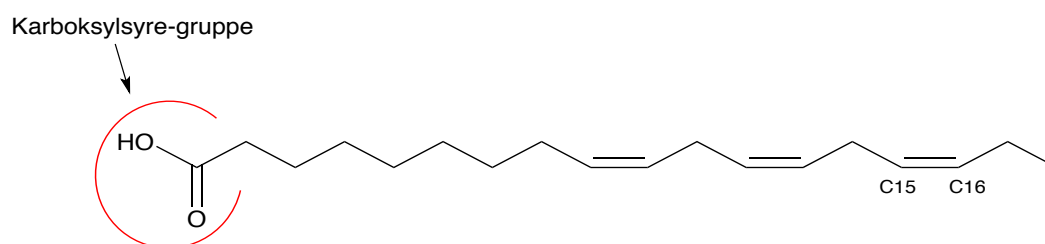
Snittseleksjon skjer ved at en RF puls med en gitt frekvensbåndbredde anvendes samtidig som en gradientpuls. Retningen til gradientpulsene er vinkelrett på det valgte snittet. Ulike snitt-tykkelser kan oppnås ved å variere gradientsyrken eller båndbredden.

Konsentrasjonen av de ulike molekylene kan fremstilles som signaltetthet, som vil gi kontrast til bildet og gjør at en kan visualisere de ulike strukturene i prøven. Ulike billedannede metoder kan en med MRI også se bløtvev som for eksempel fett og kjøtt/muskler som undersøkes i denne oppgaven.

Siden ulike vev har ulike relaksasjonsegenskaper velges pulssekvens ut fra hva en vil framstille. Spinn-ekko frekvenser bruker radiofrekvente (RF) pulser til både eksitasjon og relaksasjon. Gradient-ekko sekvenser bruker også en RF-puls til eksitasjon, men ved relaksasjon endres magnetfeltet ved bruk av mindre gradienter. Gradient-ekko sekvenser er ofte raskere enn spinn-ekko frekvenser, men mindre robuste ovenfor inhomogeniteter i magnetfeltet.

2.10 Fettsyrer

Fettsyrer består av en lang acylkjede med en karboksylsyre-gruppe i den ene enden. Det skilles mellom mettede og umettede fettsyrer. I mettede fettsyrer er alle karbonatomene i acylkjeden bundet sammen med enkeltbindinger. De er altså "mettet" med hydrogenatomer. Umettede fettsyrer har en eller flere dobbeltbindinger mellom karbonatomene. De umettede fettsyrene har forskjellige kjemiske og fysiske egenskaper enn de mettede. I tillegg er det forskjeller på de ulike umettede fettsyrene, avhengig av antall dobbeltbindinger og hvor på acylkjeden de befinner seg. For eksempel har ω -6-fettsyrer en dobbeltbinding på karbonatom-nummer seks fra metylenden av acylkjeden, mens ω -3-fettsyrer har en dobbeltbinding på karbonatom-nummer tre fra metylenden. På eksempelet i **Figur 2.6** har fettsyren 18 karbonatomer og tre dobbeltbindinger. Dette skrives gjerne som (C18:3). Karbonatomene nummeres ved å telle karbonatomer fra karboksylsyre-gruppen.



Figur 2.6: Viser et eksempel på molekylstrukturen til en fettsyre. Her er ω -3-fettsyren Alfalinolensyre (C18:3) vist. Karboksylsyregruppen er markert i rødt.

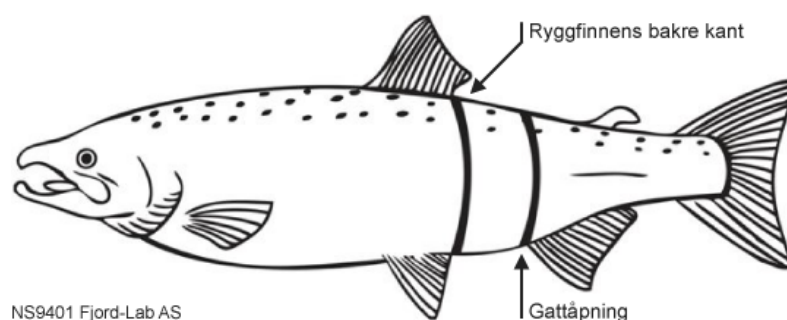
3. MATERIAL OG METODER

Metodene som er benyttet i denne oppgaven er fast-fase kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi og magnetisk resonans avbildning (MRI). Alle eksperimentene er utført med en Bruker AVIII magnet på 500 MHz WB NMR/MRI-instrumentet på Kjemisk institutt ved Universitetet i Bergen.

3.1 Prøver

Villaksen som er brukt i dette arbeidet er fra Altaelva i Finnmark, og ble tatt opp fra elva i juli 2017. Oppdrettslaksen er fra fisketorget i Bergen, levert av Vågen Seafood. Både oppdrettslaksen og villaksen som er brukt i dette arbeidet var på omtrent 5kg. Villaksen var gyteklar, da den inneholdt rogn.

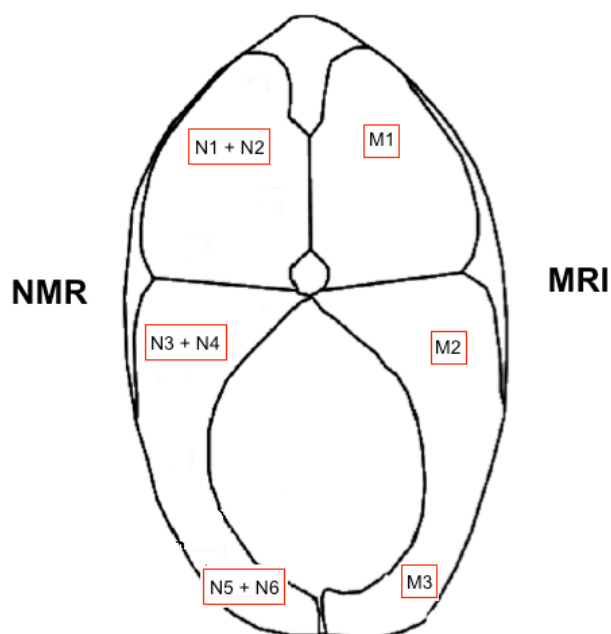
Prøver brukt til analyser av laksens filet er tatt ut etter det norske kvalitetssnittet, NQC³⁴ vist i **Figur 3.1**.



Figur 3.1: Det norske kvalitetssnittet (NQC) er på fisken fra rygffinnens bakre kant til gattåpningen. Dette er vist med piler i figuren. Figuren er hentet fra Ole Høstmark.³⁵

Filetene fra det norske kvalitetssnittet deles i to langs ryggsøylen der laksens venstre side er brukt til NMR-spektroskopi. Her er det tatt seks parallelle prøver, hvor tre av prøvene er tatt fra fettvevet og tre fra muskelvevet. I tillegg er det tatt en prøve som er

brukt til fosforeksperiment, denne prøven er tatt fra muskelvevet. Prøver som er brukt til MRI er tatt fra laksens høyre side. Her er det tatt tre paralleller på ulike plasser i snittet som vist i **Figur 3.2**.



Figur 3.2: Viser snitt av det norske kvalitetssnittet hvor de røde kvadratene angir hvor prøvene er tatt. Venstre side er brukt til NMR-spektroskopi. Tre paralleller er tatt fra fett vist i figuren som N1, N3 og N5 og tre paralleller fra muskelvevet vist i figuren som N2, N4 og N6. Høyre side er brukt til MRI, hvor det er tatt tre paralleller; M1, M2 og M3. Skjelettet av figuren er hentet fra Johnsen, C. A. ³⁶

En oversikt over prøvene som er tatt fra det norske kvalitetssnittet og brukt til NMR-spektroskopi er presentert i **Tabell 3-1** med tilhørende vekt på prøvene. Prøvene er veid for å bestemme total fettinnhold i laksene. Filetprøvene som er tatt med tilfeldig fett/kjøtt-fordeling er moset til en homogen masse.

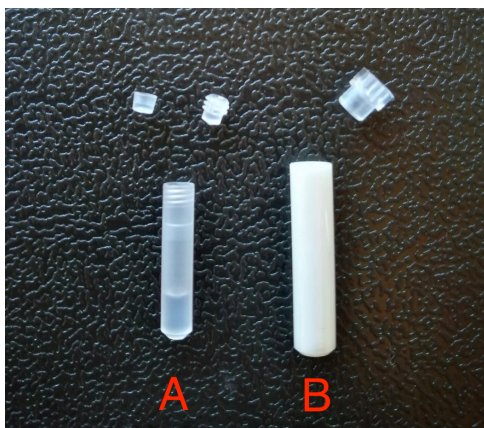
Tabell 3-1: Tabellen viser oversikt over prøvene som er tatt av det norske kvalitetssnittet. Det er tatt tre paralleller med tilfeldig fett/kjøtt-fordeling og tre paralleller av fett fra det norske kvalitetssnittet av både oppdrettslaksen og villaksen. Vekten av prøvene er oppgitt i gram.

Prøve	Parallell	Vekt [g]
Villaks	Tilfeldig	V #1 0,0263
		V #2 0,0279
		V #3 0,0261
	Fett	V #4 0,0283
		V #5 0,0252
		V #6 0,0241
Oppdrettslaks	Tilfeldig	O #1 0,0251
		O #2 0,0267
		O #3 0,0287
	Fett	O #4 0,0243
		O #5 0,0217
		O #6 0,0247

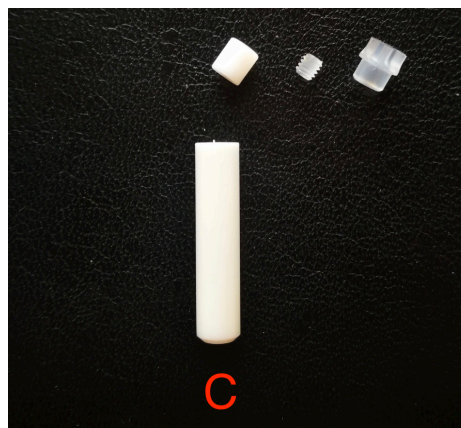
3.1.1 NMR

For ^1H og ^{13}C -eksperimentene ble vevsbiter med en vekt på omtrent 25 mg pakket i et spesialtilpasset prøverør (insert) som vist i **Figur 3.3 A**. Prøverøret sentrifugeres for å tettpakke prøven slik at en får mest mulig prøve i beholderen. Prøverøret plasseres deretter i en 50 μL ZrO_4 MAS-rotor som vist i **Figur 3.3 B** som deretter overføres til magneten. For ^{31}P -eksperimentene ble det brukt en 50 μL ZrO_4 MAS-rotor som vist i **Figur 3.3 C**. Før dataopptak ble instrumentet kalibrert og den magiske vinkelen korrekt innstilt. Under hele prøveprepareringen ble vevet holdt til dels frossent for å minimalisere degradering av prøven.

A) Brukt til ^1H og ^{13}C



B) Brukt til ^{31}P



Figur 3.3: Figuren viser insert og rotor brukt til analyse ved NMR spektroskopi A) Insert og B) 50 μL ZrO_4 MAS-rotor brukt til ^1H og ^{13}C eksperimentene, C) Rotor brukt til ^{31}P eksperimentene.

3.1.2 MRI

Ved MRI av fileten ble det skjært ut en kube (omtrent 2 x 2 x 2 cm) fra fileten og plassert direkte i et NMR-rør for MRI. Ved MRI av hjertet ble fisken tatt opp fra kjøleskap da den fremdeles var litt frossen etter å ha blitt oppbevart i fryser. Under prøveopparbeidingen ble hjertet holdt kaldt ved hjelp av et isbad. Hjertet ble spylt med destillert vann for å tømme det for blod. Da det var tømt for blod ble det spylt med Perfluoropolyether (PFPE olje). Denne oljen ble også brukt i NMR-røret sammen med hjertet.

Figur 3.4 viser bilder av hjertene fra villaks og oppdrettslaks som ble undersøkt ved MRI.

A) Villaks



B) Oppdrettslaks



Figur 3.4: Bilder av hjertene fra A) villaks og B) oppdrettslaks som ble undersøkt ved MRI.

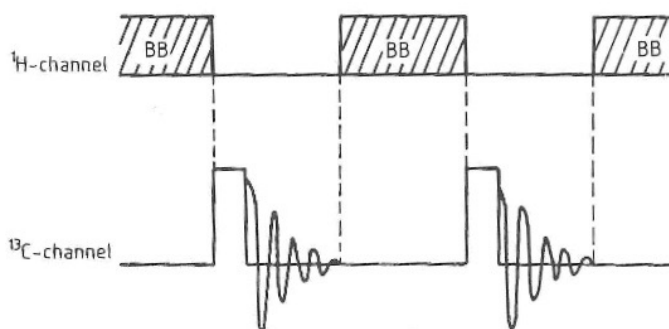
3.2 Eksperimentelt

3.2.1 NMR

Spektrene ble tatt opp ved 277 K, ved kjøleskapttemperatur for å hindre at fettene i laksen oksyderte under opptak av spektrene.

Et protonspekter ble først tatt opp for å bestemme det kjemiske skiftet til vann. Denne verdien ble benyttet for å undertrykke protonsignalet fra vann. Dette gir et spekter uten signalet fra vann som gir bedre oppløsning til de andre signalene som er av interesse. Protonspekter fra ulike prøver ble sammenlignet. Protonspekter ble også brukt til å bestemme totalt fettinnhold i laksen.

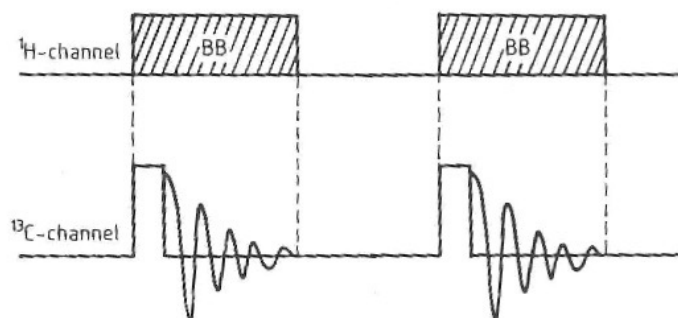
Det ble tatt opp høyoppløselig magisk vinkelspinning (MAS) ^{13}C -spekter av prøvene med en spinnhastighet på 2500 Hz. Det ble kjørt to forskjellige ^{13}C -eksperimenter med forskjellige dekoblingsteknikker for proton; standard bredbånd dekobling (**Figur 3.5**) som anvendes før akvisisjon, og «inverse-gated» dekobling (**Figur 3.6**) som anvendes under puls og dataopptaket.



Figur 3.5: Pulssekvens til ^{13}C -eksperiment med bred-bånd proton-dekobling. Figuren er hentet fra Horst Friebolin.¹ [s.134]

Figur 3.5 viser pulssekvensen til et ^{13}C -eksperiment med bred-bånd proton-dekobling. Bred-bånd dekoblingen i ^1H -kanalen er bare slått på før pulsen og etter dataopptak. Dette vil føre til at alle karbonkjernene i spekteret gir enkle resonanser. Denne pulssekvensen blir påvirket av den nukleære overhauser effekten som gjør at intensiteten på signalene blir påvirket, og dermed ikke kvantitative.

I **Figur 3.6** vises pulsssekvensen til ^{13}C -eksperiment med «inverse-gated» proton-dekobling. Ved denne pulsssekvensen slås proton-dekoblingen på bare under pulsen og dataopptaket. Dette eliminerer koblinger mellom proton og karbon, men NOE får ikke bygget seg opp. Dette gjør at resonansene er kvantitative i intensitet.



