



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE) ved Norges fiskerihøgskole

Lipider fra kiselalger som potensiell fettressurs i laksefôr

Optimalisering av ekstraksjonsutbytte samt karakterisering av fettsyresammensetning og lipidklasser.

Trond-Håkon Seljevold Solbø

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap

November 2016



Forord

Denne mastergradsavhandlingen er kronen på verket etter 5 års studieforløp ved Norges Fiskerihøgskole v/ universitetet i Tromsø. At denne dagen skulle komme er surrealistisk, der tanken på å inntre arbeidslivet virker både skremmende og spennende. Utdanningen ved NFH har vært svært lærerikt, og jeg ønsker å takke instituttet for en god personutviklende utdanning!

Det praktiske arbeidet har vært utfordrende men lærerikt. Ikke minst har det vært mentalt utfordrende, der arbeidet på labben har servert håp, tvil, skuffelser og mestringsfølelse på løpende bånd.

Jeg ønsker å takke algegruppen ved NFH for råstoffet. Uten dette ville ikke oppgaven vært mulig å gjennomføre. Ellers vil jeg også rekke en spesielt stor takk til Guro Edvinsen, Lars Dalheim og sjømatgruppa for øvrig. Dere har bidratt med høykompetent hjelp og problemløsning under det praktiske arbeidet, spesielt i de tider arbeidet var krevende. I tillegg har dere alle bidratt med god trivsel på labben, og et medførende fint år!

Jeg vil også takke personell og studenter ved NFH for innholdsrike faglige diskusjoner over fem år. Dere har vært en fornøyelse å omgås med og vil bli dypt savnet. Mine nærmeste medstudenter fortjener også en stor takk, dere har gjort studietiden minnelsesrik og jeg sitter igjen med venner for livet! Ellers vil jeg takke min kjæreste, mine foreldre, min bror, øvrig familie, og øvrige venner. Takk for at dere har hatt stor tro på meg, og for jevnlig påfyll av motivasjon og støtte under et krevende år.

Jeg ønsker særlig å takke mine veiledere Karl-Erik Eilertsen og Hanne K. Mæhre for svært konstruktiv veiledning og objektiv rettleiding under oppgaveskrivingen. Jeg vil også takke for deres behjelpelighet og faglige kompetanse som har hjulpet meg mye i det praktiske arbeidet.

Trond-Håkon Seljevold Solbø

November, 2016

Summary in English

The global aquaculture industry is growing rapidly, which has led to a global deficit of marine oils for use in aquaculture feed. This shortfall is expected to reach 40 million tonnes by 2030. In addition, it is expected a total feed requirements of global aquaculture, that will exceed 87 million tonnes by 2025. This has resulted in an introduction of vegetable ingredients in the salmon feed. This share has increased in recent years. Vegetables now account for the major components in feed for Atlantic salmon. This has meant that the salmon's position as a health-winning seafood product can be challenged over time, if the trend with decreasing content of EPA+DHA in the feed is continuing. This has been associated with the growing food requirements and the deficit for marine oils, has made it necessary to find and exploit new feed ingredients. A potential solution to the problem is to make use of marine diatoms. In this thesis *P. glacialis*, *C. furcellatus* and *S. marinoi* have been studied as potential sources of marine oil that can be used in salmon feed (on the basis of their characteristics fatty acid composition and lipid class composition). The problem of lipid extraction from siliceous algae is their robust cell wall that makes the lipid extraction challenging. It can be problematic to extract all the lipids without a proper disruption of the cell walls. This study has shown that sonication and UltraTurrax can increase the fat yield. Sonication, however, had the best effect in diatoms where fat yield may rise by 30 percent. *P. glacialis* and *C. furcellatus* proved to be particularly rich in marine n-3 HUFA fatty acids with a high content of EPA (20:5n-3). *P. glacialis* may exceed 50% of n-3 HUFAs, where fatty acids such as SDA (18:4n-3) accounting for 10% and EPA representing 30% of the fatty acid composition. However the microalgae material can contain some abnormal fatty acids, which could not be identified with the in-house fatty acid identification method. To meet this challenge, a new method was developed based on Christie (2011). The developed method succeeded in the fractionating of fatty acids on the basis of double bonds in hydrocarbon tail, which made unidentified fatty acids identifiable. The method for identification of lipid classes was also not suitable for the lipids from diatoms. Therefore a new alternative method was developed. This method was developed by combining two common methods, as the existing methods failed to isolate fat with a high content of polar lipids. The lipids extracted from the investigated diatoms were found to contain a lot of phospholipids, which may be beneficial for use in fish feed as this may increase the absorption of feed lipids in fish (especially in fish fry and juveniles). The largest proportion of EPA + DHA was found in the fraction containing phosphatidylcholine (*P. glacialis*). Due to the chemical and qualitative features of the oil from *P. glacialis* and *C. furcellatus*, the lipids from these species may serve as suitable resources for salmon feed production.

Sammendrag

Den globale oppdrettsnæringen er i kraftig vekst, noe som har medført et globalt underskudd for marine oljer til oppdrettsfôr. Dette underskuddet er forventet å tangere 40 millioner tonn innen 2030. I tillegg er det forventet et totalt fôrbehov til global akvakultur på i overkant av 87 millioner tonn innen 2025. Dette har medført at laksefôrprodusenter har introdusert vegetabiliske råvarer i fôret. Denne andelen har over de senere år også økt, slik at vegetabilier nå står for hovedkomponentene i fôr til atlantisk laks. Dette har medført at laksens posisjon som et helsefremmende sjømatprodukt kan utfordres over tid dersom utviklingen får fortsette. Dette satt i sammenheng med det økende fôrbehovet og underskuddet for marine oljer, har gjort at nye fôrressurser må finnes- og utnyttes. En potensiell løsning på problemet er å benytte seg av marine kiselalger. I denne oppgaven har *P. glacialis*, *C. furcellatus* og *S. marinoi* vært studert som potensielle oljekilder til laksefôr på bakgrunn av egenskaper i fettsyresammensetning og lipidklassesammensetning. Problemet med lipidekstraksjon fra kiselalgene er deres robuste cellevegg. Dette gjør at lipidekstraksjon er krevende, der det kan være problematisk å utvinne alt fett uten noen form for knusing av celleveggen. Oppgaven har vist at sonikering og UltraTurrax kan øke fettutbyttet. Sonikering hadde imidlertid best effekt på kiselalgematerialet og kunne øke fettutbyttet med opptil 30 prosent. *P. glacialis* og *C. furcellatus* viste seg å være særdeles rik på de marine n-3 HUFA fettsyrene, med et høyt innhold av EPA (20:5n-3). *P. glacialis* kan overskride 50% n-3 HUFA, der fettsyrer som SDA (18:4n-3) står for 10 %, og EPA kan stå for 30% av fettsyresammensetningen. Imidlertid inneholdt mikroalgematerialet noe unormale fettsyrer, som ikke kunne identifiseres via den fettsyreidentifikasjonsmetoden som praktiseres ved NFH. Dermed måtte en ny metode utvikles med utgangspunkt i Christie en tidligere beskrevet metode. Metoden evnet å fraksjonere fettsyrer på bakgrunn av dobbeltbindinger i hydroksylkjeden, som gjorde uidentifisert fett identifiserbart. Ved lipidklasseidentifisering måtte også en alternativ metode utvikles. Dette ble gjort med utgangspunkt i to utbredte metoder. Årsaken var at de eksisterende metodene ikke evnet å isolere fett med svært mye polare lipider. I mikroalgene ble det imidlertid identifisert mye fosfolipider, som er gunstig for opptak og absorpsjon i fisk (særlig i fiskeyngel). Den største andelen av EPA+DHA ble funnet i fosfatidylcholinefraksjonen for *P. glacialis*. Dermed er olje fra henholdsvis *P. glacialis* og *C. furcellatus* potensielle lipid ressurser i laksefôr på bakgrunn av lipidenes kvalitative egenskaper.

Forkortelser

EPA	Eicosapentaensyre
DHA	Docosaheksaensyre
DPA	Docosapentaensyre
SDA	Stearidonsyre
ARA	Arakidonsyre
LA	Linolsyre
ALA	Alfa-linolensyre
SFA	Mettede fettsyrer
MUFA	Enumettede fettsyrer
PUFA	Flerumettede fettsyrer
HUFA	Høyt umettede fettsyrer
FA	Fettsyrer
FFA	Frie fettsyrer
MAG	Monoacylglyserol
DAG	Diacylglyserol
1,3 DAG	Diacylglyserol med fettsyrer i posisjon 1 og 3
1,2 DAG	Diacylglyserol med fettsyrer i posisjon 1 og 2
TAG	Triacylglyserol
WE	Voksester
CE	Kolesterylester
NL	Nøytrale lipider
RNL	Resterende/relativt nøytrale lipider
PL	Fosfolipider
PC	Fosfatidylcholine
PE	Fosfatidyletanolamin
PG	Fosfoglyserol
GL	Glykolipider
SPE	Fast fase eluering
DCM	Diklormetan
MeOH	Metanol
ACT	Aceton
AcNi	Acetonitril
HP-TLC	Høytrykks tynnsjiktskromatografi

Innhold

Forord	ii
1 Innledning.....	1
1.1 Utvikling i global akvakultur	1
1.2 Oppdrett av laks i Norge.....	2
1.3 Marine oljer	2
1.4 Vegetabilsk råstoff i fôr til laksefisk.....	4
1.5 Ernæringsmessig kvalitet- og påvirkning ved vegetabilske oljer	6
1.6 Alternative kilder	7
1.6.1 Mikroalger som fôrressurs	7
1.7 Mål	9
2 Teori.....	9
2.1 Mikroalger	9
2.2 Lipider	10
2.3 Omega-3 fettsyrer og helseeffekter	14
3 Materialer og metoder	16
3.1 Materialer.....	16
3.1.1 Råstoff.....	16
3.1.2 Kjemikalier.....	17
3.2 Oppbygning av oppgaven	17
3.3 Metoder.....	18
3.3.1 Frysetørking.....	18
3.3.2 Fettekstraksjon	18
3.3.3 Hydrolyse og metylering for bestemmelse av fettsyresammensetning.....	19
3.3.4 Bestemmelse av fettsyresammensetning i gasskromatograf (FID)	19
3.4 Fast-fase separasjon.....	20
3.4.1 Separasjon på bakgrunn av fettsyrers grad av mettetet	20
3.4.2 Fast-fase separasjon på bakgrunn av fettklasser	20
3.5 Tynnsjiktskromatografi.....	22
4 Resultater og diskusjon	23
4.1 Lipidinnhold.....	23
4.2 Fettsyreprofiler i kiselalgene	27
4.2.1 Sammenlikning av fettsyreprofiler med øvrig råstoff	31
4.2.2 Separasjon på bakgrunn av dobbeltbindinger i hydroksylkjeden, mikroalger.	33
4.2.3 Fettsyreprofiler i annet materiale	40

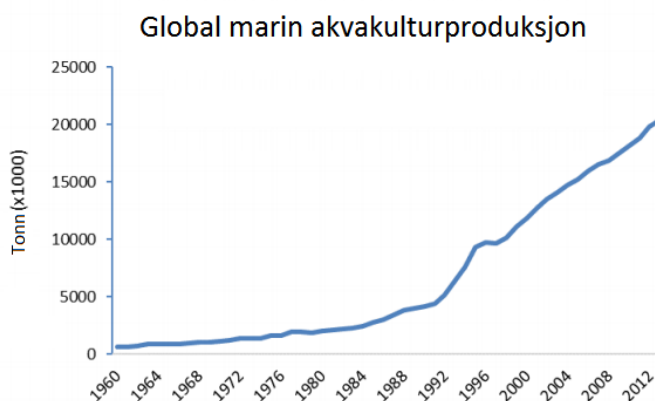
4.3	Lipidklasser og SPE-fraksjonering.....	43
4.3.1	Utgangspunktet.....	43
4.3.2	Metodeutvikling.....	46
4.3.3	Endelig metode	51
4.4	Fraksjoner fra P. Glacialis med påfølgende innhold av ulike fettsyregrupper....	58
5	Generell diskusjon og oppsummering.....	60
5.1	Fettekstraksjonsmetode og forbehandling.....	61
6	Konklusjon.....	62
6.0	Videre arbeid	64
6.1	Øvrig kommersiell nytteverdi.....	65
7	Litteratur	66

1 Innledning

1.1 Utvikling i global akvakultur

I løpet av de siste 50 årene har den globale akvakulturnæringen hatt en formidabel oppsving og på verdensbasis har det gjennomsnittlige fiskekonsumet økt fra 9,9 kg/år per person på 60-tallet til over 19 kg i 2012 (FAO, 2014). Økningen i fiskekonsumet er forårsaket av stadig økende befolkningsvekst, økt betalingsevne og økt urbanisering. I tillegg har bedre tilrettelagte distribusjonskanaler for vill og kultivert fisk gjort fisken mer tilgjengelig på markedene (FAO, 2014). Det forventes også videre vekst i det globale fiskekonsumet, blant annet ved et stadig økende konsum i utviklingsland. I tillegg forventes folketallet på jorda å passere 9,6 milliarder innen 2050, der den største befolkningsveksten er estimert å skje nettopp i utviklingsland (FAO, 2014). En slik befolkningsvekst krever også økte mengder mat, der fisk kommer til å være en sentral proteinkilde for å brødfø den økende befolkningen. Imidlertid er mange av verdens fiskebestander allerede maksimalt beskattet (Miller *et al.*, 2008), slik at det økte behovet for protein fra sjømat i hovedsak må komme fra akvakultur (FAO, 2014).

Den globale akvakulturnæringen, inkludert kultiveringen av laks, har hatt en markant økning de siste årene (Figur 1). Dette gjør at verdens samlede produksjonen av oppdrettsfisk alene, er i ferd med å passere de globale fiskeriene i kvantum (FAO, 2014). I dag er Kina verdens største akvakulturland med en produksjon på 24,4 millioner tonn oppdrettsfisk i 2012. De viktigste artene i kinesisk fiskeoppdrett er tilapia og en rekke karpearter (Tacon og Metian, 2015). I tillegg produserer Kina betydelige mengder andre akvatiske



Figur 1. Global marin akvakulturproduksjon. Total biomasse; inkludert fisk, mollusker og krepsdyr (Modifisert fra FAO, 2014).

organismer som krepsdyr og mollusker. Kinas samlede akvakultur var dermed på over 41 millioner tonn i 2012. Kinesisk akvakultur satser stort på innenlands kultivering og majoriteten av fiskekultiveringen skjer ekstensivt/semi-intensivt i dammer med fersk- eller

brakkvann. Norge på sin side er verdens sjette største fiskeoppdrettsnasjon, der intensivt lakseoppdrett i sjø er mest betydningsfullt (FAO, 2014). I et globalt perspektiv produseres det årlig om lag 66,6 millioner tonn med oppdrettsfisk til konsum, der marikultivert fisk (fisk oppdrettet i sjø) kun står for 12,6% av denne biomassen. Imidlertid omsettes den marine oppdrettsfisken globalt for 30,9 milliarder dollar, som er 26,9% av den totale verdien av kultivert fisk (FAO, 2014).

70% av den globale oppdrettede biomassen, kultiveres helt eller delvis via ekstern fôring. Dette tallet inkluderer ulike fiskearter og diverse krepsdyr. Av disse 70 prosentene kultiveres 68% av akvakulturorganismene med kommersielt tilvirket oppdrettsfôr, laks inkludert. Det totale behovet for slikt fôr var estimert til 49,7 millioner tonn i 2015, mens behovet er estimert til å overskride 87 millioner tonn i 2025 (Tacon og Metian, 2015).

1.2 Oppdrett av laks i Norge

Produksjon av laksefisk er i Norge en suksesshistorie, som startet tidlig på 70-tallet. Oppdrettsnæringen har i dag utviklet seg til å bli en av landets mest lønnsomme næringer, der om lag 24 300 årsverk er sysselsatt i primærproduksjonen med avledete virksomheter (Andreassen og Robertsen, 2014). Næringen er også økonomisk svært viktig, hvor eksporttall fra 2015 viser at om lag 1 millioner tonn atlantisk laks (*Salmo salar*) og 53 000 tonn regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble eksportert til en samlet verdi på over 50 milliarder norske kroner dette året (Sjømatrådet, 2016). Norge kultiverer i overkant av 53% av den globalt produserte biomassen og er med dette verdens største produsent av atlantisk laks (Tacon og Metian, 2015). En slik produksjon krever enorme mengder råvarer, inkludert marine oljer. I den globale laksenæringen ble i overkant av 2,1 millioner tonn fôr brukt i 2012. Fôrbehovet er imidlertid estimert til å passere 4,6 millioner tonn innen 2025 (Tacon og Metian, 2015). Totalt inngikk 16,3 millioner tonn marint råstoff til akvakulturfôr i 2012 (Tacon og Metian, 2015). Dermed har havbruksnæringen i Norge, sammen med den globale akvakulturnæringen, bidratt til en dramatisk økning innen pris- og bruksutviklingen for marine oljer.

1.3 Marine oljer

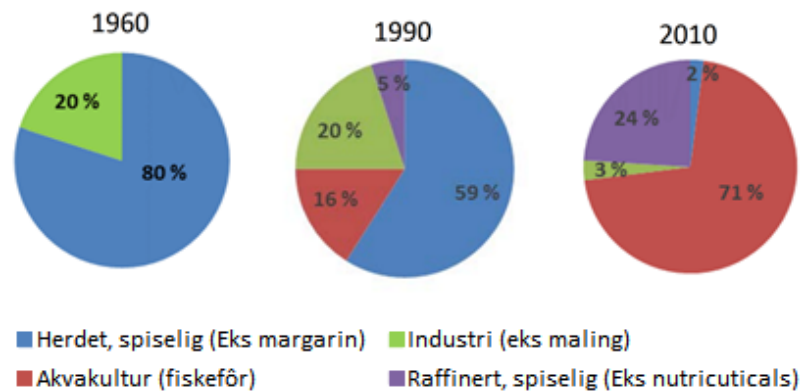
Marine oljer er kjent for sitt høye innhold av de særegne flerumettede langkjedete n-3 fettsyrene Eicosapentaensyre (EPA), og Docosaheksaensyre (DHA) som finnes i det marine miljø (Olsen, 2007). Historisk sett har fiskeoljer vært et billig produkt som i hovedsak har blitt anvendt til industrielle formål. På 1960-tallet ble om lag 80 % av all tilvirket fiskeolje hydrogenert og brukt til produksjon av margarin. Resten gikk hovedsakelig til andre

industrielle formål slik som ingrediens i maling eller til skinngraving (Figur 2) (Shepherd og Jackson, 2013). Etter hvert som akvakulturnæringen har økt i omfang, har etterspørselen etter marine oljer som føringrediens økt, spesielt til kultivering av atlantisk laks (Shepherd og Jackson, 2013). Samtidig er det

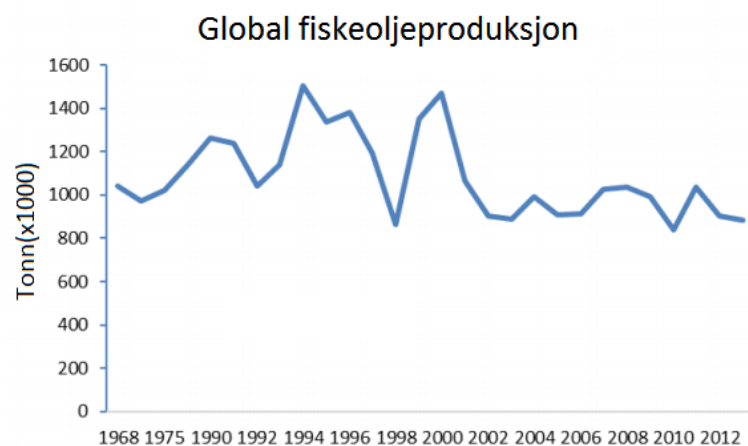
kommet nye høykostmarkeder for fiskeolje til konsum, etter at forskning fra 1970-tallet og utover har påvist helsefremmende effekter ved de særegne langkjedede omega-3 fettsyrene som finnes i fisk og andre marine organismer (Bang *et al.*, 1971; Herold og Kinsella, 1986; Tocher, 2015). Utviklingen innen disse nye markedene og de gradvise endringene i de historiske bruksområdene (figur 2), har økt etterspørselen etter marine oljer. Den økte etterspørselen, og det økte prispresset for marine oljer, som oppsto for noen tiår siden, har fortsatt parallelt med de seinere års økning i den globale akvakulturproduksjonen. Av den globalt tilgjengelige fiskeoljen i 2010 gikk 71% til fiskefôrproduksjon og 2/3 av denne andelen ble brukt i laksefôr (Shepherd og Jackson, 2013).

Den samme trenden sees også for bruken av marine oljer i høykostmarkeder til konsum (via nutraceuticals og/eller i funksjonell mat) (FAO, 2014). Dette bruksområdet hadde bare 5% andel av det totale markedet for fiskeolje i 1990, men dette segmentet har hatt en kraftig vekst

Utvikling i bruken av marine oljer(1960-2010)

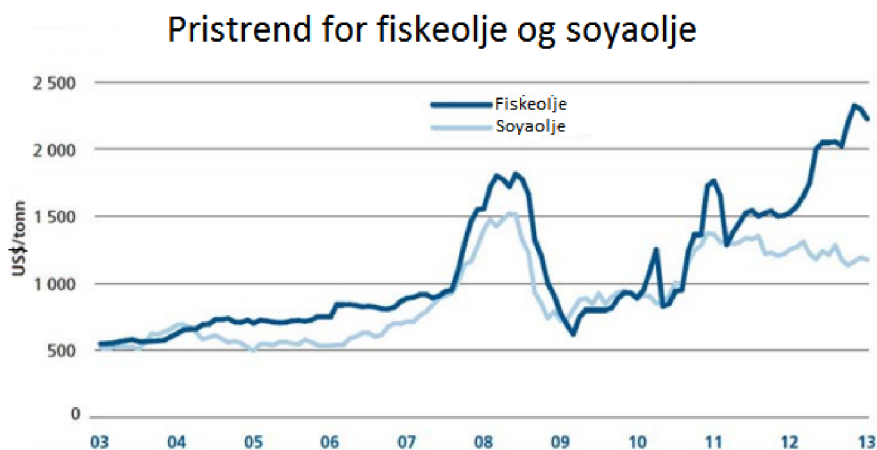


Figur 2. Det har vært en formidabel utvikling i utnyttelsen av marine oljer siden 1960, i tråd med oppblomstringen av nye markeder (Figur modifisert fra (Vang, 2015))



Figur 3. Trend i det totale tilbudet for fiskeoljeproduksjon (globalt), fra 1968 til 2012 (Modifisert fra FAO, 2014).

og utnyttet 24% av de marine oljene i 2010 (Figur 2). Selv om utviklingen av nye markeder har økt etterspørselen etter marine oljer, har ikke produksjonen av marine oljer økt. Om lag 1 millioner tonn fiskeolje produseres årlig, noe som har vært forholdsvis konstant siden tidlig på 2000-tallet (Figur 3) (FAO, 2014; Shepherd og Bachis, 2014). Den forholdsvis stabile, men begrensede tilgjengeligheten av disse oljene, har sammen med en økende etterspørsel ført til en formidabel prisøkning i de senere år (figur 4) for marine oljer. Dette har videre medført økt konkurranse om denne ressursen, og forklarer endringene i bruksområdene til marine oljer, slik at denne ressursen blir forbeholdt høykostmarkedene (Shepherd og Bachis, 2014).



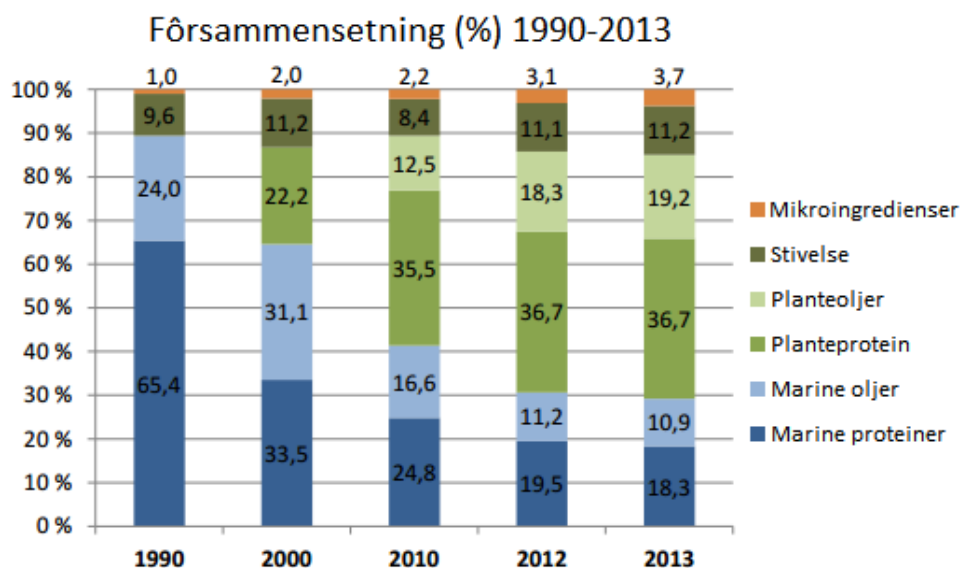
Figur 4. Prisutviklingen (dollar/tonn) for fiskeolje og soyaolje mellom årene 2003 og 2013 (Modifisert fra Vang, 2016).

Laksefôrprodusentene har siden laksenæringens frammarsj tatt store andeler av det totale markedet for marine oljer, men næringens posisjon blir i stadig sterkere grad utfordret ettersom nye høykostmarkeder direkte til konsum vokser ytterligere. I tillegg vil etterspørselen og behovet for marint fett og protein fortsatt øke, i tråd med den globale befolkningsveksten. Dette innebærer også at etterspørselen for kultivert fisk øker, som videre danner et underskudd på tilgjengelig marint fett til havbruksnæringen. Dette internasjonale underskuddet forventes også å øke i de nærmeste årene, og er estimert til å nå 40 millioner tonn i 2030 (Miller *et al.*, 2008).

1.4 Vegetabilsk råstoff i fôr til laksefisk

Den manglende tilgangen på marine oljer, sammen med prisøkningen, har ført til at fôrprodusentene gradvis har måttet endre sammensetningen av ingrediensene i fiskefôret. Utviklingen i råvarebruken til laksefôr har vært særlig merkbar siden 1990-tallet (Ytrestoyl *et al.*, 2015). I oppdrettsnæringens tidlige faser var fôret nesten utelukkende sammensatt av råvarer fra det marine miljø, men i de senere år har en økende innblanding av vegetabilske

råvarer i fôret funnet sted. Vel og merke står faktisk vegetabilier nå for majoriteten av fôringrediensene (figur 1). Opprinnelsen for de marine oljene som brukes i laksefôr har også utviklet seg mot økt anvendelse av marint restråstoff (Ytrestoyl *et al.*, 2015).



Figur 5. Utvikling i råvareopprinnelse til norsk laksefôr, fra 1990 til 2013 (Ytrestoyl *et al.*, 2014).

Årsakene til introduksjonen av de vegetabiliske råvarene er flere. Blant annet behøver oppdrettsnæringen betydelige mengder energi og næring til den enorme og stadig økende mengden oppdrettslaks. Dette har påtvunget fôrprodusentene til vegetabiliske lipidressurser, ettersom tilgangen på marine oljer som nevnt er konstant (Figur 3) og begrenset. Dette gjør at fôrprodusentene ikke vil kunne skaffe til veie tilstrekkelige mengder fôr til havbruksnæringen, uten å benytte andre ressurser. Akvakulturnæringens behov for marine lipider, skaper også bekymringer hos diverse miljøorganisasjonene med tanke på innvirkningen og det økte prisset dette medfører på de ville fiskebestandene (Ytrestoyl *et al.*, 2015).

