



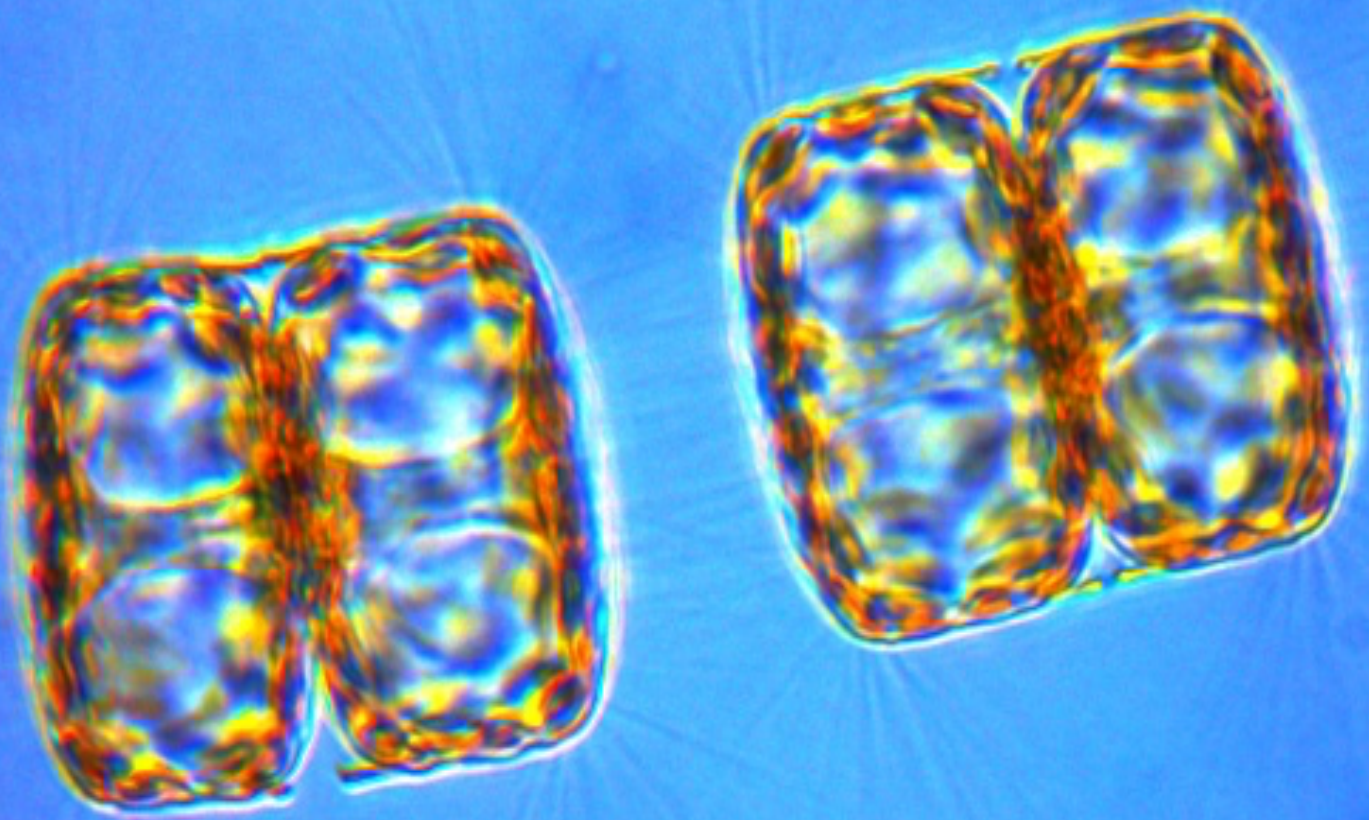
UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi.

In vitro* fordøyelse av fett fra kiselalgen *Porosira glacialis

Camilla Johnsen

*Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)
Mai 2021*



In vitro fordøyelse av fett fra kiselalgen *Porosira glacialis*

Camilla Johnsen

Master i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
UiT, Norges arktiske universitet

Tromsø
Mai 2021



Forsidebilde: *Porosira glacialis* (foto: Richard Ingebrigtsen)

Forord

Denne masteroppgaven er en avslutning på fem år på Norges fiskerihøgskole. Fem år som har gitt meg mye kunnskap, nye vennskap og noen grå hår.