Figur 3.6: Pulsssekvens til ^{13}C -eksperiment med «inverse-gated» proton-dekobling. Proton-dekoblingen slås på under pulsen og ved dataopptaket. Figuren er hentet fra Horst Friebolin.¹ [s.136]

^{13}C -eksperimentet med bred-bånd proton-dekobling tar 43 minutter å kjøre med parameterne som er brukt i dette arbeidet. Dekoblingsteknikken med «inverse-gated» proton-dekobling tar omtrent 17 timer. For at metoden skal være både kvantitativ og effektiv løses dette med å sette ventetiden mellom hvert dataopptak, $d1$ til å være så kort at NOE ikke får tid til å bygge seg opp. I studien hvor metoden som det i dette arbeidet skal verifiseres benyttes, er det funnet at ved å sette $d1$ til 10 sekunder, og ved å bruke de andre parameterne som er gitt i **Tabell 3-1** oppnås omtrent samme oppløsning som en ville fått i eksperimentet som tar 17 timer.³⁷

Tabell 3-1: Oversikt over parametere som ble brukt for de ulike dekoblingsteknikkene. Akvisisjonstiden, Aq er 50 ms ved oppdrettslaks, og 20 ms ved villaks.

Pulsprogram	Aq [ms]	$D1$ [s]	Antall skan	Tid
BB-dekobling	50	10	256	43 minutter
«inverse-gated»	50/20	50	1200-5000	< 17 timer

Pulsprogrammet med Bred-bånd-dekobling ble brukt til å kvantifisere de ulike fettsyrene, men det ble også tatt opp spekter med «inverse-gated» dekobling som ble brukt som en referanse. For karbon-eksperimentene ble linjebredden til spektrene satt til å være $lb = 4$ ved kvantifisering av fettsyrene.

Før hvert fosforeksperiment ble det tatt opp spekter med ren fosforsyre 85%, som ble brukt som en ytre standard for å finne 0 ppm. Dette gjøres for å sikre at spektrene er tatt opp med de samme betingelsene og at det ikke er noe drift i instrumentet som kan påvirke det kjemiske skiftet.

Tabell 3-2: Oversikt over parameter som ble brukt i fosforeksperimenter

Pulsprogram	Aq [s]	D1 [s]	Antall skan	Tid [timer]
Spinnende	0,1	3	9000	7,5
Statisk	0,1	3	76000/53781	62 timer

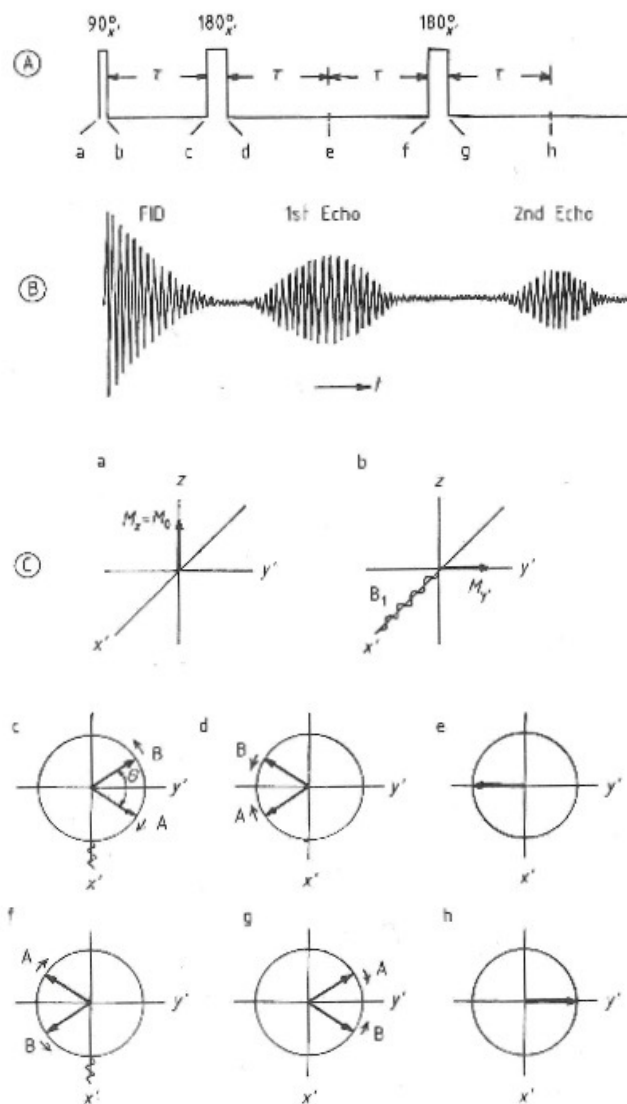
På grunn av problemer med instrumentet måtte det statiske fosforeksperimentet av villaks stanses etter færre skan enn det som ble tatt opp med oppdrettslaksen.

3.2.2 MRI

MRI eksperimentene ble tatt opp ved 285 K. På grunn av tekniske begrensninger kunne ikke MRI-eksperimentene tas opp ved en lavere temperatur. Det ble brukt en MicWB40 probe og et Micro2.5 gradientsystem (Bruker Biospin) med en indre diameter på 25 mm.

Først ble to eksperiment utført som kalles «Flash» og «Multisnitt». «Flash» tar et snitt-bilde i hver retning, x-, y- og z. Dette eksperimentet gir informasjon om prøven er riktig plassert i prøveholderen. «Multisnitt» tar 20 snitt-bilder i hver retning. Dette gir en bedre oversikt av hva prøven består av, og om hvordan parameterne som brukes passer til eksperimentet. Hoved-eksperimentet er «MultisnittMultiEkko» som tar 40 snitt-bilder i en retningen. Dette eksperimentet brukes til å måle T_2 -verdien i forskjellige vev i prøven. Dette eksperimentet ble kjørt flere ganger om det er snitt i ulike retninger av interesse.

Spinn-ekko sekvensen som brukes til å måle T_2 er forklart i **Figur 3.7** og **Figur 3.8**.



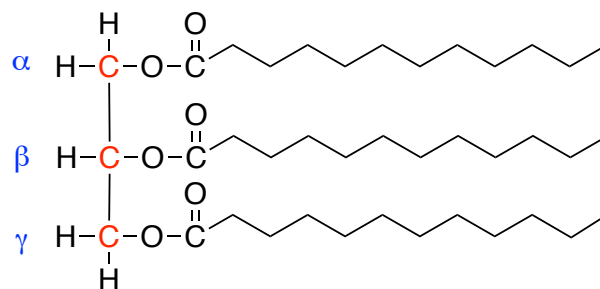
Figur 3.7: A) Spinn-ekko-pulssekvens B) FID og ekko over tid C) Vektordiagram som viser i figurene fra a-h hvordan spinnsystemet påvirkes av spinn-ekko-pulssekvensen. Figuren er hentet fra Horst Friebolin ¹[s.180]

I utgangspunktet er spinnsystemet i likevekt med magnetiseringen langs z-aksen som vist i diagram «a». En $90^\circ_{x'}$ -puls vender magnetiseringen langs y' -aksen som vist i diagram «b». Etter at $90^\circ_{x'}$ -puls slås av og det ventes en tid, τ vil kjernene, vist som A og B i diagram «c» presessere med ulike hastigheter på grunn av inhomogenitet i

magnetfeltet. Denne transverse magnetiseringen roterer nå med Larmor frekvensen i likhet med koordinatsystemet, og forblir dermed langs y' -aksen. Variasjoner i Larmor frekvensen skyldes kun variasjoner i magnetfeltet da en kun ser på en type kjerne. Kjerne A opplever et litt høyere felt enn gjennomsnittet, og B et litt lavere. Kjerne A presesserer dermed litt raskere enn gjennomsnittet, og B litt saktere. Kjernen A kommer dermed litt før koordinatsystemet som roterer med gjennomsnittet, mens B faller litt bak. I diagram «c» angis rotasjonsretningene i forhold til koordinatsystemet med små piler utenfor sirkelen. Vektorene A og B er separert med en vinkel som vist i diagram «c», de er ute av fase. Denne defasingen av vektorene reduserer størrelsen på magnetiseringen. Deretter påføres en 180°_x -puls som alternerer magnetiseringen 180° til $-y$ -planet som vist i diagram «d». Etter en ny tid, τ vil spinnene refokusere og et ekko med maks intensitet oppstår som vist i diagram «e». Dette vil kompensere for effektene av et inhomogent magnetfelt. Deretter ventes en ny tid, τ etterfulgt av en 180°_x -puls. Etter enda en ny tid, τ oppstår det et nytt ekko. Intensiteten av dette ekkoet vil være mindre enn det første på grunn av spinn-spinn relaksasjon. Ved å gjenta dette flere ganger vil reduksjonen i ekkosignalene gi et uttrykk for transvers relaksasjon, T_2 .

3.3 Kvantifisering av fettsyrer

Ved kvantifisering av de ulike fettsyrene antar en at alle fettsyrene er i triglyserid-form. Triglyserid er lager- og transportformen av fettsyrer. Et triglyserid består av ett glyserolmolekyl bundet til tre fettsyrekjeder via esterbindinger som vist i **Figur 3.9**. Ryggradskarbonene som er markert med rødt i figuren vil gi resonanser i et ^{13}C -spekter. Hvert av disse ryggradskarbonene representerer dermed ett glyserid, hvert av disse er markert i blått som α , β og γ i **Figur 3.9**. I ^{13}C -spekter av fettvev vil disse glyseridene gi to resonanser; ett sammenfallende signal fra α - og γ -glyseridet og ett signal fra β -glyseridet. Til sammen representerer disse to signalene hele triglyseridet. En kan dermed bruke signalene fra glyserid i spekteret som en intern standard. Triglyseridene i fettvevet består av ulike fettsyrer. Ved å sammenligne arealet av signalet fra triglyseridet med arealet av signalet fra fettsyrene av interesse, vil en få et forhold som gir andel av fettsyre i triglyseridet, og dermed av totalt fettsyre-innhold.



Figur 3.9: Viser eksempel på molekylstrukturen til et triglyserid. Triglyseridet består av ett glyserolmolekyl bundet til tre fettsyrekjeder via esterbindinger. α , β og γ markert i blått representerer hver sitt glyserid, og utgjør til sammen hele triglyseridet. Ryggradskarbonene som gir signal i et ^{13}C -spekter er markert med rødt.

Signalet til β -glyseridet er isolert fra andre signal og arealet av dette signalet multipliseres med tre for å få arealet til hele triglyseridet. I ^{13}C -spekter er det en resonans fra signal fra alle ω -3-fettsyrene. Totalt innhold av ω -3-fettsyrer i prøven finnes dermed ved å ta forholdet mellom arealet av denne resonansen og resonansen av α,γ -glyseridet. Arealet av resonansen fra α - og γ -glyseridet multipliseres med $3/2$ for å få arealet til hele triglyseridet.

$$(2-25) \quad \text{Total \% } \omega\text{-3-fettsyre} = \frac{A_{\omega\text{-3}}}{A_{\alpha,\gamma\text{-glyserid}} \times \frac{3}{2}} \times 100\%$$

Andel av fettsyrene DHA og EPA finnes på samme måte:

$$(2-26) \quad \% \text{DHA} = \frac{A_{\text{DHA}}}{A_{\alpha,\gamma\text{-glyserid}} \times \frac{3}{2}} \times 100\%$$

Resonansen til fettsyren EPA er fra signal av to karbonatomer. Dette arealet deles derfor på to.

$$(2-27) \quad \% EPA = \frac{(A_{EPA})/2}{A_{\alpha,\gamma\text{-glyserid}} \times \frac{3}{2}} \times 100\%$$

Andel av fettsyren ALA finnes ved å subtrahere mengde DHA og EPA fra totalt ω -3-innhold:

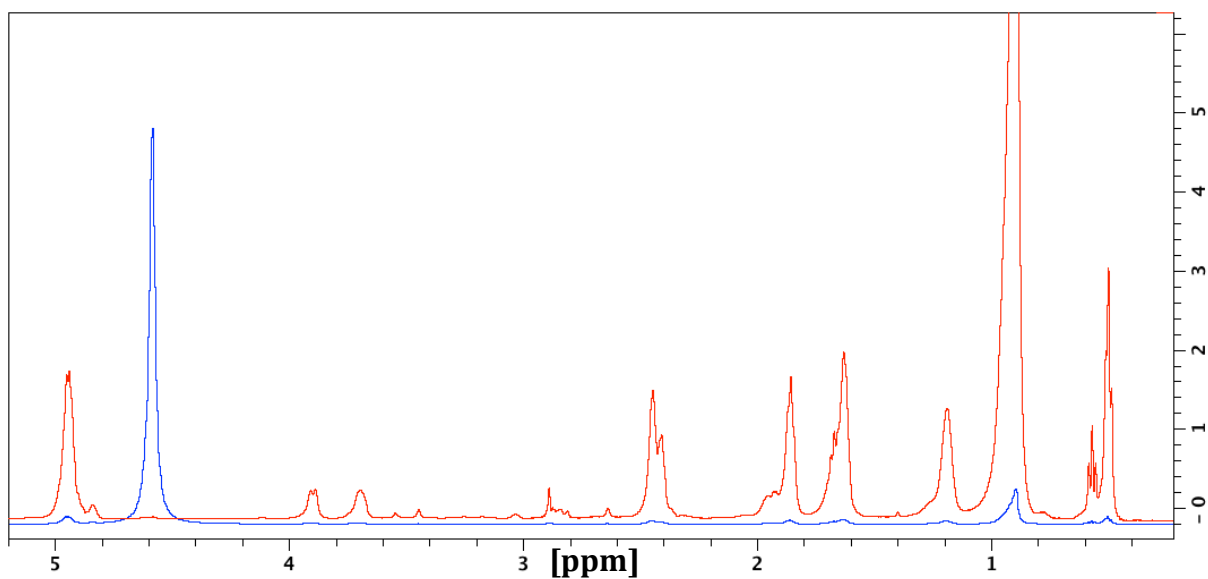
$$(2-28) \quad \%ALA = (\% \omega\text{-3}) - (\%DHA) - (\%EPA)$$

4. RESULTAT

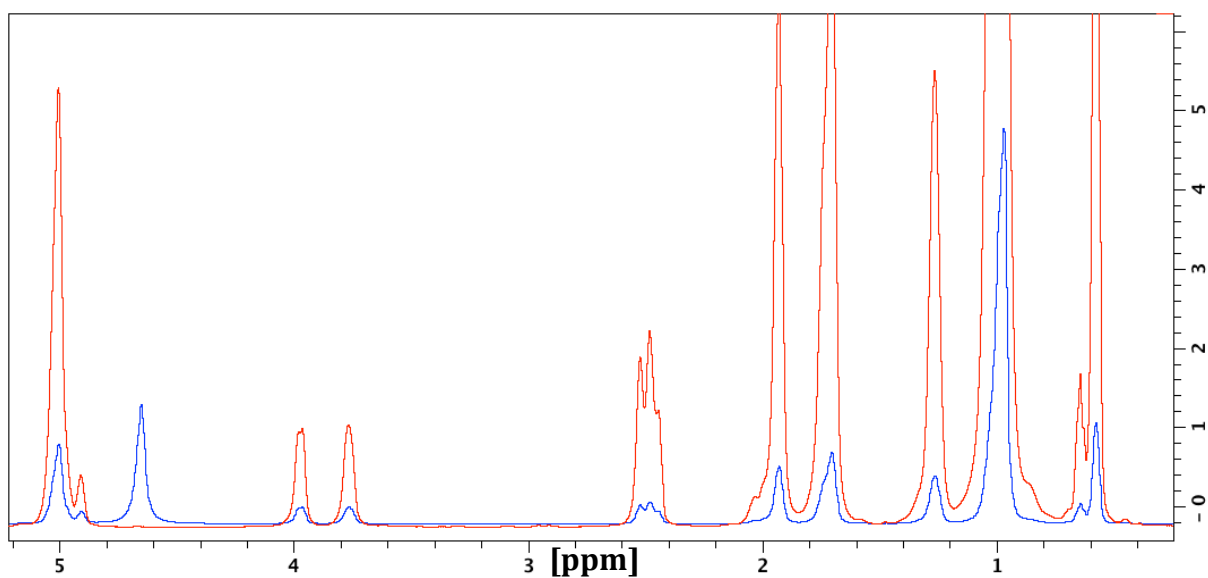
Først presenteres resultatene fra ^1H NMR som er brukt til å bestemme fettprosenten i oppdrettslaksen og villaksen som er brukt gjennom hele dette arbeidet. Deretter bestemmes fettsyresammensetningen i fiskefiletene ved bruk av fast-fase ^{13}C NMR-spektroskopi. Undersøkelser av fosforkomponenter i fosfolipider er gjort ved bruk av fast-fase ^{31}P NMR, både statisk og spinnende. Til slutt undersøkes fettfordelingen i filet og hjerte av oppdrettslaksen og villaksen ved bruk av MRI.