Den økte etterspørselen for fiskeolje har også vært en pådriver for at fôrprodusentene måtte tenke nytt. Prispresset på marine oljer utfordrer marginen til fôrprodusentene og et høyt innhold med kostbare marine oljer fordyrer fôret. Vegetabilisk råstoff er et godt alternativ økonomisk sett, siden prisen på vegetabiliske oljer er lav sammenliknet med marine oljer (figur4) og tilgangen på vegetabiliske oljer er relativt god (Liland *et al.*, 2013). Oppdrettslaks ser også ut til å ha god toleranse for vegetabiliske råvarer. Forsøk har vist at fôr med høyt innhold av vegetabiliske oljer er fint forenelig med vekst og livsvilkår hos laks (Bell *et al.*, 2003). Imidlertid burde oljen i laksefôret inneholde 2,7 % EPA+DHA for å dekke dens basale behov. Underskriddes dette påvirkes laksens helse, vekst og velferd (Sanden *et al.*, 2016). En positiv side med det stigende innholdet av vegetabilier i fôret, er at antall kilo villfisk som

benyttes for å kultivere et kilo laks reduseres. Dersom fôret har en sammensetning med 80% vegetabiliske oljer og 70% vegetabilisk protein, vil laksen produsere mer fiskeprotein enn det som blir brukt i fôret (Liland *et al.*, 2013). Imidlertid diskuteres det fortsatt om et fôr bestående av for mye vegetabiler, kan redusere laksens motstandsdyktighet mot sykdommer (Gjoen *et al.*, 2004; Metochis *et al.*, 2016).

1.5 Ernæringsmessig kvalitet- og påvirkning ved vegetabiliske oljer

En ulempe med å erstatte de marine oljene med vegetabiliske oljer, er at forskning har vist at laksefiletens depotfett vil gjenspeile fettsyresammensetningen i fôret (Torstensen *et al.*, 2004). Vegetabilene vil dermed påvirke fettsyresammensetningen i fiskemuskel. En omfattende endring har inntruffet de siste 10-15 årene, etter at vegetabiliske kilder for alvor ble introdusert i laksefôret (Sanden *et al.*, 2016). De marine oljene er naturlig rik på EPA/DHA, men disse er fraværende i vegetabiliske oljer. Imidlertid finnes det flere vegetabiliske oljer som er rik n-3 fettsyren α -linolensyre (18:3n-3) (ALA), som imidlertid ikke er spesifikk for det marine miljø. Rapsolje er den vegetabiliske oljen som er mest brukt i laksefôr, og inneholder om lag 10% ALA (Olsen, 2007). I tillegg inneholder de vegetabiliske oljene ofte mye linolsyre (18:2n-6) (LA), for eksempel inneholder rapsolje om lag 20 % LA (Olsen, 2007). Den økende bruken av disse oljekildene i laksefôret, påvirker også n-6/n-3 forholdet i oppdrettslaksen (Ytrestoyl *et al.*, 2015). Med dagens fôrsammensetning har n-6 innholdet overskredet n-3 innholdet, slik at n-6/n-3 forhold er på om lag 1 (Sissener *et al.*, 2016). Vel og merke er ALA inkludert i n-3 kategorien, slik at n-6/EPA+DHA innholdet er nesten 2 (Sissener *et al.*, 2016). Imidlertid er den absolutte mengden fett i laksemuskelen så stor, at fileten fortsatt vil inneholde en god andel av EPA+DHA. I dagens situasjon inneholder fileten av oppdrettslaks om lag 18,4 % fett, og EPA+DHA innholdet er 1,36 g pr 100 g fileten (Ytrestoyl *et al.*, 2015). Dermed er oppdrettslaksens status som en god kilde til disse fettsyrene per dags dato opprettholdt, selv om n-3/n-6 forholdet er redusert (Henriques *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2012). For øvrig kan de helsefremmende effektene man oppnår ved å spise oppdrettslaks utfordres, dersom trenden med det synkende innholdet av EPA+DHA vedvarer samtidig som n-6/n-3 forholdet stiger (Bell *et al.*, 2003). I dagens vestlige kosthold ligger n-6/n-3 forholdet på 15-17 (Simopoulos, 2002), noe som er langt over det anbefalte forholdet på 5 (Nifes, 2014).

Bruken av vegetabiler i laksefôret kan med andre ord påvirke laksens status som god kilde for helsefremmende marine fettsyrer. I tillegg er bruken av vegetabiliske råvarer

problematisk i et økologisk perspektiv, fordi det diskuteres hvor bærekraftig det er å utnytte stadig større andel planteingredienser for fiskeproduksjon. Dyrkning av planteråvarer påkrever ferskvann, gjødsel, fosfor, pesticider, landareal, og ikke minst kan planteråvarene anvendes direkte til konsum (Ytrestoyl et al., 2014).

1.6 Alternative kilder

For å få bukt med denne problematikken er det rettet fokus mot andre kilder rik på marine n-3 fettsyrer, som også forhåpentligvis vil være konkurransedyktige på pris. En potensiell løsning kan være å benytte EPA+DHA rik olje fra genmodifiserte vegetabiler. Her kan man tilføye gener i plantene som koder for de enzymer som muliggjør dannelsen av EPA og DHA (Betancor *et al.*, 2015). Lipider fra for eksempel transgen oljedodre (*Camelina Sativa*) kan inneholde over 20% EPA, og ha et redusert n-6 innhold sammenliknet med den naturlige oljedodreoljen (Betancor *et al.*, 2015). Imidlertid er genmodifisert materiale meget kontroversielt og forbudt i mange land. I tillegg løser ikke GMO-vegetabilier problematikken vedrørende vann og arealbehov.

1.6.1 Mikroalger som fôrressurs

Marine kiselalger, som er en klasse marine mikroalger, er også lansert som en mulig ingrediens i laksefôr. Algene kan erstatte hele eller deler av de konvensjonelle vegetabiliske fôringrediensene. Fôringsforsøk har vist at SFA innholdet i laksemuskelen reduseres dersom 6 % av plantemelet erstattes med mel av kiselalgen *Phaeodactylum tricornutum* (Sorensen *et al.*, 2016). Mikroalger har i en årrekke vært benyttet som fôr i ulike akvakulturformer, der de i hovedsak brukes som levendefôr til krepsdyr, mollusker eller fiskelarver i Asia (Hemaiswarya *et al.*, 2011). På årsbasis dyrkes om lag 5 millioner kg mikroalger, der om lag en femtedel av dette brukes i akvakulturfôr. Artsutvalget inkluderer flere arter kiselalger, både fra ferskvann og det marine miljø (Hemaiswarya *et al.*, 2011). Et av hovedpunktene for marine mikroalgers potensielle egnethet som fôrressurs, er at de er primærprodusentene av EPA og DHA (som i naturen videre akkumuleres i den marine næringskjeden). I tillegg inneholder mikroalgene karotenoider og vitaminer. Disse har en antioksidativ effekt, som beskytter lipidene fra oksidasjon. Dermed kan mikroalgeolje ha en forholdsvis god fettstabilitet, sett i sammenheng med tradisjonelle oljer som er rik på flerumettede fettsyrer (Patil *et al.*, 2007). Dette er fordi eventuelle antioksidanter gjerne fjernes under prosesseringen av tradisjonelle oljer. I tillegg er mikroalgelipidene innkapslet av en robust cellevegg, noe som kan ytterligere øke motstandsdyktigheten mot oksidasjon (Patil *et al.*, 2007). Det finnes imidlertid motstridende studier som antyder at mikroalgenes høye klorofyllinnhold kan ha en prooksidativ effekt

(Heath og Packer, 1968). De marine mikroalgenes naturlige evne til å syntetisere store mengder EPA og DHA, gjør at de til en aktuell og spennende lipidressurs. En potensiell utnyttelse av mikroalger som fôrressurs kan være bærekraftig, ettersom de befinner seg på lavest mulig trofisk nivå. I tillegg er de dyrkningsaktuelle, hvor de vokser effektivt og ikke krever store landarealer eller store mengder ferskvann (Mata *et al.*, 2010). I dyrkningssammenheng vil de også ha en høyere fotosyntetisk effektivitet enn terrestriske planter, og de kan dermed også dyrkes mer effektivt (Mussgnug *et al.*, 2007). Mikroalgedyrkning kan også settes i sammenheng med industri (McGinn *et al.*, 2011), der fototrofe mikroalger kan fiksere CO₂ fra avgasser til glukose i fotosyntesen. Dermed kan mikroalgene produsere etterspurte næringsstoffer i bytte mot CO₂. I tillegg kan mikroalgedyrkingen betegnes som et miljøverntiltak i industrien (Cavonius, 2016). Flere ledende fôrprodusenter har implementert mikroalger som fôringrediens i laksefôr, blant annet Skretting og Biomar (Kyst.no, 2016; Skretting, 2016).

Problemet med bruken av mikroalgeolje er algenes beskyttende cellevegg, som fungerer som et hardført skall (Cavonius *et al.*, 2014). Celleveggenes tykkelse og beskyttende evne varierer imidlertid mellom ulike arter. Dette medfører at effektiviteten til en lipidekstraksjon også varierer på bakgrunn av artene (Cavonius *et al.*, 2014). Dette i tillegg til at mikroalger er små og vanskelig å isolere. Tradisjonell oljekoking som benyttes ved pelagisk fisk og annet marint restråstoff, baserer seg på at oljen utvinnes ved sentrifugering etter proteiner har blitt denaturert med varme i forkant (Vang, 2015). Dette er ikke aktuelt ved lipidutvinning fra mikroalger, der en ekstraksjon basert på kjemikalier og/eller enzymer må påregnes (Mercer og Armenta, 2011). Dermed vil en potensiell fettekstraksjon gjerne bli dyrere sammenliknet med vegetabiliske- eller marine lipidressurser. Samtidig kan bruk av organiske løsemidler medføre en betydelig eksplosjonsfare i en storskala produksjon (Mercer og Armenta, 2011).

Mange kiselalgearter har sitt opphav i det marine miljø., og en rekke ulike kiselalger kan være interessante for utnyttelse i laksefôr. Til tross for potensialet, finnes forholdsvis få industrirettede studier på gruppen, og kun et lite utvalg kiselalgearter brukes i akvakulturfôr (Lebeau og Robert, 2003). Få analyser er også gjort på fettsyre- og lipidklassesammensetning for de aktuelle artene i denne studien (Degerlund og Eilertsen, 2010).

1.7 Mål

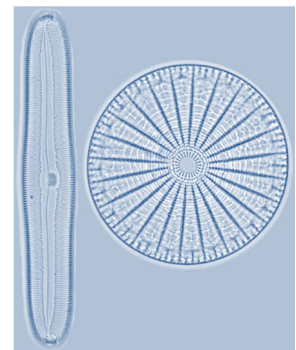
Opgavens to hovedmål var å optimalisere fett ekstraksjonsutbyttet i tre ulike kiselalger, med fokus på forbehandlingsteknikker som baserer seg på mekanisk knusing av celleveggen. Det andre hovedmålet var å karakterisere kiselalgenes fettsyre- og lipidklasseprofil. De tre ulike mikroalgene var *Chaetoceros furcellatus*, *Porosira glacialis* og *Skeletonema marinoi*.

2 Teori

2.1 Mikroalger

Begrepet mikroalger, eller fytoplankton er et vidt begrep som inkluderer enkelte cyanobakterier og andre eukaryote organismer, som marine fytoplankton (Cavonius, 2016). Mikroalgenes størrelse varierer mye basert på art, men generelt er organismene flere mikrometer og algene vokser som enkeltceller eller i mindre kolonier. Mikroalgene er definert som små organismer som enten er i stand til å gjennomføre fotosyntese direkte (fotoautotrofe), mens andre er mixotrofe, eller fotoheterotrofe og kan (i tillegg eller alene) benytte organiske forbindelser som næring (Devi *et al.*, 2012). Mikroalgene er helt sentrale for havets primærproduksjon, og en av de største gruppene innenfor marine mikroalger er diatomeer, eller kiselalger som de tradisjonelt kalles (Lebeau og Robert, 2003). Kiselalger lever i flere ulike miljøer på planeten og deres habitat sprer seg fra havet, til ferskvann, ørken og til og med skyer (Yadugiri, 2009). Kiselalgene tilhører supergruppen *Chromophyta* som inneholder et stort, men noe upresist artsregister. Artsregisteret er estimert til å inneholde 250 slekter, og 100,000 ulike kiselalgearter (Norton *et al.*, 1996). Blant disse anslagsvis 100,000 artene har 12,000 forskjellige arter vært beskrevet (Mann og Vanormelingen, 2013).

Kiselalger beskrives som autotrofe, encellede organismer der celleveggen består av silikaskall. Dette er bygd opp av to overlappende silikasjikt (Reimann *et al.*, 1965), som anses å ha en beskyttende effekt mot byttedyr (Lebeau og Robert, 2003). Kiselalgecellene varierer i størrelse fra 2 μm til 2 mm, og de finnes i to ulike fasonger: Pennate kiselalger som er bilateralt symmetriske (avlange), og sentriske kiselalger som er sirkulære (figur 6) (Medlin *et al.*, 1996). Sentriske kiselalger er i hovedsak pelagiske i de frie vannmassene, mens pennate kiselalger også finnes bunnlevende (bentisk) (Bowler *et al.*, 2008). De pennate kiselalgene har utviklet seg fra de sentriske, og er også mest tallrik (Armbrust, 2009).



Figur 6. En pennat kiselalge (til venstre), og en sentrisk kiselalge (til høyre) (Wisconsin, 2010)

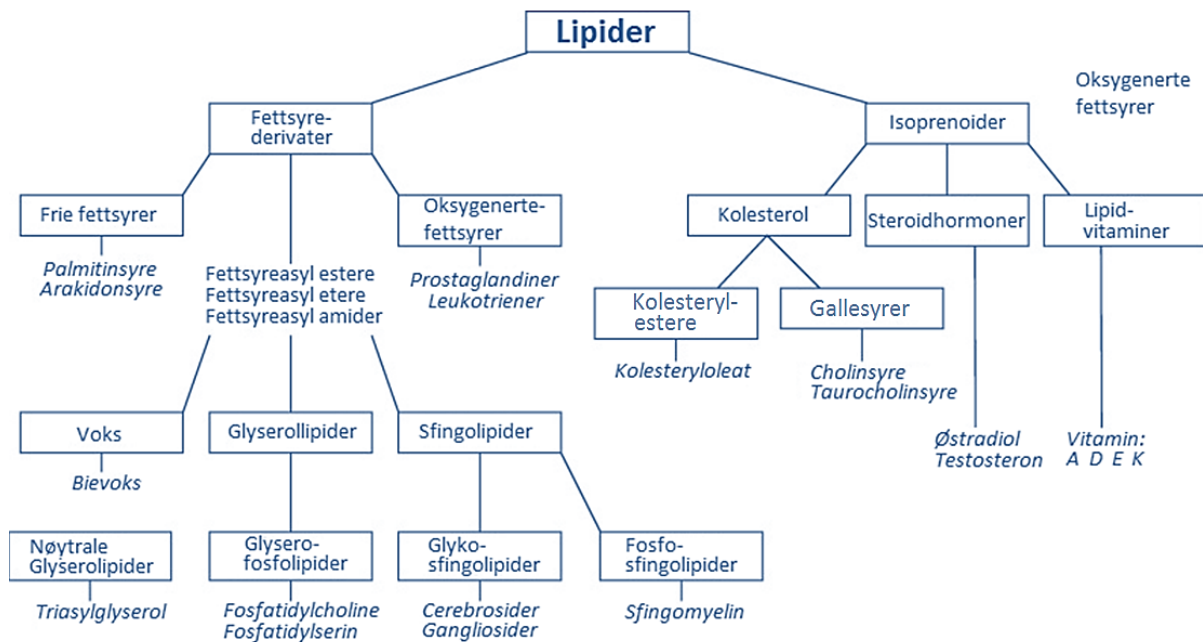
Kiselalgene er hovedsakelig voksende som frittstående enkeltceller, men flere arter vokser i mindre kolonier og henger sammen i kjeder. Algenes vekst betinges av tilgjengeligheten på lys, uorganiske næringsstoffer som (nitrogen, fosfor, og silisium), løst CO₂ samt spormetaller som jern, magnesium og zink (De Baar, 1994). De arktiske mikroalgenes hovedkilde til nitrogen er nitrat, og nitrogenet er ofte det begrensende næringsstoffet for oppblomstringen av kiselalger og andre mikroalger (Kristiansen og Farbrot, 1991). I områder med klare årlige sesongoppblomstringer (som i den subarktiske sonen) skjer algeveksten under den karakteristiske våroppblomstringen. Algeoppblomstringen i disse områdene initieres av en økning i lysmengde på vårparten, samt god tilgjengelighet på regenererte næringsstoffer fra vinterhalvåret. Økt lysintensitet og daglengde optimaliserer også betingelsene for fotosyntese og dermed også algenes livsbetingelser (Falciatore og Bowler, 2002).

Kiselalger og andre mikroalger har en enestående og helt sentral økologisk rolle. Marine mikroalger står for en fraksjon av verdens plantebiomasse, men som primærprodusenter binder de opp omlag 50 % av verdens CO₂, og omdanner dette til karbonholdige næringsstoffer (Field *et al.*, 1998). Kiselalgene står alene for om lag 25% av planetens primærproduksjon (Lebeau og Robert, 2003) og sammen med andre eukaryote fytoplankton er kiselalgene kilden til om lag 40% av primærproduksjonen i havet (Falkowski *et al.*, 1998). Mikroalgene er derfor helt avgjørende for livet i havet (Legendre, 1990).

2.2 Lipider

Lipider er en heterogen gruppe makromolekyler som karakteriseres ved sine hydrofobe karaktertrekk og lipidgruppen omfatter et stort antall forbindelser på bakgrunn av deres løselighetsegenskaper (Figur 7) (Fuchs *et al.*, 2011).

Det finnes flere måter å inndele de forskjellige lipidene på. En av de mest egnede måtene er å dele de inn etter funksjoner lipidene har i organismen; depotfett, membranlipider og lipider med spesifikke biologiske funksjoner (Olsen, 2007).



Figur 7. Oversikt over forbindelser som sammenføres i lipidbegrepet (Fuchs et al., 2011)

Der er også mulig å skille mellom enkle og komplekse lipider. Enkle lipider danner to produkter når lipidet hydrolyseres (Fahy *et al.*, 2005). Denne gruppen inkluderer (tri-, di-, og mono) acylglyseroler, steroler, sterylestere, uforestret fett (frie fettsyrer) og voksesterer.

Acylglyserolene inneholder en til tre fettsyrer forestret til den treverdige alkoholen glyserol. I triacylglyserolene (TAG) kan alle fettsyrene være forskjellig, to kan være like eller alle tre kan være like. Formen TAG finnes vanligvis som tettpakket opplagsnæring (depotfett) i dyr, plantefrø eller fisk. Acylglyseroler finnes også som intracellulære energilagre slik som hos mikroalger, der de er pakket i dråper inni cytoplasma (Berge *et al.*, 1995).

Frie fettsyrer (FFA) er enkle fettsyrer ubundet til andre molekyler. Frie fettsyrer dannes når for eksempel lipaser har spaltet fettsyrer av fra andre molekyler (Eks TAG eller PL). Konsentrasjonen av FFA er lav i fotosyntetiske celler. Årsaken er at FFA har en hemmende effekt på elektronoverføringen, samt at de er utsatt for oksidasjon. Oksidasjonsproduktene er også skadelig for cellene. Dermed er det en nødvendighet at konsentrasjonen av frie fettsyrer holdes til et minimum mikroalger (Berge *et al.*, 1995).

Steroler er molekyler bygd opp av karakteristiske ringstrukturer med hydroksylmolekyler som sidegrupper. I dyreriket er kolesterol det viktigste sterole. Kolesterol er en viktig strukturkomponent i blant annet membraner. Kolesterol gir cellene både formfasthet og fleksibilitet, noe som fjerner behovet for en cellevegg. Kolesterol fungerer også som en forløper til vitamin D, gallesalter og en rekke hormoner. Planter inneholder små konsentrasjoner kolesterol i membraner og overflatelipider (Behrman og

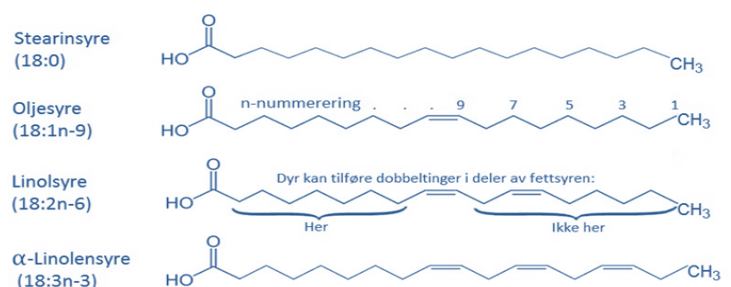
Gopalan, 2005). I kiselalger finner man steroler som strukturkomponenter i celleveggene, samt som viktige signalmolekyler (Ponomareako *et al.*, 2004). Hvis en av sterolenes hydroksylerte sidegrupper forestres til en fettsyre, omtales stereolet som sterylester.

De komplekse lipidene kategoriseres ved at det dannes tre- eller flere produkter når lipidene hydrolyseres (Fahy *et al.*, 2005). De komplekse lipidene er videre delt inn i to hovedklasser: Lipider med et sfingosinskjelett (kalt sfingolipider), og lipider med et glyserolskjelett (omtalt som glyserollipider). Innad er disse lipidgruppene videre definert på bakgrunn av strukturen på lipidets polare hode: Fosfolipider eller fosfolipider (PL) har en hodegruppe bestående av fosfat bundet til en alkohol, mens glykolipider har en hodegruppe av et suktermolekyl (Fahy *et al.*, 2005). Fosfolipidene inngår normalt som strukturkomponenter i cellemembran og cellevegg. De er vanlige i både animalske og vegetabiliske organismer. I kiselalger finnes særlig fosfolipidene fosfatidyletanolamin (PE) og fosfatidylcholin (PC) i celleveggen (Berge *et al.*, 1995). Glykolipider (GL) er karakteristisk i kiselalger, hvor de detekteres intracellulært i de fotosyntetiske membranene (kloroplastmembranene), sammen med fosfatidylglyserol (PG) (Berge *et al.*, 1995)

De enkle lipidene omtales også som nøytrale lipider, mens de komplekse lipidene også er omtalt som polare lipider (Cavonius, 2016). De minst polare lipidene (slik som hydrokarboner, voksester, sterolester, acyl-ester og TAG) er mye mindre polar enn de mest polare lipidene (fosfo-, glyko-, og sfingolipidene). Sammensetningen av lipider på bakgrunn av polaritet, kan blant annet studeres ved tynnsjikt-kromatografi (Fuchs *et al.*, 2011).

Fettsyrer (figur 8) består av en hydrofil karboksylgruppe som er bundet til en hydrofob hale (hydrokarbonkjede). I hovedsak er de naturlige fettsyrene rettkjedete der hydrokarbonkjeden inneholder et partall med karbonatomer, normalt mellom 12- og 22. Årsaken til partallet i halen er lipogenesis, hvor fettsyre-syntasene elongerer fettsyrene med to-og-to karboner som hentes fra koenzymet acetyl-CoA (Olsen, 2007).

Fettsyrene grupperes ved graden av umettethet, der fettsyrene kan deles inn i tre grupper basert på antall dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden.

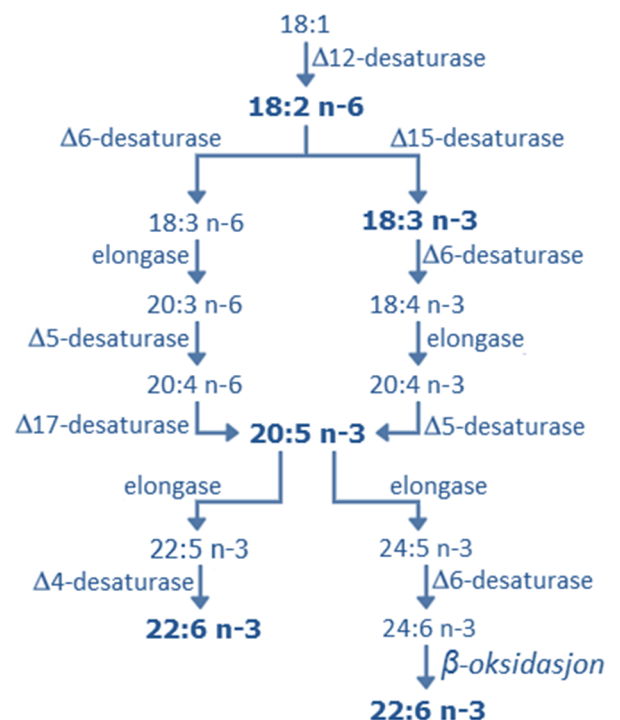


Figur 8. Navn, strukturformel, og strukturell oppbygning av en mettet-, enumettet-, og to flerumettete fettsyrene. Stearinsyre inngår i syntesen av de essensielle fettsyrene linolsyre (LA) og α-linolensyre (ALA). Modifisert fra (FAO, 1994).

Disse grupperingene er mettede-, enumettede-, og flerumettede fettsyrer. Mettede fettsyrer (SFA) er helt foruten dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. Enumettede fettsyrer (MUFA) har én dobbeltbinding i hydrokarbonkjeden, mens det er to eller flere dobbeltbindinger flerumettede fettsyrers hydrokarbonkjede. De flerumettede fettsyrene kan ytterligere kategoriseres etter antall dobbeltbindinger. Flerumettede fettsyrer (PUFA; Polyunsaturated fatty acids) har to til tre dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden, mens høyt flerumettede fettsyrer (HUFA; highly unsaturated fatty acids) har mellom fire og seks (Olsen, 2007). Det er i HUFA-kategorien man finner de marine fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA).

Fettsyrenes formel viser lengden av hydrokarbonkjeden (antallet karbonatomer) samt graden av umettethet (antallet dobbeltbindinger) i kjeden. I tillegg er det normalt å legge til hvor første dobbeltbinding befinner seg fra metylenden (CH_3) på hydrokarbonkjeden (figur 8). Finnes dobbeltbindingen ved karbon nummer 3, bakover fra metylenden har man en omega-3 fettsyre (n-3 fettsyre). Dermed vil DHA ha formelen $22:6n-3$ eller $22:6(\omega-3)$

For dyr og mennesker er linolsyre (LA; $18:2n-6$) og α -linolensyre (ALA; $18:3n-3$) de ernæringsmessig essensielle fettsyrene. Bare planter, inkludert fytoplankton, har enzymer som kan omdanne oljesyre ($18:1 n-9$) til linolsyre ($18:2: n-6$) og videre til α -linolensyre (ALA; $18:3n-3$). Enzymene heter henholdsvis $\Delta 12$ -desaturase og $\Delta 15$ -desaturase (figur 9). EPA og DHA er biologisk essensielle for dyr og mennesker. Dette innebærer at de til en viss grad kan syntetiseres av kroppens enzymer fra ALA. Denne prosessen er ineffektiv i dyr og mennesker, slik at den syntetiserte mengden er liten, men tilstrekkelig nok til å dekke de mest basale behovene. Mikroalgene er primærprodusenten av EPA og DHA (Legendre, 1990), der disse fettsyrene akkumuleres videre i den marine næringskjeden. Årsaken til den ineffektive syntetiseringen av EPA og DHA fra ALA i dyr



Figur 9. Enzymatisk syntetisering av fettsyrer i mikroalger. Mikroalger kan i motsetning til dyr danne $20:5n-3$ fra $20:4 n-6$. Dyr er i stand til å danne EPA og DHA (fra ALA) slikt høyre side av figuren fremviser. Mikroalger danner kun DHA (fra EPA) slik det er fremvist til venstre i figuren (utarbeidet med utgangspunkt fra Guschina og Harwood, 2006)

og mennesker, er at enzymet $\Delta 6$ -desaturase er et begrensende enzym. Dette enzymet er nødvendig for å omdanne ALA til stearidonsyre (SDA; 18:4n-3) og for å omdanne LA til gamma-linolensyre (GLA; 18:3n-6) (figur 9). I tillegg til at aktiviteten til $\Delta 6$ -desaturase er begrenset i dyr, kan omdannelsen til SDA bli ytterligere begrenset hvis n-6/n-3 forholdet er høyt. Årsaken til dette er at $\Delta 6$ -desaturase har høyere affinitet for n-6 fettsyrene og dermed prioriteres omdanningen av LA til GLA (Coupland, 2008). GLA syntetiseres også videre til arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) (Olsen, 2007), som opphavet for videre dannelse av n-6 eikosanoider. I mikroalger er dette uproblematisk, fordi mikroalgene benytter enzymet $\Delta 17$ -desaturase i dannelsen av EPA fra arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) (figur 9). I mikroalger er syntesevegen via n-6 fettsyrene mest effektiv ved fremstillingen av EPA (Guschina og Harwood, 2006). Det er verdt å merke seg at omdannelsen av SDA til EPA er forholdsvis effektiv i dyr (Coupland, 2008).