Det er flere jeg må takke, men først og fremst må jeg takke veilederen min, Ragnar Ludvig Olsen. Tusen takk for god veiledning gjennom denne prosessen. Dine støttende og snille ord, samt smittende glade vesen har vært gull verdt dette året.

Jeg må også rette en stor takk til Guro Edvinsen og Tone Friis Aune for hjelp og veiledning på laboratoriet. Samt vil jeg takke Lars Dalheim og Jon Brage Svenning for å alltid stille opp når spørsmål dukker opp.

Tusen takk til mamma og pappa for all støtte i studietiden og takk til studievenner for fem flotte år, men da spesielt Rikke Stabell og Maren Lootz Aarthun. Hverdagen hadde ikke blitt det samme uten dere.

Tromsø, mai 2021

Camilla Johnsen

Sammendrag

Behovet for fett som inneholder langkjedede omega-3 fettsyrer i fiskefôr og helsekostprodukter har økt. Fiskeolje som tradisjonelt har blitt brukt i disse produktene er mangelvare og mange har foreslått at primærprodusentene, marine mikroalger, kan dyrkes og brukes til slike formål. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om fett i mikroalgen *P. glacialis*, kan fordøyes i et *in vitro* fordøyelsessystem med pancreatin fra svin. I utgangspunktet skulle lipidspaltende enzymer fra blindsekker undersøkes, men å ekstrahere slike fra blindsekker mislykkedes.

Biomassen av mikroalger som er brukt i denne oppgave, hadde et høyt innhold av vann (91%) og aske (4,3%), men et lavt fettinnhold (6,3%) på tørrstoffbasis eller 0,6% av våtvekt. Det lave innholdet kan forklares med vekstfasen til mikroalgen. Innholdet av LC-PUFA n-3 i *P. glacialis* besto i hovedsak av 30% EPA og 5% DHA. Det ble påvist et høyt innhold av C16 PUFA som er unikt for de lavere nivåene i næringskjeden i havet. Fett ekstrahert fra *P. glacialis* hadde et høyt innhold av frie fettsyrer som også er observert av andre. Fett i både frysetørket og våt intakt *P. glacialis* ble fordøyd av pancreatin og det viste at det våte materialet ble lettere fordøyd enn det frysetørkede. Triacylglycerol spaltes raskere *in vitro* med pancreatin til frie fettsyrer enn de polare lipidklassene monogalaktosyldiacylglycerol, digalaktosyldiacylglycerol og fosfatidylglyserol fra kloroplastmembraner.

Basert på resultatene kan man konkludere med at våt intakt *P. glacialis* blir lettere fordøyd enn frysetørket *P. glacialis*. I fiskefôr vil det antakelig kunne være bedre å inkludere våt biomasse av mikroalger siden det er så vanskelig å ekstrahere fett på en enkel måte.

Summary

The need for fat that contains long-chain omega-3 fatty acids in fish feed and health food products has increased. Fish oil that traditionally has been used is limited resource and many have suggested that the primary producers, marine microalgae, can be cultivated and used for such purposes. The specific aim of this study was to investigate whether fat in the microalga *P. glacialis* could be digested in an *in vitro* digestive system with pancreatin from pigs. Initially, lipid-cleaving enzymes from salmon's pyloric caeca were to be investigated, but it was not possible to extract such enzymes.

The biomass of microalgae used in this aim had a high content of water (91%) and ash (4,3%), but a low-fat content (6,3%) on dry weight or 0,6% on wet weight basis. The low content can be explained by the growth phase of the microalgae. The content of LC-PUFA n-3 in *P. glacialis* consisted mainly of 30% EPA and 5% DHA. A high content of C16 PUFA was detected, which is unique to those in the lower levels of the food chain in the sea. Fat extracted from *P. glacialis* had a high content of free fatty acids which also has been observed by others. Fat in both freeze-dried and wet intact *P. glacialis* was digested by pancreatin and this showed that the wet material was more easily digested than the freeze-dried. Triacylglycerol is broken down more rapidly *in vitro* with pancreatin to free fatty acids than the polar lipid classes monogalactosyldiacylglycerol and digalactosylglycerol from the chloroplast membranes.