4.1 NMR av det norske kvalitetsnittet (NQC)

Resultatene av prøver fra fett fra det norske kvalitetsnittet er presentert i figurer med tilhørende forklaringer. For å sammenligne fett i oppdrettslaks og villaks, er tre parallelle ^1H -spektre og ^{13}C -spektre tatt opp. ^{13}C -spektrene er brukt for å kvantifisere mengden av de ulike umettede ω -3-fettsyrene. ^1H -spektrene er brukt for å sammenligne ulike parallelle prøver. ^1H -spekter av tre parallelle prøver av villaksen og oppdrettslaksen er tatt opp hvor prøvene hadde en tilfeldig fett/kjøtt-fordeling. Disse prøvene er brukt for å finne totalt fettinnhold i laksen. Fettprøvene er brukt som en ekstern standard for å beregne fettinnholdet i prøvene med tilfeldig fett/kjøttfordeling. Alle ^1H -spekter er utført med og uten vannundertrykking.



Figur 4.1: ^1H -spekter av prøve fra fett av villaks med vannundertrykking (i rødt) og uten vannundertrykking (i blått).



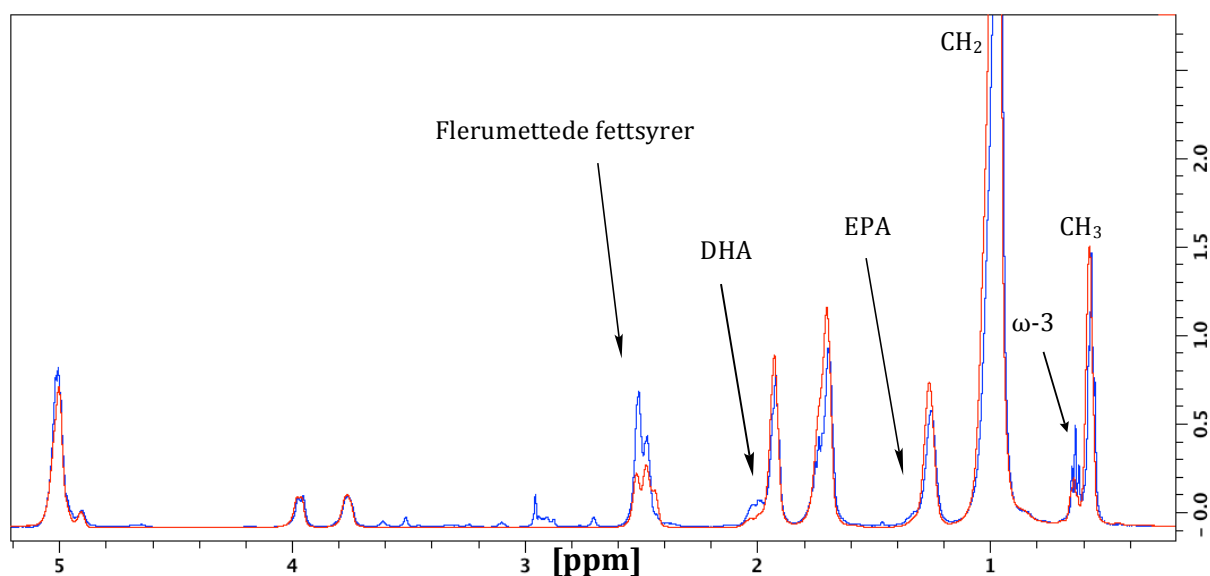
Figur 4.2: ^1H -spekter av prøve av oppdrettslaks tatt fra fett med vannundertrykking (i rødt) og uten vannundertrykking (i blått).

Figur 4.1 og **Figur 4.2** viser forskjellen på ^1H -spektere med og uten vannundertrykking. I **Figur 4.1** ser en et kraftig signal på rundt 4,7 ppm (blått spekter). Dette er vannsignalet som i rødt spekter er undertrykket. Ettersom dette er prøver tatt fra fett

er det mindre vann i disse prøvene enn i prøver fra annet biologisk materiale, likevel er signalet fremtredende. Veldig kraftige signal i et spekter kan gjøre at oppløsningen til de mindre signalene blir dårligere, og kan i verste tilfelle forsvinne. Ved å undertrykke vannet ser en at de øvrige signalene blir kraftigere. Spektrene er skalert likt, slik at de er sammenlignbare i intensitet. Ved å sammenligne spekter av oppdrettslaks (**Figur 4.1**) og villaks (**Figur 4.2**) ser en at andelen vann er høyere i prøven av villaks.

Alle parallellene av de ulike prøvene gir de samme resonansene med relativt lik intensitet (**Vedlegg A**). Dette er nyttig informasjon da parallellene skal være samme prøve. Det vil være noe forskjell i signalintensitet da prøveholderne er små, men dette korrigeres for når en tar hensyn til innveid prøvemengde.

Parallellene tatt fra fettene brukes som en ekstern standard for å beregne fettinnholdet i prøvene med tilfeldig fett-/kjøttinnhold for dermed å beregne total fettprosent i laksene.

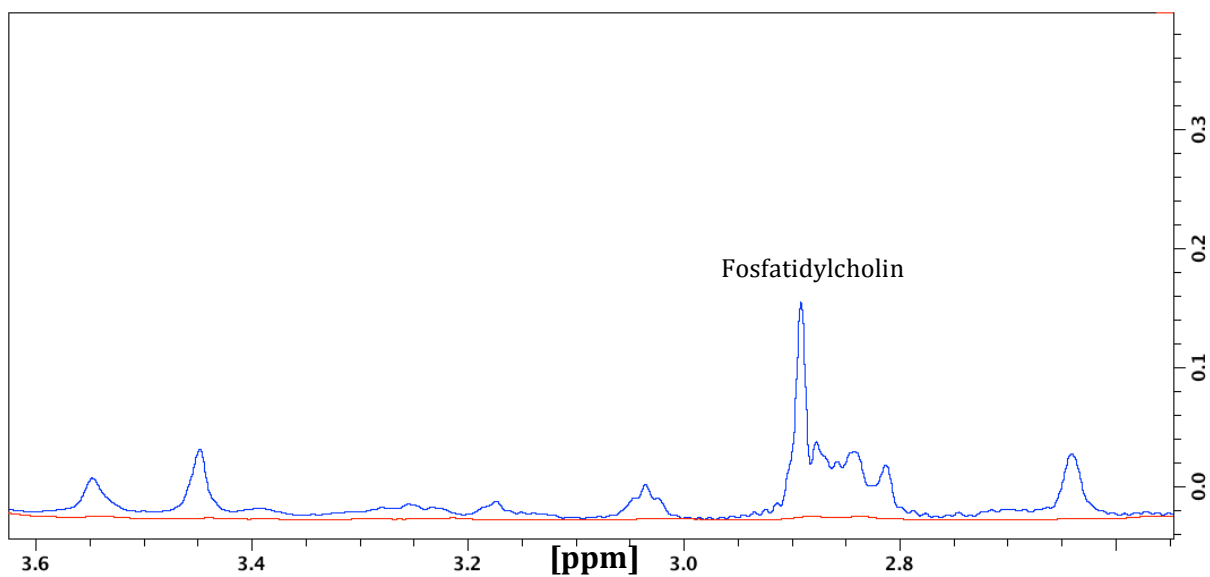


Figur 4.3: ^1H -spekter av prøver fra fett av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått) med vannundertrykking. Tilordning av spekteret som Nestor et al. ³⁸

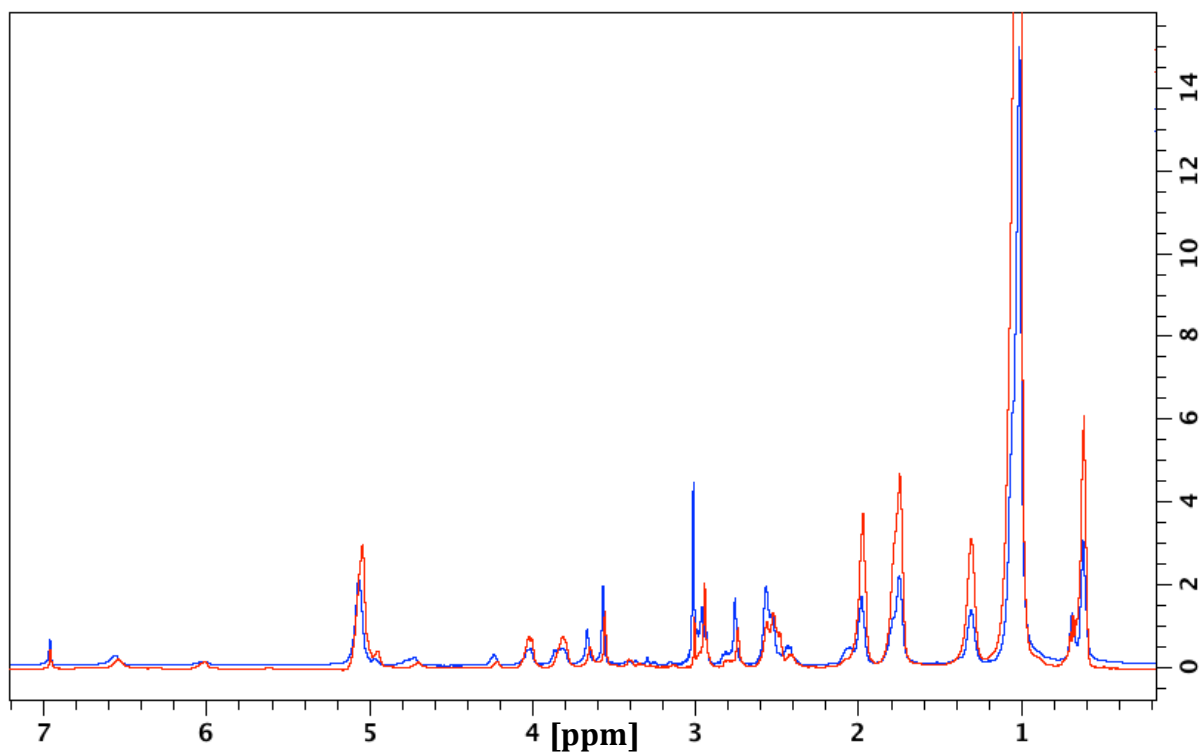
I **Figur 4.3** sammenlignes et ^1H -spekter av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått). Spektrene ser relativt like ut, men en kan se forskjeller i intensitet på noen av

resonansene. I ^1H -spekteret er oppløsningen dårlig som gjør at resonansene overlapper med hverandre. I dette tilfelle hvor en skal bestemme mengden av fettsyrene EPA og DHA, observeres disse som "skuldre" på kraftigere resonanser, mens ALA ikke kan identifiseres. I spekteret ved 0,6 ppm vises et signal for CH_3 . Dette signalet er splittet i to hvor den høyeste toppen er CH_3 fra alle fettsyrene utenom ω -3-fettsyrene. Metylgruppen fra ω -3-fettsyrer vises i toppen til venstre. Dette signalet er kraftigere for villaks (i blått) enn oppdrettslaks (i rødt). I figuren ser en også et kraftig signal fra CH_2 som er CH_2 fra alle fettsyrene utenom fra EPA og DHA. Fettsyrene EPA og DHA observeres som "skuldre" på kraftigere signal. Her finnes EPA som en skulder på signalet som er ved 1,2 ppm, mens DHA ser en som en skulder på toppen som er ved 2 ppm. Resonansen av EPA ved 1,25 ppm ser relativt lik ut i intensitet for oppdrettslaks og villaks. Skulderen på resonansen ved 2 ppm viser signal fra DHA, som er kraftigere for villaks enn for oppdrettslaks. Ved 2,4 ppm ser en et signal som er fra CH_2 -grupper i flerumettede fettsyrer. Blått spekter som er av villaks har høyere intensitet av signalene som kommer fra alle typer ω -3-fettsyrer og flerumettede fettsyrer. Rødt spekter som er av oppdrettslaks, har noe høyere intensitet for signalene som viser CH_2 -grupper fra fettsyrer i området mellom 1 og 2 ppm.

I tillegg observeres det resonanser mellom 2,6 ppm og 3,6 ppm som er forskjellige mellom villaks og oppdrettslaks. I **Figur 4.4** vises dette området forstørret. Her ser en at det er resonanser fra villaksen (i blått) som ikke observeres i oppdrettslaksen. Den største resonansen på 2,85 ppm er fra fosfatidylcholin.



Figur 4.4: Viser området fra 2,6 ppm til 3,6 ppm forstørret fra ¹H-spekteret av prøver fra fett av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått) med vannundertrykking. Tilordning av signalet fra fosfatidylcholin er hentet fra Nestor et al. ³⁸



Figur 4.5: ¹H-spekter fra prøve av oppdrettslaks (i rødt) og villaks i blått av tilfeldig fett-/kjøttfordeling.