2.3 Omega-3 fettsyrer og helseeffekter

I løpet av de siste tiårene har konsumentene blitt mer bevisst på samspillet mellom personlig helse og sunn mat. Forskning har nemlig vist at et høyt inntak av fettsyrene EPA, dokosapentaensyre (DPA) og DHA har helsefremmende effekter. Blant annet vil et høyt inntak av EPA, DPA og DHA gi en større innlemmelse av disse fettsyrene i blodlipider, celler og vev. Et høyt innhold av EPA, DPA og DHA kan også påvirke cellemembraners struktur samt membranproteinenes funksjon som signalprotein, reseptorer og enzymer. Dette gjør at EPA og DHA optimaliserer den cellulære responsen som igjen resulterer i optimaliserte vekst-, utviklings- og helseforhold (Calder, 2014). I tillegg reduseres risikoen for hjerte- og karsykdommer ved høyt inntak av EPA og DHA. Årsaken til den reduserte risikoen for hjerte- og karsykdommer er at en rekke risikofaktorer slik som blodtrykk, trombosedannelse, blodplatene, plasmaets triacylglyserolkonsentrasjon, vaskulær funksjon, hjerterytmier og hjertefrekvensvariabilitet og betennelsesreaksjoner, påvirkes positivt ved høyt inntak av EPA og DHA (Calder, 2014).

En av årsakene til disse positive effektene er at EPA og DHA omdannes til gunstige fettsyrehormoner (eikosanoider) som demper betennelsesreaksjoner i kroppen. Fettsyrehormoner omdannes riktignok også fra n-6 HUFA (ARA; 20:4n-6). Disse vil imidlertid være betennelsesfremmede (Adkins og Kelley, 2010). Forskning viser at et samlet daglig inntak på et halvt gram av EPA og DHA vil kunne redusere risikoen for hjerte- og karsykdommer betydelig (Harris *et al.*, 2009). Et høyt daglig inntak av EPA og DHA har også positiv innvirkning mot flere sykdommer som leddgikt, inflammatorisk tarmsykdom og andre

betennelsessykdommer som astma og psoriasis (Calder, 2014), men forskningsresultatene er ikke helt entydige innen dette feltet. DHA er også viktig for utviklingen av hjernen og øyet, derfor anbefales gravide og ammende å innta nok EPA og DHA (Calder, 2014). Det hevdes også at et høyt innhold av EPA, DPA og DHA har en korrelasjon til redusert risiko for flere psykiske lidelser som depresjon (Grosso *et al.*, 2014). Tidligere var anbefalinger fra nasjonale og internasjonale helsemyndigheter spesifikt rettet mot inntak av EPA og DHA, på bakgrunn av de helsefremmende effektene fra disse fettsyrene. En oversiktsartikkel av Mæhre *et al.*, (2015) viser imidlertid at helsemyndigheter og helseorganisasjoner har korrigert rådene mot et inntak av sjømat generelt (tabell 1). Dette er fordi et isolert inntak av høyraffinert og konsentrert HUFA kan føre til økt peroksidativt stress på fettsyrene, der metabolitter fra oksiderte fettsyrer også kan ha skadelig effekt i kroppen (Mæhre *et al.*, 2015). En annen faktor for rådomleggingen mot økt sjømatkonsum, er sjømatens innhold av andre helsefremmende næringsstoffer. I tillegg synes opptaket av EPA+DHA å være høyere fra fisk enn fra kosttilskudd og de øvrige komponentene i sjømaten gir sannsynligvis positive synergieffekter sammen med EPA og DHA (Mæhre *et al.*, 2015). Dermed bør et isolert inntak av EPA+DHA inntas som et supplement, og ikke som en erstatning for sjømat.

Tabell 1. Oversikt over anbefalt daglig inntak av fisk og marine n3-fettsyrer (modifisert fra Mæhre *et al.*, (2015))

Myndighet/ Organisasjon	Land/Region	År	Anbefaling
AHA	USA	2015	Spis (helst feit) fisk minimum to ganger i uken
Helsedirektoratet/ VKM	Norge	2014	Spis fisk som middag, minimum 2-3 ganger i uken
FAO/ WHO	Verden	2011	Spis minimum 1-2 serveringer på 100g fisk i uken
EFSA	Europa	2010	Innta en daglig dosering på 250 mg EPA+DHA
SACN	Storbritannia	2004	Innta en daglig dosering på 450 mg EPA+DHA
ISSFAL	Storbritannia/Euro	2004	Innta en daglig dosering på 500 mg EPA+DHA

pa

Forkortelser: AHA, The American Heart Association. VKM, Vitenskapskommitten for mattrygghet. FAO, Food and Agricultural Organization of the United Nations. WHO, Verdens helseorganisasjon. EFSA, European Food Safety Association. SACN, Scientific Advisory Committee for Nutrition. ISSFAL, International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Råstoff

3.1.1.1 Mikroalger

De tre artene som inngikk i studien er vanlige i arktiske- og subarktiske havområder. To av artene var omfavnet av kategorien nanoplankton (0-20 μm). Disse er *S. marinoi* og *C. furcellatus*, mens *P. glacialis* var i kategorien mikroplankton (20-200 μm) (Sierburth *et al.*, 1978). For øvrig var alle algeartene i oppgaven sentriske kiselalger, men ikke i samme monofyletiske gruppe. Imidlertid er *Skeletonema* og *Chaetoceros* i samme fylogenetiske gruppe, slik at *S. marinoi* og *C. furcellatus* er monofyletisk beslektet (Huseby *et al.*, 2013). Kiselalgene som ble undersøkt i denne studien, ble skaffet til veie av professor Hans Christian Eilertsen og hans forskningsgruppe.

Dyrkningsvilkår

Chaetoceros furcellatus identifikasjonsnummer 61, ble dyrket i en 600-liters søyle av plexiglass, ved Norges fiskerihøgskole. Vanntemperaturen var 7 °C. Høstningstidspunkt er imidlertid ukjent. *C. Furcellatus* ble mottatt dypfrost 4/01.2016.

Porosira glacialis (napisnummer: 12665012, 12665014, 12665015, og 12665016) ble dyrket i Finnfjord, der alle variantene er av samme kultur. Forskjellen mellom de ulike variantene er høstningstidspunktet, med stigende klorofylltetthet i kulturen. Napisnummer 12665012 ble høstet 06.06.2015. Napisnummer 12665014 ble høstet 12.06.2015, napasnummer 12665015 ble høstet 13.06.2015, mens napasnummer 12665016 ble høstet 14.06.2015. Temperaturforholdene under dyrkningen var 5-7 °C.

Skeletonema marinoi var dyrket i Finnfjord, temperaturen var 12 °C. Ukjent høstningstidspunkt. Mottatt frysetørket 13.05.2016.

3.1.1.2 Øvrig råstoff

Trana var kjøpt av sjømatgruppen ved Norges fiskerihøgskole, høsten 2015. Trana var av merket Möllers, og utløpsdatoen var 04.2016. Trana var lagret i kjøleskap ved ca 3 °C.

Brunalgen sauetang (*Pelvetia Canaculata*) var mottatt i oppmalt og frysetørket form. Dette materiale var høstet i 2010, ved 69° nord, 18° øst (Brentsholmen, Kvaløya, Troms). Materialet var oppbevart mørkt og tørt i romtemperatur.

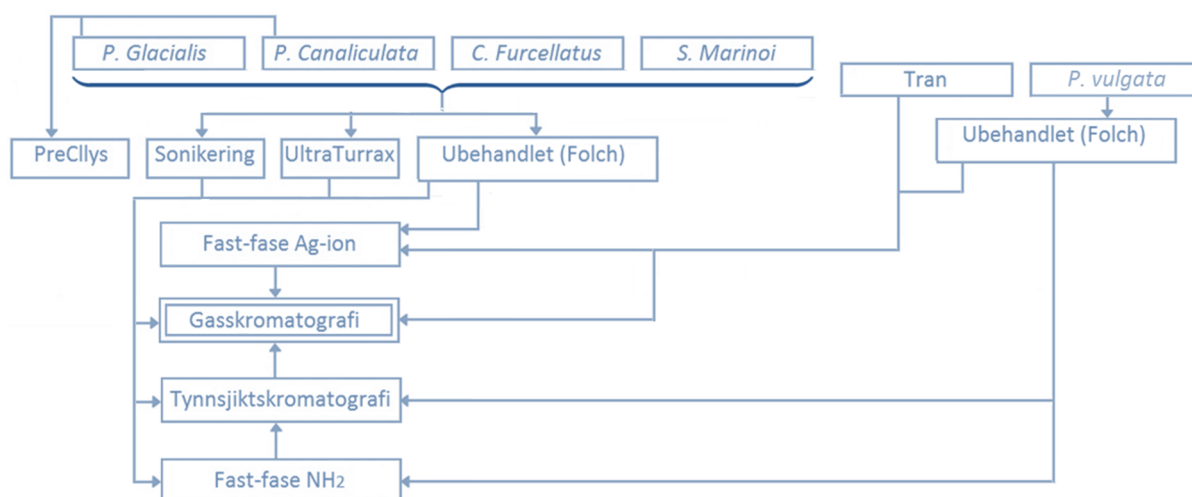
Albuene (*Patella vulgata*). Høstet vinteren 2013 ved 68° nord, 13° øst (Haug, Lofoten, Nordland). Kookt og ferskt materiale var frysetørket og oppbevart mørkt og tørt, i romtemperatur.

3.1.2 Kjemikalier

Samtlige kjemikalier var av p.a kvalitet, og levert av Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, dersom annet ikke er oppgitt: Diklormetan, metanol, heptan, svovelsyre, natriumklorid, isooktan, isopropanol, dietyleter, eddiksyre, natriumacetat, aceton, acetonitril, koppersulfat og fosforsyre.

3.2 Oppbygning av oppgaven

Oppgaven var delt i tre hoveddeler; ekstraksjon med ulike forbehandlingsteknikker, bestemmelse av fettsyresammensetning og bestemmelse av lipidklasser samt fettsyresammensetning i disse. I tillegg ble metodeutvikling svært sentralt i denne oppgaven, spesielt med henblikk på fast-fase separasjon på bakgrunn av lipidklasser. Figur 10 viser hvilke råstoff som inngikk i de ulike metodene ved det praktiske arbeidet. På grunn av meget begrenset tilgjengelig mengde av de undersøkte mikroalgene ble det dessverre ikke gjennomførbart å sammenligne Folch's metode med andre lipidekstraksjonsmetoder med andre kjemiske ekstraksjonsprotokoller, til tross for at dette opprinnelig var planlagt.



Figur 10. Oppbygningen av oppgaven. *P. canaliculata* og enkelte varianter av *P. glacialis* var eneste råstoff behandlet med Precellys. Tran var kun analysert ved Ag+-SPE fraksjonering og gasskromatografi. *P. vulgata* ble analysert ved begge SPE-variantene samt tynnsjikt-kromatografi. Forbehandlingsmetoder ble ikke forsøkt på *P. vulgata*. Råstoffet som går via Precellys, Sonikering, og UltraTurrax er forbehandling før Folch's metode.

3.3 Metoder

3.3.1 Frysetørking

Råstoff av *C. furcellatus* var motatt i dypryst form. Dette ble videre frysetørket i en Genesis 35EL (VirTis, Gardiner, NY, USA) frysetørker under vakuum. Vannet ble fordampet i løpet av 3 døgn, og råstoffet ble videre lagret mørkt og tørt i romtemperatur.

3.3.2 Fettekstraksjon

Folchs metode (1957) ble benyttet, men kloroform ble erstattet av diklormetan for helse- og sikkerhetsårsaker. 50-200 milligram frysetørket råstoff ble løst i teflonrør med 20 ml diklormetan:metanol (2:1 DCM:MeOH). Prøvene ble plassert i en ristemaskin (Multi Reax, Heidolph Instruments, GmbH & Co, Schwabach, Tyskland) og ristet i 20 minutter. Prøvene ble så sentrifugert ved 2000g i 10 minutter ved 4° C (Sentrifuge av type Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland). Etter sentrifugeringen ble all væske overført ved hjelp av glasspipette til nye teflonrør, slik at fast råstoff ble unnlatt. Videre ble 4 ml 0,9% NaCl i destillert vann tilsatt teflonrørene, før rørene ble ristet for hånd og igjen sentrifugert med samme betingelser. Etter sentrifugeringen ble den upolare fasen (øverste fase i teflonrørene) pipettert ut, mens den polare fasen ble overført til en rundkolbe. Rundkolben ble så satt i en rotavapor (IKA RV10 Control, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland) under 100 millibars trykk, samtidig som kolben roterte i vannbad på 33 °C slik at resterende kjemikalier dampet vekk. Videre ble 3 ml 2:1 DCM:MeOH tilsatt rundkolbene og overført til tarerte glassampuller. Ampullene ble så satt til tørking under en strøm av nitrogengass for å dampe vekk kjemikaliene. Det resterende innholdet i ampullene var lipider og mengden lipider ble beregnet via formelen:

$$\% \text{ Fett} = \frac{\text{Ampullvekt med innhold} - \text{Ampullvekt}(tom)}{\text{Råstoff vekt (g prøve)}} * 100\%$$

Til slutt ble innholdet løst til 10mg/ml 2:1 DCM:MeOH.

3.3.2.1 Forbehandling: Mekanisk celleruptur, UltraTurrax

50-200 milligram prøve ble løst i 5ml 2:1 DCM:MeOH, før løsningen ble behandlet i UltraTurrax (av typen T25 Basic), levert av Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland. Behandlingstiden var 30 sekunder under 24.000 rpm. Etterpå ble de resterende 15ml med 2:1 DCM:MeOH tilført prøvene, der prøvene så inngikk som normalt i metoden beskrevet i kapittel 3.3.2.

3.3.2.2 *Forbehandling: Celleruptur ved ultralyd, sonikering*

Etter at prøvene ble ristet 20 minutter i ristemaskin, ble prøvene plassert i et ultralydbad av typen Ultrasonic cleaner, modellnummer 3210E-MTH, produsert av Branson Ultrasonics corporation, Danbury, USA. Prøvene ble her sonikert i 60 minutter ved 37 °C. Videre inngikk prøvene i metoden som beskrevet i kapittel 3.3.2.

3.3.2.3 *Forbehandling: Mekanisk celleruptur med glasstein, Precellys*

100-200 milligram *P. Glacialis* og *P. Canaliculata* ble løst i 5ml 2:1 DCM:MeOH. Videre ble prøvene homogenisert i 20 minutter, før innholdet ble jevnt fordelt i 6 møllerør. Rørene ble plassert i en PreClylys vev-homogeniserer type 24, levert av Bertin Technologies, Bretonneux, Frankrike. Behandlingen foregikk ved 3 intervaller på 15 sekunder ved 5900 rpm. Behandlingen hadde 15 sekunders pause mellom intervallene. Videre ble resterende mengde DCM:MeOH tilsatt prøvene, slik at total mengde 2:1 DCM:MeOH ble 20ml. Videre inngikk prøvene i protokollen beskrevet i kapittel 3.3.2.

3.3.3 Hydrolyse og metylering for bestemmelse av fettsyresammensetning

Metoden beskrevet av Stoffel et al., (1959) ble gjennomført med enkle modifikasjoner. 100µl prøve (lipidløsning løst til 10mg/ml i 2:1 DCM:MeOH) ble løst i 0,9ml diklormetan og 2ml 2% H₂SO₄. Løsningen ble varmebehandlet ved 100 °C i en time, slik at lipidene ble metylert. Videre ble 3,5ml heptan og 3,5 ml 5% NaCl tilsatt prøvene, før de ble godt ristet i en VWR 1719(EU) 50Hz ristemaskin (ved 2400 rpm). Den øverste fasen (heptan/lipidfase) ble så tatt ut og dampet til tørrhet med nitrogengass. Videre ble prøvene løst i 100 µl heptan før prøvene ble overført til analyserør og klargjort for gasskromatografi (FID).

3.3.4 Bestemmelse av fettsyresammensetning i gasskromatograf (FID)

Fettsyresammensetningen ble analysert i en Agilent 6890N gasskromatograf, levert av Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. Gasskromatografen var utstyrt med en 7683 auto-injektor og en flammeionisasjonsdetektor (FID). Kapillærkollonnen var av type Varian CP7419 (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal), som var levert av Varian Ing., Middelburg, Nederland. Helium ble benyttet som bæregass i separasjonen.

Fettsyrene ble identifisert og bestemt via retensjonstiden til seks skjente standarder. Disse var: Pufa1,- PUFA2,- og PUFA 3 levert av Supleco Analytical, Bellefonte, PA, USA. Samt GLC80, GLC411, og GLC546 fra Nu-Check Prep, Inc., Elysan, MN, USA.

3.4 Fast-fase separasjon

3.4.1 Separasjon på bakgrunn av fettsyrers grad av mettetet

Metoden ble utviklet på bakgrunn av Christie (2011). Kolonnene som ble benyttet var 6ml SPE-kolonne av type Supleco Discovery AG-ION, der kolonnene inneholdt 750 mg sølv- ioner som bindingsmiddel. 1 ml (1mg/ml metylestere løst i DCM) lipidprøve ble satt på en pre-kondisjonert kolonne (kondisjonert i en fast rekkefølge med 6 ml Acetonitril (AcNi), 6 ml Aceton (ACT) og 12 ml DCM). Prøvene ble via kolonnen vasket til 7 ulike fraksjoner, bestående av løsemidler med ulik polaritet i en bestemt rekkefølge (tabell 2). Alle fraksjoner ble samlet opp, og dampet til tørrhet med nitrogengass. Videre ble de tørre fraksjonene løst i 100 µl heptan og overført til analyserør, før de ble analysert i gaskromatograf (FID).

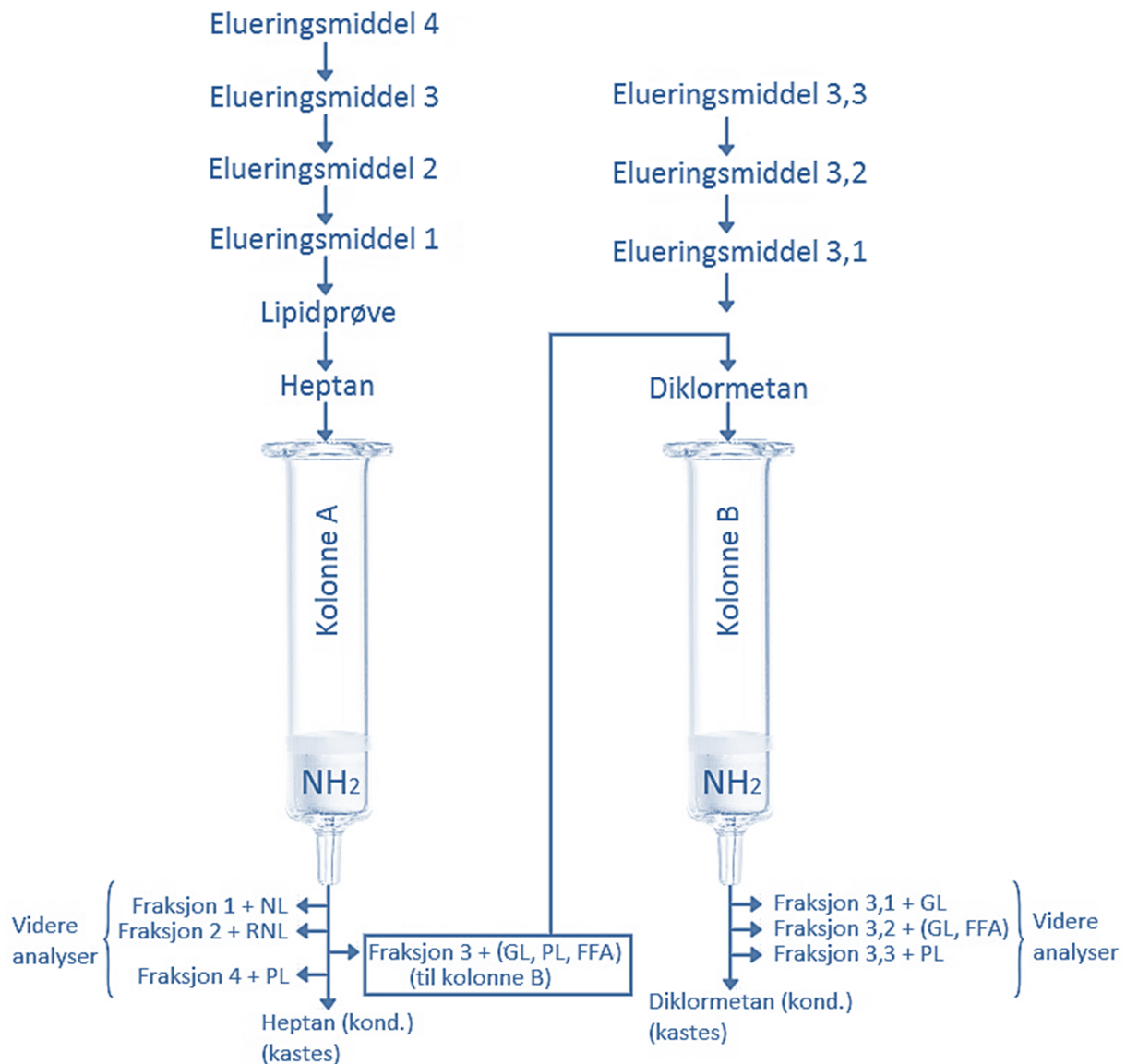
Tabell 2. Fraksjoner, løsninger og volum benyttet i Ag-ion separering

Fraksjon	Elueringsmiddel	Volum (ml)	Fettsyrer eluert
Fraksjon 1	DCM	6 ml	SFA
Fraksjon 2	ACT	6 ml	Monoener
Fraksjon 3	DCM:ACT (90:10)	6 ml	Diener
Fraksjon 4	ACT:AcNi (98:2)	7 ml	Triener
Fraksjon 5	ACT:AcNi (96:4)	7 ml	Tetraener
Fraksjon 6	ACT:AcNi (95:5/94:6)	7 ml/6 ml	Pentaener
Fraksjon 7	ACT:AcNi (88:12/60:40)	6 ml	Heksaener

3.4.2 Fast-fase separasjon på bakgrunn av fettklasser

Metoden er utviklet med bakgrunn i Dybvik et al., (2008) samt Vaghela og Kilara (1995). 200 µl lipidprøve (løst til 5 mg/ml i diklormetan) ble tilsatt i en 6 ml SPE Bond-elut kolonne (Agilent Technologies, USA). Separasjonen ble gjennomført i en Visiprep vakuum manifold (Supelco, Bellafonte, PA, USA). Kolonnens bindemiddel besto av 1 gram aminopropyl. Bindemiddelet i kolonnen bandt opp lipidene, hvor elueringsmiddel med trinnvis stigende polaritet ble tilført (tabell 3). Dette medførte at nøytralt fett ble vasket ut først (og samlet opp), hvor lipider med stigende polaritet etter hvert ble vasket ut (og samlet opp). For at separasjonen skulle være tilstrekkelig ble to kolonner per prøve brukt. Fra den første kolonnen (kolonne A, kondisjonert med heptan) ble fire ulike elueringsmidler satt på og fraksjonen samlet opp. Fraksjon nummer tre ble tørket under nitrogengass, løst i 200 µl DCM og satt på

ny kolonne (kolonne B) som var kondisjonert med 6 ml DCM (figur 10). Videre ble disse lipidene løst ut med elueringsmiddel 3,1-3,3. Til slutt ble alle fraksjonene tørket under nitrogen og videre løst til ca 10 mg/ml i DCM og applisert på en HP-TLC plate for tynnsjiktskromatografi. Resterende lipider ble nitrogentørket, løst opp til 10 mg/ml i 2:1 DCM:MeOH og metylert for fettsyreidentifikasjon ved gaskromatografi.



Figur 11. Fremgangsmåte ved fast-fase separasjon på bakgrunn av fettklasser. NL= nøytrale lipider, RNL= resterende/relativt nøytrale lipider (slik som kolesterol og DAG), PL = fosfolipider, GL= Glykolipider, FFA= Frie fettsyrer.

Fraksjonene og elueringsmidlene som vises i figur 11 er nærmere beskrevet i tabell 3.

Tabell 3. Fraksjoner, løsninger og volum benyttet i SPE-separering ved isolering av fettklasser (NH₂)
NL= Nøytrale lipider, RNL= resterende/relativt nøytrale lipider, FFA= frie fettsyrer, GL= glykolipider,
PE= fosfatidyletanol, PG= fosfatidylglyserol, PC= fosfatidylcholine.

Fraksjon	Elueringsmiddel	Volum (ml)	Lipidklasser eluert
Fraksjon 1	DCM:Isooktan 1:1	6 ml	NL
Fraksjon 2	DCM:Isooktan 3:1	6 ml	RNL, GL
Fraksjon 3	DCM:Isopropanol 4:1	6 ml	RNL, FFA, GL, PE, PG
Fraksjon 4	MeOH + 0,05m NaAcetat	6 ml	PC
Fraksjon 3,1	DCM	6 ml	GL, FFA
Fraksjon 3,2	Dietyleter:Eddiksyre 98:2	9 ml	GL, FFA (PG)
Fraksjon 3,2	MeOH	6 ml	PE, FFA

Til slutt ble alle oppsamlingsampullene med innhold tørket med nitrogen, blandet ut i 50 µl DCM, før 2 µl ble applisert på HP-TLC plater for tynnsjiktskromatografi.

3.5 Tynnsjiktskromatografi

Lipidklassene i materialet ble undersøkt med tynnsjiktskromatografi (Fuchs *et al.*, 2011). Lipidprøver av ble oppløst i DCM til det fikk en konsentrasjon på 10 mg/ml. Et elueringskar ble tilsatt 10 ml elueringsvæske (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:2). Silikabelgate HP-TLC (Merck, Darmstadt, Tyskland) plater ble så markert med blyant hvor prøvene og standardene skulle avsettes, ca 1cm fra platens bunn. 2 µl av hver lipidprøve ble så applisert på platen. Platen ble så plassert oppreist i et elueringskammer hvor det virket til elueringsvæsken hadde trukket opp slik at bare den øverste centimeteren av platen var tørr. Platen ble så tatt ut av kammeret for tørking, før den ble sprayet med kobberløsning (10% kopparsulfat og 8% fosforsyre i destillert vann). Platen ble så plassert i et varmeskap som holdt ca 85°C, der platene ble varmet opp til 180°C. Dette for fremkalling av lipidflekkene på platen. Lipidklassestandardene for identifikasjon av var: Glyserider, levert av Supleco Analytical, Bellefonte, PA, USA. Denne inneholdt FFA, TAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG og MAG (disse inneholdt oljesyre. (5mg/ml). Lipidstandard 16:1A av Nu-Check Prep, Inc., Elysan, MN, USA ble også applisert. Denne inneholdt PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol 1,3 DAG, TAG, Voks- og kolesterylester (disse inneholdt palmitinsyre) 20mg/ml.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Lipidinnhold

Tabell 4. fettprosent i prøver

N=5	<i>P. glacialis</i>				<i>C. furcellatus</i>		<i>S. marinoi</i>	<i>P. canaliculata</i>
ID	12662012	12662014	12662015	12662016	61A	61B	-	-
Behandling	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ubehandlet	8,6 ± 0,8	11,1 ± 0,5	13,1 ± 0,6	14,8 ± 0,7*	17,4 ± 0,5*	13,3 ± 0,5*	6,8 ± 0,3*	3,3 ± 0,3
UltraTurrax	10,5 ± 0,6	12,4 ± 0,8	14,7 ± 0,6	15,4 ± 0,5*	18,6 ± 0,6*	13,9 ± 0,5*	7,4 ± 0,6*	5,1 ± 0,4
Sonikering	11,3 ± 0,5	13,3 ± 0,7	15,1 ± 0,3	15,7 ± 0,4*	19,4 ± 0,4*	15,8 ± 0,3*	8,1 ± 0,5*	3,5 ± 0,3
PreCllys	8,8 ± 1,1	-	13,7 ± 1,3	-	-	-	-	3,9 ± 0,9

*) n=3
 61A 200 mg prøve
 61B 60 mg prøve
 -) ingen data

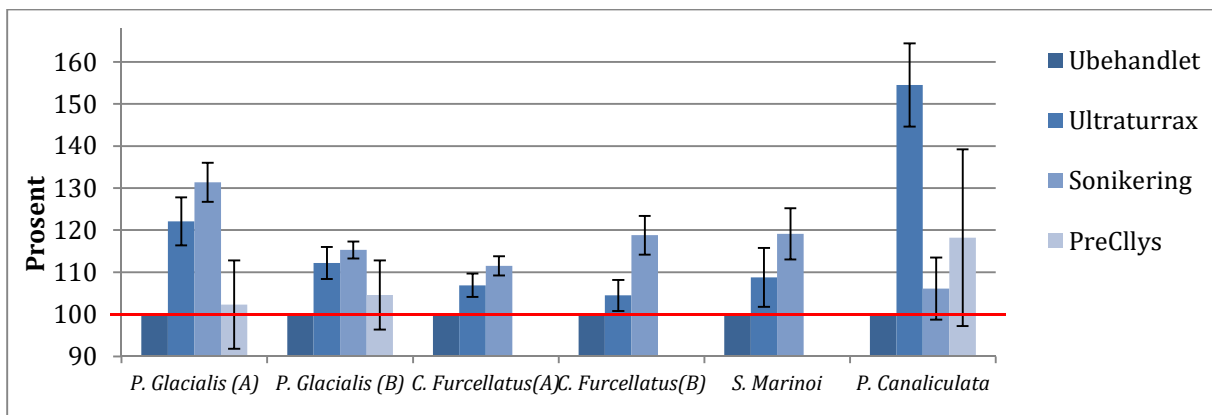
Som vist i tabell 4 og figur 12, hadde de ulike forbehandlingsteknikkene en positiv effekt på fettutbyttet i samtlige råstoffvarianter. For alle kiselalgeartene var forbehandling i ultralydsbad (sonikering) mest effektivt. Imidlertid hadde også UltraTurrax en god effekt på mikroalgeartene, der enkelte paralleller var vel så god som sonikering. Dette vises ved at standardavviket kan overlape hverandre innad de ulike forbehandlingsmetodene (tabell 4).