Based on the results, it can be concluded that lipids in wet intact *P. glacialis* is easier to digest than in freeze-dried *P. glacialis*. In fish feed, it would probably be better to include wet biomass of microalgae due to the difficulty and costs of extracting lipids.

Innholdsfortegnelse

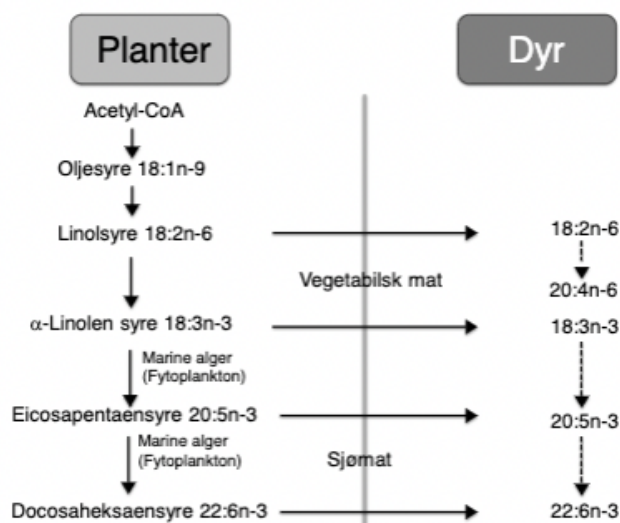
1	Introduksjon	1
2	Bakgrunn	5
2.1	<i>Mikroalger</i>	5
2.2	<i>Fordøyelsessystemet</i>	8
2.3	<i>Lipid fordøyelse</i>	9
3	Materialer og metoder	11
3.1	<i>Kjemikalier</i>	11
3.2	<i>Vann- og askeinnhold</i>	11
3.3	<i>Frysetørrking</i>	12
3.4	<i>Isolering av enzymer i blindsekk til laks</i>	12
3.5	<i>Lipase assay</i>	13
3.6	<i>Fettekstraksjon</i>	13
3.7	<i>Fettsyresammensetning</i>	14
3.8	<i>Lipidklassesammensetning</i>	15
3.9	<i>In vitro-fordøyelse av tran</i>	16
3.10	<i>In vitro-fordøyelse av P. glacialis</i>	17
4	Resultater	18
4.1	<i>Fett, vann- og askeinnhold</i>	18
4.2	<i>Fettsyresammensetning av oljene</i>	18
4.3	<i>Lipidklassesammensetning</i>	19
4.4	<i>In vitro fordøyelse med pancreatin</i>	20
4.5	<i>In vitro fordøyelse med lakseekstrakt</i>	22
5	Diskusjon	23
6	Konklusjoner	26
7	Referanseliste	27

Forkortelser

ALA	α -linolensyre
ARA	Arakidonsyre
DAG	Diacylglyserol
DCM	Diklormetan
DGDG	Diagalaktosyldiacylglyserol
DHA	Dokosaheksaensyre (22:6n-3)
ELSD	Evaporative light scattering detector
EPA	Eikosapentaensyre (20:5n-3)
FA	Fettsyre
FAlc	Fettalkoholer
FFA	Frie fettsyrer
FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatograf
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Intern standard (17:0)
LA	Linolsyre
LC-PUFA n-3	Langkjedede omega-3 fettsyrer
MAG	Monoacylglyserol
MeOH	Metanol
MGDG	Monogalaktosyldiacylglyserol
PG	Fosfatidylglyserol
PUFA	Flerumettede fettsyrer
TAG	Triacylglyserol
TS	Tørrstoff
VV	Våtvekt