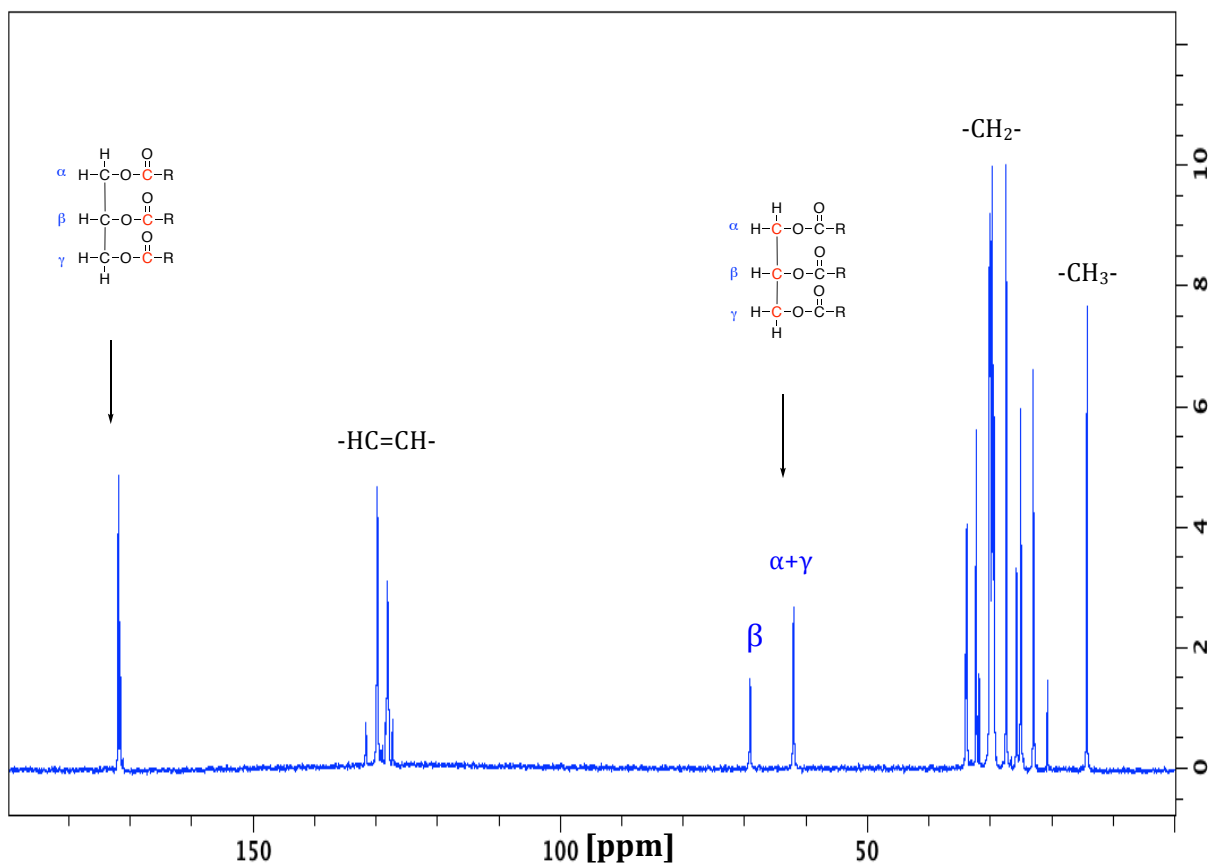
I **Figur 4.5** vises et ^1H -spekter fra en av parallellene av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått) med tilfeldig fett-/kjøttfordeling. Ved å sammenligne disse to spektrene med spektrene som bare inneholder fett, ser en at spektrene fra fett gir færre resonanser, noe som er forventet da disse prøvene inneholder færre komponenter.

Ved beregning av fettinnhold i prøvene antar en at fettprøvene som brukes som en ekstern standard bare inneholder fett og vann. Derved beregnes integralet til vannsignalet og de resterende resonansene i spekteret. Etersom en har innveid vekt på prøvene, kan mengde fett, vann og fettprosenten beregnes. Mengde muskelvev ble beregnet ved å trekke fra mengde fett og vann av vekten på prøven.

Tabell 4-1: Tabellen viser beregnet innhold av vann, muskelvev og fettprosent i de ulike parallellene.

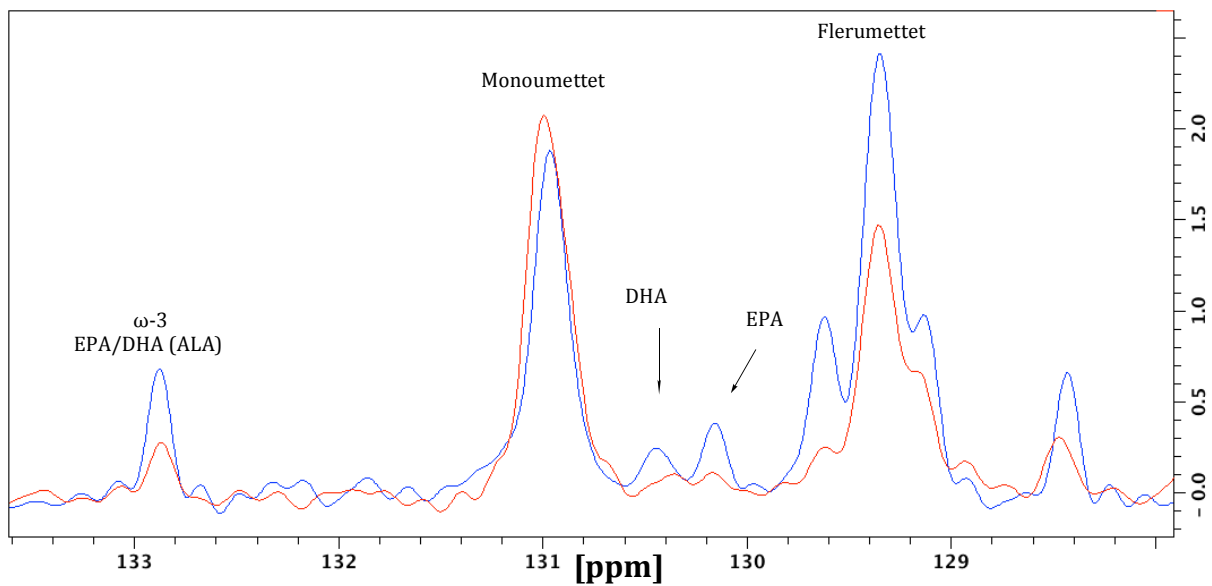
Prøve	Villaks			Oppdrettslaks		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
Parallell						
Vann [%]	59,0	56,6	60,1	76,9	73,0	67,6
Muskelvev [%]	36,6	36,6	35,8	22,3	17,4	22,3
Fett [%]	4,4	6,5	4,0	10,7	9,5	10,0
Gjennomsnitt [%]	5			10		

Fra **Tabell 4-1** ser en at beregnet gjennomsnittlig fettprosent i laksene er henholdsvis 5 og 10% i villaks og oppdrettslaks. Det er litt sprik i parallellene, men en fettprosent på dobbelt så mye i oppdrettslaks som i villaks var forventet. Gjennomsnittlig vanninnhold er henholdsvis 59 og 73% for villaksen og oppdrettslaksen. Ellers er det funnet at innhold av muskelvev er på 36% i villaksen, sammenlignet med 21% i oppdrettslaksen.



Figur 4.6: ^{13}C MAS NMR-spekter av oppdrettslaks. Resonansene fra de umettede fettsyrene er rundt 130 ppm. De to resonansene ved 60 og 70 ppm er begge signaler fra glyserid-ryggradskarboner ($\alpha + \gamma$) og (β).

Figur 4.6 viser et fullt ^{13}C -spekter med «inverse-gated» proton-dekobling. Det er resonansene rundt 130 ppm som er interessante i dette tilfelle, da det er der resonansene fra de umettede fettsyrene er. I tillegg ser en to resonanser på 60 og 70 ppm. Dette er fra glyserid som brukes til å regne ut mengden av fettsyrene. Det er en resonans for β -karbonet og en resonans for α - og γ -karbonet. Da disse til sammen er signal fra alle ryggradskarbonene i glyseridet, kan de brukes som en indre standard for å sammenligne med signalene av de umettede fettsyrene og bestemme mengden av fett.



Figur 4.7: ^{13}C -spekter forstørret i området hvor resonanser fra de umettede fettsyrene befinner seg. Her vises spektrene av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått).

I **Figur 4.7** ser en et kraftig signal fra monoumettede fettsyrer og et kraftig signal fra flerumettede fettsyrer ved henholdsvis 131 ppm og 129,2 ppm. Mellom disse signalene observeres også signalene fra fettsyrene EPA og DHA. Ved 133 ppm er det en resonans fra alle ω -3-fettsyrene, både EPA, DHA og ALA fra fett i oppdrettslaksen (i rødt) og fra villaksen (i blått). Dette signalet er kraftigere for fett fra villaksen (i blått). En ser også fra spekteret at signalene fra EPA og DHA er kraftigere i villaksen. Signalet for monoumettet fett er noe høyere for oppdrettslaksen, mens signalet for flerumettet fett er kraftigere for villaksen.

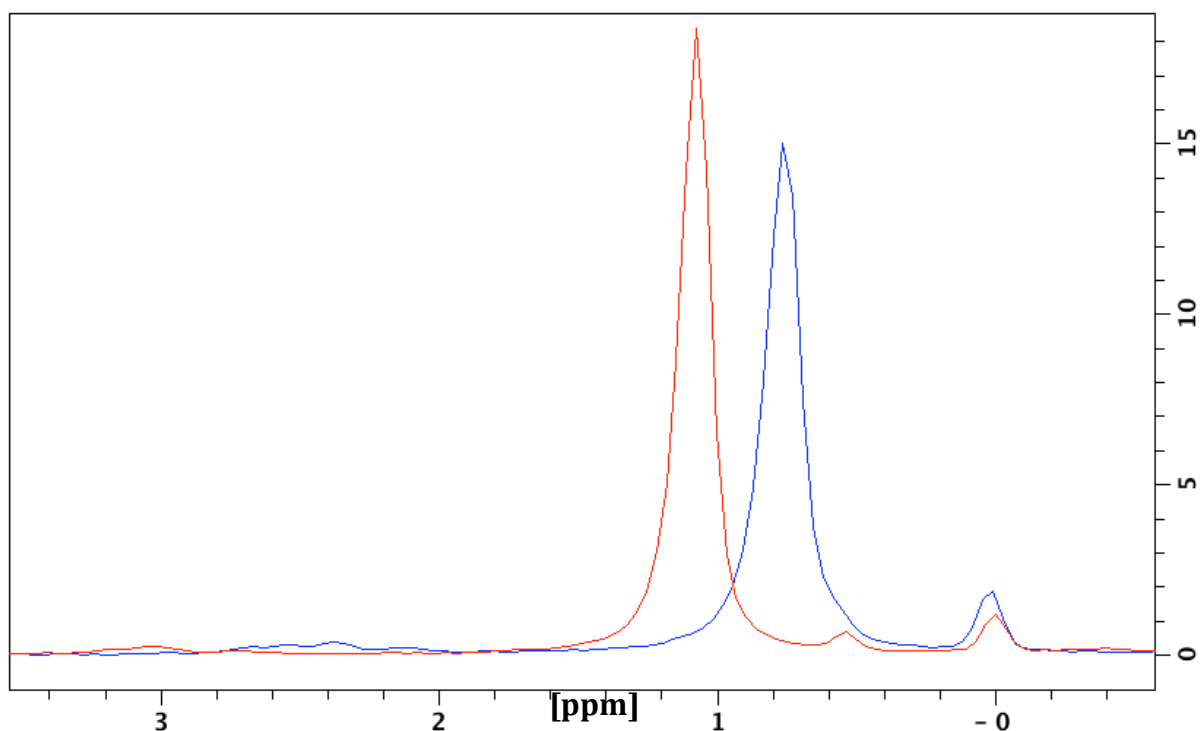
Tabell 4-2: % DHA, EPA og ALA av total fettprosent i villaks og oppdrettslaks beregnet fra signalintensiteten i ¹³C MAS spektrene.

Prøve	Parallell	EPA [%]	DHA [%]	ALA [%]	Total % DHA/EPA
Villaks	#1	9,3	14,2	0	23,5
	#2	8,7	15,3	0	24,0
	#3	8,9	14,1	0	23,0
	Gj.snitt	9,0	14,5	0	23,5
Oppdrettslaks	#1	2,7	4,6	10,1	7,3
	#2	3,9	4,7	8,0	8,6
	#3	3,2	5,0	9,2	8,2
	Gj.snitt	3,3	4,7	9,1	8,0

Tabell 4-2 viser prosent av de ulike ω -3-fettsyrene med tre paralleller av fett fra oppdrettslaks og villaks. Ut fra tabellen ser en at det er stor forskjell i mengde av de marine ω -3-fettsyrene i oppdrettslaks og i villaks. Dette samsvarer med resultatene observert i **Figur 4.7**, der signalet for alle ω -3-fettsyrene er høyere for villaksen enn for oppdrettslaksen, selv om dette signalet inkluderer ALA i fett fra oppdrettslaksen. En ser også at det er høyere mengder av DHA som EPA i både fett fra villaks og oppdrettslaks. Gjennomsnittlig innhold av EPA er funnet å være 9,0% i villaks, sammenlignet med 3,3% i oppdrettslaks. Det er også store forskjeller i innhold av DHA, hvor det er 14,5% i villaks og 4,7% i oppdrettslaks. Fettsyren som det ikke er noe av i villaksen, ALA ble funnet til å være gjennomsnittlig 9,1% av totalt fettinnhold i oppdrettslaks. Gjennomsnittlig prosent av EPA/DHA ser en ble funnet til å være 23,5% i villaks mot 8,0% i oppdrettslaks.

4.2 Fosfor

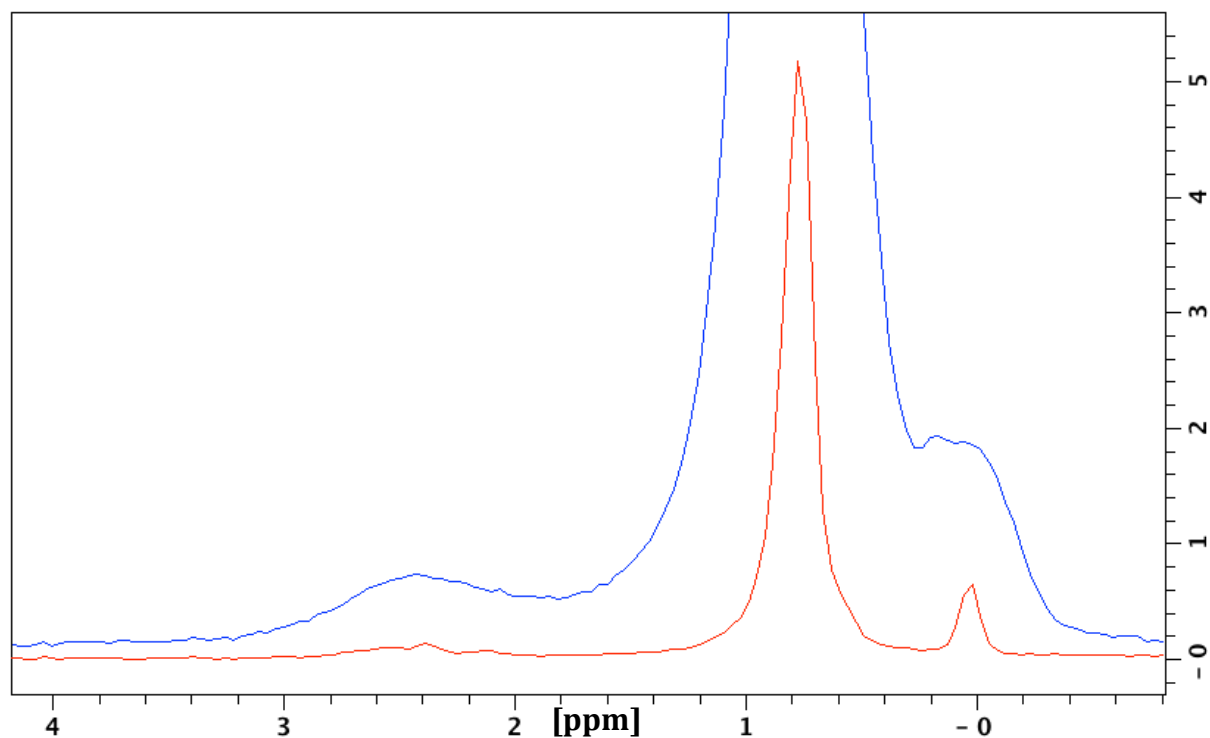
Fast-fase ^{31}P NMR-spektroskopi er benyttet for å undersøke om den ulike dietten hos oppdrettslaks og villaks kan påvirke sammensetningen av fosforholdige cellekomponenter, også fosfolipider i cellemembraner. Fosforspekter med en spinnhastighet på 3500 Hz, i tillegg til statiske eksperiment er utført av både oppdrettslaks og villaks for å undersøke om det er noen ulikheter i fosforholdige forbindelser i fiskekjøttet.