Prinsippet for sonikering, eller ultralydsbad, er at ultralyd sendes gjennom prøvene slik at de intercellulære interaksjonene påvirkes ved at det dannes bobler som sprekker. Dette kan bidra til å bryte cellemembranen og/eller celleveggen i materiale som behandles (Vinatoru *et al.*, 1997). På denne måten kan lipider ha blitt frigjort fra celleveggen i prøvene, som uten celleruptur har vært pakket inn og beskyttet i kiselalgenes silikaskjelett og cellevegg. En annen faktor som kan ha bidratt til det økte fettutbyttet kan være intracellulært depotfett. Dette kan ha lekket ut fra de skadde celleveggene og dermed blitt lettere tilgjengelig for ekstraksjon etter denne forbehandlingen. De presenterte resultatene stammer fra prøver som er sonikert i en time ved 37 °C. Det er også utprøvd en sonikeringstid på henholdsvis 30 min og to timer. Behandling i 30 min er forsøkt ved 4 °C og 37 °C, men ingen av disse ga like god effekt som ultralydsbehandling i én time. To timers behandlingstid medførte noe høyere utbytte, men ikke betydelig høyere enn én timers sonikering. Muligens kan utbyttet forbedres ytterligere ved lengre behandling ved høyere temperatur.

For ubehandlet *P. glacialis* napsnummer 12662014 var lipidinnholdet fra ubehandlet prøve omlag 11,1 %. For prøve behandlet med UltraTurrax var lipidprosenten ca 12,4, mens sonikering sørget for et ekstraksjonsutbytte på omtrent 13,3%. Denne trenden var tilnærmet lik for alle mikroalgene (tabell 4).

For makroalgen *P. canaliculata*, eller sauetang på norsk, var ikke sonikering like effektivt. Ekstraksjonsutbyttet var ca 3,5% etter sonikering, mens utbyttet i ubehandlet prøve var ca 3,3%. Årsaken til mangelen på effekt på makroalgen, kan være at råstoffet består av eukaryote planteceller der celleveggen inneholder kompliserte strukturelle polysakkarider og proteiner (Maehre *et al.*, 2016). Strukturene kan ha medført at sonikeringen ikke evnet å skade nok av de komplekse strukturene i plantevevet til å gi en klar effekt fra forbehandlingsmetoden. Det var stor variasjon mellom forsøk til forsøk. Enkelte sauetangprøver hadde ingen økning i ekstraksjonsutbyttet, mens andre paralleller hadde over 10% økning. Vel og merke var gjennomsnittlig relativ endring i ekstraksjonsutbyttet ved sonikering omlag 6,1 % for sauetang (figur 12).

Forbehandling med UltraTurrax hadde imidlertid god effekt på sauetang. Grunnen er antakeligvis at UltraTurrax-kniven evnet å male opp råstoffet, slik at plantevevet ble lettere eksponert for løsemidlene. Dette medførte at mer lipider ble ekstrahert ut. Makroalgene inneholder nok minimalt med intracellulært depotfett, men membranlipidene kan være godt beskyttet i plantevevet. Dermed kunne forbehandlingsmetodene også ved makroalgen virke ved å øke membranlipidenes eksponering for ekstraksjonsmidlene. Metoden økte fettutbyttet betydelig, med omtrentlig 55 % (figur 12).



Figur 12. Prosentvis utbytte ved forbehandlingsteknikker. Rød linje er gjennomsnittlig utbytte for ubehandlet Folch (1957) som er satt til 100% og referanseverdi. *Glacialis A* = napsnummer 12662012. *Glacialis B* = napsnummer 12662015. *C. Furcellatus A* = ID 61A (200 mg). *C. Furcellatus B* = ID 61B (60mg).

For å illustrere effekten av de ulike forbehandlingsmetodene på de forskjellige prøvematerialene, fremstiller figur 12 relativt fettutbytte grafisk. For hvert prøvemateriale, er ekstraksjonsutbyttet uten forbehandling satt til 100%. Sonikering hadde som diskutert, en gjennomgående effekt på kiselalgene. Denne forbehandlingsmetoden ga også det høyeste gjennomsnittlige fettutbyttet for kiselalgene. Den største økningen i utbyttet var for *P. glacialis* (napsnummer 12662012), der metoden i økte gjennomsnittlig fettutbytte med 31,4 % i forhold til ubehandlet materiale. Forbehandling med UltraTurrax ga også en generell økning i fettutbyttet hos kiselalgene. Også UltraTurrax hadde best effekt på *P. glacialis* (Napsnummer 12662012) der fettutbyttet økte med 22,1 %.

UltraTurrax var derimot ikke like effektivt på *C. furcellatus*, der enkelte replikater kom under de høyeste replikatene for ubehandlede *C. furcellatus*-prøver. I henhold til gjennomsnittsverdien hadde imidlertid UltraTurrax en viss effekt, men gjennomsnittsoøkningen er vel og merke liten. Spesielt framtrædende er dette for *C. furcellatus* 61B. Samme tendensen sees også vedrørende *S. marinoi*. Forskjellen mellom de to *C.*

furcellatus-variantene, 61A og 61B, er prøvestørrelsen. Lipidene fra *C. furcellatus* 61B stammer fra en innveid prøvevekt på 60 ± 4 mg. Her var det generelt noe større standardavvik sammenlignet med *C. furcellatus* 61A, hvor lipidene var ekstrahert fra en innveid prøvevekt på 200 ± 3 mg. Dette viser at usikkerheten øker dersom man reduserer mengden råstoff som behandles. Sannsynligvis skyldes dette usikkerhet ved veiing, der såpass små mengder vil gi økt usikkerhet. Imidlertid vil eventuelle tap av materiale underveis i ekstraksjonen også gi økt usikkerhet.

Forbehandlingsteknikken som ga høyest ekstraksjonsutbyttet ved *C. furcellatus* var sonikering. Imidlertid økte ekstraksjonsutbyttet mest for 61B, der økningen var på ca 18,8%. For 61A økte ekstraksjonsutbyttet med omlag 11,5%. Det er også verdt å merke seg at ekstraksjonsutbyttet fra forbehandlingsteknikken var om lag 19% for *S. marinoi*.

Precellys-behandlingen, eller mølleknusing, viste svært varierende resultater. Visuelt sett var mye fargede pigmenter som klorofyll ekstrahert ut, og disse ekstraktene var tydelig grumsete. En utfordring ved metoden var at Precellys-instrumentet som var tilgjengelig ved NFH, ikke var konfigurert for større enn 2 ml møllerør. Dette gjorde at løst materiale måtte fordeles på 6 rør. Når møllerørens innhold skulle tilbakeføres til teflonrør var det svært krevende å få med alt materialet over. Flere vaskinger med 1 ml 2:1 DCM:MeOH måtte til for å få Precellysrørene forholdsvis rene. Overføringen medførte ofte søl, og øvrige vanskeligheter med å få all råstoff med til teflonrørene. Dette medførte svinn, som også ble synliggjort ved høye standardavvik (tabell 4 og figur 12). Grunnet de store utfordringene knyttet til anvendelsen av denne metoden, ble denne forbehandlingen droppet før alle råstoffene ble utprøvd. Det er imidlertid ikke usannsynlig at denne forbehandlingsmetoden kan ha gjennomgående effekt på ekstraksjonsutbyttet, dersom et Precellys-instrument konfigurert for større møllerør benyttes.

Ekstraksjonsutbyttet herfra var i enkelte paralleller på høyde med UltraTurrax og sonikering for alle prøvegruppene. Vel og merke viste andre paralleller et klart negativt utbytte i forhold til ubehandlet materiale. Dette forklarer det store standardavviket. Denne usikkerheten er en av årsakene til at figur 12 er inkludert i oppgaveteksten. Her fremstilles klart og tydelig den usikkerheten som oppsto med underdimensjonerte møllerør, men samtidig det latente potensialet som ligger i metoden. Det kunne også vært interessant å studere de ulike cellene ved en mikroskopfigur. Der kunne ubehandlede celler vært sammenliknet med forhandlede, for og objektivt å bestemme hvorvidt celleveggen hadde tatt skade i en grad som var mulig å observere objektivt.

4.2 Fettsyreprofiler i kiselalgene

Tabell 5. Fettsyreprofiler (%) for *P. glacialis*. Ub = ubehandlet. Ut= forbehandlet med UltraTurrax. So= forbehandlet i ultralydsbad (sonikering).

Fettsyre:	N=4 <i>P. glacialis</i>											
	12662012			12662014			12662015			12662016		
	Ub	Ut	So	Ub	Ut	So	Ub	Ut	So	Ub	Ut	So
14:0	5,6±0,4	5,4±0,2	6,0±0,1	6,4±0,0	6,3±0,1	6,1±0,2	5,6±0,0	6,1±0,2	6,2±0,6	5,9±0,1	5,8±0,3	6,1±0,1
16:0	5,4±0,4	5,7±0,6	6,1±0,1	6,6±0,3	6,4±0,3	6,4±0,2	6,5±0,1	6,6±0,2	6,7±0,4	6,6±0,2	6,6±0,1	6,5±0,1
SFA	11,0±0,8	11,1±0,8	12,1±0,2	13±0,3	12,7±0,4	12,5±0,4	12,1±0,1	12,7±0,4	12,9±1,3	12,5±0,3	12,4±0,4	12,6±0,2
16:1n-7	8,5±0,3	8,1±0,4	8,4±0,2	7,6±0,2	7,4±0,1	8,0±0,3	7,8±0,2	7,5±0,3	7,7±0,1	7,4±0,2	7,2±0,2	7,3±0,2
18:1 n-9	2,0±0,1	1,9±0,2	1,9±0,2	1,9±0,1	2,1±0,1	1,7±0,2	1,9±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1	1,8±0,0
MUFA	10,5±0,4	10,0±0,6	10,3±0,4	9,5±0,3	9,5±0,2	9,7±0,5	9,7±0,3	9,5±0,4	9,7±0,2	9,4±0,3	9,2±0,3	9,1±0,2
16:2n-x	2,4±0,3	2,7±0,2	2,5±0,3	2,6±0,1	2,6±0,2	2,7±0,2	3,1±0,1	2,8±0,2	2,7±0,2	2,8±0,1	3,1±0,2	2,8±0,1
16:2n-4	2,6±0,2	3,3±0,1	2,5±0,1	3,2±0,2	3,3±0,1	3,1±0,1	3,4±0,1	3,6±0,2	3,1±0,1	3,6±0,2	3,6±0,3	3,7±0,1
16:3n-4	17,9±0,3	17,7±0,4	17,3±0,3	16,7±0,3	16,9±0,4	17,2±0,3	17,4±0,3	18±0,4	17,6±0,4	19,8±0,5	19,4±0,4	19,5±0,5
16:4n-x	13,8±0,2	13,4±0,2	13,6±0,1	13,3±0,3	13,4±0,1	13,5±0,2	12,4±0,1	12,6±0,2	13,4±0,2	11,2±0,4	11,5±0,2	11,1±0,1
18:2n-6	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D	U.D
18:4n-3	10,4±0,4	10,2±0,3	9,9±0,1	9,8±0,6	9,8±0,2	8,2±0,4	9,8±0,3	9,8±0,4	9,6±0,1	10,1±0,3	10,2±0,2	10,4±0,1
20:5n-3	27,1±0,3	26,8±0,3	26,7±0,2	25,5±0,2	26,1±0,3	26,0±0,3	25,2±0,3	26,2±0,4	26,0±0,3	25,6±0,4	25,6±0,2	25,4±0,3
22:6n-3	2,9±0,2	2,8±0,1	2,8±0,0	2,7±0,0	2,7±0,1	2,8±0,0	2,6±0,1	2,8±0,1	2,9±0,0	2,6±0,1	2,7±0,2	2,7±0,1
PUFA	77,1±1,9	76,9±1,6	74,9±1,1	73,8±1,7	74,8±1,4	73,5±1,5	73,9±1,3	75,8±1,9	75,3±1,3	75,7±1,5	76,1±1,7	75,6±1,3
HUFA n-3	54,2±1,1	53,2±0,9	53,0±0,4	51,3±1,1	52,0±0,7	50,5±0,7	50,0±0,8	51,4±1,1	51,9±0,6	49,5±1,2	50,0±0,8	49,6±0,6
EPA+DHA	30,0±0,5	29,6±0,4	29,5±0,2	28,2±0,2	28,8±0,4	28,8±0,3	27,8±0,4	29,0±0,5	28,9±0,3	28,2±0,5	28,3±0,4	28,1±0,4

Uidentifiserte fettsyrer: Før 14:0 og mellom 14:0 og 16:0

Gul farge: Uidentifisert i henhold til kjente standarder

U.D: Kan finnes, men gjennomsnittet er under deteksjonsgrensen (0,5%)

Tabell 6. Fettsyreprofiler (%) for *C. furcellatus* og *S. marinoi*. Ub = ubehandlet. Ut= forbehandlet med UltraTurrax. So= forbehandlet i ultralydsbad (sonikering).

Fettsyre:	<i>C. furcellatus</i>			<i>S. marinoi</i>		
	ID:61			Napis?		
	Ub	Ut	So	Ub	Ut	So
14:0	10,6±0,8	10,2±0,8	10,3±0,7	13,6±1,1	14,0±0,7	14,1±0,7
16:0	7,6±0,6	7,1±0,4	7,1±0,2	8,9±0,4	8,3±0,6	8,3±0,6
SFA	18,2±1,4	17,3±1,2	17,4±0,9	22,5±1,5	22,3±1,3	22,4±1,3
12:1	1,2±0,1	1,4±0,2	1,3±0,3	3,6±0,1	3,8±0,2	3,5±0,2
16:1n-7	16,7±0,6	17,1±0,9	17,1±0,6	16,5±0,5	17,5±0,3	17,6±0,4
18:1n-9	0,7±0,1	0,5±0,1	0,6±0,2	U.D	U.D	U.D
18:1n-7	-	-	-	8,5±0,1	7,7±0,2	7,9±0,2
MUFA	18,5±0,8	19,0±1,2	19,0±1,1	28,6±0,7	29,0±0,7	29,0±0,8
16:2n-x	3,3±0,2	3,5±0,2	3,3±0,1	1,3±0,0	1,2±0,1	1,3±0,1
16:2n-4	6,7±0,3	6,7±0,2	6,6±0,1	3,2±0,2	3,3±0,2	3,4±0,2
16:3n-4	14,5±0,3	14,5±0,2	14,7±0,2	9,3±0,7	9,1±0,4	9,0±0,3
16:4n-x	6,5±0,1	6,7±0,0	6,7±0,1	12,9±0,7	14,2±0,8	14,0±1,1
18:2n-6	-	-	-	1,2±0,1	0,9±0,0	0,8±0,1
18:3n-3	0,5±0,2	0,6±0,1	0,7±0,2	1,6±0,4	1,4±0,4	1,3±0,3
18:4n-3	0,6±0,1	0,9±0,2	0,9±0,0	2,4±0,1	2,6±0,2	2,7±0,1
20:5n-3	29,7±0,5	29,9±0,4	29,9±0,5	10,4±0,3	11,7±0,3	11,9±0,4
22:6n-3	0,6±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2	2,1±0,4	2,4±0,3	3,1±0,4
PUFA	62,4±1,8	63,5±1,4	63,4±1,4	44,4±2,9	46,8±2,7	48,4±3,0
HUFA n-3	37,4±0,8	38,2±0,7	38,2±0,8	27,8±1,5	29,9±1,6	30,7±2,0
EPA+DHA	30,3±0,6	30,6±0,5	30,6±0,7	12,5±0,7	14,1±0,6	15,0±0,8

Uidentifiserte fettsyrer: Før 14:0

Gul: Uidentifisert i henhold til kjente standarder

U.D: Kan finnes, men gjennomsnittet er under deteksjonsgrensen (0,5%)

- : Ikke detektert i flertallet av paralleller

Som vist i tabell 5 inneholder *P. glacialis* mye EPA, der innholdet varierer mellom 25,2% til 27,1 % av total mengde metylerte fettsyrer (FAME). Andelen av n-3 HUFA er svært høy for *P. Glacialis* og ligger mellom 49,2 og 54,2% for de analyserte prøvene. HUFA kategorien inkluderer her 22:6n-3, 20:5n-3, 18:4n-3 og 16:4n-x. Årsaken til at sistnevnte er inkludert er at ulike artikler beskriver en 16:4n-3 fettsyre som vanlig i mikroalger (Piepho *et al.*, 2012). Det kan imidlertid synes som denne kategoriseringen er en ren antakelse i disse prøvene, men vurderingen til n-3 fettsyre beskrives og begrunnes nærmere i kapittelet om Ag⁺-SPE fraksjonering.

Årsaken til at n-3 HUFA er inkludert i FAME presentasjonene, er at denne kategorien inkluderer 18:4n-3. Hos dyr er syntesen av 20:5n-3 fra 18:4n-3 forholdsvis effektiv (Coupland, 2008). Det betyr at denne fettsyren (18:4n-3) vil kunne videresyntetiseres hos laks. Det høye innholdet av EPA+DHA (ca 30 %) og totalt n-3 HUFA, stadfester at *P. glacialis* har et meget lovende potensiale som egnet lipidressurs i laksefôr. De ulike variantene av *P. glacialis* korresponderer til ulike høstningstidspunkt, med påfølgende økende klorofyllinnhold i kulturen. Det er imidlertid lite variasjon i fettsyreprofilen mellom de ulike variantene av arten, samt mellom de ulike forbehandlingsmetodene. Også for *C. furcellatus* og *S. marinoi* (tabell 6) er 16:4n-x fettsyren inkludert i summeringen av mengden n-3 HUFA. I disse artene sees også en relativt høy andel n-3 HUFA, på henholdsvis 38 og 29 %. Imidlertid er dette tallet noe lavere enn det som var funnet for *P. glacialis* (tabell 5). For *C. furcellatus* var andelen EPA omtrent 30 %, noe som gjør at *C. furcellatus* har den høyeste andelen EPA blant kiselalgeartene. *C. furcellatus* hadde imidlertid den laveste andelen DHA blant kiselalgene, med omtrent 0,7 %. Dermed har ikke *C. furcellatus* høyere EPA+DHA innhold enn *P. glacialis*, til tross for artens høye innhold av EPA. Dermed inneholder begge disse artene om lag 30% EPA+DHA summert. *S. marinoi* hadde ca 14 % EPA+DHA, noe som var under halvparten av mengden som finnes i de to andre kiselalgeartene. Imidlertid er DHA innholdet i *S. marinoi* opptil 3,5 %, som er det høyeste innholdet målt blant disse kiselalgeartene. Når det angår n-6 fettsyrer ble 18:2n-6 ikke identifisert i *C. furcellatus* og kun spormengder under deteksjonsgrensen var funnet i lipider fra *P. glacialis*. For *S. marinoi* derimot ble omlag 1% LA identifisert.

Dersom 16:4n-x ekskluderes fra resultatpresentasjonen, vil stort sett n-3 HUFA innholdet være i underkant av 40 % for *P. glacialis*. Dette er forøvrig et svært høyt innhold sammenlignet med andre marine oljeopprinnelser som er vanlig å bruke i laksefôr (Mcgill og Moffat, 1992). Tabell 5 viser også at omlag 75% av fettsyrene i *P. glacialis* er PUFA, som her inkluderer alle fettsyrene med to eller flere dobbeltbindinger. Høyest innhold PUFA er funnet i ubehandlet *P. glacialis* napsnummer 12662012, hvor innholdet er omlag 77,4 %. Også for PUFA-fettsyrene er det lite variasjon mellom de ulike variantene og forhandlingene av *P. glacialis*. Andelene SFA og MUFA er også ganske konstante, der innholdet er henholdsvis ca 12- og i underkant av 10%.

Som for *P. glacialis*, er det også for *C. furcellatus* og *S. marinoi* forholdsvis liten variasjon i fettsyreprofilen mellom de ulike forbehandlingsteknikkene. Imidlertid er det noe variasjon innad de ulike variantene av *S. marinoi*, og fettsyrebestemmelsene for denne arten

gir generelt høyere standardavvik enn tilfellet er for de andre to kiselalgeartene. SFA og MUFA innholdet er henholdsvis omlag 22 % og 29 % i *S. marinoi*. Dette er de høyeste verdiene blant mikroalgematerialet. Innholdet av SFA og MUFA i *C. furcellatus* er henholdsvis 17,5 % SFA og 19% MUFA. *Chaetoceros furcellatus* og *S. marinoi* var også de eneste artene som hadde et identifiserbart innhold av 12:1, hvor andelen var henholdsvis ca 1% og 3 % .

Totalt sett skiller *S. marinoi* seg noe ut sammenliknet med *P. glacialis* og *C. furcellatus*. Arten har gjennomgående høyere andel MUFA og SFA med tilsvarende lavere andel PUFA (45%). I tillegg har arten mindre n-3 HUFA, som hentyder at arten ikke er like kapabel til å syntetisere EPA og DHA som de andre to artene.

Når det angår det økte fettutbyttet fra de ulike forbehandlingsteknikkene, sees ingen framtreende forskjell på fettsyreprofilen sammenlignet med ubehandlet materiale. Dette var gjennomgående for alle mikroalgeartene. Imidlertid vil det relative innholdet av for eksempel EPA+DHA være høyere pr 100g råstoff i sonikert materiale, siden ekstraksjonen av fett er mer effektiv etter sonikering sammenlignet med ekstraksjon direkte fra ubehandlet materiale.

Tradisjonell fettsyreidentifisering ved GC-FID, baserer seg på å knytte separate fettsyretopper i en prøve opp mot kjente FAME standarder. Denne metoden viste seg utfordrende å benytte mot kiselalgematerialet. Dermed er to ulike fettsyrer merket i gult, som henviser at de oppfører seg som uidentifisert vedrørende tradisjonell fettsyreidentifikasjon der kjente standarder benyttes. Imidlertid er de inkludert i tabellen, siden de har blitt identifisert basert på retensjonstid og antall dobbeltbindinger ved Ag^+ -SPE fraksjonering (Kapittel 4.2.2).

4.2.1 Sammenlikning av fettsyreprofiler med øvrig råstoff

Tabell 7. Fettsyreprofiler i annet utvalgt marint råstoff. *P. glacialis* og *S. marinoi* er presentert i uthevet skrift i kolonnene til høyre.

N=4	<i>P. canaliculata</i>			Tran	<i>P. vulgata</i>	<i>P. glacialis</i>	<i>S. marinoi</i>
	Ub	Ut	So	Ub	Heat treated Ub	12662012 Ub	- Ub
Fettsyre:							
14:0	9,1±0,5	9,3±0,5	8,7±0,4	3,5±0,2	6,5±0,4	5,6±0,4	13,6±1,1
16:0	9,8±0,7	10,4±0,8	10,0±0,6	10,1±0,6	12,0±0,4	5,4±0,4	8,9±0,4
18:0	2,4±0,2	2,2±0,1	2,3±0,1	2,1±0,2	3,8±0,1	-	-
SFA	21,3±1,4	21,9±1,4	21,0±1,1	15,7±1,0	22,3±0,9	11,0±0,8	22,5±1,5
12:1	-	-	-	-	-	-	3,6±0,1
16:1n-7	1,6±0,1	1,5±0,2	1,5±0,1	8,7±0,3	2,6±0,2	8,5±0,3	16,5±0,5
18:1n-12	-	-	-	0,7±0,1	-	-	-
18:1n-9	39±0,8	40,3±0,7	41,1±0,8	13,1±0,3	20,9±0,7	2,0±0,1	-
18:1n-7	-	-	-	4,1±0,1	3,7±0,2	-	8,5±0,1
20:1n-9	1,3±0,1	1,3±0,1	1,3±0,2	13,6±0,4	3,7±0,4	-	-
20:1n-x	-	-	-	-	2,2±0,3	-	-
22:1n-11	-	-	-	6,8±0,2	-	-	-
22:1n-9	-	-	-	0,6±0,1	0,7±0,2	-	-
24:1n-9	1,1±0,1	1,0±0,0	1,0±0,1	0,8±0,2	1,2±0,1	-	-
MUFA	41,9±1,1	44,1±1,0	44,9±1,2	48,4±1,7	35,0±2,1	10,5±0,4	28,6±0,7
16:2n-x	-	-	-	-	-	2,4±0,3	1,3±0,0
16:2n-4	-	-	-	-	-	2,6±0,2	3,2±0,2
16:3n-4	-	-	-	2,1±0,3	0,7±0,2	17,9±0,3	9,3±0,7
16:4n-x	-	-	-	-	-	13,8±0,2	12,9±0,7
18:2n-6	13,1±0,3	13,2±0,4	13,3±0,2	2,4±0,3	3,8±0,1	-	1,2±0,1
18:3n-4	-	-	-	-	1,9±0,1	-	-
18:3n-3	3,2±0,3	3,4±0,2	3,3±0,2	0,7±0,3	1,8±0,2	-	1,6±0,4
18:4n-3	0,6±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	1,2±0,2	3,6±0,1	10,4±0,4	2,4±0,1
20:2	1,0±0,1	1,1±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	4,9±0,2	-	-
20:3n-6	2,2±0,1	2,1±0,1	2,3±0,2	-	0,7±0,2	-	-
20:3n-3	0,8±0,3	1,1±0,2	0,7±0,2	-	1,9±0,3	-	-
20:4n-6	6,8±0,4	6,7±0,3	7,0±0,2	5,8±0,4	8,2±0,2	-	-
20:4n-3	-	-	-	0,6±0,1	0,7±0,1	-	-
20:5n-3	3,2±0,4	4,0±0,2	3,6±0,3	8,3±0,3	10±0,4	27,1±0,3	10,4±0,1
22:5n-3	-	-	-	1,3±0,1	0,9±0,1	-	-
22:6n-3	-	-	-	12,2±0,4	-	2,9±0,2	2,1±0,4
PUFA	30,8±2,0	32,2±1,7	31,6±1,5	35,5±2,5	39,1±2,1	77,4±2,2	44,4±2,7
HUFA n-3	3,8±0,5	4,6±0,3	4,1±0,4	23,6±1,1	15,2±0,7	54,2±1,14	27,8±1,3
EPA+DHA	3,2±0,4	4,0±0,2	3,6±0,3	20,5±0,7	10,0±0,4	30,0±0,5	12,5±0,5

På bakgrunn av at *P. glacialis* og *S. marinoi* har de mest ulike fettsyreprofilene innad kiselalgeartene, inngår disse i sammenligningstabellen med det øvrige råstoffet.