1 Introduksjon

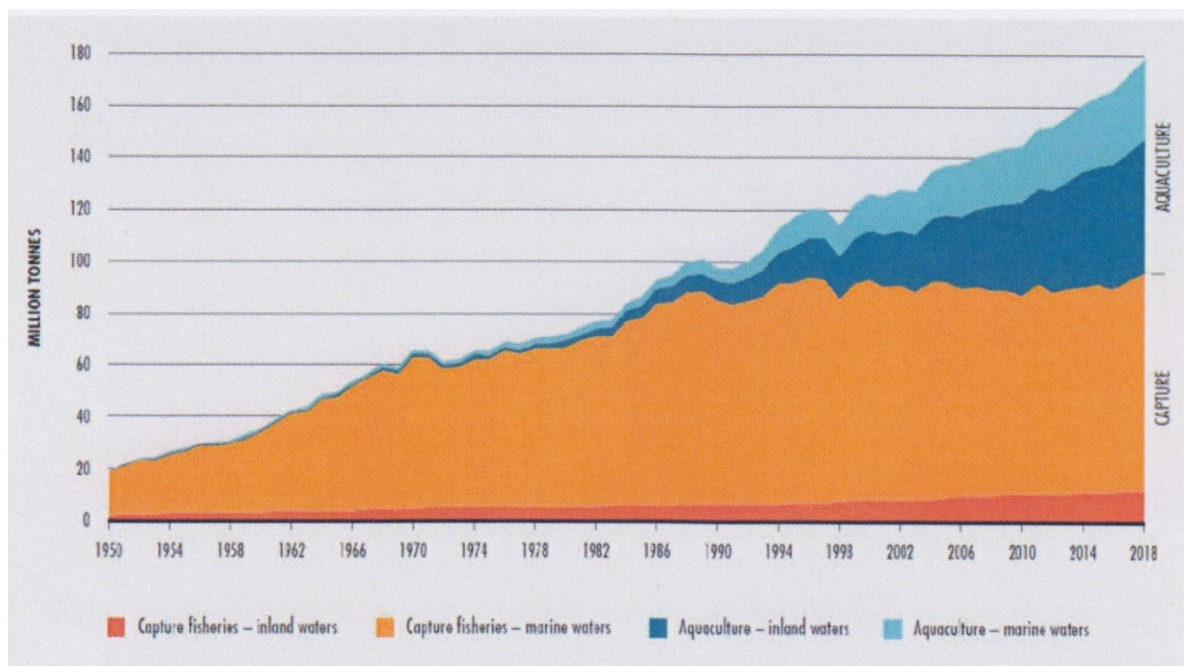
Fisk er hovedkilden vår til eikosapentaensyre (EPA; 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA; 22:6n-3), og oppdrettet atlantisk laks (*Salmo salar* L.) spiller en viktig rolle når det kommer til å forsyne mange mennesker med disse fettsyrene (Jensen *et al.*, 2012). Med utgangspunkt i acetyl-CoA kan alle organismer, både planter og dyr, syntetisere stearinsyre (18:0) og oljesyre (18:1n-9). Men den videre syntesen til linolsyre (LA; 18:2n-6) og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) kan kun skje i planter (figur 1). Grunnen er fordi det kun er planter som har enzymer som kan plassere en dobbeltbinding etter karbonnummer 6 og 3 fra metylenden (omegaenden). De fleste dyr, inkludert mennesker, kan omdanne LA og ALA i vegetabilsk mat til henholdsvis arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) og EPA og DHA, men som vist med stiplede linjer i figur 1, skjer det bare i liten grad. Kun marine alger kan effektivt syntetisere EPA og DHA i store mengder. Disse akkumuleres så videre oppover i næringskjeden og blir i hovedsak gjort tilgjengelig for mennesker via sjømat.



Figur 1. EPA og DHA finnes bare i sjømat fordi disse fettsyrene syntetiseres av marine mikroalger, som er i bunnen av næringskjeden i havet (Hentet fra Olsen, 2017)