Figur 4.8: ^{31}P -spekter av villaks (i rødt) og oppdrettslaks (i blått) tatt opp med en spinnhastighet på 3500 Hz.

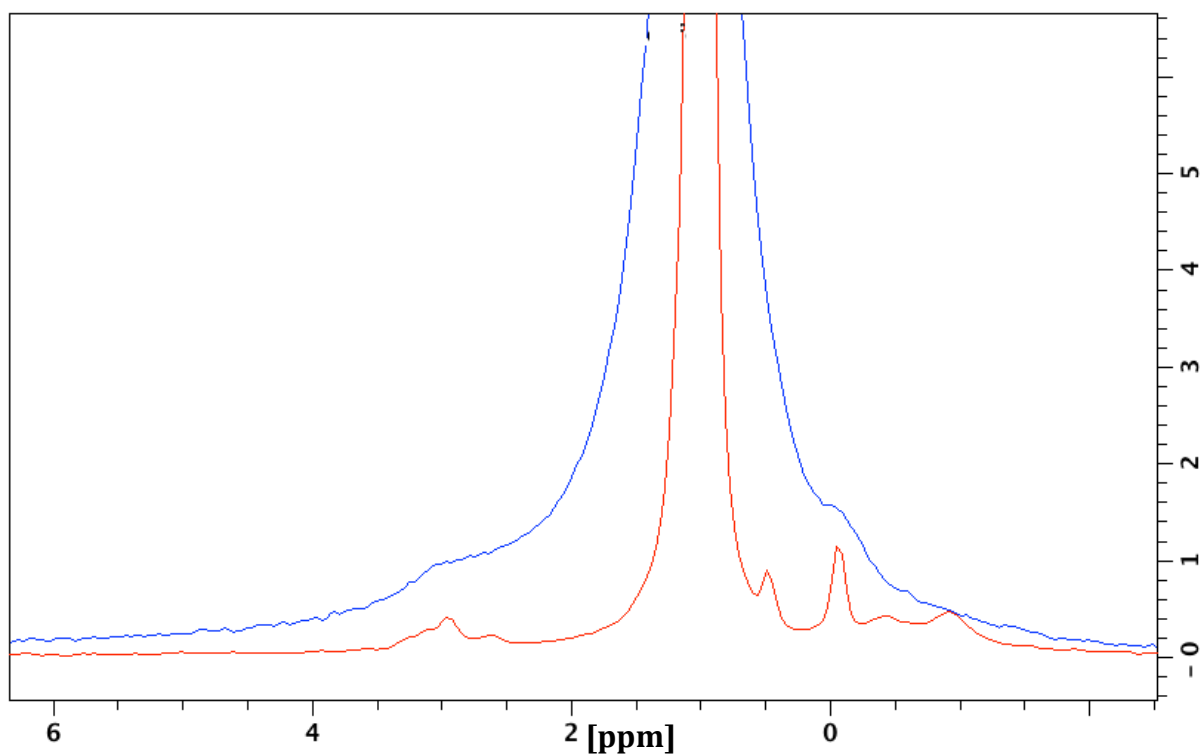
I **Figur 4.8** ser en to kraftige signal ved $\approx 1,25$ ppm og $\approx 0,75$ ppm, for henholdsvis villaks og oppdrettslaks. Spinnende sidebånd i disse spektrene (Ikke vist i **Figur 4.8**) er ved 18,1 og 18,6 ppm for henholdsvis oppdrettslaks og villaks. Disse er 3500 Hz fra isotropt kjemisk skift. Dette kan ikke observeres ved intensiteten på spektrene i **Figur 4.8**. Spinnende sidebånd har sitt opphav fra lite mobile fosfolipider i cellemembranen. De tilhørende isotrope kjemiske skiftene er ikke synlige i **Figur 4.8** da de er under de

store signalene ved henholdsvis $\approx 0,75$ og $\approx 1,25$ ppm i oppdrettslaks og villaks. Spinnende sidebånd brukes til å finne kjernen sitt isotrope kjemiske skift ved å gå spinnhastigheten i Hz fra sidebåndet. Det kjemiske skiftet for den lite mobile fosfolipidfraksjonen i spekteret ble funnet ved 1,4 ppm for villaksen og 0,8 ppm for oppdrettslaksen.



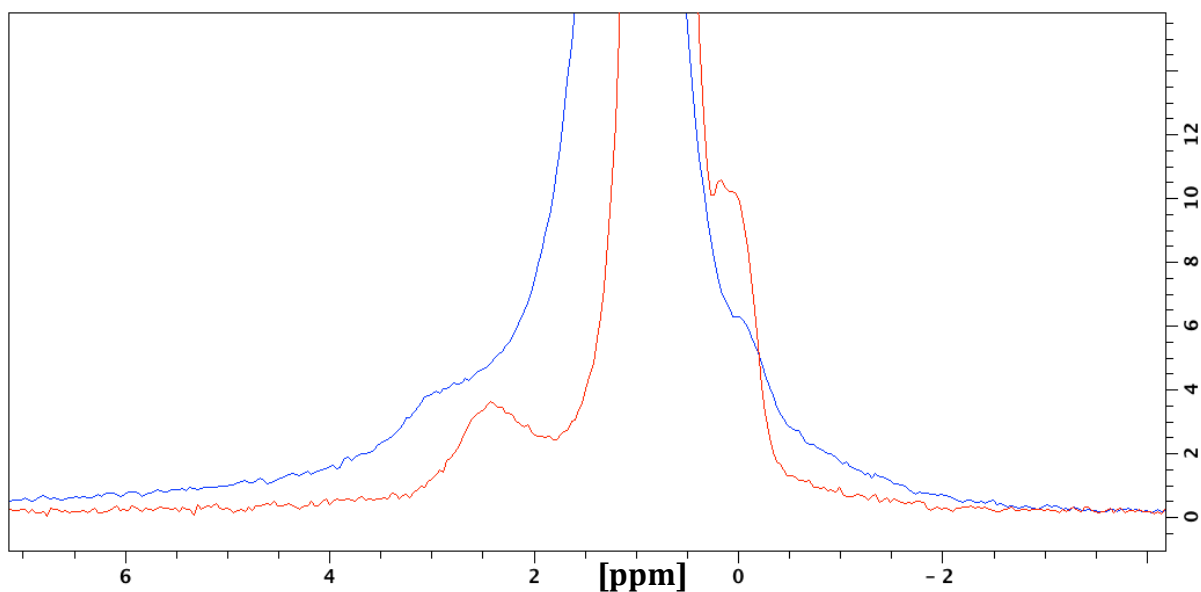
Figur 4.9: ^{31}P -spekter av oppdrettslaks tatt opp med en spinnhastighet på 3500 Hz (i rødt) og statisk (i blått).

Figur 4.9 viser både spinnende og statisk spekter av oppdrettslaks. I begge spektrene observeres et kraftig signal ved $\approx 0,75$ ppm. Dette signalet har opphav fra mobile cellulære fosforkomponenter. I det spinnende spekteret (i rødt) observeres det i tillegg en resonans ved 0 ppm. Det statiske spekteret (i blått) har også et bredt signal i området $\approx -0,1$ til 3,1 ppm. Dette er fordi signalet har opphav i rigide strukturer i cellemembranen. I det spinnende spekteret vil disse resonansene inngå i det kraftige signalet fra de mobile fosformolekylene. Det er heller ikke mulig å observere det kjemiske skiftet til fosfolipidene i det spinnende spekteret da resonansen blir begravd i det store signalet ved $\approx 0,75$ ppm. Det isotrope kjemiske skiftet ble identifisert ved hjelp av det spinnende sidebåndet i spekteret vist i **Figur 4.8**.



Figur 4.10: ^{31}P -spekter av villaks tatt opp med en spinnhastighet på 3500Hz (i rødt) og statisk (i blått)

Figur 4.10 viser både spinnende og statisk spekter av villaks. I begge spektrene observeres et kraftig signal ved $\approx 1,0$ ppm. I det spinnende spekteret (i rødt) observeres det i tillegg resonanser med lavere intensitet ved ≈ 0 , 0,5, og 3,0 ppm. Det statiske spekteret (i blått) har også et bredt signal i området $\approx -0,25$ til 3,30 ppm.

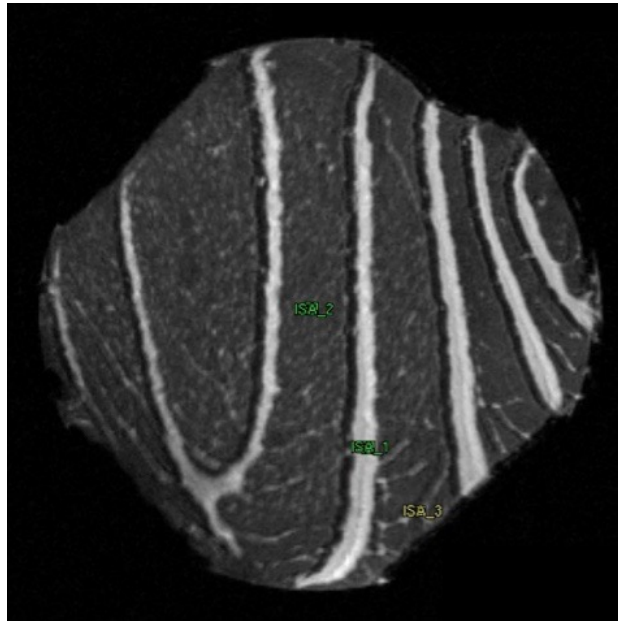


Figur 4.11: Statisk ^{31}P -spekter av oppdrettslaks (i rødt) og villaks (i blått)

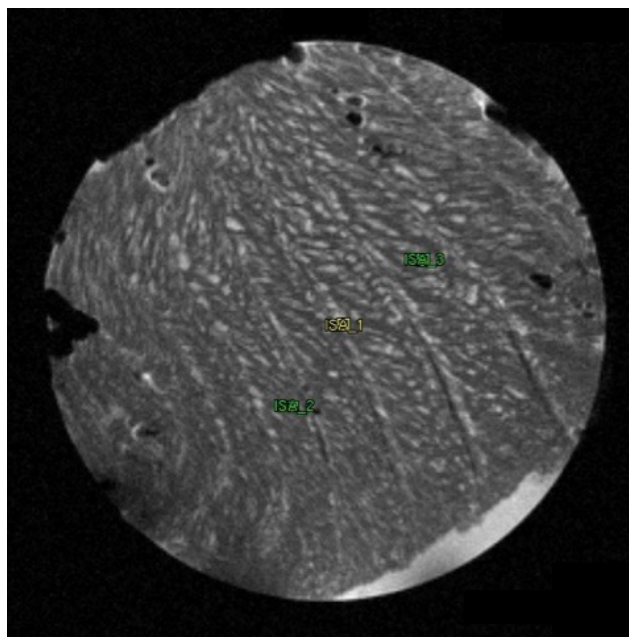
Figur 4.11 viser statiske spektre av oppdrettslaks og villaks. Her ser en også de brede resonansene fra fosfolipider i cellemembran fra villaks (i blått) og oppdrettslaks (i rødt). Halv-verdi bredden ble målt til å være 3,7 ppm i villaksen og 3,0 ppm i oppdrettslaksen.

4.3 MRI av det norske kvalitetssnittet (NQC)

For å undersøke fettfordelingen i fileten er det tatt MR-bilder av filetene. Bildene er tatt opp med sekvensen RARE (Rapid Imaging with Refocused Echos). Oppløsningen på bildene er på 50x50 mikrometer. Tykkelsen av snittet er på 0,5 mm. T_2 -verdiene ble målt med sekvensen Multi-Slice-Multi-Echo., som i likhet med RARE er en spinn-ekko sekvens.



Figur 4.12: MR-bilde av filet fra oppdrettslaks. Det gule og grønne kvadratet på bildet viser hvor T_2 -verdiene er målt. Høy T_2 -verdi gir lys kontrast i bildet.



Figur 4.13: MR-bilde av filet fra villaks. Det gule og grønne kvadratet på bildet viser hvor T_2 -verdiene er målt. Høy T_2 -verdi gir lys kontrast i bildet.

Figur 4.12 og **Figur 4.13** viser MR-bilder av fileten tatt fra det norske kvalitetssnittet av oppdrettslaks og villaks. De hvite stripene en ser i **Figur 4.12** og **Figur 4.13** er fett. En ser at oppdrettslaksen inneholder større mengder fett da de hvite stripene er veldig

markerte og brede i motsetning til bildet av villaksen i **Figur 4.13**. En ser fra MR-bildet av villaksen at den inneholder mindre fett, som gjør at det er de lyse kontrastene fra bindevevet som er lysest i bildet.

Det gule og grønne kvadratet på bildene viser hvor T_2 -verdiene er målt. **Tabell 4-3** viser en oversikt over T_2 -verdiene som ble målt av de ulike parallellene i kjøttet og fett/bindevevet i laksene.

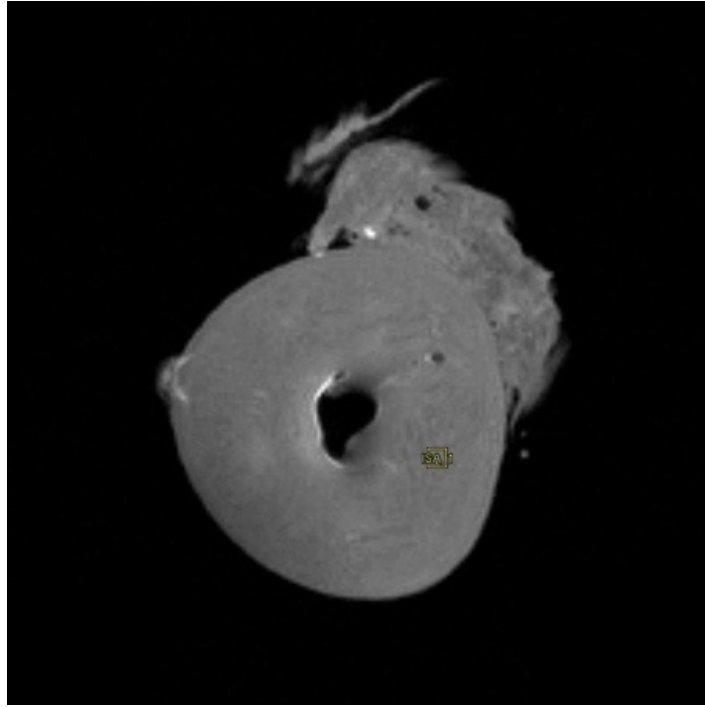
Tabell 4-3: T_2 -verdier målt i kjøtt og fett/bindevev fra oppdrettslaks og villaks

T_2-verdier [ms]	Villaks			Oppdrettslaks		
Parallell	#1	#2	#3	#1	#2	#3
Kjøtt	42	57	40	26	26	27
Fett/bindevev	50	30	53	54	61	59

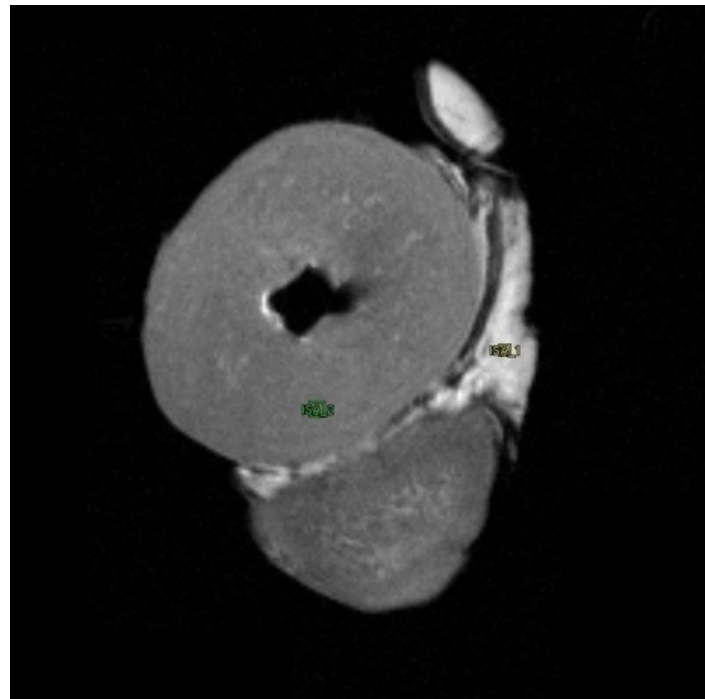
Ved å sammenligne T_2 -verdiene målt i kjøttet i **Tabell 4-3** ser en at T_2 -verdiene i villaks er høyere enn for oppdrettslaks. For målingene gjort ved fett/bindevevet er det omvendt, der T_2 -verdiene er høyere i oppdrettslaks enn i villaks.