Fettsyreprofilene til det øvrige råstoffet har mer kjente sammensetninger enn kiselalgelipidene (tabell 7). Fettsyreprofilen til det øvrige marine råstoffet likner det som er vanlig i høyerestående marine organismer og øvrige marine palntematerialer (Maehre *et al.*, 2014; McGill og Moffat, 1992; Olsen, 2007). For eksempel inneholder alle prøvene som er fremstilt i tabell 7, bortsett fra *P. glacialis*, 18:3n-3. I tillegg har det øvrige materialet flere fettsyrer enn de som er funnet i kiselalgematerialet. Dette gjelder innenfor alle fettsyregruppene, slik som 18:0 i SFA, 24:1n-9 i MUFA, og 20:2 samt 22:5n-3 i PUFA. Med unntak av 20:1n-x i albuesnegl som ble identifisert via Ag⁺-ion SPE-fraksjonering, kunne samtlige fettsyrer i disse materialene bli identifisert ved bruk av de kjente standardene. Disse prøvene inneholdt ikke 16:2 og 16:4 fettsyrene som var framtreddende i kiselalgene. Et annet moment som kan noteres er at tran inneholder 12,2% 22:6n-3. Dette var i særklasse den høyeste andelen av denne fettsyren, blant det undersøkte materialet. Tran inneholdt også mest MUFA med et snittinnhold på ca 48,4 %. Generelt er SFA, MUFA og n-6 innholdet høyere og PUFA tilsvarende lavere i det øvrige marine råstoffet, sammenlignet med kiselalgene. Sauttang har det høyeste n-6 innholdet blant materialet. Dette er omlag 22 % (ubehandlet prøve). Tran har ca 5,8 %, mens det er 12,7 % i albuesnegl. Dette gjør at n-6/n-3 forholdet blir høyere i det øvrige råstoffet enn i kiselalgene. For eksempel er n-6/n-3 forholdet i tran 0,23, mens det er nærmest 0 i *C. furcellatus* og *P. glacialis*. Det høyeste n-6/n-3 forholdet blant det undersøkte materialet, finnes i sauetang der dette forholdet er på omtrent 1,6 (i ubehandlet sauetang).

Tran inneholder 23,6% n-3 HUFA. Dermed har tran det høyeste innholdet blant det øvrige råstoffet. Dette er imidlertid under halvparten av mengden n-3 HUFA sammenlignet med *P. glacialis* dersom 16:4 inkluderes. Uten å ta med denne, har *P. glacialis* faktisk betydelig mer n-3 HUFA enn tran. For EPA er det albuesnegl som kommer nærmest kiselalgene med ca 10 % andel av denne n-3 fettsyren. Dette er omtrent på nivå med *S. marinoi*, som tidligere nevnt hadde minst prosentandel EPA blant mikroalgene. Totalt sett er det *S. marinoi* som har en fettsyreprofil mest lik profilen man ser i det øvrige undersøkte råstoffet, mens de andre to kiselalgeartene skiller seg nokså klart ut. Uansett vil nok samtlige av kiselalgene være egnet som förlipider til laks, på bakgrunn av fettsyrenes marine profil. Til tross for at det optimalt sett er ønskelig med noe høyere andel DHA. Vel og merke vurderes *P. glacialis* som det beste alternativet, på bakgrunn av høyt EPA+DHA innhold, der DHA

innholdet er høyere enn i *C. furcellatus*. I tillegg inneholder *P. glacialis* mest SDA som også vil være nyttig i laksefôr.

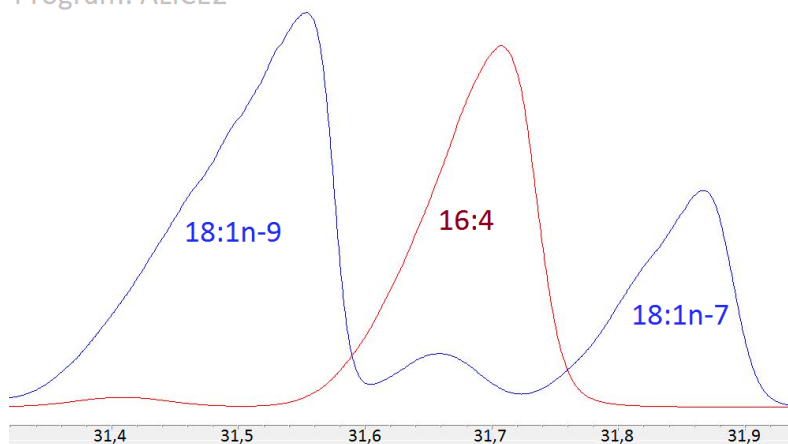
4.2.2 Seperasjon på bakgrunn av dobbeltbindinger i hydroksylkjeden, mikroalger.

Som nevnt i 4.2 ble det under bestemmelsen av fettsyreprofilene i mikroalgene oppdaget en del uidentifiserte fettsyrer. I henhold til normal identifisering ville disse fettsyrene antakeligvis vært vurdert til 18:1n-9. Årsaken er at tilgjengelige FAME-standarder ikke inkluderer de aktuelle 16C HUFA. I tillegg har 16:4 og 18:1n-9 så godt som identisk retensjonstid. Retensjonstiden mellom disse to fettsyrene skilles på omlag 8 sekunder i det benyttede GC-analyseprogrammet (ALICE 2) (figur 13). Dette analyseprogrammet hadde også lengst intervall mellom disse to fettsyrene blant de utprøvde programmene! Hvis man også tar med i betraktningen at retensjonstiden påvirkes av relativ konsentrasjon av de aktuelle fettsyrene, betyr det at sannsynligheten for at disse kan forveksles er svært stor. Ut fra litteraturen var det også en forventning om at kiselalgene burde inneholde 16:4n-3 (Piepho *et al.*, 2012). Denne fettsyren ville også i teorien ha liknende retensjonstid som 18:1 med tanke på kjedelengde og antall dobbeltbindinger. I sum var det om lag 10% av fettsyrene i *C. furcellatus*-prøvene som ikke kunne identifiseres med sikkerhet. Således måtte en alternativ analysemetode tas i bruk.

Nærbilde av retensjonstidene for 18:1n-9, 16:4, og 18:1n-7.

P. Glacialis (rød) og PUFA 3 (blå)

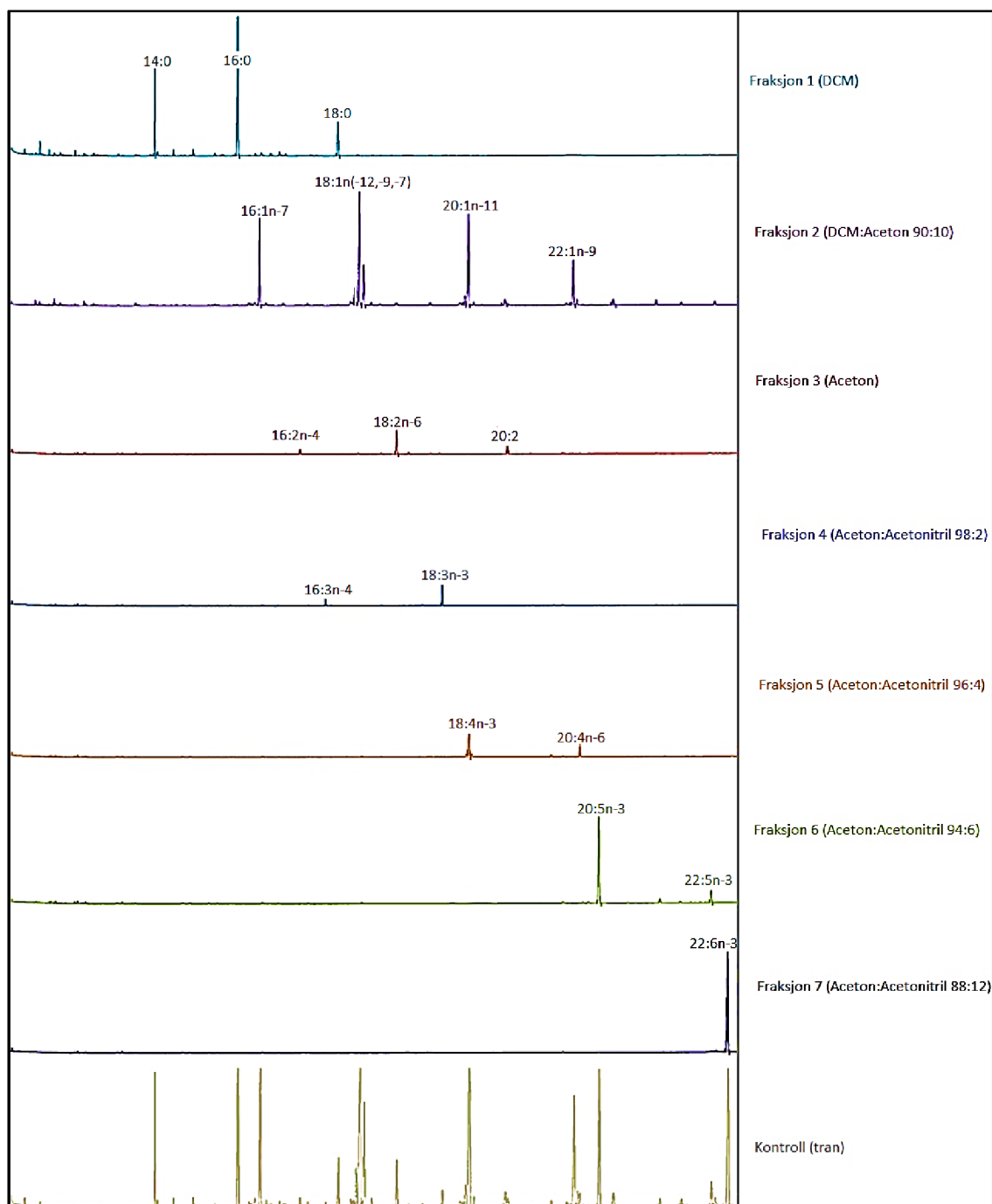
Program: ALICE2



Figur 13. Figuren viser et utsnitt av et kromatogram, der retensjonstiden til fettsyrene; 18:1n-9, 16:4 og 18:1 n-7 inntre. Figuren viser et kraftig forstørret og innsnevret kromatogram, der tidsperspektivet er de 30 sekundene som skiller retensjonstiden til disse tre fettsyrene fra start til slutt.

Figur 13 viser klart og tydelig at den fettsyren som var tilstede i prøvene ikke var hverken 18:1 n-9 eller n-7. Figuren er imidlertid fra et kraftig innsnevret kromatogram, som klart og

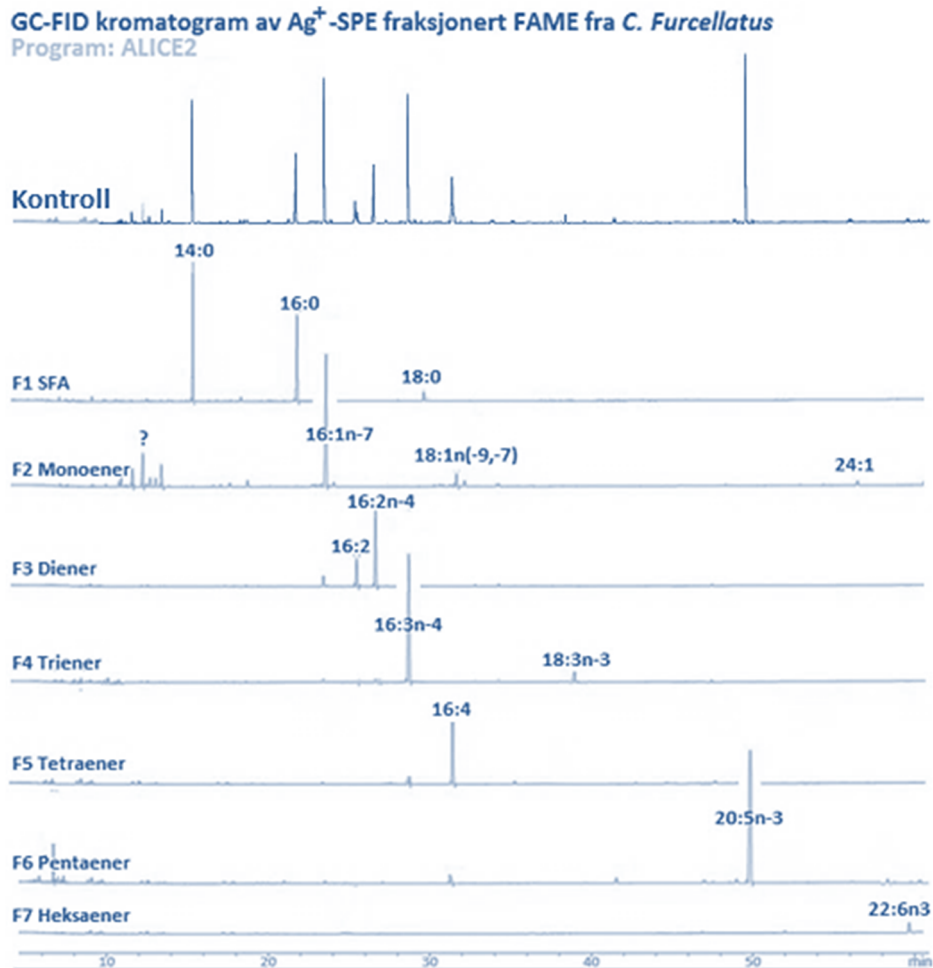
tydelig viser den ufullstendige overlappen. I det fullstendige kromatogrammet så fettsyren i prøven ut til å delvis overlapse med 18:1n-9 som var kjent fra standardene. Ved å «zoome» inn på problemområdet ble det imidlertid avdekt at dette muligens var en annen fettsyre. En aktuell metode for mer metodisk analyse var beskrevet av Christie (2011). Denne metoden benytter seg av SPE-kolonner med Ag^+ -ioner som binder fettsyrestere (FAME), med stigende grad av mettetthet slik at man kan skille fettsyrer på bakgrunn av dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. Denne metoden ble utprøvd og resultatet var lovende, men for upresist. På bakgrunn av den overnevnte metoden, ble elueringsmidler med ulik polaritet utprøvd til fraksjonene var rene. For hver endring i elueringsmidlene, ble resultatene kartlagt ved å undersøke fettsyresammensetningen i fraksjonene via GC-FID. Metodeutviklingen ble gjennomført med metylerte prøver fra tran og *C. furcellatus*. Endelig sammensetning av elueringsmidler og løsemiddelvolum er presentert i tabell 2 (i metodekapittelet).



Figur 14. Skjematisk fremstilling av fraksjoner i tran. Nederst er full prøve til sammenlikning. Alle fraksjonene i tran var identifiserbar mot kommersielle standarder.

Figur 14 viser endelig sammensetning av elueringsmidler brukt i denne metoden, og viser at den modifiserte metoden evnet å fraksjonere metylert tran på graden av mettetthet i trans fettsyrer. Retensjonstiden til de største toppene passer med retensjonstidene til fettsyrer med aktuell grad av mettetthet fra kjente standarder. Summerer man alle fraksjonene vil man få et tilnærmet bilde av full prøve (nederst i figur 14). Vel og merke vil størrelsen på toppene ikke kunne si noe om innhold i fullprøven. Dette fordi denne metoden er kvalitativ metode. GC-

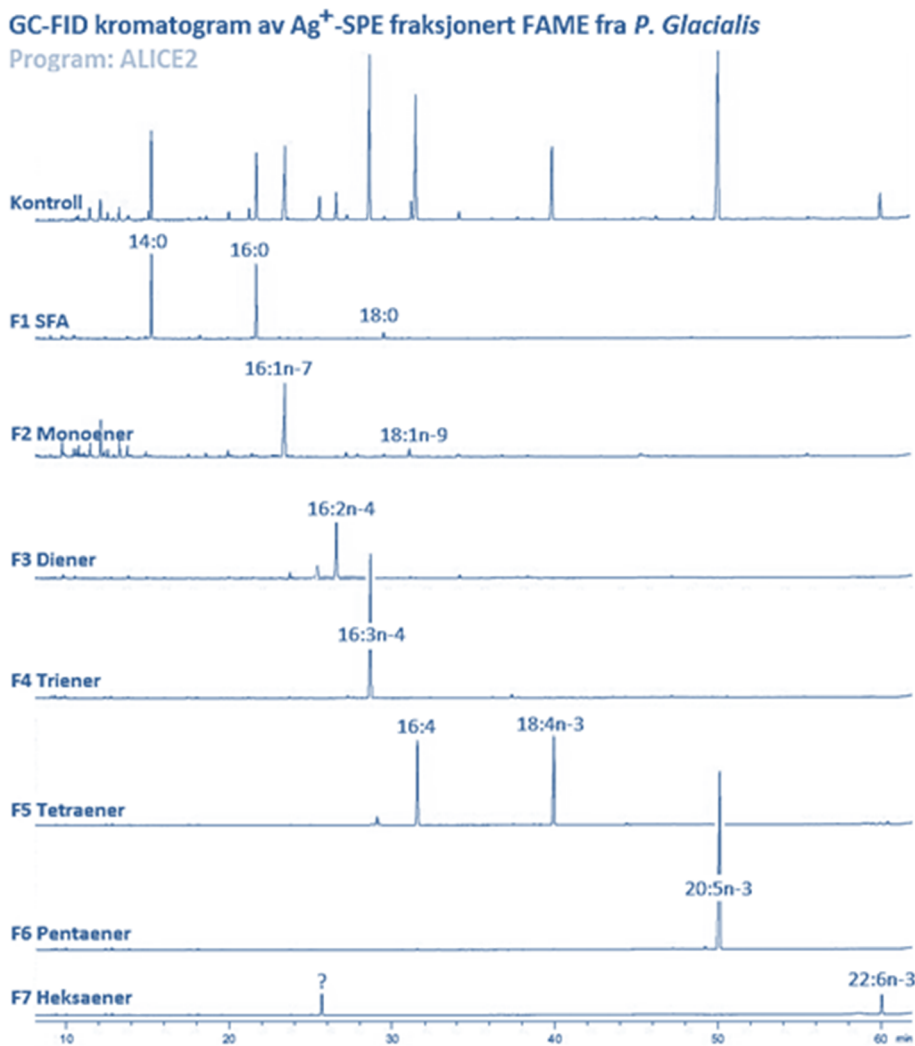
FID identifiserer- og bestemmer relativt innhold for de fettsyrene som er tilstede i prøvene. Dermed vil fraksjoner med få fettsyrer medføre en unaturlig stor arealprosent, og kan således ikke benyttes for å videre kvantifisere innholdet av den aktuelle fettsyren i fullprøven.



Figur 15. GC-FID kromatogrammer som viser fraksjonene av *C. Furcellatus* etter Ag⁺-SPE fraksjonering. Tydelig og god separasjon, der figuren viser tilstedeværelsen av en 16:2(n-x) fettsyre samt 16:4(n-x). Disse finnes det ikke kommersielle FAME-standardere for. Sistnevnte fettsyre opptrer i samme tidsintervall som 18:1 fettsyrer, og lar seg således enkelt forveksle undet tradisjonell (ufraksjonert) GC-FID (der fettsyrene detekteres via kjente FAME-standarder).

Ved fraksjoneringen av *C. furcellatus* viste metoden seg å være godt egnet til å separere fettsyrene i denne kiselalgen, utfra antallet dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. Fraksjonene forble forholdsvis rene, og en videre karakterisering av uidentifiserte fettsyrer er dermed mulig (figur 15). Imidlertid ser man at små mengder av enkelte flerumettede fettsyrer kan dukke opp i den påfølgende fraksjonen. Eksempel på dette ser man i fraksjon 5 (figur 16) hvor rester av trien-fettsyren 16:3n-4 er med i fraksjonen for tetraen-fettsyrer. Ved å eksperimentere med volumenet av de aktuelle fraksjonene er det mulig at man kan få

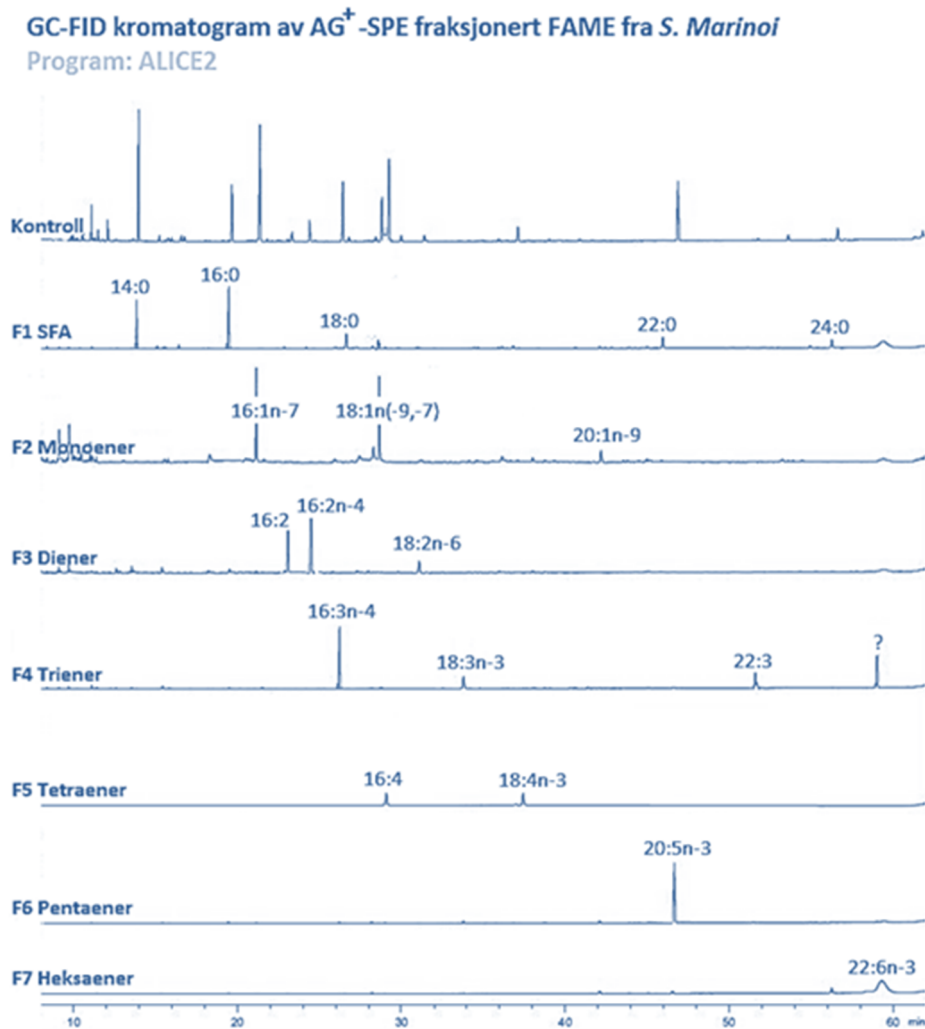
fraksjonene helt rene om ønskelig. Imidlertid ser det ut til at dette eventuelt må gjøres for hvert enkelt materiale. I fraksjon 3, som i utgangspunktet kun skal inneholde diener kan man blant annet finne den tidligere omtalte 16:2. Denne fettsyren var fullstendig uidentifisert før Ag^+ -SPE fraksjoneringen fant sted. På bakgrunn av denne fraksjoneringen kan man nå anslå med relativ sikkerhet at dette faktisk er en 16:2 fettsyre, siden denne fraksjonen bare inneholder diener. Fettsyren har en sannsynlig n-7 konfigurasjon på bakgrunn av retensjonstid og at litteraturen tidligere har beskrevet en 16:2n-7 fettsyre i flere kiselalgearter (Dunstan *et al.*, 1994; Volkman *et al.*, 1991). Konfigurasjonen (n-7) er som nevnt usikker, siden en identifiserende analyse i GC-MS (massespektrometri) ikke er utført. I fraksjon 5 (som skal inneholde fettsyrer med fire dobbeltbindinger) er det en stor topp som havner omkring retensjonstiden til 18:1, som var utgangspunktet for denne analysen (se fraksjon 2). Denne fettsyren vurderes til en 16:4 fettsyre på bakgrunn av at fettsyrens retensjonstid er forlenget i henhold til 16:3n-4, og samtidig en del kortere enn 18:4. Litteraturen har også implementert en 16:4 fettsyre i sine fettsyrekarakteriseringer for mikroalger. Mer spesifikt en 16:4n-3 fettsyre (Piepho *et al.*, 2012). Dermed anslås denne fettsyren til å være en n-3 fettsyre, men det er imidlertid en ren antakelse. Årsaken er at tilgjengelig utstyr og analysemetoder ikke kan benyttes for å bestemme dette. Den identifiserte fettsyren kan imidlertid også være en n-1 fettsyre (Dunstan *et al.*, 1994).



Figur 16. GC-FID kromatogrammer som viser fraksjonene av *P. glacialis* etter Ag⁺-SPE fraksjonering. Bemerk tilstedeværelsen av 16:2(n-x) samt 16:4(n-x). En uidentifisert topp kan sees i fraksjon 7. Denne er vurdert til å være kontaminasjon.

Kromatogrammene i figur 16 viser fraksjonert *P. glacialis*. Her ser man at den utviklede sammensetningen av elueringsmidler, også her evner med relativt stor nøyaktighet å isolere FAME på graden av mettetet. I tillegg ser man at fraksjonene summert viser de samme fettsyrene som er presentert i full prøve (øverst i figur 16). Som ved *C. furcellatus* ble også en 16:4 fettsyre identifisert i *P. glacialis*. Denne fettsyren blir vurdert som den samme fettsyren som ble detektert i figur 15, på bakgrunn av samme retensjonstid i samme fraksjon. Toppen for den usikre 16:2 fettsyren er ikke like fremtredende i denne figuren. Imidlertid kan en liten topp skimtes før 16:2n-4, der denne toppen er vurdert til å være samme 16:2 fettsyre som var detektert i figur 15 og 17. Ser man tidlig i fraksjon 2 for alle mikroalgene finnes noe grums (figur 15, 16 og 17). Disse forbindelsene er ikke forenelig med retensjonstidene til noen av standardfetsyrene. Dermed er dette ekskludert fra den prosentvise sammensetningen i

mikroalgeprøvene. I fraksjon 7 (figur 16) sees også en topp på omlag 35,5 minutter. Denne fraksjonen skal kun inneholde seksumettet fett, slik at denne toppen er vurdert til å være noen form for kontaminasjon. Denne toppen er heller ikke fremtredende i noen av parallellene som har vært analysert i tabell 5.



Figur 17. GC-FID kromatogrammer som viser fraksjonene av *S. Marinoi* etter Ag-SPE fraksjonering. Bemerk tilstedeværelsen av 16:2(n-x) samt 16:4(n-x). En stor uidentifisert topp finnes også i fraksjon 4, som sannsynligvis er kontaminasjon.

Ag⁺-SPE fraksjonert FAME fra *S. marinoi* skilte seg ut i henhold til de to andre mikroalgeartene. Årsaken er den store og brede toppen man ser i fullprøve etter ca 28 minutter (øverst i figur 17). Dette innholdet ville i de to andre artene vært vurdert til 16:4 på bakgrunn av toppene i de andre kiselalgene inneholder svært lite 18:1. *S. marinoi* derimot inneholder mye 18:1n-7 som klart vises i fraksjon 2 (figur 17). Imidlertid er det som tidligere beskrevet ikke mulig å bedømme prosentvis innhold i fraksjonene via denne kvalitative analysen. Dette vanskeliggjør bestemmelsen av det prosentvise innholdet i full prøve,

ettersom både 16:4 og 18:1n-7 er representert godt over deteksjonsnivå. Dette gjør arealprosenten i fullprøve vanskelig å bestemme siden GC-FID identifiserer disse to fettsyrene som en topp, der begge signalene stammer fra denne toppen. Løsningen var å finne et middepunkt manuelt i GC-programvaren, og på den måten separere toppene.