I 1990 kom proteiner og oljer som ble brukt i laksefôr fra fiskemel og fiskeolje (Aas *et al.*, 2019). Fra da har det på grunn av etterspørselen etter sjømat og annen fisk vært en kraftig økning i global oppdrettsnæring (figur 2). Dette inkluderer også oppdrett av atlantisk laks som er en etterspurt vare på verdensmarkedet. I dag produseres det nærmere 1 million tonn fiskeolje, hvor 75% går til fiskefôr mens resten i hovedsak går til produksjon av kosttilskudd (Tocher, 2015). Det forventes ikke noen økning i produksjon av fiskeolje, men heller en nedgang på grunn av at mer pelagisk fisk blir brukt direkte som menneskemat (Olsen & Hasan, 2012). Fôr

til laks består i dag av cirka 55% protein, 31% fett og 10% karbohydrater (stivelse) og 4% mikronæringsstoffer som vitaminer og mineraler (Aas *et al.*, 2019). Av fett i fôret er nå 2/3 deler planteolje (rapsolje) mens resten er marine oljer. Det er kjent at laks i sjøvannsfasen må ha minst 2% til sammen av EPA og DHA i fôret for at den skal kunne vokse og trives godt (Sissener *et al.*, 2016; Bou *et al.*, 2017). Antakelig gjelder det også marin fisk generelt fordi de langkjedede omega-3 fettsyrene (LC-PUFA n-3) produseres først og fremst av marint fytoplankton og slik fisk har derfor mistet evnen til å lage LC-PUFA n-3 fra 18:3n-3 (Sargent *et al.*, 2002).



Figur 2. Utvikling i fangstvolum av vill fisk og produksjon i oppdrett fra 1950 til 2018 (FAO 2020).

Dersom oppdrettsnæringen skal fortsette å vokse samtidig med at fisken får et akseptabelt innhold av EPA og DHA, vil det derfor være nødvendig å finne nye fôrstoffer som inneholder LC-PUFA n-3. Slike mulige kilder er godt beskrevet i en oversiktsartikkel av Douglas R. Tocher (Tocher, 2015). Et nærliggende alternativ er å utnytte restråstoffer fra foredling av fisk som ikke kan brukes direkte som menneskemat, som ingredienser i fiskefôr både som kilde for protein og olje. Dette gjøres allerede i dag ved landbasert sløying og foredling av fisk, inkludert laks, i Norge (Olsen *et al.*, 2014). Andre marine ressurser er såkalt mesopelagisk fisk som oftest befinner seg på havdyp mellom 100 og 1000 meter og som til nå ikke har vært utnyttet. Dette er store bestander, men det kan være utfordringer med fangstteknologi, ombordprosessering og relativt høyt innhold av noen tungmetaller. I tillegg kan fettsyrene i stor grad foreligge som voksestere (Olsen *et al.*, 2020). Andre mulige råstoffer

kan være oljer fra planter som er blitt genmodifisert til å innhold høyt nivå av LC-PUFA n-3 (Betancor *et al.*, 2018).

Siden EPA og DHA produseres av marine fytoplankton har det blitt sett på om man kan massedyrke disse. Den marine kaldtvannsisalgen *Porosira glacialis* kan være en mulig kandidat. Dette på grunn av dens evne til raskt å akkumulere biomasse gjennom fotosyntese, dette uten å konsumere organisk karbon eller å konkurrere om landareal der konvensjonelle matprodukter kan produseres (Svenning, 2021). På denne måten kan man ta vekk presset på de ville fiskebestandene som i dag brukes til å produsere fiskemel og fiskeolje for å lage oppdrettsfôr.

Det finnes imidlertid flere utfordringer ved å bruke mikroalger eller ingredienser utvunnet fra mikroalger, i produksjon av fiskefôr. Dette gjelder både økonomiske forhold og innhold og utnyttelse av næringsstoffene. For det første kan kapitalkostnadene ved å masseprodusere og konservere mikroalger til fôrproduksjon være store (Shah *et al.*, 2018; Dalheim *et al.*, 2020). Et annet aspekt er at mikroalger er planter, dvs. de har en kraftig cellevegg (grønnalger) bestående av karbohydrater som oftest er vanskelig å fordøye for karnivore organismer, for eksempel laks. Tilsvarende problemstilling kan gjelde for kiselalger (diatoméer) som har et utvendig kisel skall (silisiumskall). Når det gjelder lipider i mikroalger så er det også noen utfordringer. Mikroalger som dyrkes i kultur akkumulerer større mengder fett når næringstilgangen blir dårlig (Reitan *et al.*, 1994). Det vil si at det er først når veksten (økning i biomasse) reduseres at fettinnholdet i algene øker.