4.4 MRI av hjerte

For å undersøke om fettinnhold i laksen også påvirker andre organ ble det tatt MR-bilder av hjertet til laksene. Her vises MR-bilder av hjertene til oppdrettslaks og villaks. Bildene er tatt opp med RARE, samme sekvens som filetene. Oppløsningen på bildene er på 50x50 mikrometer. Tykkelsen av snittet er på 0,5 mm.



Figur 4.14: MR-bilde av hjertet fra villaks.



Figur 4.15: MR-bilde av hjertet fra oppdrettslaks. Det gule og grønne kvadratet viser hvor T₂-verdiene ble målt.

Figur 4.14 og **Figur 4.15** viser MR-bilde av hjertet til oppdrettslaks og villaks. Den største forskjellen en ser ved å sammenligne disse figurene er at det er stor kontrast i hjertet fra oppdrettslaksen (**Figur 4.15**). Lys kontrast i bildet kommer av en høy T_2 -verdi. Det lyse en ser i bildet vil være fett da fett har en høyere T_2 -verdi enn muskel/hjerte.

5. DISKUSJON

I denne oppgaven er det bestemt mengden av umettede fettsyrer og totalt fett i kjøtt fra oppdrettslaks og villaks. For å få en nøyaktig, effektiv og riktig mengdebestemmelse av fettsyrene og totalt fett er prøveopparbeiding og den valgte analysemetoden avgjørende. Nåværende prosedyrer for slike analyser er basert på Folch-metoden publisert i 1957.²⁰ Ekstraksjonsmetoden er utprøvd og mye anvendt for å bestemme total mengde fett. For å forbedre fettutbytte for mengdebestemmelsen, er ekstraksjonsmetoden testet ut med flere endringer. Ametaj et al. forbedret utbytte ved å forlenge tiden til 20 timer hvor prøven blir behandlet med kloroform/metanol-blanding og deretter veid (gravimetrisk metode).³⁹ En av ulempene med gravimetriske metoder er at forbindelsene i prøven ikke blir karakterisert før prøven veies. Dette kan gi feilaktige mengdebestemmelser. I tillegg er det prøvd ut å legge til ytterligere trinn i prøveopparbeidelsen foruten om ekstraksjon ved at fettsyrene blir ekstrahert med kloroform/metanol og deretter kjemisk modifisert ved metylering.⁴⁰ Fettsyrene og totalt fett blir mengdebestemt ved gasskromatografi og det rapporteres om høyere gjenvinning av fettsyrer og fett enn for andre metoder. I tillegg er det fordelaktig å bruke gasskromatografi fremfor gravitasjonsmetode, da komponentene i prøven blir karakterisert før de blir mengdebestemt.

Standardmetoden for ekstraksjon av fettsyrer og fett ved NIFES¹⁹ er en modifisering av den klassiske Folch-metoden²⁰. Prøveopparbeidelsen skjer ved ekstraksjon med kloroform/metanol etterfulgt av filtrering, forsåpning og metylering før separasjon med gasskromatografi. For hvert trinn i en prøveopparbeiding introduseres det mulige feil, spesielt i trinn som ekstraksjon og kjemisk modifisering av prøven.

Væske-fase ¹H og ¹³C NMR-spektroskopi er en etablert metode for å kvantifisere fettsyresammensetningen av fettekstrakter fra fisk^{4, 22-27}, og er komplementær til gasskromatografi. NMR-spektroskopi er derfor et viktig analyseverktøy i dette feltet. Væskefase NMR krever at prøven er i væskeform. Dette innebærer prøveopparbeiding som ekstraksjon³⁰ på samme måte som ved bruk av gasskromatografi. Ved tidkrevende

prøveopparbeiding kan fettsyrene og fett oksidere, som gir tap av prøve. I tillegg er det tidkrevende å ta opp ^{13}C -spektra i væskefase fordi denne kjernen har lav følsomhet.

Ved fast-fase NMR-spektroskopi blir målingene gjort direkte på vevet uten noen form for behandling eller ekstraksjonsprosedyre med organiske løsemidler. Det at målingene gjøres direkte på prøven eliminerer usikkerhet og degradering av prøven ved opparbeiding og gjør fast-fase NMR til en tidssparende og effektiv metode. I vev fra fisk er det proteiner og andre mindre molekyler tilstede. Signalene fra proteiner vil ikke være observerbare ved disse betingelsene fordi proteinene er rigide strukturer og beveger seg lite. Molekyler som det er lav konsentrasjon av vil ikke observeres, fordi signalene blir for svake. Fast fase NMR-spektroskopi har stort potensial på flere områder hvor det i dag benyttes kjemisk ekstraksjon. Fast fase NMR-spektroskopi kan derfor være direkte, kvantitativ, nøyaktig og tidsbesparende. Dette er vist i et fast fase NMR arbeid der fettsyrer i laks er blitt undersøkt.³¹

5.1 NMR av det norske kvalitetssnittet (NQC)

^1H NMR er sensitivt, slik at det gir godt signal på bare noen få minutter sammenlignet med ^{13}C NMR som kan ta opp mot 17 timer for å få et godt signal. Ulempen med bruk av ^1H -spekter for kvantifisering er at oppløsningen kan være dårlig som gjør at resonansene overlapper med hverandre. I tillegg inneholder prøven vann som gir sterkt signal som kan kamuflere signal fra prøven. Dette løses ved vannundertrykking som er vist i **Figur 4.1** og **Figur 4.2**. Her ser en at ved undertrykking av vannsignalet, er signalet fra vann nesten usynlig og signal fra prøven kommer tydelig frem.

I **Figur 4.3** ble et ^1H -spekter brukt for å identifisere de ulike fettsyrene i villaks og oppdrettslaks. Resultatene i dette arbeidet reflekterer det at villaksen inneholder mer ω -3-fettsyrer, flerumettede fettsyrer og DHA, mens oppdrettslaks inneholder også andre typer fettsyrer. De mest interessante resonansene i dette arbeidet er fra ω -3-fettsyrene. Resonansen som viser et utslag for alle ω -3-fettsyrene viser tydelige forskjeller i spektrene fra villaks og oppdrettslaks. ^1H -spektra kan brukes til å kvantifisere total mengde ω -3-fettsyrer, noe som tidligere er gjort,³⁸ men i dette arbeidet ønsker en å kvantifisere de ulike typene ω -3-fettsyrene. Av de ω -3-fettsyrene

som er av interesse er DHA og EPA tilstede i spekteret for villaksen, mens ALA ikke kan identifiseres i disse spektrene. ^1H -spektrene indikerer forskjellene på fettsyresammensetning i villaks og oppdrettslaks, men egner seg ikke til å kvantifisere de ulike typene ω -3-fettsyrene.

Fra samme figur observeres det signal mellom 2,6 ppm og 3,6 ppm som er forskjellig i spektrene av oppdrettslaks og villaks. Her er det signal fra blått spekter som er av villaks som ikke finnes i rødt spekter som er av oppdrettslaks. Dette området er forstørret i **Figur 4.4**. Signalet med høyest intensitet her er også funnet i et tidligere arbeid ³⁸ der de rapporterer at signalet er fosfatidylcholin. Da signalet er ved det samme kjemiske skiftet antas det at dette er fosfatidylcholin. Dette kan tyde på at det er kommet noe kjøtt i prøven av villaks da dette signalet finnes i både villaks og oppdrettslaks i spekteret vist i **Figur 4.5** hvor prøvene er en blanding av fett og kjøtt.

For å kunne bestemme totalt fett i kjøtt fra oppdrettslaksen og villaksen brukt i dette arbeidet ble det i tillegg til ^1H -spektrene med prøver tatt fra fett, kjørt ^1H -spektre med prøver med et tilfeldig innhold av fett og kjøtt (**Figur 4.5**). Resultatene som er beregnet fra disse spektrene er vist i **Tabell 4-1**. Tabellen viser innholdet av vann, muskelvev og fett i tre parallelle prøver av villaksen og oppdrettslaksen tatt fra samme område av det norske kvalitetssnittet. En ser i tabellen at det i villaksen ble funnet et gjennomsnittlig vanninnhold på 59%, mens det i oppdrettslaksen ble funnet et vanninnhold på 73%. Andel muskelvev ble funnet til å være 36% i villaksen og 21% i oppdrettslaksen. Fettprosenten ble beregnet til å være 5% i villaksen og 10% i oppdrettslaksen. Fettinnholdet i laks vil variere med flere faktorer som alder og vekt på fisken, samt årstid og regionen den befinner seg. Villaksen er mindre fet blant annet fordi den på gytevandringen fra havet til elvene normalt ikke tar til seg føde. Den vil også være magrere rett etter gyting. Villaksen i denne studien hadde ikke gytt da den inneholdt rogn. Fettinnholdet i laksen varierer også gjennom de ulike delene av fisken. I en annen studie som også er gjort på det norske kvalitetssnittet ble det funnet et fettinnhold på 6,8% i villaks og 12,5% i oppdrettslaks.⁴¹ Dette indikerer at oppdrettslaksen generelt har en dobbelt så høy fettprosent som villaksen.

Som nevnt tidligere er ikke ^1H NMR verken i løsning eller fast fase en egnet metode til å kvantifisere de ulike typene ω -3-fettsyrene. Det er for dårlig oppløsning som gjør at resonansene for de ulike ω -3-fettsyrene overlapper med hverandre. I motsetning til ^1H er ^{13}C lite sensitivt da det naturlig bare er omtrent 1% av karbon som finnes av denne isotopen. Dette gjør at signalstyrken på ^{13}C NMR er mye svakere enn ^1H NMR, noe som fører til at det tar lenger tid å ta opp spekter med tilstrekkelig signal. Til gjengjeld gir ^{13}C MAS NMR god oppløsning som gjør at fettsyrene får separate signal i motsetning til ^1H NMR. Ved bruk av bredbånd proton-dekobling under opptak av spekteret unngår en at nukleær overhauser effekten (NOE) bygges opp, noe som vil påvirke intensiteten av resonansene. Dette gjør det mulig å bruke ^{13}C MAS NMR til kvantifisering av de ulike typene ω -3-fettsyrene.

Figur 4.6 viser et ^{13}C -spekter med «inverse-gated» proton-dekobling. Ved 15 ppm i spekteret ser en et signal fra CH_3 . Til venstre for dette signalet er det et område fra 20 til 35 ppm med mange resonanser fra ulike CH_2 -grupper. Da det er flere ulike fettyper i prøven med ulike posisjoner av CH_2 -gruppen vil CH_2 -gruppene gi flere signal med noe forskjellig kjemisk skift. Til venstre for disse signalene ser en to topper på 60 og 70 ppm. Dette er signal fra ryggradskarbonene i glyserid. I figuren er kjemisk formel av glycerid vist med tilhørende resonanser. Karbonene markert med rødt viser hvilke karbon som gir signal ved resonansene. Signalet ved 70 ppm er signal fra α - og γ -karbonet i triglyseridet, mens β -karbonet gir et eget signal ved 60 ppm da det har et noe ulikt kjemisk miljø. Da disse signalene fra ryggradskarbonene til sammen gir signal for hele triglyseridet og en antar at alle fettsyrene er i triglyseridform kan en bruke disse signalene som en indre referanse til å kvantifisere mengden av de ulike fettsyrene. Det er denne metoden som ble benyttet av Totland et. al.³¹ Ved 170 ppm er det et signal som er fra karbonyl-karbonene i triglyseridet. Rundt 130 ppm er det flere signal. Disse er fra de umettede fettsyrene ($\text{C}=\text{C}$ -karboner). Det er disse fettsyrene som er interessante i dette tilfellet da det er her ω -3-fettsyrene som en ønsker å kvantifisere befinner seg. Dette området er forstørret i **Figur 4.7**.

Figur 4.7 viser spekter av villaks (i blått) og oppdrettslaks (i rødt) i området for $\text{C}=\text{C}$ signal. Det er et kraftig signal fra monoumettede fettsyrer og et kraftig signal fra flerumettede fettsyrer ved henholdsvis 131 ppm og 129,2 ppm. Intensiteten på signalet

fra flerumettede fettsyrer er mye kraftigere for villaksen (i blått) enn oppdrettslaksen (i rødt). Intensiteten på signalet for monoumettede fettsyrer er noe høyere for oppdrettslaksen enn villaksen. Mellom disse to signalene finner en to topper som er signal fra EPA og DHA. I motsetning til ^1H -spekteret får en her separate signal for ω -3-fettsyrene som gjør det mulig å kvantifisere disse. Signalet av DHA kommer fra karbon nummer 5 i acylkjeden, mens signalet fra EPA kommer fra både karbon 5 og 6 i acylkjeden. Dette tas hensyn til ved kvantifisering slik at arealet av dette signalet fra EPA deles på to. Ut i fra intensiteten på disse to signalene ser en at innholdet av både EPA og DHA er høyere i villaksen (blått spekter). Dette kan også bekreftes ved å se på signalet ved 133 ppm i spekteret. Denne resonansen viser signal fra både EPA, DHA og også ALA for oppdrettslaksen. Selv om ALA inngår i dette signalet for oppdrettslaksen i tillegg til EPA og DHA, er intensiteten på toppen mye kraftigere for villaks (i blått). Dette sier noe om hvor store mengdeforskjellene av disse fettsyrene er i villaksen og oppdrettslaksen ved å bare sammenligne spektrene.

Mengde DHA, EPA og ALA av total fettprosent ble beregnet fra ^{13}C MAS spektrene. Resultatene fra disse beregningene vises i **Tabell 4-2**. Disse resultatene gjenspeiler de store forskjellene mellom villaks og oppdrettslaks observert i ^{13}C -spekteret (**Figur 4.7**). I tabellen finner en at det er stor forskjell i mengde av de marine umettede ω -3-fettsyrene i villaksen og oppdrettslaksen. Andelen EPA ble funnet til å være 9,0% i villaksen sammenlignet med 3,3% i oppdrettslaksen. Forskjellen for DHA var enda høyere da mengde DHA for villaksen var på 14,5% sammenlignet med 4,7% for oppdrettslaksen. Dette utgjør til sammen en forskjell i totalt EPA/DHA innhold på 23,5% i villaksen og 8,0% i oppdrettslaksen. I tillegg ble det funnet at andel ALA var på 9,1% i oppdrettslaksen. Grunnen til de store forskjellene i fettsyresammensetningen er at oppdrettslaks har en diett ulik den som villaksen har tilgjengelig, og dette gjenspeiles i fettsyresammensetningen i fileten. ⁴⁻⁷ Et gjennomsnittlig fiskefôr inneholder om lag 30% marine og 70% vegetabiliske råvarer. Dette gjør at oppdrettslaksen inneholder fettsyrer som finnes i vegetabiliske råvarer som ALA og ω -6. Da villaksen naturlig har en diett bestående av bare marine råvarer vil den ikke inneholde disse fettsyrene.