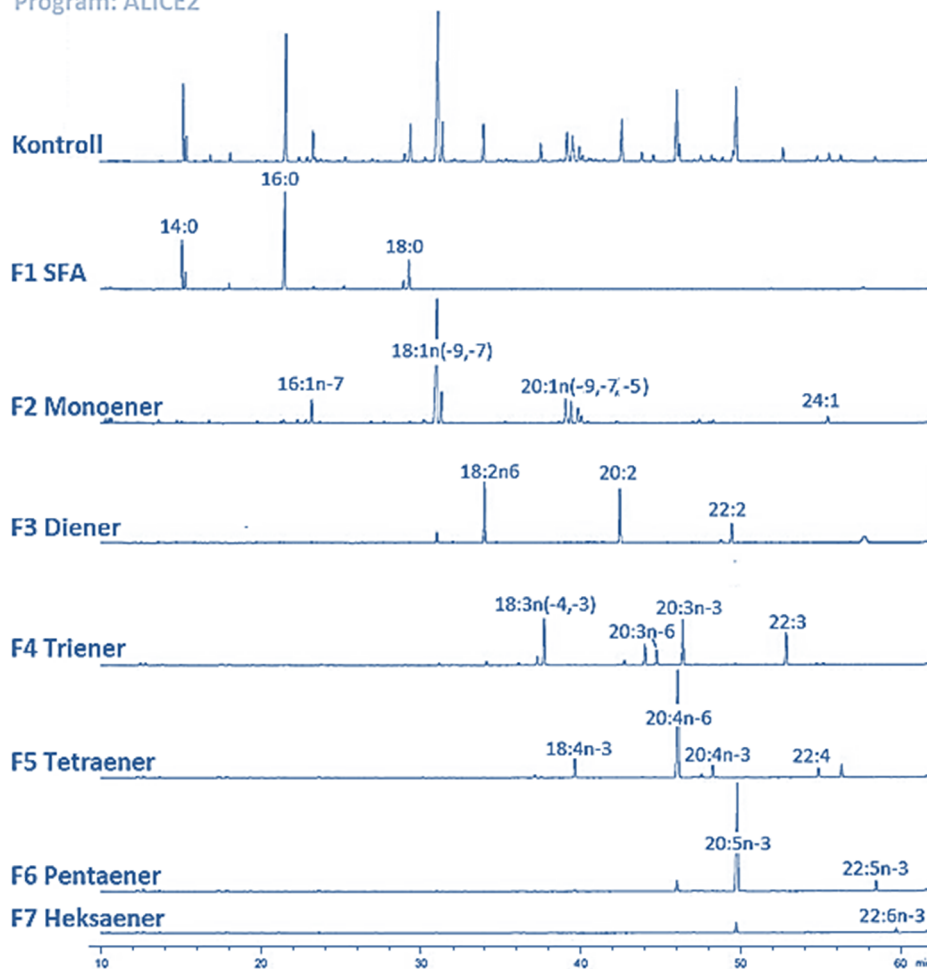
I fraksjonene (figur 17) sees fettsyrer som ikke er beskrevet i fettsyresammensetningen av full prøve (eks 18:0). Årsaken er at det er så lavt fettsyreinhold samt et begrenset utvalg fettsyrer i de ulike fraksjonene, slik at fettsyrene blir kraftig oppkonsentrert. Dette medfører at toppenes arealprosent blir høyere, og kan således havne over deteksjonsnivået. Dette blir igjen synlig på kromatogrammene av fraksjonene. I denne prøven dukker det opp en uidentifisert topp på omlag 60 minutter i trien-fraksjonen. Denne fettsyren skal utfra fraksjon ha 3 dobbeltbindinger, muligens kunne 24:3n-3 være en aktuell kandidat, men den ikke kan identifiseres via de kjente standardene. Denne toppen er ikke fremtredende i full prøve, og er dermed ansett som en mulig kontaminasjon i fraksjonen eller artefakt i GC-FID analysen.

4.2.3 Fettsyreprofiler i annet materiale

Metoden som var utviklet for å identifisere fettsyrer på bakgrunn av dobbeltbindinger i FAME, viste seg også å være velfungerende for øvrig marint råstoff som presentert i figur 18 og 19.

GC-FID kromatogram av AG+-SPE faksjonert FAME fra albueskjell

Program: ALICE2



Figur 18. GC-FID kromatogram av fraksjoner fra Ag⁺-SPE-fraksjonert albuesnegl (*P. vulgaris*). Bemerk 20:1 fettsyrene i fraksjon 2. Disse samsvarer med hva som sees i full prøve (øverst). Identifiseringen av disse er forholdsvis usikker.

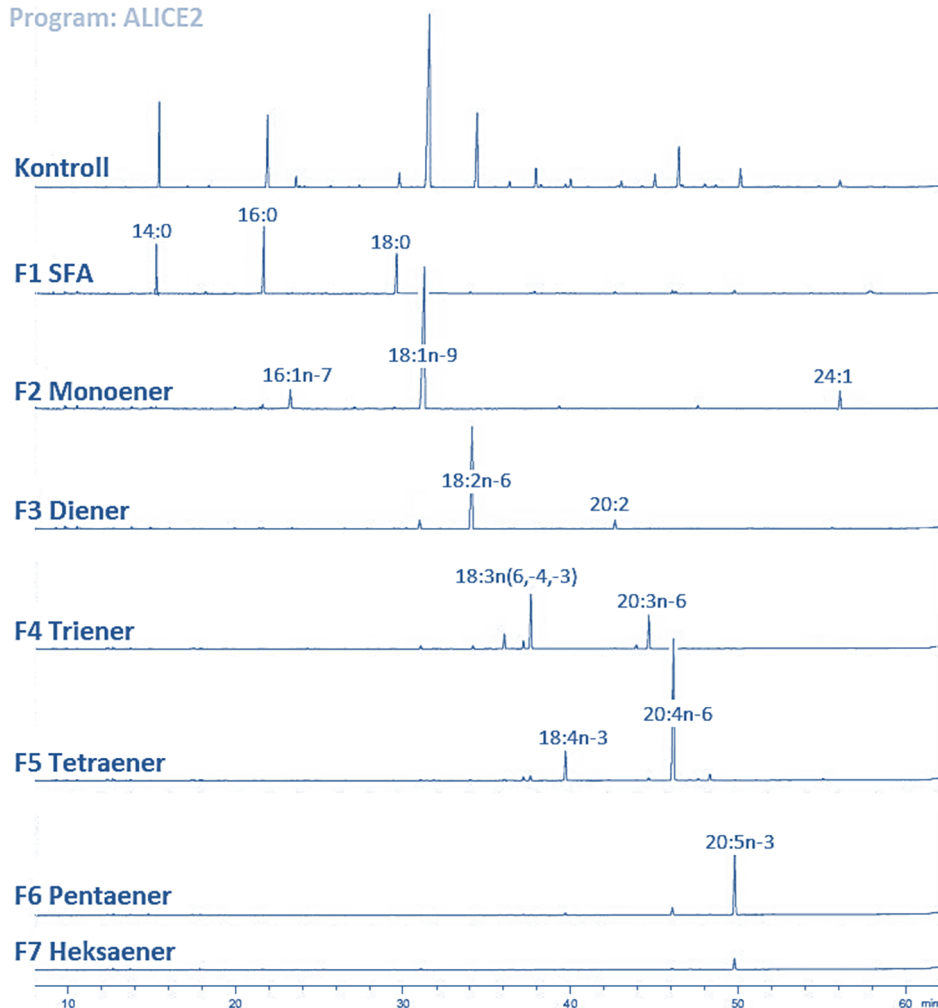
Fraksjonene fra *P. vulgata*, eller albuesnegl på norsk, viste en rekke andre fettsyrer enn de som var detektert i kiselalgene. Dette er forenelig med funnene beskrevet i tabell 7. For albuesnegl viser også fraksjonene identifikasjonen av andre fettsyrer enn de som er beskrevet i karakteriseringen av full prøve. Årsaken er som for *S. marinoi*, at fettsyrene er oppkonsentrerte i de respektive fraksjonene. Dermed blir det prosentvise innholdet høyt nok til at de kommer over deteksjonsgrensen i analysen (figur 18). Imidlertid kan enkelte av fettsyrene også sees som små sportopper i kromatogrammet fra full prøve (øverst i figur 18). Imidlertid er arealprosenten for de aktuelle fettsyrene er så lav i full prøve (under 0,5% av totalt fettsyreinnhold), at de ikke er inkludert blant fettsyrene i full prøve (Tabell 7).

Til sammenlikning med mikroalgematerialet er det ikke spor av noen 16:4 fettsyrer i albuesnegl. Imidlertid sees tre ulike 20:1 fettsyrer i fraksjon 2. Disse er vurdert til å være 20:1n-9, -7 og -5. Årsaken er at 20:1n-9 er kjent via standarder, der de to andre fettsyrene

kommer like etter, slik at n-konfigurasjonen passer med retensjonstiden. Disse uidentifiserte fettsyrene er også presentert i ulike settinger fra litteraturen. Blant annet er fettsyrene inkludert i fettsyrekarakteriseringen for ulike krepsdyr (Narciso og Morais, 2001; Yang *et al.*, 2016). Det er også en mulighet for at en eller flere av de ukjente fettsyrene, kan være 20:1n-15, -14, -13, -11, -9 eller -7. Dette fordi de fire førstnevnte også er beskrevet i marint råstoff, blant annet i andre mollusker (Dunstan *et al.*, 1993; Huynh *et al.*, 2007). Dersom dette er tilfellet vil de to sistnevnte fettsyrene opptre lengst bak av fettsyrene i figuren. Kromatogrammene fra albuesnegl viser også at de kommersielle standardene passer fint til høyerestående organismer med en mer «konvensjonell» fettsyreprofil.

GC-FID kromatogram av Ag^+ -SPE fraksjonert FAME fra sauetang

Program: ALICE2



Figur 19. GC-FID kromatogram av fraksjoner fra Ag^+ -SPE-fraksjonert sauetang (*P. canaliculata*).

I sauetang var det heller ikke identifisert 16:2 eller 16:4 som ble identifisert i mikroalgen. De øvrige fettsyrene var forholdsvis uproblematisk å bestemme via kjente standarder. Imidlertid finnes andre makroalger, som kan ha en fettsyreprofil som er mere lik mikroalger og dermed

inneholde 16:4 (Maehre *et al.*, 2014). Spesielt er dette fremtredende i grønnalger som *Ulva lactuca* (Maehre *et al.*, 2014). I figur 19, som viser kromatogrammene for de forskjellige fraksjonene fra sauetang, er det tilsynelatende rester av enkelte fettsyrer tilhørende fraksjonen før. Et eksempel på dette sees i fraksjon 3, hvor det er en meget liten topp som stemmer overens med elueringstiden til 18:1n-9. Dette er også gjeldende i fraksjon 7, hvor en liten EPA topp er påvist. Generelt kan det nevnes at denne tendensen til lekkasje til påfølgende fraksjon ble mer aktuelt fra tetraen-fraksjonen til pentaen-fraksjonen, og særlig fra pentaen-fraksjonen til heksaen-fraksjonen. Også her finnes flere fettsyrer i fraksjonene som havner under deteksjonsgrensen i full prøve, forårsaket av den tidligere diskuterte oppkonsentreringen av arealprosenten siden fraksjonen består av et svært lavt antall fettsyrer i lave konsentrasjoner.

4.3 Lipidklasser og SPE-fraksjonering

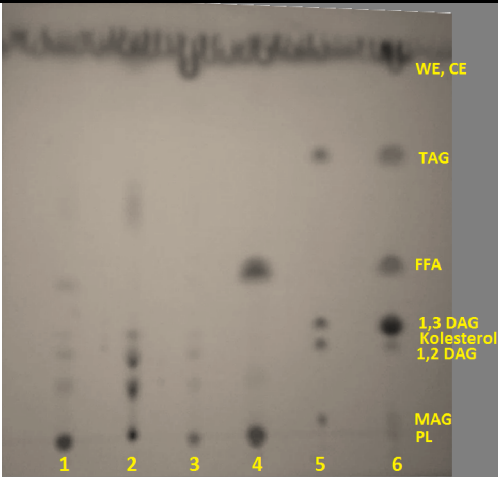
4.3.1 Utgangspunktet

For å bestemme fettclassesammensetningen i mikroalgeomaterialet ble to metoder utprøvd. Disse var henholdsvis Vaghela og Kilara, (1995)(tabell 8) og Dybvik *et al.*, (2008)(tabell 9). Begge metodene tar utgangspunkt i å fraksjonere lipider på bakgrunn av lipidklasser ved en aminopropylbasert SPE-kolonne, for så kontrollere lipidklassenes renhet i fraksjonene ved tynnsjiktskromatografi. Prinsippet for tynnsjiktskromatografi er at jo høyere polaritet en lipidforbindelse har, jo lengre ned kommer forbindelsen på tynnsjiktsplaten. Dermed vil de mest nøytrale lipidene vandre opp mot toppen av platen i elueringskammeret. De mer polare lipidene vil imidlertid holde seg nærmere appliseringspunktet. På bakgrunn av dette vil fosfolipider og øvrige lipider med høy polaritet ikke bevege seg opp langs platen i særlig grad med det elueringsmidlet som benyttes i elueringskammeret (Heptan:Dietyleter:eddiksyre 70:30:2 v/v) (Fuchs *et al.*, 2011). De ulike lipidklassene analyseres ved å sammenlikne prøvene med lipidklassestandarder som avsettes til side for prøvene som skal analyseres.

Polare lipider kan imidlertid også analyseres. Dette kan gjøres ved å benytte elueringsmiddel med høyere polaritet i elueringskammeret. På denne måten kan for eksempel fosfatidylcholine og fosfatidyletanolamin skilles og identifiseres (Fuchs *et al.*, 2011). En slik analyse er imidlertid ikke gjort i denne studien grunnet mangelen på egnede standarder.

Tabell 8. Oversikt over forsøk basert på Vaghela og Kilara (1995). Tabellen viser hva som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som forventes å dukke opp i fraksjonene, sammenliknet med hva som er observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktspalten for forsøket presentert, inkludert spornumrene med påfølgende resultat. Lipidprøven er av *P. glacialis* napsnummer 12662012, løst til 10mg/ml i DCM. 200 µl er injisert på kolonnen. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side.

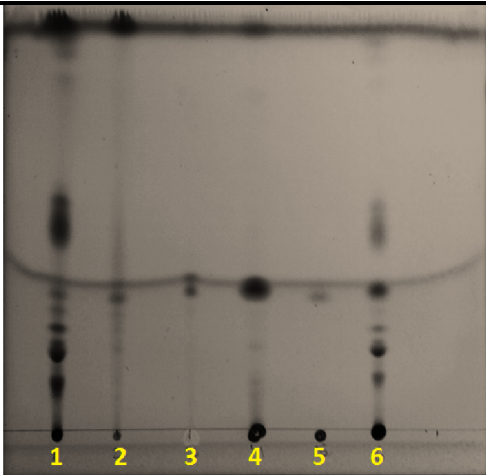
Protokoll basert på Vaghela og Kilara (1995). Kolonnen ble kondisjonert med 2:1 DCM:Isoprop.

Resultat fra tynnsjiktspalte	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	Full prøve	Full prøve	Mye PL
	2	F1 = 6 ml 2:1 DCM:Isopropanol	NL	NL, 1,2 DAG GL, PL
	3	F2 = 6 ml 98:2 Dietyleter:Eddiksyre	RNL, FFA	PL, GL, 1,2 DAG, CE/WE
	4	F3 = 6 ml metanol	PL	PL, FFA
	5	Standard, glyserider	Standard, glyserider	MAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG, TAG
	6	Standard, 16:1A	Standard, 16:1A	PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol, 1,3 DAG, TAG, Voks og kolesterylester

Tabell 8 viser metoden utviklet av Vaghela og Kilara (1995). Metoden baserer seg på et én-kolonnensystem og det viste seg at metoden ikke var spesielt godt egnet til å fraksjonere lipider med høyt innhold av polare lipider. Metoden var opprinnelig utviklet for myselipider som hovedsakelig inneholder nøytrale lipider som TAG (Vaghela og Kilara, 1995). Det denne platen stadfestet, var imidlertid den betydelige andelen fosfolipider tilstede i lipider fra *P. glacialis*. Dette kan være svært positivt i fôr, spesielt til fiskeyngel i oppdrettssammenheng. Årsaken er at det spekuleres i at de fleste fiskearter (fiskelarver og yngel) ikke har medfødt evne til å danne fosfolipider (Coutteau *et al.*, 1997). Dermed vil et fosfolipidrikt fôr kunne bidra til god vekst og utvikling i fiskeyngel (Tocher *et al.*, 2008). Hvor det angår resultatene fra platen ser man imidlertid at de benyttede elueringsmidlene ikke hadde optimal polaritet for

å fraksjonere lipidene fra *P. glacialis*. Dermed ble de påfølgende resultatene på tynnsjiktplate urene. Dette kan studeres ved å se framtrædende fosfolipidflekker i alle sporene på platen (tabell 8). På bakgrunn av dette kunne ikke denne protokollen benyttes til å isolere lipidklassene i råstoffet. Bemerk at forkortelsene i tabellen betyr følgende: CE, kolesterylester. WE, voksester. 1,2 DAG, diacylglyserol med fettsyrer i posisjon 1 og 2. 1,3 DAG diacylglyserol med fettsyrer i posisjon 1 og 3.

Tabell 9. Forsøk basert på protokoll fra Dybvik et al., (2008). Tabellen viser hva som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som forventes å dukke opp i fraksjonene, sammenliknet med hva som er observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert, inkludert spornumrene med påfølgende resultat. Lipidprøven er av *P. glacialis* napsnummer 12662012, løst til 10mg/ml i DCM. 200 µl er injisert på kolonnen. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side. Spor 5 er en testfraksjon for å kartlegge om det var mer lipider igjen etter fraksjon 2.

Dybvik et al., (2008). Kolonne kondisjonert med 2:1 DCM:Isoprop.				
Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1,1: 6 ml 2:1 DCM:Isopropanol	NL	«full prøve»
	2	F1,2: 6 ml 98:2 Dietyleter:Eddiksyre	FFA	PL, FFA, NL
	3	F1,3: 6 ml 6:1 MeOH:DCM+0,05m natriumacetat	PE	PL (hvit), FFA
	4	F2: 6:1 MeOH:DCM	PC	PL, 1,2 DAG, FFA
	5	Test (F3): 6 ml 6:1 MeOH:DCM+0,05m natriumacetat	Potensielt mer PL	PL, FFA
	6	Full prøve	Mye PL	Mye polare lipider

Tabell 9 viser plate, elueringsmidler, fraksjoner med påfølgende appliseringsspor fra forsøk basert på protokollen beskrevet av Dybvik et al., (2008). Denne protokollen er opprinnelig utviklet for torskeroegn, som har et høyt innhold av fosfolipider og dermed kunne metoden i teorien være aktuell for å fraksjonere lipider fra mikroalgene. Metoden baserer seg på et to-

kolonnesystem der fraksjon 1 var 2:1 DCM:Isopropanol+1% eddiksyre. Denne ble dampet inn og satt på ny kolonne (kolonne b), som var kondisjonert med 2:1 DCM:Isopropanol. Elueringsmidlene var også i denne protokollen ikke optimale for å få en ønsket fraksjonering. Fosfolipider var også her framtrede i alle fraksjoner.

4.3.2 Metodeutvikling

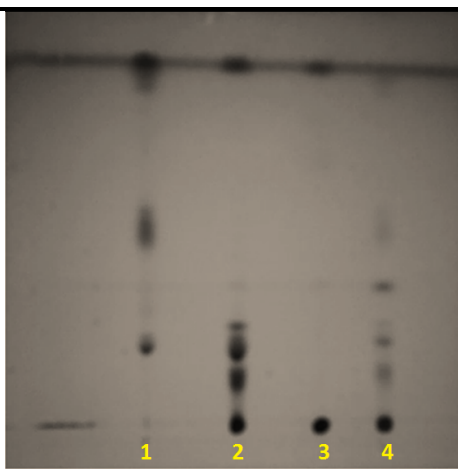
De overnevnte to protokollene var utgangspunktet for lipidklassifiseringen i oppgaven. Imidlertid viste de seg lite egnet som protokoller for mikroalgemateriale (figurene i tabell 8 og 9). Dermed dannet disse metodene grunnlaget for et omfattende og møysommelig arbeid, med å utvikle og optimalisere en protokoll som var tilpasset det undersøkte prøvematerialet fra *P. glacialis*. Resultatene fra de to omtalte protokollene ble benyttet som bakgrunn og utgangspunkt for den videre metodeutviklingen.

Tabell 10. Utviklingstrinn som evnet å isolere nøytrale lipider. Tabellen viser hva som er applisert på platens spornnummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som forventes å dukke opp i fraksjonene, sammenliknet med hva som er observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert, inkludert spornnumrene med påfølgende resultat. Lipidprøven er av *P. glacialis* napsnummer 12662012, løst til 10mg/ml i DCM. 200 µl er injisert på kolonnen. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side.

Utviklingstrinn, system med en kolonne. Kolonnen er kondisjonert med 6 ml heptan.				
Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1= 6 ml 1:1 DCM:Isooktan	NL	NL
	2	F2= 6 ml 60.30:10 DCM: Isooktan: Isoprop.	RNL, GL, PE	RNL, GL, PE,
	3	F3= 6 ml Metanol	PC	PC, GL, FFA
	4	Full prøve	Mye PL	Som forventet
	5	Standard, glyserider	Standard, 16:1A	MAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG, TAG
	6	Standard, 16:1A	Standard, 16:1A	PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol 1,3 DAG, TAG, WE/CE

En av platene som var viktig i utviklingen av en endelig metode er presentert i tabell 10. Platen var et gjennombrudd i metodeutviklingen siden elueringsmidlet og volumet i fraksjon 1 (spor 1 i figuren over) ga nøytrale lipider uten innslag av PL. Imidlertid var fraksjon 3 uren, der både noe FFA og anslagsvis GL dukket opp. Dette viste at fraksjon 2 ikke hadde nok styrke eller volum til å løse ut disse lipidene (Tabell 10). På bakgrunn av resultatene, var neste trinn i metodeutviklingen å oppjustere elueringsmidlene i fraksjon 2 i henhold til nødvendig polaritet. Det som vurderes til GL er de forbindelsene som havner mellom MAG og 1,2 DAG på platene. WE er voksester, og CE er kolesterylester.

Tabell 11. Eksempel på metodeutviklingstrinn. Denne tabellen viser systemet som videre ble utgangspunktet for en protokoll basert på to kolonner. Tabellen viser hva som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som forventes å dukke opp i fraksjonene, sammenliknet med hva som er observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert, inkludert spornumrene med påfølgende resultat. Lipidprøven er av *P. glacialis* napsnummer 12662012, løst til 10mg/ml i DCM. 200 µl er injisert på kolonnen. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skematisk presentert ved tabellens høyre side.

Utviklingstrinn, énkolonnensystem. Kolonne kondisjonert heptan.				
Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1= 6 ml 1:1 DCM:Isooktan	NL	NL
	2	F2= 6 ml 4:1DCM: Isopropanol	RNL, GL, PE,	RNL, GL, PE, FFA
	3	F3= 6 ml Metanol	PC	PC
	4	Full prøve	Mye PL	Som forventet

Etter at flere oppjusterte elueringsmidler var forsøkt, ble 4:1 DCM:Isopropanol utprøvd som elueringsmiddel i fraksjon 2 (Tabell 11). Dette viste seg å være et viktig ledd i metodeutviklingen. Denne protokollen ble dermed det siste forsøket basert på énkolonnensystemet til Vaghela og Kiara (1995). Resultatene fra protokollen i tabell 10 viste at nøytrale lipider ble isolert ved fraksjon 1 (spor 1, tabell 11) og PC samlet i fraksjon 3 (spor 3).

Dermed inneholdt de tre fraksjonene de lipidklassene de var estimert til å inneholde. Denne protokollen ble brukt videre som et grunnlag for et to-kolonnesystem, basert på protokollen til Dybvik et al., (2008).

Tabell 12. Tabellen viser et to-kolonnesystem som var viktig under utviklingen av endelig metode. Systemet er en videreføring på bakgrunn av resultatene i tabell 11. Tabellen viser hva som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som forventes å dukke opp i fraksjonene, sammenliknet med hva som er observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert, inkludert spornumrene med påfølgende resultat. Kolonne A er kondisjonert heptan og kolonne B med 2:1 DCM:Isooktan. Lipidprøve er av *P. glacialis* napsnummer 12662012 løst til 10 mg/ml i DCM. 200 µl er injisert på kolonnen. Fraksjon 2 ble tørket og løst i 200 µl 2:1 DCM:Isooktan, før dette ble injisert på kolonne B. Fraksjonene fra kolonne B vises som 2,1-2,3. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side.

Presentasjon av utviklingstrinn, to-kolonnesystem.

Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1= 6 ml 1:1 DCM:Isooktan	NL	NL
	2	F2,1 = 6 ml 3:1 DCM:Isooktan.	RNL, GL	RNL, GL 1,2 DAG, 1,3 DAG evt kolesterol
	3	F2,2= 6 ml 98:2 Dietyleter:eddiksyre	FFA	FFA, DAG evt kolesterol, GL
	4	F2,3 = 6 ml 6:1MeOH:DCM + 0,05m natriumacetat	PE/PG	PE, PG, GL, 1,2 DAG, FFA
	5	F3 = 6 ml MeOH	PC	PC, FFA
	6	Full prøve	Full prøve	Som forventet
	7	Standard, Glycerider	Standard, Glycerider	MAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG, TAG

8	Standard, 16:1A	Standard, 16:1A	PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol 1,3 DAG, TAG, Voks og kolesterylester
---	-----------------	-----------------	-----------------------------------------------------------------------------------

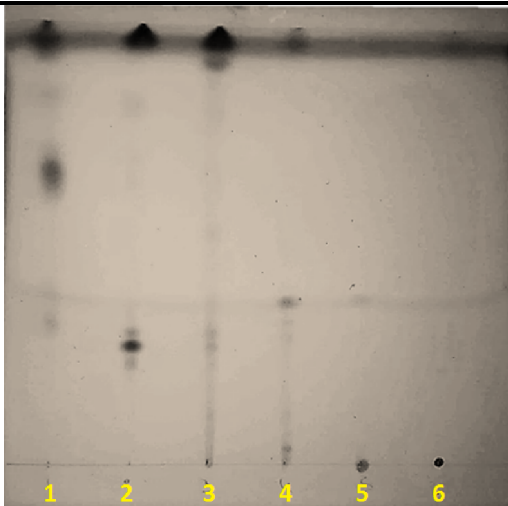
Tabell 12 viser en oversikt over protokoll og resultat fra et videreutviklet oppsett fra tabell 11. Utviklingstrinnet i dette forsøket baserer seg på et to-kolonnensystem. Fraksjon 2 (fra kolonne 1) ble dampet inn, løst i DCM før den ble satt på kolonne 2 (prekondisjonert med 2:1 DCM:Isooktan). Elueringsmidlene brukt i denne protokollen bidro til at fire av fem fraksjoner ble vurdert som akseptable (men ikke perfekte). Fraksjon 2,3 (tredje fraksjon fra kolonne 2) inneholdt noe som er vurdert som GL samt noe FFA (Spor 4). En liten FFA flekk var også tilstede i spor 5, som vel og merke var forventet å kun bestå av PC.

På grunn av minkende tilgjengelig prøvemateriale av *P. glacialis*, ble varmebehandlet albuesnegl (*P. vulgata*) forsøkt i dette oppsettet. Disse prøvene viste seg å ha liknende andel polare lipider som *P. glacialis*, der oppsettet fra tabell 12 også viste liknende resultater som er presentert i tabell 12. Selvsagt var lipidprofilen ulik, men fordelingen nøyttalt/polart fett var tilsvarende i fraksjonene. Årsaken til at varmebehandlet albuesnegl ble foretrukket, var at varmebehandlingen hadde inaktivert lipaser og fosfolipaser. I det albuesneglmaterialet som ikke var varmebehandlet var det kun detektert PL og FFA i lipidprofilen. Dette hentydet at enzymene hadde vært aktiv under langtidslagringen for denne prøvegruppen.

Protokollen presentert i tabell 12 var som diskutert ikke optimal for å isolere alle lipidklassene i *P. glacialis*. Videreutviklingen fra dette forsøket ble basert på en økt mengde eller styrke i elueringsmiddel 3,1 og 3,2. Dette viste seg lettere sagt enn gjort, der en rekke forsøk med ulike elueringsmidler ble utført. De videreførte utviklingsforsøkene ble gjort med albuesnegl, der *P. glacialis* ble forsøkt i de mest lovende protokollene. En tendens var imidlertid at mer fosfolipider ble fraksjonert ut i disse oppjusterte fraksjonene, sammen med glykolipider for *P. glacialis*. Hvilke form for fosfolipider dette var kan ikke fastslås, men fosfoglycerol (PG) er en kandidat, siden litteraturen antyder at PG ofte finnes i kloroplastenes membraner sammen med glykolipider i mikroalger (Berge *et al.*, 1995). Dette kan imidlertid ikke fastslås uten at en HP-TLC analyse for polar fase ikke er utført. Årsaken til at et slikt forsøk ikke er utført er fordi aktuelle standarder ikke var tilgjengelig i denne fasen av forsøksperioden.