En annen utfordring er at ekstraksjon av lipider fra mikroalger kan være kostbart særlig når lipidinnholdet er relativt lavt (Svenning *et al.*, 2020). I feit fisk er det ganske enkelt å utvinne fiskeolje fordi fettene består i all hovedsak av ikke-polare lipider, i all hovedsak triacylglyserol. Fiskeoljen utvinnes ganske enkelt ved at proteinene denatureres med varme og deretter kan oljen utvinnes ved sentrifugering. Oljer fra planter som inneholder triacylglyserol (TAG), for eksempel soya, må imidlertid ekstraheres med ikke-polare løsemidler, oftest heksan. Polare lipider som fosfolipider, er ofte vanskelig å utvinne og man må gjerne bruke en blanding av ikke-polare og polare løsemidler. Eksempel er en blanding av heksan og isopropanol (Svenning *et al.*, 2020). Diatoméer inneholder ofte mye polare membranlipider; fosfolipider og galaktolipider (Artamonova *et al.*, 2017; Svenning *et al.*, 2020). Fosfatidylglyserol (PG) og galaktolipidene (monogalaktosyldiacylglyserol; MGDG og digalaktosyldiacylglyserol; DGDG) fins i de fotosyntetiserende organellene (kloroplastene) i diatoméene (Boudiere *et al.*, 2014; Dalheim, 2021). Laks er fra naturen sin side ikke tilpasset til å spise plantemateriale og

et spørsmål blir om laksen vil kunne fordøye de unike polare lipidene fra kloroplaster i mikroalger.

Dalheim *et al.* (2021) har nettopp vist i et *in vitro* system at enzymer fra bukspyttkjertelen hos svin (pancreatin) er i stand til å bryte ned PG, MGDG og DGDG ekstrahert fra *P. glacialis*. Dette ble målt som økning i mengden frie fettsyrer som kan absorberes i tarmen. Svin er imidlertid som oss mennesker, omnivore, og kan derfor spise både planter og dyr. I utgangspunktet var derfor det overordnede målet med oppgaven å undersøke om enzymer fra bukspyttkjertelen hos laks var i stand til å hydrolysere de nevnte kloroplastlipider slik at det dannes frie fettsyrer. I den begrensede tiden tilgjengelig var det imidlertid ikke mulig å ekstrahere bukspyttkjertelenzymer fra laks. Hovedmålet med oppgaven ble derfor forandret til å undersøke om kommersielt tilgjengelig pancreatin fra svin kunne fordøye fett i intakt *P. glacialis*. Det vil si danne frie fettsyrer uten å ekstrahere fettene først.

2 Bakgrunn

2.1 Mikroalger

Mikroalger er en stor gruppe encellede organismer som kan dyrkes under heterotrofe eller autotrofe betingelser. Heterotrof vekst foregår ved at organisk karbon, for eksempel karbohydrat, brukes som karbonkilde og en slik kjent mikroalge er *Schizochytrium* sp. som kan brukes for å produsere DHA-rike olje (Lopes da Silva *et al.*, 2019). Autotrofiske (fotoautotrofiske) mikroalger utnytter karbondioksid og lys for å vokse gjennom fotosyntese som i vanlige planter. Noen mikroalger kan vokse på begge måter og dyrkes gjerne ved en blanding av heterotrofe og autotrofe (mixotrofe) betingelser. Den mest kjente er kanskje *Haematococcus pluvialis* som brukes til å produsere naturlig astaxanthin velegnet for bruk ved økologisk oppdrett av laks (Olsen *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2016).

Fotoautotrofe mikroalger i havet er en av verdens viktigste primære produsenter av organisk biomasse. Disse har sin oppblomstring i våre farvann om våren og høsten når tilgang på næringssalter og lys for fotosyntese er god. Denne oppblomstringen i bunnen av næringskjeden fører til høy biomasseproduksjon fra zooplankton til fisk. Mikroalger i det akvatiske miljø deles gjerne inn i to hovedgrupper; grønnalger og diatoméer. Grønnalger har en cellevegg bestående av ufordøyelig karbohydrater som andre planter. *Chlorella vulgaris* er en kjent grønnalge som kan dyrkes for produksjon av ulike kosttilskudd eller dyrefôr (Ru *et al.*, 2020).