Fra **Tabell 4-1** ser en at det er dobbelt så mye totalt fett i oppdrettslaksen som i villaksen. Dette gir oppdrettslaksen et høyere innhold av de marine fettsyrene per gram,

men dette medfører i tillegg vesentlig høyere innhold av vegetabiliske fettsyrer som ALA og ω -6-fettsyrer.

For å kunne si noe om at metoden som er benyttet i dette arbeidet er kvantitativ, sammenlignes resultatene fra dette arbeidet med resultatene fra studien til Totland et al. I **Tabell 5-1** er resultatene fra begge studier presentert.

Tabell 5-1: Andel EPA, DHA og ALA funnet i dette arbeidet sammenlignet med tidligere arbeid. Tall fra tidligere arbeid er hentet fra Totland et al. ²⁹

	Villaks		Oppdrettslaks	
	Dette arbeidet	Tidligere arbeid	Dette arbeidet	Tidligere arbeid
EPA [%]	9,0	6,9	3,3	3,8
DHA [%]	14,5	10,7	4,7	5,7
ALA [%]	0	0	9,1	8,0
Total % DHA/EPA	23,5	17,6	8,0	9,5

Ved å sammenligne mengdene av fettsyrene i villaks bestemt i dette arbeidet med tidligere funn ser en fra tabellen at andel EPA er høyere i laksen i dette arbeidet. Et innhold på 9,0% EPA ble bestemt mot 6,9% i det tidligere arbeidet. Forskjellen på DHA er enda større med 14,5% i dette arbeidet mot 10,7% i tidligere arbeid. Dette gir en forskjell i total andel av DHA/EPA i villaks på 23,5% mot 17,6% i det tidligere arbeidet.

Fettinnholdet og fettsyresammensetningen i villaks vil variere med flere faktorer, og en kan dermed ikke sammenligne disse studiene direkte. Villaksen i dette arbeidet var på 5 kg og i det tidligere arbeidet var vekten på villaksen under 3kg. Villaksen vil være fetere jo eldre og større den er. Den blir derimot magrere på gytevandringen fra havet til elvene da den på vandringen normalt ikke tar til seg føde. Den vil også være magrere rett etter gyting. Villaksen i denne studien hadde ikke gytt da den inneholdt rogn. I

tillegg kan fettsyresammensetningen variere i ulike deler av fisken og fileten. I dette arbeidet er det tatt prøver fra det norske kvalitetssnittet. I den tidligere studien er prøvene tatt fra bukfettet.

I motsetning til villaksen vil fettinnholdet i oppdrettslaksen variere bare med alder og størrelse på fisken. De andre faktorene som gir varierende fettinnhold i villaksen vil være relativt konstant for oppdrettslaksen. Ved å sammenligne andel fettsyrer i oppdrettslaksen mellom disse studiene ser en at andel EPA og DHA er funnet å være henholdsvis 3,3% og 4,7% i dette arbeidet mot 3,8% og 5,7% i det tidligere arbeidet. Andel ALA er 9,1% i dette arbeidet mot 8,0% i det tidligere arbeidet. Som forventet er forskjellen av andel marine fettsyrer mindre for oppdrettslaks, enn for villaks. Total andel DHA/EPA i oppdrettslaks er noe lavere i dette arbeidet sammelignet med tidligere arbeid, henholdsvis fra 8,0% til 9,5%. Andel ALA er derimot noe høyere i dette arbeidet. En ytterligere økning i vegetabiliske ω -3-fettsyrer og en reduksjon i de marine ω -3-fettsyrene i fôret siden 2016 kan være en forklaring. Oppdrettslaksen brukt i det tidligere studiet var ferdig fabrikkpakket frosne fileter, kjøpt på supermarked som gjør at en ikke vet hvor stor eller hvor på fisken prøvene er tatt fra. Resultatene er dermed ikke direkte sammenlignbare.

5.2 Fosfor

Vi har nå sett at fettsyresammensetningen i dietten har stor påvirkning på fettsyresammensetningen i fileten. Selv om det er i mindre grad, så påvirker også fettsyresammensetningen i dietten fosfolipidsammensetningen i cellene.⁴² Fosfolipider utgjør største delen av cellemembraner. Sammensetningen av fosfolipidene i cellemembranene regulerer cellefunksjonen og membranfluiditeten. Dette gjør at det kreves en stabil membransammensetning. For å undersøke om det er forskjell i fosforprofilene til oppdrettslaks og villaks ble det utført fosforspekter på prøver av det norske kvalitetssnittet. Det ble tatt opp fosforspekter av både oppdrettslaksen og villaksen med en spinnhastighet på 3500 Hz. I tillegg er det tatt opp statiske fosforspekter av oppdrettslaksen og villaksen.

I **Figur 4.8** vises fosforspekter av villaks (i blått) og oppdrettslaks (i rødt) tatt opp med en spinnhastighet på 3500Hz. Her ser en et kraftig signal i hvert av spektrene. Disse signalene oppstår ved ulike kjemiske skift. Det kan si noe om det indre miljøet i cellene, som for eksempel pH. I **Figur 4.9** ser en to spekter av oppdrettslaks. Spekteret i rødt er tatt opp med en spinnhastighet på 3500Hz, mens spekteret i blått er statisk. Det statiske spekteret viser at det kraftige signalet i det spinnende spekteret er signal fra flere resonanser. Signal fra rigide molekyler i det statiske spekteret vil ved spinnende eksperiment bidra til det samme signalet som gjør dette signalet kraftigere enn det egentlig er. Dette vil si at de største fosfor-komponentene en ser i **Figur 4.8** er signal fra komponenter som er mobile. En kandidat kan være kreatinfosfat som er et mobilt og relativt lite molekyl. I **Figur 11** er statiske spekter av oppdrettslaks og villaks sammenlignet. Avstanden på de rigide signalene fra cellemembranene ble målt til å være 0,7 ppm lavere i oppdrettslaksen enn i villaksen. Dette demonstrerer ulik mobilitet i cellemembranene som kan tyde på forskjeller i hodegrupper og/eller fettsyrer i fosfolipidene. Hvor tett fosfolipidene pakkes sammen i cellemembranene har betydning for hvor mobile cellemembranene er. Ettersom det i dette arbeidet er funnet markante forskjeller i fettsyresammensetningen i fettene i fileten, er det grunn til å mistenke forskjellig fettsyresammensetning også i cellemembranene.

4.3 MRI

For å få en visuell sammenligning av fettfordelingen i fileten ble det brukt MR-avbildning. **Figur 4.12** og **Figur 4.13** viser MR-bilder av fileten av henholdsvis oppdrettslaks og villaks. Bildene er tatt fra samme region i det norske kvalitetssnittet. MR-bildene viser hvordan fettene er distribuert i fileten. Ved å sammenligne kontrastene i bildene ser en at kontrasten i MR-bildet av oppdrettslaks (**Figur 4.12**) er mye skarpere enn i MR-bildet av villaks (**Figur 4.13**). En ser at de lyse stripene er mye breiere og kraftigere i bildet av oppdrettslaksen. Dette er fordi oppdrettslaksen inneholder mer fett da lyse områder viser fett. Dette bekrefter den store forskjellen i fettprosent som ble funnet til å være dobbelt så høyt i oppdrettslaksen som i villaksen.

Oppdrettsnæringen har utfordring med økt innslag av bløt tekstur og at fileten spalter seg. Muskelsegmentene i fiskefileter er festet til hverandre med bindevev. Når dette

bindevevet sprekker oppstår det filetspalting. Muskel med mye bindevev er fastere i teksturen, mens et lavt innhold kan gi en bløt tekstur i fileten. Selv om laks med høyt fettinnhold ofte er mykere, har bindevevet betydning for fastheten på fileten. Styrken, som vil si grad av kryssbindinger og mengde bindevev vil påvirke i hvilken grad fileten holder seg sammen og ikke spaltes.⁴³

For å måle fastheten på fileten ble T_2 -verdier i fett/bindevev og kjøttet målt. Denne verdien sier noe om hvor mobile molekylerne er. Ved å se på MR-bildet av villaksen (**Figur 4.13**) kan en se lys kontrast mellom fettstripene. Grunnet lavere innhold av fett i denne fileten ser en fettstet som smale striper i fileten, mens bindevevet som har den høyeste T_2 -verdien gir de lyseste kontrastene. Dette samsvarer med resultatene som ble funnet (**Tabell 4-1**) hvor villaksen inneholder mindre fett og mer vann enn oppdrettslaksen. **Tabell 4-3** viser T_2 -verdiene for alle tre parallellene av oppdrettslaks og villaks som ble målt i fettstet/bindevev og kjøttet/muskel. Her ser en at T_2 -verdiene målt i kjøttet er høyere i villaksen enn i oppdrettslaksen. Dette kan være grunnet det høye innholdet av bindevev i kjøttet. T_2 -verdiene målt i fettstet er høyere i oppdrettslaksen enn i villaksen. Dette indikerer at fettstet i oppdrettslaksen er mer mobilt enn i villaksen som kan gi det en bløt tekstur.

Fokuset i denne oppgaven har vært på de helsebringende marine ω -3-fettsyrene i utgangspunktet for konsumentens helse, men dietten og fettsammensetningen har også stor betydning for fiskens helse. Fett har flere viktige funksjoner foruten å være en energikilde. For eksempel er hver eneste cellemembran bygget opp av fett. I cellemembranene finnes det både mettede, umettede og flerumettede fettsyrer og kolesterol. Forholdet mellom disse bestemmer hvordan fettsyrene pakkes sammen og hvor flytende membranen blir. Flere mettede fettsyrer og kolesterolemolekyler gjør membranen stivere, mens de flerumettede fettsyrene gjør membranen mer flytende. Fettsammensetningen er altså viktig i alle deler av fisken. Ulike organ består av ulike fettsammensetninger. I hjernen finnes det for eksempel spesielt mye av ω -3-fettsyren DHA.

Planteoljer påvirker sammensetningen av fett i hjertet, og ettersom hjertet er et viktig organ for fiskens helse er det interessant å se om det er noen synlige forskjeller på

hjertet til villaksen og oppdrettslaksen siden de har så ulike dietter. Det ble derfor tatt MR-bilde av hjertet til laksene. **Figur 4.14** og **Figur 4.15** viser MR-bilde av henholdsvis hjertet til villaksen og oppdrettslaksen. Ved å sammenligne disse bildene ser en at det er en stor forskjell i kontrasten på bildet av oppdrettslaksen. Da de lyse områdene indikerer områder med mye fett ser en at hjertet til oppdrettslaksen er omgitt av fett, noe hjertet til villaksen ikke er. En ser her at den høye fettprosenten hos oppdrettslaksen gjør at fett lagres rundt hjertet.

6. KONKLUSJON

Fast-fase ^1H -NMR spektroskopi har vist seg å være en rask metode for å bestemme fettinnholdet i laks. Fettinnholdet i oppdrettslaks demonstrerer at den produseres under intensive forhold med fri tilgang til fôr. Fast fase ^{13}C -NMR spektroskopi har vist seg å være en pålitelig metode for å kvantifisere de marine ω -3-fettsyrene. Substitusjon av marine ingredienser med planteingredienser påvirker tydelig fettresammensetningen i oppdrettslaks. Da andel av de marine ω -3-fettsyrene av det totale fettinnhold ble funnet til å være omtrent dobbelt så høyt i villaks som oppdrettslaks indikerer det at laks, på lik linje med humane celler, er lite egnet til å omdanne vegetabiliske ω -3-fettsyrer som ALA til de marine ω -3-fettsyrene EPA og DHA. Om dette var tilfellet ville oppdrettslaks inneholdt like mye EPA og DHA som villaks, og utfordringene med vegetabiliske oljer i fôret ville heller ikke vært tilstede. Grunnet det høye fettinnholdet vil oppdrettslaks fremdeles være en god kilde til EPA og DHA, men det innebærer også høyere mengder av vegetabiliske fettsyrer som ALA og ω -6-fettsyrer.

Fast fase ^{31}P -NMR spektroskopi viste at fosforprofilene i oppdrettslaks og villaks er forskjellige. Det er ikke nok data på området til å identifisere de ulike fosfortypene, eller om forskjellene skyldes andre faktorer som for eksempel pH. Sammenligning av filetene av oppdrettslaks og villaks ved MRI gjenspeilte det ulike fettinnholdet som ble funnet med ^1H NMR-spektroskopi. MRI av hjertet viste at oppdrettslaksen lagrer fett rundt hjertet. Dette ble ikke observert i hjertet på villaksen.

Videre arbeid

Fast-fase NMR-spektroskopi er et relativt nytt verktøy med stort potensial som må utvikles ytterligere. Videre arbeid på dette feltet vil være å erstatte tradisjonelle analysemetoder med kompliserte prøveopparbeidelser med fast fase NMR-spektroskopi. Siden fosforspektrene av villaks og oppdrettslaks er ulike, er det grunnlag for å studere hvilke fosforforbindelser som gir opphav til signalene. Det hadde også vært interessant å sammenligne andre organer i oppdrettslaks og villaks ved å benytte MRI og fast-fase NMR-spektroskopi.