Tabell 13. Siste utviklingstrinn og endelig protokoll. Lipidprøven er fra varmebehandlet albuesnegl. Dette er samme protokoll som er presentert i tabell 3 og figur 11 (metodekapittelet). Tabellen viser hvilken fraksjon som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som var forventet å dukke opp i fraksjonene sammenliknet med hva som faktisk ble observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktspalten for forsøket presentert. Lipidprøven besto av 1 mg *P. vulgata* (løst i 5 mg/ml DCM). 200 µl lipidprøve er injisert på kolonne A. Denne kolonnen var kondisjonert med heptan, mens kolonne B var kondisjonert med DCM. Fraksjon 3 ble tørket og løst i 200 µl DCM, før dette ble injisert på kolonne B. Fraksjonene fra kolonne B vises som 3,1-3,3. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side.

Endelig metode, to-kolonnensystem. *P. vulgata*

Resultat fra tynnsjiktspalte	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1= 6 ml 1:1 DCM:Isooktan	NL	NL
	2	F2 = 6 ml 3:1 DCM:Isooktan.	RNL	1,2 DAG, 1,3 DAG, kolesterol
	3	F3,1= 6 ml DCM	RNL	RNL
	4	F3,2 = 9 ml 98:2 Dietylet.:eddiks.	FFA	FFA, MAG
	5	F3,3 = 6 ml MeOH	PE	PE (FFA)
	6	6 ml MeOH + 0,5m NaAcetat	PC	PC

Ved bruk av endelig metode ble de mest nøytrale lipidene isolert i fraksjon 1. Resterende mengde samt andre forholdsvis nøytrale lipider ble også isolert i fraksjon 2 (slik som 1,2- og 1,3 DAG og noe kolesterol). Dette vises i platens spornummer 1 og 2. Ser man på spor 3 i figuren (tabell 13), kan man se lipidene isolert i fraksjon 3,1. Denne fraksjonen skulle i teorien inneholde forholdsvis polare lipider, men noe rester fra fraksjon 2 ses sammen med kolesterylester/voksester. Fraksjon 4 skulle inneholde frie fettsyrer, men noe MAG og andre forbindelser ble også framtrepende. Dette er fremstilt i figurens spor 4 i tabell 13. Fraksjon 5 inneholdt fosfatidyletanolamin og noe frie fettsyrer (se spor 5). Fraksjon 6 inneholdt det som er vurdert til fosfatidylcholin. Dette er det samme systemet som er vist i tabell 3 og figur 11 (metodekapittelet). Til forandring fra mikroalgeomaterialet finnes en solid flekk med TAG i *P.*

vulgata. Dette kan ses i spor 1 i figuren i (tabell 13). Imidlertid var TAG var nesten fraværende i mikroalgeomaterialet.

4.3.3 Endelig metode

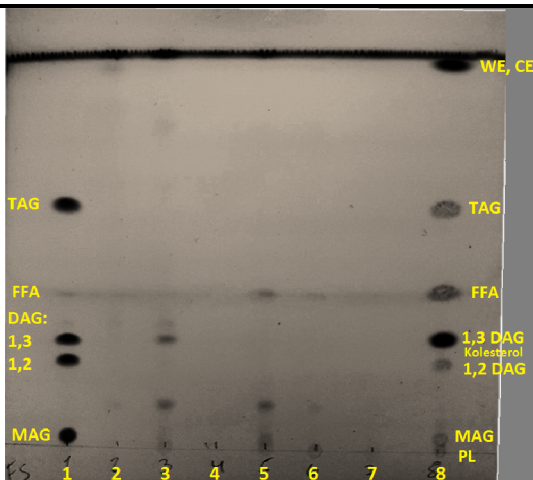
Tabell 14. Endelig protokoll. Lipidprøven er 1 mg sonikert *P. glacialis*, napisnummer 126602012 (løst til 5 mg/ml i DCM). Dette er samme protokoll som er presentert i tabell 3 og figur 11 (metodekapittelet). Tabellen viser hvilken fraksjon som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som var forventet å dukke opp i fraksjonene sammenliknet med hva som faktisk ble observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktspalten for forsøket presentert. 200 µl lipidprøve er injisert på kolonne A. Denne kolonnen var kondisjonert med heptan, mens kolonne B var kondisjonert med DCM. Fraksjon 3 ble tørket og løst i 200 µl DCM, før dette ble injisert på kolonne B. Fraksjonene fra kolonne B vises som 3,1-3,3. Sporene som er anvist på platen med de appliserte fraksjonene/elueringsmidlene er skjematisk presentert ved tabellens høyre side.

Endelig protokoll, sonikert <i>P. glacialis</i>				
Resultat fra tynnsjiktspalte	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	F1= 6 ml 1:1 DCM:Isooktan	NL	NL
	2	F2 = 6 ml 3:1 DCM:Isooktan.	RNL	RNL
	3	F3,1= 6 ml DCM	RNL, GL	GL, FFA
	4	F3,2 = 9 ml 98:2 Dietylet.:eddiks.	FFA	FFA, GL, PG, FFA, DAG
	5	F3,3 = 6 ml MeOH	PE	PE (FFA)
	6	F4= 6 ml MeOH + 0,5m NaAcetat	PC	PC

For *P. glacialis* fungerte den endelige sammensetningen av elueringsmidler forholdsvis godt. Som presentert i tynnsjiktspalten (tabell 14), er fosfolipider helt fraværende i fraksjon 1, 2, og 3,1. Dette kan observeres ved å se på spor 1, 2, og 3 på platen i tabellen. Noe fosfolipider er imidlertid funnet i fraksjon 3,2 sammen med glykolipider, og anslagvis DAG og kolesterol (se spor 4). Fosfolipidene fra denne fraksjonen vurderes som tidligere diskutert til fosfatidylglycerol. Bemerk at fosfolipidflekken i spor 5 er estimert til å inneholde fosfatidyletanolamin, mens fosfolipidflekken i spor 6 sannsynligvis er fosfatidylcholine. Disse

to sistnevnte vurderingene er gjort med bakgrunn i hva som er forventet fra protokollen beskrevet av Dybvik et al., (2008). Imidlertid er dette antakelser, ettersom en polar-fase HP-TLC også her ikke er utført for fraksjonene. Det er også verd å merke seg at det er noe FFA og noe voksester/kolesterylestere finnes i spor 5, selv om fraksjonen i utgangspunktet kun skulle inneholde PE. Funnene i spor 5 stammer fra fraksjon 4.

Tabell 15. Endelig protokoll. Lipidprøven er 1 mg sonikert *C. furcellatus* (løst til 5 mg/ml i DCM). Dette er samme protokoll som er presentert i tabell 3 og figur 11 (metodekapittelet). Tabellen viser hvilken fraksjon som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som var forventet å dukke opp i fraksjonene sammenliknet med hva som faktisk ble observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert. 1 mg lipider (200 µl lipidløsning) er injisert på kolonne A. Denne kolonnen var kondisjonert med heptan, mens kolonne B var kondisjonert med DCM. Fraksjon 3 ble tørket og løst i 200 µl DCM, før dette ble injisert på kolonne B. Fraksjonene fra kolonne B vises som 3,1-3,3. Sporene som er anvist på platen med de medfølgende fraksjonene/elueringsmidlene er skematisk presentert ved tabellens høyre side.

Endelig protokoll, sonikert <i>C. furcellatus</i>				
Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	Standard, glyserider	Standard, glyserider	MAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG, TAG
	2	F1 = 6 ml 1:1 DCM:Isooktan.	NL	NL (lite)
	3	F2= 6 ml 3:1 DCM:Isooktan	RNL	PL, MAG, 1,3 DAG, GL
	4	F3,1 = 6 ml DCM	RNL, GL	Blank
	5	F3,2= 9 ml 98:2 Dietylet.:eddiks.	FFA	PL, MAG, GL, FFA
	6	F3,3= 6 ml MeOH	PE	PE, GL, FFA
	7	6 ml MeOH + 0,5m NaAcetat	PC	PC (lite)
	8	Standard, 16:1A	Standard, 16:1A	PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol 1,3 DAG, TAG, Voks og kolesterylester

Som en ser i tabell 15 fungerte ikke sammensetningen av elueringsmidler brukt i den endelige protokollen optimalt for *C. furcellatus*. Dermed er ikke fraksjonene fullstendig rene, slik at uforventede lipider finner sted i de fleste sporene (tabell 14). Dette manifesterer et behov for individuelle metodiske tilpasninger basert på denne arten. Ser man på spor 2 og 7 (elueringsfraksjon 1 og 4) er disse rene. Imidlertid er spor 4 nærmest blankt. Dette sporet

skulle i teorien fremvise middelpolare lipider (fraksjon 3,1), men elueringsmidlene har ikke evnet å løse de ut. De mellompolare lipidene har imidlertid dukket opp i fraksjon 3,2 og 3,3, sammen med FFA og PL. Dette er observerbart i spor 5 og 6. Vel og merke skulle ikke fraksjon 3,2 (Spor 5) inneholde FFA og fraksjon 3,3 (spor 6) skulle ikke inneholde PL.

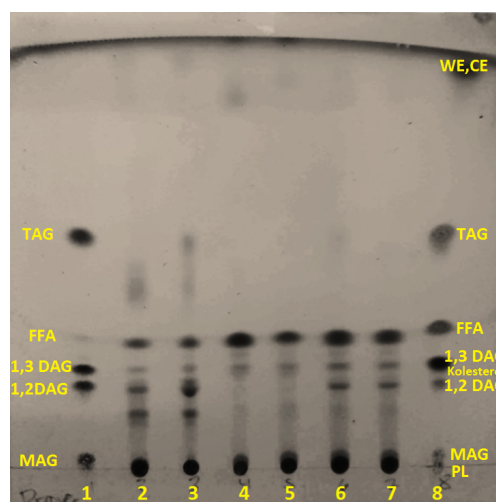
C. furcellatus inneholder svært beskjedne mengder TAG. Noe 1,3 DAG eller kolesterol er synlig i spor 3. Noe MAG kan også skimtes i spor 3 og 5. Imidlertid er det noe polare lipider som ikke kan identifiseres med de appliserte standardene. Disse har høy polaritet, og passer således i profilen til glykolipider (havner mellom MAG og 1,2 DAG på tynnsjiktspalten). På bakgrunn av dette anslås disse å være uidentifiserte varianter av glykolipider.

Tabell 16. Endelig protokoll. Lipidprøven er 1 mg sonikert *S. marinoi* (løst til 5 mg/ml i DCM). Dette er samme protokoll som er presentert i tabell 3 og figur 11 (metodekapittelet). Tabellen viser hvilken fraksjon som er applisert på platens spornummer. I tillegg vises benyttede elueringsmidler for de ulike fraksjonene. Tabellen viser også hvilke lipidklasser som var forventet å dukke opp i fraksjonene sammenliknet med hva som faktisk ble observert. Ved tabellens venstre side er tynnsjiktplate for forsøket presentert. 1 mg lipider (200 µl lipidløsning) er injisert på kolonne A. Denne kolonnen var kondisjonert med heptan, mens kolonne B var kondisjonert med DCM. Fraksjon 3 ble tørket og løst i 200 µl DCM, før dette ble injisert på kolonne B. Fraksjonene fra kolonne B vises som 3,1-3,3. Sporene som er anvist på platen med de medfølgende fraksjonene/elueringsmidlene er skematisk presentert ved tabellens høyre side.

Endelig protokoll, sonikert <i>S. marinoi</i>				
Resultat fra tynnsjiktplate	Spor	Elueringsmiddel i fraksjon	Lipidklasser forventet	Lipidklasser observert
	1	Standard, glyserider	Standard, glyserider	MAG, 1,2 DAG, 1,3 DAG, TAG
	2	F1 = 6 ml 1:1 DCM:Isooktan.	NL	NL, PL, GL, 1,2 DAG
	3	F2= 6 ml 3:1 DCM:Isooktan	RNL	GL, kolesterol, PL
	4	F3,1 = 6 ml DCM	RNL, GL	Blank
	5	F3,2= 9 ml 98:2 Dietylet.:eddiks.	FFA	FL, MAG, GL, FFA
	6	F3,3= 6 ml MeOH	PE	PE, FFA
	7	6 ml MeOH + 0,5m NaAcetat	PC	PC
	8	Standard, 16:1A	Standard, 16:1A	PL, MAG, 1,2 DAG, Kolesterol 1,3 DAG, TAG, Voks og kolesterylester

Som ved *C. furcellatus*, fungerte ikke den endelige fraksjoneringsprotokollen optimalt på lipidene fra *S. marinoi*. Her var fraksjonene gjennomgående urene, der uforventede fettklasser stort sett dukker opp i sporene (tabell 16). Spor 7 er vel og merke et unntak, der det som er vurdert til fosfatidycholine er isolert. Imidlertid er det verd å notere seg at det ikke kom ut

glykolipider i de to siste fraksjonene, i motsetning til *C. furcellatus*. På en annen side ble det isolert fosfolipider i alle fraksjoner bortsett fra fraksjon 2 (spor 3). Også til forandring fra *C. furcellatus* kan noe TAG skimtes i *S. marinoi* (spor 2). En annen bemerkning er at spor 6 (fraksjon 3,3) er nesten blank, denne fraksjonen var forventet å inneholde PE. Spørsmålet er dermed om innholdet er spredt over øvrige fraksjoner, eller om arten inneholder lite PE. På bakgrunn av resultatene fra *S. marinoi* er ikke metoden fungerende, og det burde utvikles en sammensetning av elueringsmidler som evner å danne rene fraksjoner for denne arten. Årsaken til at elueringsmidlene ikke fungerte på *S. marinoi* og *C. furcellatus* er anslagsvis at disse artene har en ulik lipidklassefordeling sammenliknet med *P. glacialis*.

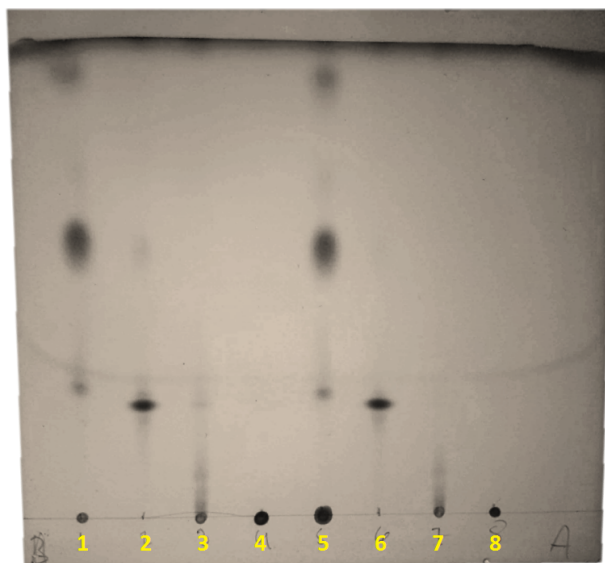


Figur 20. Sammenlikning av ubehandlede og sonikerte, men ufraksjonerte lipidprøver fra de undersøkte mikroalgeartene. På tynnsjiktplaten er følgende prøver applisert: Spor 1: Standard, glyserider. Spor 2: sonikert *glacialis*. Spor 3: Ubehandlet *glacialis*. Spor 4: Ubehandlet *furcellatus*. Spor 5: Sonikert *furcellatus*. Spor 6: Ubehandlet *marinoi*. Spor 7: Sonikert *marinoi*. Spor 8: Standard, 16:1A.

Sammenliknes ubehandlet og sonikert mikroalgemateriale (figur 20), ser man små forskjeller ved den relative fordelingen i lipidclassesammensetningen. For eksempel er fosfolipidflekken for *P. glacialis* og *C. furcellatus* større og kraftigere i de sonikerte prøvene. Imidlertid er dette vanskelig å definere objektivt sett. Man ser i tillegg en nedgang i mengden av de nøytrale lipider i det sonikerte materialet, noe som antakelig indikerer en høyere relativ andel polart fett i disse prøvegruppene.

På bakgrunn av de små forskjellene i fosfolipidflekkene i figur 20, skulle fraksjonert mikroalgematerialet i utgangspunktet dampes inn under nitrogen og veies. På denne måten kunne prosentandelen av de ulike fraksjonene i teorien kvantifiseres på bakgrunn av vekten til full prøve, med eller uten forbehandling. I tillegg var tanken at det økte fettutbyttet forbehandlingsteknikkene sto for, kunne kvantifiseres ved å sammenlikne det prosentvise

innholdet fra hver fraksjon mellom ubehandlet og forbehandlet prøve. Ideen bak det hele var å utvikle en metode på de små kolonnene (6 ml), for så å kjøre metoden på store NH₂-SPE kolonner (20 ml). Imidlertid hadde de store kolonnene ulike bindegenskaper enn de små, slik at fraksjonene ikke ble rene med den sammensetningen i/av elueringsmidler som var utviklet for de små kolonnene. På dette tidspunktet av studien var det heller ikke tilstrekkelig mengde prøvemateriale tilgjengelig til å utvikle en egen metode til de store kolonnene. Som et alternativ ble metningspunktet til de små kolonnene utprøvd (figur, 21) for å se om man kunne tilsette mer lipider på de små kolonnene (tilstrekkelig stor mengde til å veies), men kolonnen tålte ikke særlig mer enn 1 mg fett. Dette fordelt på 3+3 fraksjoner utgjorde imidlertid så lav vekt at feilmarginen fra vekta og/eller kontaminasjon utgjorde mer enn lipidinnholdet i beholderne, slik at alle fraksjonene summert inneholdt større vekt lipider enn den mengden som var tilsatt på kolonnen. Dermed ble bare fettsyreprofilen i fraksjonene bestemt, uten å kunne si noe om prosentvis størrelse i fraksjonene. Imidlertid var dette skuffende, ettersom det var observerbar forskjell mellom lipidclassesammensetningen mellom ubehandlet og sonikert prøve.



Figur 21. Metningsforsøk for 6 ml SPE-kolonne. Kolonne to er i dette forsøket utelatt, fordi hensikten med forsøket var å se hvor mye lipider bindemiddelet i kolonne A kunne takle uten at den ble overbelastet. Til spor 1 til 4 ble 2,5 mg fett satt på kolonnen, mens det til sporene 5 - 8 ble satt på 5 mg fett. Spor 1 og 5 er fraksjon 1. Spor 2 og 6 er fraksjon 2. Spor 3 og 7 er fraksjon 3. Spor 4 og 8 er fraksjon 4. Figuren viser at kolonnen overbelastes allerede med 2,5 mg lipider. Dette manifesteres ved at fosfolipider kommer ut i fraksjon 1.

Det ble forsøkt å tilsette 2,5, 5, 10 og 20 mg lipider. Resultatene fra de to førstnevnte lipidmengdene er tatt med her (figur 21). Som en ser fra metningsforsøket, kunne ikke disse

aminopropyl-SPE kolonnene binde opp hverken 2,5- eller 5 mg lipider og det er tydelig innslag av fosfolipider i spor 1 og 5. Disse fraksjonene skal ikke inneholde fosfolipider (tabell 13). Noen lipidkonsentrasjoner mellom 1- og 2,5 mg ble imidlertid ikke forsøkt. Årsaken er at dette var verdiløst for dette forsøket, fordi en så lav totalvekt ikke lar seg veie. Derfor var også 2,5 mg også bare for illustrasjon.

Forsøket viste også at den endelige protokollen ikke var spesifikk nok for *S. marinoi* og *C. furcellatus*. Dermed ble fraksjonene ikke rene. Ubehandlet prøve og råstoff forbehandlet med UltraTurrax var også fraksjonert på bakgrunn av lipidklasser for alle mikroalgene. Tendensen var at tynnsjiktplatene med disse prøvegruppene ikke hadde utpreget objektiv forskjell kontra de som var forbehandlet med sonikering. Derfor er ikke resultatene fra disse presentert i studien.

4.4 Fraksjoner fra *P. Glacialis* med påfølgende innhold av ulike fettsyregrupper

Mikroalgeråstoffet som ble fraksjonert på bakgrunn av lipidklasser ble videre analysert i GC-FID. Fettsyreprofilen ble også her bestemt via tradisjonell karakterisering med kjente standarder, samt ved sammenlikning av Ag⁺-SPE fraksjonene. Under fettsyrekarakteriseringen av lipidklassefraksjonene ble imidlertid en rekke fettsyrer identifisert, som ikke samsvarte med fullprøvene; hverken ved den normale fettsyrebestemmelsen av metylerte fullprøver, eller under Ag⁺-SPE fraksjoneringen. Blant annet ble det detektert varierende innhold av 20:4n-6. I tillegg fantes spormengder av en rekke andre fettsyrer som har vært detektert i liten eller ingen grad, blant annet 22:5n-3, 20:4n-3, 20:3n-3 og 18:3n-4. En annen bemerkning er at prosentfordelingen innad i fraksjonene kunne være svært høy for SFA, der tendensen viste at disse summert var mye høyere enn i full prøve. I tillegg finnes til dels store prosentandeler stearinsyre, 18:0, som ikke har vært framtrædende tidligere. Årsaken er anslagsvis en oppkonsentrering av fettsyrer i prøvene samtidig som andelen av de kjente fettsyrene kunne synke eller forsvinne i enkelte fraksjoner. Dermed kvantifiserer GC-FID en prosentandel i henhold til andelen fettsyrer og mengden av disse i de ulike fraksjonene. Dette medførte at fettsyresammensetningen kan bli betydelig endret ettersom det innholdet som tidligere kunne være spormengder under 0,5%, nå kunne bli anrikt i de respektive fraksjonene. Dette var særlig inntreffende i henholdsvis *C. furcellatus* og *S. marinoi*. På bakgrunn av det overnevnte presenteres resultatene for *P. glacialis* ved fettsyregrupper. I tillegg er det konkrete prosentvise innholdet erstattet med tre poengvise prosentvisninger, som henviser i hvilken grad de respektive fettsyregruppene er representert (tabell 17).

Tabell 17. Fordeling av fettsyreklasser i de ulike fraksjonene av ubehandlet, UltraTurrax-behandlet og sonikert *P. glacialis*. (-) har under 1 % innhold. (+) Har 1-7 % innhold. (++) Har 7,1 til 15,9 % innhold. mens (+++) representerer over 16% innhold av de ulike fettsyreklassene

<i>P. glacialis</i> , ubehandlet						
	F1	F2	F3,1	F3,2	F3,3	F4
SFA	+++	+++	+++	+++	+++	++
MUFA	+	+	-	+	-	-
PUFA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
n-6	++	-	+	-	-	-
HUFA n-3	+++	++	++	+	++	+++
EPA+DHA	++	++	+	+	+	+++
<i>P. glacialis</i> , UltraTurrax						
	F1	F2	F3,1	F3,2	F3,3	F4
SFA	+++	+++	+++	+++	+++	++
MUFA	-	+	-	+	-	+
PUFA	+++	+++	+++	+++	++	+++
n-6	-	-	+	+	-	-
HUFA n-3	+++	++	++	+	+	+++
EPA+DHA	++	+	+	+	-	+++
<i>P. glacialis</i> , Sonikert						
	F1	F2	F3,1	F3,2	F3,3	F4
SFA	++	+++	+++	+++	+++	+
MUFA	+	-	-	+	-	+
PUFA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
n-6	+	++	-	-	+	+
HUFA n-3	+++	++	+++	++	+	+++
EPA+DHA	++	++	++	+	+	+++

Fettsyregrupperingene innad de ulike fraksjonene, viser at fraksjon 4 (PC) inneholder mest EPA+DHA. Dette vises ved at EPA+DHA stort sett er representert med lavere andel i de øvrige fraksjonene. Dette er logisk, ettersom EPA og DHA er sentrale membranlipider i det marine miljø. Alle de ulike forbehandlingsteknikkene resulterte i det samme bildet vedrørende EPA+DHA innholdet, altså at innholdet var mest framtrødende i fraksjon 4. De fraksjonene som hadde nest høyst EPA+DHA innhold var fraksjon 1, og fraksjon 2. Imidlertid var innholdet av EPA+DHA kun 3,8% i fraksjon 2 for materiale forbehandlet med UltraTurrax. Dette resulterte at denne fraksjonen ikke oppnår mer enn et plusstegn i tabell 17. Til sammenlikning var innholdet i samme fraksjon 8- og 10% i henholdsvis ubehandlet og sonikert materiale. Dermed oppnår begge disse prøvegruppene en poengscore på to plusstegn for fraksjonen.

Tabellen viser også at fraksjon 4 har relativt lavt innhold av SFA, sammenliknet med andre fraksjoner. Dette var framtrødende i alle forbehandlingsteknikkene. Et moment som kan

være verd å trekke fram, er at fraksjon 1 for alle forbehandlingsteknikkene har en angitt score på over 16% n-3 HUFA. Her er den noe usikre 16:4n-3 fettsyren inkludert og faktisk kan innholdet av denne fettsyren være opp mot 10 % alene. Fraksjonene 2, 3,1, 3,2 og 3,3 inneholder generelt mye SFA, der alle har over 16%.

Som tidligere beskrevet ble fraksjon 3,3 funnet å inneholde FFA og PE, der sistnevnte også er vanlig i celleveggen til mikroalgene. Derfor er det bemerkelsesverdig at innholdet av EPA+DHA i denne fraksjonen er under 7% for samtlige prøvegrupper. Noe annet som kan være interessant å bemerke, er at fraksjon 3,3 fra UltraTurrax-behandlet *P. glacialis* har et lavere PUFA innhold sammenlignet med de øvrige prøvegruppene. Det totale PUFA innholdet i denne fraksjonen var 14,9%, noe som medfører to plusstegn i tabellen. Til sammenlikning inneholdt de andre prøvegruppene i overkant av 20% PUFA, slik at disse fikk tre plusstegn i kategorien. Imidlertid er de fettsyrene som står for størsteparten av PUFA-innholdet i fraksjon 3.3, relativt korte diener. Altså fettsyrer med to dobbeltbindinger, der 16:2n-x og 16:2n-4 er framtrepende i denne fraksjonen. Dette er gjeldende for alle prøvegruppene av *P. glacialis*.

MUFA innholdet var også gjennomgående lavt i alle prøvegrupper for alle fraksjoner. Den største andelen er funnet i fraksjon 1 i sonikert *P. glacialis*. Imidlertid var dette innholder på 6,4%, noe som resulterte i et plusstegn i tabell 17. Til kontrast var MUFA-innholdet gjennomgående på om lag 10% i fullprøvene (tabell 5).

Tilsvarende fettsyreidentifikasjonen fra de ulike fettklassefraksjonene for *S. marinoi* og *C. furcellatus* er ikke presentert i oppgaven fordi disse resultatene var nokså sprikende og således både vanskelig å presentere og forklare. Årsaken er antakeligvis korrelert til at separasjonsprotokollen ikke evnet å isolere ut rene fraksjoner. Dermed ble ikke et mønster dannet for innholdet av fettsyregruppene i fraksjonene.

5 Generell diskusjon og oppsummering

I denne studien benyttes tre ulike kiselalgearter som kan være aktuelle i laksefôr. Artene er *Skeletonema marinoi*, *Chaetoceros furcellatus* og *Porosira glacialis*. Alle disse artene er vanlige i Nord-Atlanteren og i arktiske havområder, men det foreligger forholdsvis lite lipidanalyser på disse artene – spesielt hvordan ulike dyrkningsbetingelser påvirker lipidproduksjonen fra disse artene vil være interessant å få kartlagt ytterligere (Degerlund og Eilertsen, 2010). I senere tid har det vært et økt fokus på disse artene fra algegruppen ved Universitetet i Tromsø, og spesielt har fokuset vært rettet på *P. glacialis*. Denne arten har

også særlig blitt satset på i algegruppens dyrkningsanlegg ved Finnfjord i Troms. Kiselalgeartene i denne oppgaven er aktuelle siden de har potensiale til å kunne bidra til å redusere mangelen for marine oljer i havbruksnæringen, spesielt med tanke på at de inngår i en hittil lovende storskala dyrkning i industrielle bioraktorer.