Diatoméer, også kalt kiselalger, er eukaryote encellede organismer med et silisiumskall (kiseliskall). Disse mikroalgene er den mest artsrike algegruppen med opptil 200.000 forskjellige arter i det akvatiske miljø (Armbrust 2009, Mann & Vanormelingen 2013). Cellene til kiselalgene har en størrelse mellom 5-200 μm i diameter eller lengde, og celleveggen (kiseliskallet) blir også kalt frustule. Kiseliskallet er som en boks der skallet på den ene siden overlapper skallet på andre siden. Skallet er dekket av porer for å gjøre utvekslingen av molekyler mellom cytoplasma og miljøet lettere (Hale & Mitchell, 2001). For å vokse krever kiselalger flere uorganiske næringsstoffer, eksempelvis nitrogen, fosfor, jern og silikon som byggesteiner (Dalheim, 2021). Karbon utgjør imidlertid størstedelen av biomassen, og gjennom fotosyntese blir CO_2 omdannet til organisk karbon.

Fotoautotrofe mikroalger er avhengig av lys og kan dyrkes på flere måter i stor (industriell) skala. Den tradisjonelle måten har vært å dyrke dem i åpne dammer i områder med høy temperatur og masse sol (figur 3). Slik dyrking har lave konstruksjonskostnader, men har den ulempen at miljøbetingelsene (for eksempel skiftende sollys og temperatur som gir ulike

konsentrasjoner av CO₂ i vannet) kan variere (Xu *et al.*, 2009). I tillegg kan forurensende mikroorganismer være en utfordring.



Figur 3. Tradisjonell industriell produksjon av alger i åpne dammer. (Hentet fra Cyanotech).

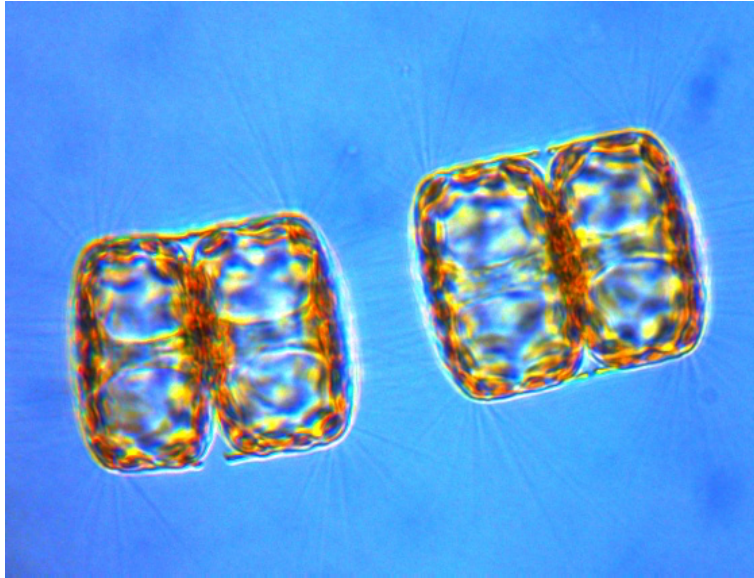
Lukkede dyrkningssystemer har flere fordeler enn åpne dammer, men også her er det tekniske utfordringer (Xu *et al.*, 2009). Lukkede dyrkningssystemer foregår inni en fotobioreaktor, hvor miljøparameterne som lys, temperatur og miksing blir kontrollert (Zittelli *et al.*, 2013). Figur 4 viser et vanlig oppsett på en fotoreaktor (vertikale rør) og det skal sikre optimalt forhold mellom overflate og volum (Dalheim, 2021). Produktiviteten til fotobioreaktorer er høy sammenlignet med åpne dammer. Dette fordi det er mulig å fange opp strålingsenergien, optimalisere dyrkningsområdet og ha bedre variable energiforbruksverdier for miksing, gass-og væskeutveksling (Jorquera *et al.*, 2010). En annen fordel er at lukkede systemer ikke blir utsatt for forurensning på lik linje som åpne dammer. En av ulempen med lukkede dyrkningssystemer og grunnen til at det ikke anvendes like mye som åpne dammer, er de høye konstruksjons- og driftskostnadene (Gupta *et al.*, 2015)



Figur 4. Lukket system for produksjon av alger. (Hentet fra @jongerius_ecoduna_algae).