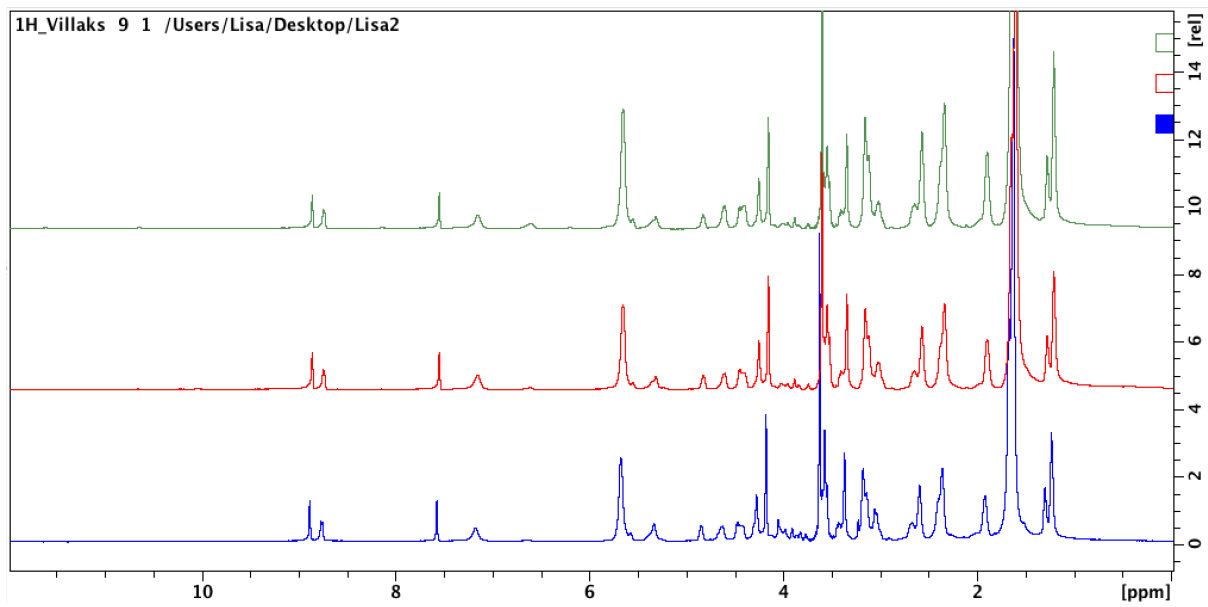
7. LITTERATURLISTE

1. Friebolin, H.; Beconsall, J. K., *Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy*. VCH Weinheim: 1993.
2. Giovanni M. Turchini, B. E. T., Wing-Keong Ng, Fish oil replacement in finfish nutrition *Rev Aquaculture* **2009**, *1* (10-57).
3. Albert G.J Tacon, M. M., Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects *Aquaculture* **2008**, *285* (1-4).
4. Igarashi, T.; Aursand, M.; Hirata, Y.; Gribbestad, I. S.; Wada, S.; Nonaka, M., Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n- 3 fatty acids in fish oils by high-resolution 1 H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, *77* (7), 737-748.
5. Aursand, M.; Axelsonb'c, D., Origin recognition of wild and farmed salmon (Norway and 13 Scotland) using C NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques. *Magnetic resonance in food science: a view to the future* **2001**, *5*, 227.
6. Aursand, M.; Bleivik, B.; Rainuzzo, J. R.; Leif, J.; Mohr, V., Lipid distribution and composition of commercially farmed atlantic salmon (salmosalar). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1994**, *64* (2), 239-248.
7. Bell, J. G.; McEvoy, J.; Tocher, D. R.; McGhee, F.; Campbell, P. J.; Sargent, J. R., Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition* **2001**, *131* (5), 1535-1543.
8. Mozaffarian, D.; Lemaitre, R. N.; King, I. B.; Song, X.; Huang, H.; Sacks, F. M.; Rimm, E. B.; Wang, M.; Siscovick, D. S., Plasma phospholipid long-chain ω -3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: a cohort study. *Annals of internal medicine* **2013**, *158* (7), 515-525.
9. Cunnane, S. C.; Crawford, M. A., Energetic and nutritional constraints on infant brain development: implications for brain expansion during human evolution. *Journal of human evolution* **2014**, *77*, 88-98.
10. Simopoulos, A. P., Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular neurobiology* **2011**, *44* (2), 203-215.
11. Wang, C.; Harris, W. S.; Chung, M.; Lichtenstein, A. H.; Balk, E. M.; Kupelnick, B.; Jordan, H. S.; Lau, J., n- 3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary-and secondary-prevention studies: a systematic review-. *The American journal of clinical nutrition* **2006**, *84* (1), 5-17.
12. Alvheim, A. R.; Torstensen, B. E.; Lin, Y. H.; Lillefosse, H. H.; Lock, E. J.; Madsen, L.; Frøyland, L.; Hibbeln, J. R.; Malde, M. K., Dietary Linoleic Acid Elevates the Endocannabinoids 2 - AG and Anandamide and Promotes Weight Gain in Mice Fed a Low Fat Diet. *Lipids* **2014**, *49* (1), 59-69.
13. Kostråd fra helsedirektoratet. (accessed 16.05).
14. Kostråd om fisk og sjømat <https://helsenorge.no/kosthold-og-ernaring/kostrad/spis-fisk-oftere> (accessed 16.05).

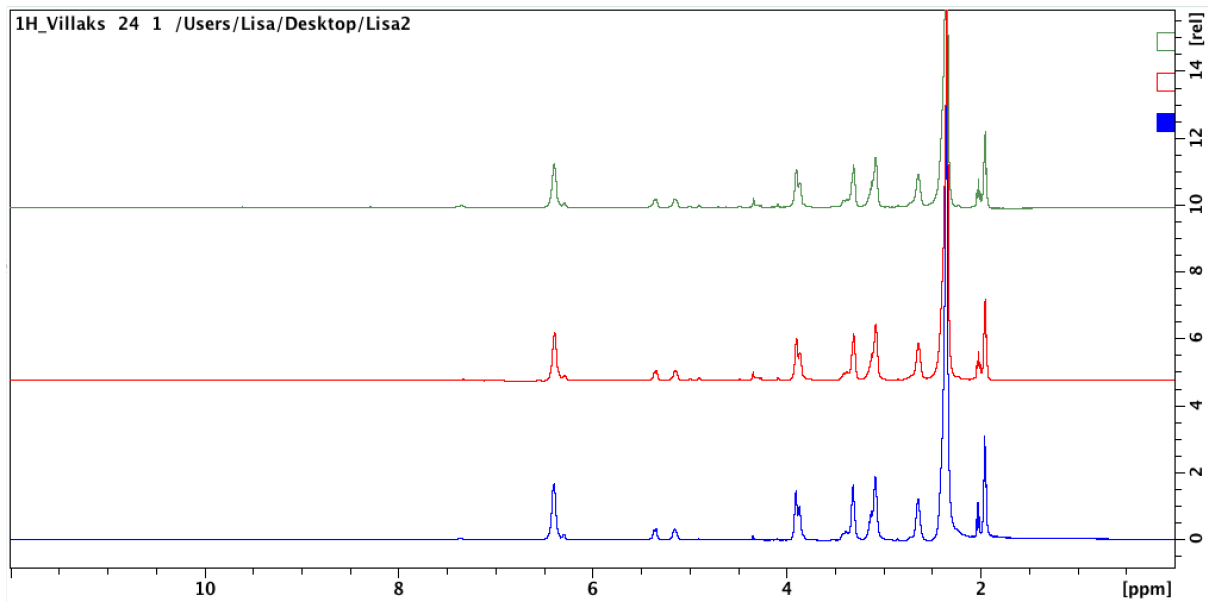
15. Lie O., L. G., Fatty acid composition of glycerophospholipids in seven tissues of cod (*Gadus morhua*), determined by combined high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J.Chromatography* **1991**, 565 (119-29).
16. Soxhlet, F., Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytechnisches* **1879**, 232 (461-465).
17. Bloor, W., A method for the determination of fat in small amounts of blood *J Biol Chem* **1914**, 17 (377).
18. Bornmann, J., Assoc. of Agric. Chem: 1931.
19. Næringsstoff i sild og makrell
<https://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900663> (accessed 10.05).
20. Folch J, L. M., Sloane Stanley GH., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **1957**, 226 (497).
21. Becker, E. D., A brief history of nuclear magnetic resonance. *Analytical chemistry* **1993**, 65 (6), 295A-302A.
22. Aursand, M.; Rainuzzo, J.; Grasdalen, H., Quantitative high-resolution ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance of ω 3 fatty acids from white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1993**, 70 (10), 971-981.
23. Aursand, M.; Grasdalen, H., Interpretation of the ¹³C-NMR spectra of omega-3 fatty acids and lipid extracted from the white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chemistry and physics of lipids* **1992**, 62 (3), 239-251.
24. Erikson, U.; Standal, I. B.; Aursand, I. G.; Veliyulin, E.; Aursand, M., Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2012**, 50 (7), 471-480.
25. Sacchi, R.; Medina, I.; Aubourg, S. P.; Addeo, F.; Paolillo, L., Proton nuclear magnetic resonance rapid and structure-specific determination of ω -3 polyunsaturated fatty acids in fish lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1993**, 70 (3), 225-228.
26. Sacchi, R.; Medina, I.; Aubourg, S. P.; Giudicianni, I.; Paolillo, L.; Addeo, F., Quantitative high-resolution carbon-13 NMR analysis of lipids extracted from the white muscle of Atlantic tuna (*Thunnus alalunga*). *Journal of agricultural and food chemistry* **1993**, 41 (8), 1247-1253.
27. Aursand, M.; Jørgensen, L.; Grasdalen, H., Positional distribution of ω 3 fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1995**, 72 (3), 293-297.
28. Aursand, M.; Jørgensen, L.; Grasdalen, H., Quantitative high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance of anserine and lactate in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, 112 (2), 315-321.
29. Dais, P.; Misiak, M.; Hatzakis, E., Analysis of marine dietary supplements using NMR spectroscopy. *Analytical Methods* **2015**, 7 (12), 5226-5238.
30. Ingrid S. Gribbestad, M. A., Iciar Martinez, High-resolution ¹H magnetic resonance spectroscopy of whole fisk, filets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assesment and compositional analyses. *Aquaculture* **2005**, 250 (445-457).

31. C. Totland, J. G. S., S. Steinkopf, W. Nerdal, Analysis of wild and farmed salmon using ¹³C solid-state NMR and MRI directly on fillet tissue. *The Royal Society of Chemistry 2017* **2017**, 1290-1296.
32. Andrew, E. R., A historical review of NMR and its clinical applications. *British medical bulletin* **1984**, *40* (2), 115-119.
33. Alia, A.; Ganapathy, S.; de Groot, H. J., Magic angle spinning (MAS) NMR: a new tool to study the spatial and electronic structure of photosynthetic complexes. *Photosynthesis research* **2009**, *102* (2-3), 415.
34. Salmon, A., Colour and Fat Measurement. *Norwegian Standards Association, Oslo* **1994**.
35. As, F.-L., NQC snitt (Norwegian quality cut). AS, N. F.-L., Ed. Ole Høstmark.
36. Johnsen, C. A., Lokasjoner for kvalitetsanalyser. 2006.
37. Totland, C.; Seland, J.; Steinkopf, S.; Nerdal, W., Analysis of wild and farmed salmon using ¹³C solid-state NMR and MRI directly on fillet tissue. *Analytical Methods* **2017**, *9* (8), 1290-1296.
38. Gustav Nestor, J. B., Christian Schilechtriem et al., High-resolution ¹H Magic Angle Spinning NMR spectroscopy of intact Arctic Char (*Salvelinus Alpinus*) Muscle. Quantitative Analysis of n-3 Fatty Acids, EPA and DHA *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (10799-10803).
39. Ametaj BN, B. G., Lu Y, Young JW, Beitz DC, Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J agric Food Chem* **2003**, *51* (2105).
40. Sonnich Meier, S. A. M., Horaldur Joensen, Otto Grahl-Nielsen, Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A.* **2006**, *1104* (291-8).
41. Nichols, P. D.; Glencross, B.; Petrie, J. R.; Singh, S. P., Readily available sources of long-chain omega-3 oils: is farmed Australian seafood a better source of the good oil than wild-caught seafood? *Nutrients* **2014**, *6* (3), 1063-1079.
42. Olsen, R. E.; Taranger, G. L.; Svåsand, T.; Skilbrei, O. T., Improved method for triacylglycerol-derived fatty acid profiling by various non-lethal and lethal sampling techniques in Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions* **2013**, *4* (3), 251-261.
43. Markøre, T. *Tekstur i oppdrettslaks*; 2008.

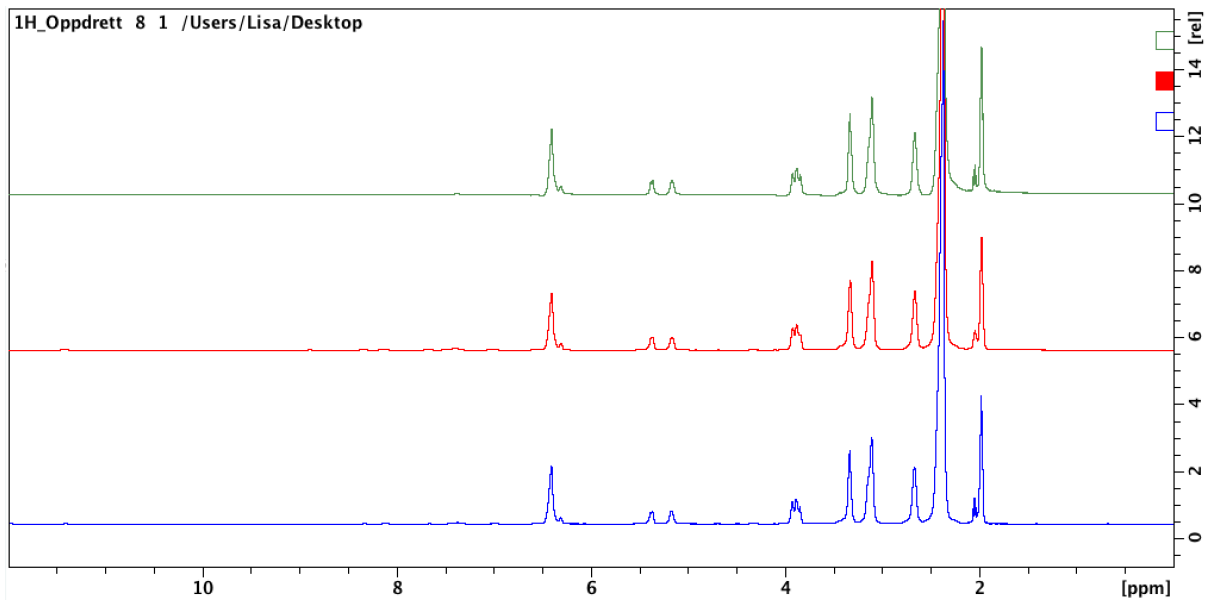
VEDLEGG A



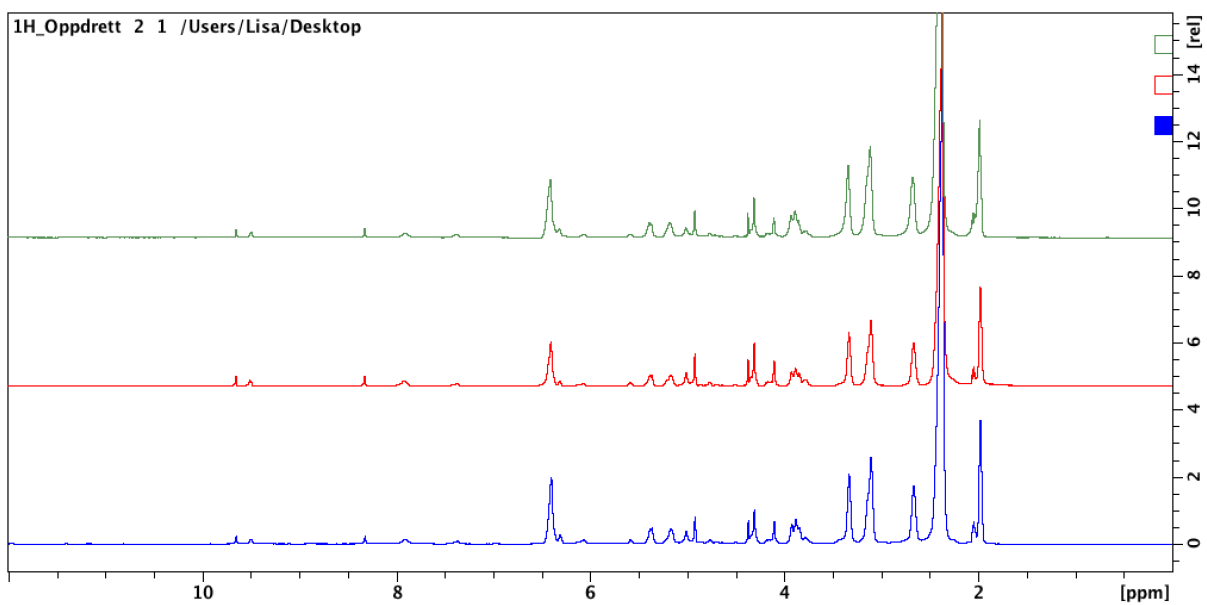
Figur A.1: Paralleller muskel/kjøtt-prøver av villaks



Figur A.2: Paralleller fett-prøver av villaks



Figur A.3: Paralleller fett -prøver av oppdrettslaks



Figur A.4: Paralleller muskel/kjøtt -prøver av oppdrettslaks