5.1 Fettekstraksjonsmetode og forbehandling

Folch (1957) er en fettekstraksjonsmetode som i hovedsak er utviklet for animalsk råstoff. Imidlertid har ekstraksjonsmetoden vist god egnethet til andre råstoffopprinnelser fra det marine miljø, slik som makroalger (Maehre *et al.*, 2014), mikroalger (Griffiths *et al.*, 2010), blekksprut, fisk med flere (Iverson *et al.*, 2001). Vel og merke finnes flere aktuelle metoder for fettekstraksjon, slik som Bligh and Dyer (1959) og Soxhlet. Ekstraksjonsmetodene varierer stort sett på polariteten i løsemidler. Dermed bør de ulike ekstraksjonsmetodene i hovedsak være tilpasset lipidpolaritet i råstoffet man skal isolere fra (Fuchs *et al.*, 2011; Guckert *et al.*, 1988). Flere studier hentyder også at ekstraksjonsmetoder basert på Folchs metode evner å ha liten forskjell fra Bligh and Dyer (1959), eller gi et marginalt bedre utbytte enn Bligh and Dyer ved lipidekstraksjon fra mikroalgemateriale (Griffiths *et al.*, 2010; Ryckeboesch *et al.*, 2012). I tillegg har det vært antydning at Bligh and Dyer kan være en ugunstig ekstraksjonsmetode for mikroalgemateriale, siden metodens egnethet begrenses i materiale der lipidinnholdet kan overstige 10% (Guckert *et al.*, 1988). I denne oppgaven var tilgangen til mikroalgematerialet en stor begrensende faktor som satte rammene for hva som var gjennomførbart. Dermed ble Folchs metode gjennomført med enkelte modifikasjoner under fettekstraksjonen. Folch er imidlertid en middelpolar ekstraksjonsmetode som i teorien kan ekstrahere både polart og upolart fett. Etter resultatene fra tynnsjikt-kromatografien ble analysert, ble det imidlertid avdekket at mikroalgene inneholder mye polare lipider. På bakgrunn av dette kunne en sammenlikning av Folch's og Bligh and Dyer's metoder vært interessant mellom de aktuelle kiselalgeartene. Bligh and Dyer's metode kan på grunn av sin høyere polaritet i løsemiddelsammensetningen, sannsynligvis evnet å ekstrahere mer polart fett. På bakgrunn av at Bligh and Dyer er mer tilspisset mot polare lipider, kunne nok dette ført til en ulik fettclassesammensetning av de ekstraherte lipidene, som nok også kunne gitt både endret lipidinnhold og fettclassesammensetning. Fettsyresammensetningen kunne vært annerledes siden den største andelen av EPA+DHA viste seg i denne studien å være i de polare lipidene.

Det kunne også vært interessant å undersøke etanolekstraksjon, der etanol er svært polart og kan således være egnet for ekstraksjon av polare lipider (Moreau *et al.*, 2003). En eventuell etanolekstraksjon vil også være kommersielt attraktiv ved isolering av lipider fra

mikroalger, til bruk i oppdrettsfôr eller kosttilskudd. Dette fordi etanol er forholdsvis billig og har begrenset toksisitet. Dermed vil en etanolekstraksjon være fordelaktig i et kommersielt perspektiv. Både Bligh and Dyer's metode og etanolekstraksjon ville også vært meget interessant å undersøke i kombinasjon med de forbehandlingsteknikkene som er utprøvd i denne studien. I tillegg kunne flere forbehandlingsteknikker vært utprøvd, slik som morterknusing under flytende nitrogen, potter- elvehjemhomogenisering og mikrobølgeknusing. Disse parameterne bør undersøkes dersom framtidige studier kan skaffe til veie tilstrekkelige mengder med de aktuelle mikroalgene. Lipidinnholdet og fettsyresammensetningen er i alle fall meget lovende for alle de undersøkte artene i denne studien.

6 Konklusjon

De utprøvde forbehandlingsteknikkene hadde god effekt på lipidekstraksjon fra mikroalgene. Blant de utprøvde teknikkene hadde sonikering best effekt og resulterte i opptil 30% økning i lipidinnholdet. Imidlertid viste alle formene for celleruptur seg å ha god effekt på lipidutbyttet. Lipidene som er inkorporert i cellemembranen og assosiert med mikroalgens robuste cellevegg, ble tilgjengeliggjort som følge av forbehandlingstrinnene, slik at løsemidlene ekstraherte fettene mer effektivt. Vel og merke kan selvfølgelig intracellulært depotfett også ha bidratt til det økte ekstraksjonsutbyttet.

Kiselalgene inneholder mye n-3 HUFA og har et høyt innhold av EPA+DHA, mer spesifikt så er det EPA konsentrasjonen som er klart størst. Faktisk kunne innholdet av EPA være opp mot 30 ganger større enn innholdet av DHA. *C. furcellatus* og *P. glacialis* har relativt likt EPA+DHA innhold, men *P. glacialis* har mest n-3 HUFA og i enkelte prøver inneholdt disse godt over 50% n-3 HUFA. Disse to artene har også høyest prosentandel PUFA og det samlede PUFA-innholdet er opp mot 70 %. Med en slik fettsyreprofil vil lipidene fra kiselalgene, i sær fra *P. glacialis* og *C. furcellatus*, være svært godt egnet som n-3 og lipidkilde for laksefôrproduksjon. Disse lipidene inneholder også betydelige mengder n-3 fettsyrer, og kommer også godt ut sammenlignet med tradisjonell olje fra sild eller chilensk industrifisk (anchoveta). Det respektive innholdet av EPA+DHA i sild og anchoveta omlag 20 og 32 prosent (Mcgill og Moffat, 1992). Imidlertid er DHA innholdet mye høyere i de overnevnte fiskeoljene. Oljen i kiselalgartene *C. Furcellatus* og *P. glacialis* inneholder også mer EPA+DHA, samt lavere n-6 innhold enn det som er beskrevet i transgen vegetabil olje. Imidlertid kan en kombinasjon av olje fra transgene vegetabiler (til tross for at transgene

produkter til matproduksjon fortsatt er meget omdiskutert), kiselalger og industrifisk være fordelaktig med tanke på infrastrukturen i dagens samfunn. Imidlertid er mikroalgene en stor ikke-utnyttet ressurs, som kan bidra til å minske det globale underskuddet for fiskeolje. På denne måten kan mikroalger også bidra til å redusere dagens press på utsatte fiskebestander og terrestriske dyrkingsarealer. I tillegg kan mikroalgene bidra som en aktuell fôrressurs slik at det forventede framtidige økte fôrbehovet kan møtes. I tillegg kan mikroalger være høyaktuell for å sikre oppdrettslaksen som et bærekraftig produkt, også i årene som kommer.

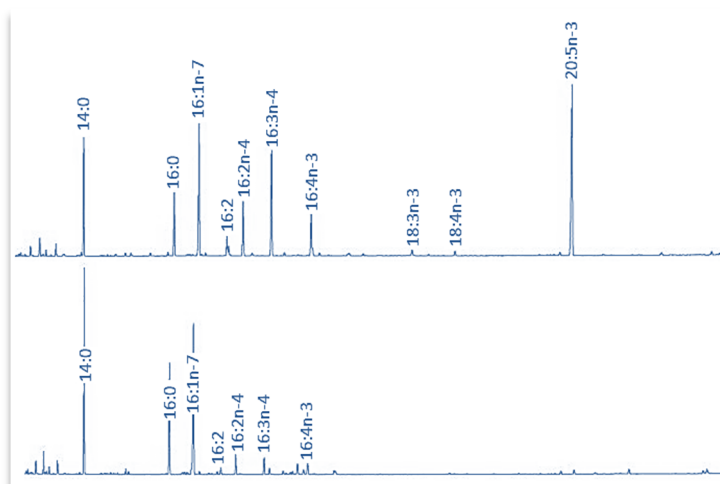
I de studerte kiselalgene finner man et svært lavt n-6 innhold. Dette gjør slik at n-6/n-3 forholdet nærmest er 0. Dermed kan en implementering av kiselalgeolje i laksefôr ikke bare reversere den synkende trenden med HUFA n-3, men også bidra til å redusere laksens n-6/n-3 forhold. I tillegg kan en olje basert på kiselalger i laksefôret gjenetablere en klar marin profil i laksens muskel, og sikre oppdrettslaks som en god kilde for helsefremmende sjømat. Som nevnt vil det være helt avgjørende å utvikle en god og industrielt økonomisk bærekraftig ekstraksjonsmetode for disse lipidene. Den økonomiske bærekraften i anvendelsen av mikroalgene vil også kreve at man i framtiden får etablert en effektiv stor-skala produksjon av mikroalgene. I tillegg bør proteinkvaliteten kartlegges, og det vil nok i tiden som kommer bli gjennomført en rekke studier av laksefôr med ulikt innslag av både intakte mikroalger og ekstraherte lipider og proteiner fra algen. Her vil nok en rekke aspekter være viktige å undersøke rettet mot fordøyelse og opptakseffektivitet av både lipider og proteiner fra mikroalger, samt sammenligne tilvekst og fiskevelferd mellom nye og eksisterende fôrsammensetninger.

Kiselalgeartene viste seg å inneholde svært mye polare lipider, der fosfolipider var framtrædende. Fosfolipider er spekulert i å ha bedre absorpsjon og opptak enn med tradisjonelle TAG-rike oljer i flere fiskearter (Tocher *et al.*, 2008), men resultatene er ikke entydige. Det ble også observert en del glykolipider i materialet. Det finnes imidlertid lite studier på ernæringsmessige kvaliteter ved inntak av disse i fisk. Fosfolipidene i *P. glacialis* viser seg også å inneholde majoritetsandelen av EPA+DHA. I overkant av 30 % av kiselalgens EPA+DHA innhold stammer fra fosfatidylcholine. Dermed kan en olje utvunnet fra *P. Glacialis* være godt egnet i fôr. Særlig til lakseparr og annen oppdrettsyngel, dette fordi flere fiskeyngelararter har behov for fosfolipidrik olje i fôret (Tocher *et al.*, 2008). Kiselalgens lipidklasseprofil viste at TAG nesten ikke var tilstede. Dette er i kontrast til utbredte oljekilder som diverse vegetabiliske oljer og industrifisk.

6.0 Videre arbeid

I denne studien ble de uidentifiserte fettsyrene delvis identifisert via Ag^+ -SPE fraksjonering. Imidlertid var de identifiserte fettsyrenes n-x kategorisering gjort på bakgrunn av hva som er funnet i andre mikroalgearter tidligere. Dermed bør en studie ved GC-MS gjøres for å stadfeste n-x antakelsen som er gjort. I tillegg kunne en metode vedrørende fast-fase separasjon på lipidklasser vært videre utviklet for *C. furcellatus* og *S. marinoi*. Det er også åpenbart at det vil være interessant å undersøke kiselalgeartenes øvrige næringsinnhold, spesielt med fokus på protein- og aminosyreanalyse. I tillegg ville det vært interessant å bestemme askeinnhold i mikroalgematerialet basert på kiselalgenes silikaskjelett. I tillegg kunne en lut-titrering være interessant, for å kvantifisere andelen frie fettsyrer i materialet. En videre analysering av hvilke fettklasser som står for økningen i utbyttet fra lipidekstraksjonen ville imidlertid vært svært nærliggende å undersøke. Her kunne alternative metoder vært utviklet for å kvantifisere hvorvidt en eller flere fraksjoner øker, satt i sammenheng med ubehandlet prøve. Dette kunne eventuelt også vært gjort ved GC-MS

Et oksidasjonsforsøk ville også vært interessant å gjennomføre. Litteraturen har vist motstridende resultater. Enkelte artikler anslår at lipider fra mikroalger har god lagringsstabilitet grunnet naturlig høyt innhold av karatenoider og øvrige antioksidanter. Andre artikler påpeker at det motsatte kan være tilfellet, siden det høye innholdet av klorofyll kan binde mye oksygen og dermed virke prooksidierende. I denne studien har ingen oksidasjonsforsøk vært gjennomført, men en bemerkning er at langtidslagring av frysetørket materiale ser ut til å kunne føre til et stort tap av flerumettede fettsyrer (figur 30).



Figur 22. Effekt på fettsyresammensetning ved langtidslagring av frysetørket *C. furcellatus* (lagret 10 måneder mørkt og tørt i romtemperatur). Langkjedete fettsyrer med fler enn 3 dobbeltbindinger er forsvunnet eller kraftig redusert.

Under denne lagringen var råstoff fra *C. furcellatus* frysetørket og oppbevart mørkt og tørt i romtemperatur. Råstoffet ble lagret fra starten av januar til slutten av oktober. Dette resulterte i at samtlige n-3 HUFA var kraftig redusert i relativt innhold parallelt med at prøvene inneholder en mye større andel 14:0 og 16:0 (figur 30). Dette er en faktor som gjør det helt avgjørende å studere hvordan man bør lagre det frysetørkede råstoffet, for å unngå degradering av de flerumettede fettsyrene. Eventuelt om det er mulig å gjøre andre grep slik som varmeinaktivering av enzymer, for å motvirke denne effekten under lagring.

Det vil som diskutert også være helt avgjørende å gjøre fôringsforsøk. Effekten av ulike innslag av kiselalger (lipider, proteiner eller intakte alger) i laksefôr bør kartlegges, både med tanke på lønnsomhet, hvor effektivt laksen kan benytte disse fôringsrediensene og hvordan dette eventuelt påvirker fiskehelse og -velferd.

6.1 Øvrig kommersiell nytteverdi

Et eventuelt kosttilskudd basert på de studerte kiselalgartene kunne introduseres som kosttilskudd. Kiselalgene er per definisjon ikke animalsk råstoff. Dette medfører at algene kunne vært et høyaktuelt omega-3 tilskudd, der det kunne vært solgt som nisjeprodukt. Målgruppen kunne blant annet vært veganere, der det i disse gruppene finnes et latent potensiale. Gruppen er også voksende (Radnitz *et al.*, 2015). Men her er det en nokså lang vei fram til eventuell lansering av et kommersielt kosttilskudd ettersom dokumentasjon av slike produkter må anskaffes.

7 Litteratur

1. Adkins Y, Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 21(9):781-92.
2. Andreassen O, Robertsen R (2014) Nasjonale ringvirkninger i havbruksnæringen. Tromsø: Nofima, 49/2014.
3. Armbrust EV (2009) The life of diatoms in the world's oceans. *Nature.* 459(7244):185-92.
4. Bang HO, Dyerberg J, Nielson AB (1971) Plasma Lipid and Lipoprotein Pattern in Greenlandic West-Coast Eskimos. *Lancet.* 1(7710):1143-&.
5. Behrman EJ, Gopalan V (2005) Cholesterol and plants. *J Chem Educ.* 82(12):1791-3.
6. Bell JG, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2003) Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil "wash out". *Aquaculture.* 218(1-4):515-28.
7. Bell JG, Tocher DR, Henderson RJ, Dick JR, Crampton VO (2003) Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J Nutr.* 133(9):2793-801.
8. Berge JP, Gouygou JP, Dubacq JP, Durand P (1995) Reassessment of Lipid-Composition of the Diatom, *Skeletonema-Costatum*. *Phytochemistry.* 39(5):1017-21.
9. Betancor MB, Sprague M, Usher S, Sayanova O, Campbell PJ, Napier JA, Tocher DR (2015) A nutritionally-enhanced oil from transgenic *Camelina sativa* effectively replaces fish oil as a source of eicosapentaenoic acid for fish. *Sci Rep-Uk.* 5.
10. Blish EG, Dyer WJ (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Phys.* 37(8):911-7.
11. Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otilar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kroger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jezequel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaut M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van De Peer Y, Grigoriev IV (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature.* 456(7219):239-44.
12. Calder PC (2014) Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur J Lipid Sci Tech.* 116(10):1280-300.
13. Cavonius LR (2016) *Fraction of lipids and proteins from the microalga Nannochloropsis oculata* Gothenburg, Sweden: Chalmers University of Technology.
14. Cavonius LR, Carlsson NG, Undeland I (2014) Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods. *Anal Bioanal Chem.* 406(28):7313-22.

15. Christie WW (2011) Solid-Phase Extraction Chromatography in the Silver Ion Mode Accessed: [29.02.2016]. Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=40352>.
16. Coupland K (2008) Stearidonic acid: A plant produced omega-3 PUFA and a potential alternative for marine oil fatty acids. *Lipid Technology*. 20(7):152-4.
17. Coutteau P, Geurden I, Camara MR, Bergot P, Sorgeloos P (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*. 155(1-4):149-64.
18. De Baar HJW (1994) von Liebig's Law of the Minimum and Plankton Ecology (1899-1991) *Progress in Oceanography*. 33:347-85.
19. Degerlund M, Eilertsen HC (2010) Main Species Characteristics of Phytoplankton Spring Blooms in NE Atlantic and Arctic Waters (68-80A degrees N). *Estuar Coast*. 33(2):242-69.
20. Devi MP, Subhash GV, Mohan SV (2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renew Energ*. 43:276-83.
21. Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM (1993) The Effect of Lyophilization on the Solvent-Extraction of Lipid Classes, Fatty-Acids and Sterols from the Oyster *Crassostrea-Gigas*. *Lipids*. 28(10):937-44.
22. Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM, Leroi JM, Jeffrey SW (1994) Essential Polyunsaturated Fatty-Acids from 14 Species of Diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*. 35(1):155-61.
23. Dybvik AI, Falch E, Rustad T (2008) Solid phase extraction as a tool to separate lipid classes and study deterioration of marine lipids. *J Aquat Food Prod T*. 17(1):39-59.
24. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Eur J Lipid Sci Tech*. 107(5):337-64.
25. Falciatore A, Bowler C (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu Rev Plant Biol*. 53:109-30.
26. Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. 281(5374):200-6.
27. FAO (1994) Figure 2,1: Diagram of fatty acids Accessed: [06.10.2016]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/V4700E/V4700E01.GIF>.
28. FAO (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
29. Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 281(5374):237-40.
30. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem*. 226(1):497-509.
31. Fuchs B, Suss R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J (2011) Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *J Chromatogr A*. 1218(19):2754-74.
32. Gjoen T, Obach A, Rosjo C, Helland BG, Rosenlund G, Hvattum E, Ruyter B (2004) Effect of dietary lipids on macrophage function, stress susceptibility and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem*. 30(2):149-61.

33. Griffiths MJ, van Hille RP, Harrison STL (2010) Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. *Lipids*. 45(11):1053-60.
34. Grosso G, Galvano F, Marventano S, Malaguarnera M, Bucolo C, Drago F, Caraci F (2014) Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*.
35. Guckert JB, Cooksey KE, Jackson LL (1988) Lipid Solvent Systems Are Not Equivalent for Analysis of Lipid Classes in the Microeukaryotic Green-Alga, *Chlorella*. *J Microbiol Meth*. 8(3):139-49.
36. Guschina IA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*. 45(2):160-86.
37. Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, Toner CD, Colombo J, Cunnane SC, Holden JM, Klurfeld DM, Morris MC, Whelan J (2009) Towards Establishing Dietary Reference Intakes for Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. *J Nutr*. 139(4):804s-19s.
38. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 125(1):189-&.
39. Hemaiswarya S, Raja R, Kumar RR, Ganesan V, Anbazhagan C (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microb Biot*. 27(8):1737-46.
40. Henriques J, Dick JR, Tocher DR, Bell JG (2014) Nutritional quality of salmon products available from major retailers in the UK: content and composition of n-3 long-chain PUFA. *Brit J Nutr*. 112(6):964-75.
41. Herold PM, Kinsella JE (1986) Fish Oil Consumption and Decreased Risk of Cardiovascular-Disease - a Comparison of Findings from Animal and Human Feeding Trials. *Am J Clin Nutr*. 43(4):566-98.
42. Huseby S, Degerlund M, Eriksen GK, Ingebrigtsen RA, Eilertsen HC, Hansen E (2013) Chemical Diversity as a Function of Temperature in Six Northern Diatom Species. *Mar Drugs*. 11(11):4232-45.
43. Huynh MD, Kitts DD, Hu C, Trites AW (2007) Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *Comp Biochem Phys B*. 146(4):504-11.
44. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH (2001) Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*. 36(11):1283-7.
45. Jensen IJ, Maehre HK, Tommeraas S, Eilertsen KE, Olsen RL, Elvevoll EO (2012) Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Bulletin*. 37:25-9.
46. Kristiansen S, Farbrot T (1991) Nitrogen Uptake Rates in Phytoplankton and Ice Algae in the Barents Sea. *Polar Res*. 10(1):187-92.
47. Kyst.no (2016) BioMar tar i bruk mikroalger Accessed: [08.10.2016]. Available from: <http://kyst.no/nyheter/biomar-tar-i-bruk-mikroalger/>.
48. Lebeau T, Robert JM (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl Microbiol Biot*. 60(6):624-32.
49. Legendre L (1990) The Significance of Microalgal Blooms for Fisheries and for the Export of Particulate Organic-Carbon in Oceans. *J Plankton Res*. 12(4):681-99.

50. Liland NS, Rosenlund G, Berntssen MHG, Brattelid T, Madsen L, Torstensen BE (2013) Net production of Atlantic salmon (FIFO, Fish in Fish out < 1) with dietary plant proteins and vegetable oils. *Aquacult Nutr.* 19(3):289-300.
51. Maehre HK, Jensen IJ, Eilertsen KE (2016) Enzymatic Pre-Treatment Increases the Protein Bioaccessibility and Extractability in Dulse (*Palmaria palmata*). *Mar Drugs.* 14(11).
52. Maehre HK, Jensen IJ, Elvevoll EO, Eilertsen KE (2015) omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. *Int J Mol Sci.* 16(9):22636-61.
53. Maehre HK, Malde MK, Eilertsen KE, Elvevoll EO (2014) Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *J Sci Food Agric.* 94(15):3281-90.
54. Mann DG, Vanormelingen P (2013) An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *J Eukaryot Microbiol.* 60(4):414-20.
55. Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 14(1):217-32.
56. McGill AS, Moffat CF (1992) A Study of the Composition of Fish Liver and Body Oil Triglycerides. *Lipids.* 27(5):360-70.
57. McGinn PJ, Dickinson KE, Bhatti S, Frigon JC, Guiot SR, O'Leary SJB (2011) Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynth Res.* 109(1-3):231-47.
58. Medlin LK, Kooistra WHCF, Gersonde R, Wellbrock U (1996) Evolution of the diatoms (Bacillariophyta) .2. Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Mol Biol Evol.* 13(1):67-75.
59. Mercer P, Armenta RE (2011) Developments in oil extraction from microalgae. *Eur J Lipid Sci Tech.* 113(5):539-47.
60. Metochis C, Crampton VO, Ruohonen K, Bell JG, Adams A, Thompson KD (2016) The effects of increasing dietary levels of amino acid-supplemented soy protein concentrate and constant dietary supplementation of phosphorus on growth, composition and immune responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem.* 42(3):807-29.
61. Miller MR, Nichols PD, Carter CG (2008) n-3 Oil sources for use in aquaculture - alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutr Res Rev.* 21(2):85-96.
62. Moreau RA, Powell MJ, Singh V (2003) Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *J Am Oil Chem Soc.* 80(11):1063-7.
63. Mussgnug JH, Thomas-Hall S, Rupprecht J, Foo A, Klassen V, McDowall A, Schenk PM, Kruse O, Hankamer B (2007) Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnol J.* 5(6):802-14.
64. Narciso L, Morais S (2001) Fatty acid profile of *Palaemon serratus* (*Palaemonidae*) eggs and larvae during embryonic and larval development using different live diets. *J Crustacean Biol.* 21(3):566-74.
65. Nifes (2014) Omega-3 og omega-6 i kostholdet Accessed: [10.05.2016]. Available from: <https://www.nifes.no/forskningstema/sjomat-og-helse/sjomat-og-kostholdet/omega-3-og-omega-6-i-kostholdet/>.

66. Norton TA, Melkonian M, Andersen RA (1996) Algal biodiversity. *Phycologia*. 35(4):308-26.
67. Olsen RL (2007) *Lipidkjemi med vekt på fisk*. Tromsø: UiT.
68. Patil V, Kallqvist T, Olsen E, Vogt G, Gislerod HR (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int*. 15(1):1-9.
69. Piepho M, Arts MT, Wacker A (2012) Species-Specific Variation in Fatty Acid Concentrations of Four Phytoplankton Species: Does Phosphorus Supply Influence the Effect of Light Intensity or Temperature? *J Phycol*. 48(1):64-73.
70. Ponomareako LP, Stonik IV, Aizdaicher NA, Orlova TY, Popovskaya GI, Pomazkina G, Stonik VA (2004) Sterols of marine microalgae *Pyramimonas* cf. *cordata* (Prasinophyta), *Attheya ussurensis* sp nov (Bacillariophyta) and a spring diatom bloom from Lake Baikal. *Comp Biochem Phys B*. 138(1):65-70.
71. Radnitz C, Beezhold B, DiMatteo B (2015) Investigation of lifestyle choices of individuals following a vegan diet for health and ethical reasons. *Appetite*. 90:31-6.
72. Reimann BE, Lewin JC, Volcani BE (1965) Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms. I. The Structure of the Cell Wall of *Cylindrotheca Fusiformis* Reimann and Lewin. *J Cell Biol*. 24:39-55.
73. Ryckebosch E, Muylaert K, Foubert I (2012) Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J Am Oil Chem Soc*. 89(2):189-98.
74. Sanden M, Liland NS, Saele O, Rosenlund G, Du SS, Torstensen BE, Stubhaug I, Ruyter B, Sissener NH (2016) Minor lipid metabolic perturbations in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) caused by suboptimal dietary content of nutrients from fish oil. *Fish Physiol Biochem*. 42(5):1463-80.
75. Shepherd CJ, Jackson AJ (2013) Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *J Fish Biol*. 83(4):1046-66.
76. Shepherd J, Bachis E (2014) Changing Supply and Demand for Fish Oil. *Aquacult Econ Manag*. 18(4):395-416.
77. Sierburth JM, Smetacek V, Lenz J (1978) Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limology and Oceanography*. 23(6):1256-63.
78. Simopoulos AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 56(8):365-79.
79. Sissener NH, Waagbo R, Rosenlund G, Tvenning L, Susort S, Lea TB, Oaland O, Chen L, Breck O (2016) Reduced n-3 long chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial production cycle in seawater. *Aquaculture*. 464:236-45.
80. Sjømatrådet (2016) Laks og ørret for 50 milliarder i 2015 Accessed: [08.08.2016]. Available from: <http://www.seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Laks-og-%C3%B8rret-for-50-milliarder-i-2015>.
81. Skretting (2016) Vekst i laksenæringen ikke lenger avhengig av tilgangen på fiskeolje Accessed: [01.11.2016]. Available from: <http://www.skretting.com/nb-NO/settings/news/general-news/vekst-i-laksenaringen-ikke-lenger-avhengig-av-tilgangen-pa-fiskeolje/>.

82. Sorensen M, Berge GM, Reitan KI, Ruyter B (2016) Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) - Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*. 460:116-23.
83. Stoffel W, Chu F, Ahrens EH (1959) Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography - Micromethod for Preparation of Methyl Esters. *Anal Chem*. 31(2):307-8.
84. Tacon AGJ, Metian M (2015) Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. *Rev Fish Sci Aquac*. 23(1):1-10.
85. Tocher DR (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*. 449:94-107.
86. Tocher DR, Bendiksen EA, Campbell PJ, Bell JG (2008) The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*. 280(1-4):21-34.
87. Torstensen BE, Froyland L, Lie O (2004) Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil - effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquacult Nutr*. 10(3):175-92.
88. Vaghela MN, Kilara A (1995) A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction (vol 72, pg 1117, 1995). *J Am Oil Chem Soc*. 72(12):1597-.
89. Vang B (2015) *Recovery and properties of oil from the copepod Calanus finmarchicus*: UiT.
90. Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip PI, Lazurca D, Mason TJ (1997) The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason Sonochem*. 4(2):135-9.
91. Volkman JK, Dunstan GA, Jeffrey SW, Kearney PS (1991) Fatty-Acids from Microalgae of the Genus *Pavlova*. *Phytochemistry*. 30(6):1855-9.
92. Wisconsin TUo (2010) Picture of a pennate and a centric diatom Accessed: [10.10.2016].
93. Yadugiri VT (2009) Milking diatoms - a new route to sustainable energy. *Curr Sci India*. 97(6):748-50.
94. Yang G, Li CL, Wang YQ (2016) Fatty Acid Composition of *Euphausia superba*, *Thysanoessa macrura* and *Euphausia crystallorophias* Collected from Prydz Bay, Antarctica. *J Ocean U China*. 15(2):297-302.
95. Ytrestoyl T, Aas TS, Asgard T (2015) Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*. 448:365-74.