Begge dyrkningssystemene har både fordeler og ulemper, men til nå handler alt om å redusere produksjonskostnader og samtidig holde høy kvalitet.

I denne oppgaven ble den marine kaldtvanns kiseslalten *P. glacialis* (figur 5) brukt. Den kalles også havets diamant og er en mikroalge i *Thalassiosiraceae* familien. Algene har stor cellediameter med en diameter på 45 μm (Artamonova *et al.*, 2017). Arten er ikke av den dominante typen, men kan bli funnet langs Norgeskysten og i Barentshavet under våroppblomstringen (Degerlund & Eilertsen, 2010).



Figur 5: *P. glacialis* (foto: Richard Ingebrigtsen).

Dyrkingen av *P. glacialis* var blitt gjort av Finnfjord AS og foregikk utendørs i 2019 i en vertikal 6000 L kolonnefiberfotobioreaktor, med lignende dyrkingsforhold som de som ble brukt av Svenning *et al.* (2019). I reaktoren var det tilsatt 100 g Kristalon Flower® (14% N, 3,9% P) og 1 L silikatløsning per 1000 L filtrert sjøvann i reaktoren. Surhetsgraden (pH) ble holdt under 8,0 ved å boble tanken med fabrikkroyk som inneholdt CO₂. CO₂ i røyken ble også utnyttet av *P. glacialis* som karbonkilde under veksten.

2.2 Fordøyelsessystemet

Art og levemåte er med på å bestemme fiskens fordøyelsessystem. Fisk kan være herbivore, omnivore eller karnivore og slike spesialiseringer av fôr krever forskjellige morfologiske og fysiologiske tilpasninger for svelg, fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer (Jobling, 1995). Jeg vil ta for meg fordøyelsen til karnivor fisk siden laksen er karnivore.

Fordøyelsessystemet til fisken består i noe grad av lignende magetarmkanal som hos mennesket, med tilliggende organer (lever, galleblære og bukspyttkjertel). Det starter med munn og gjellehule, før det går over i oesophagus (spiserøret) og ventrikkelen (magesekk). Ventrikkelen er et hulrom som består av flere deler – proximal og distal mage (antrum) og som ender i pylorus, starten på framtarmen. Framtarmen består av pyloric caeca (blindsekker) som ender i tyntarmen (baktarm) og rectum (anus). Enkelte arter har en rett kanal fra munn til anus, mens andre arter har en foldet og brettet kanal – som deretter deles inn i strukturelt funksjonelle deler. Fordøyelsen av mat starter som oftest i munn og svelg ved å bryte ned maten til mindre deler. Om tennene spiller en rolle i dette steget av fordøyelsen er artsavhengig. I de fleste

fiskearter er spiserøret kort og uten fordøyelsesenzymer, noe som gjør det mulig å innta store mengder mat.

Karnivore fisk har en ganske kort mage i forhold til herbivore fisk. Men selv om den er kortere, har den sekk lignende magen muskelceller som kan utvide seg dermed oppbevare store mengder mat. Den øvre delen av magen har en kortvarig lagringsfunksjon og har en mottakelig refleks som gjør det mulig å innta mat kontinuerlig. Mellom øvre og nedre mage, ligger «pacemaker» regionen, her starter kontraksjoner som bryter ned og mikser maten før den går inn i distal mage, hvor den brytes enda mere ned. Magesaften med saltsyre og pepsin starter den enzymatiske nedbrytningen av proteiner i maten. Fisk har oftest ingen klart avgrenset eller synlig bukspyttkjertel som hos pattedyr, men er gjerne lokalisert i eller rundt blindsekkene.

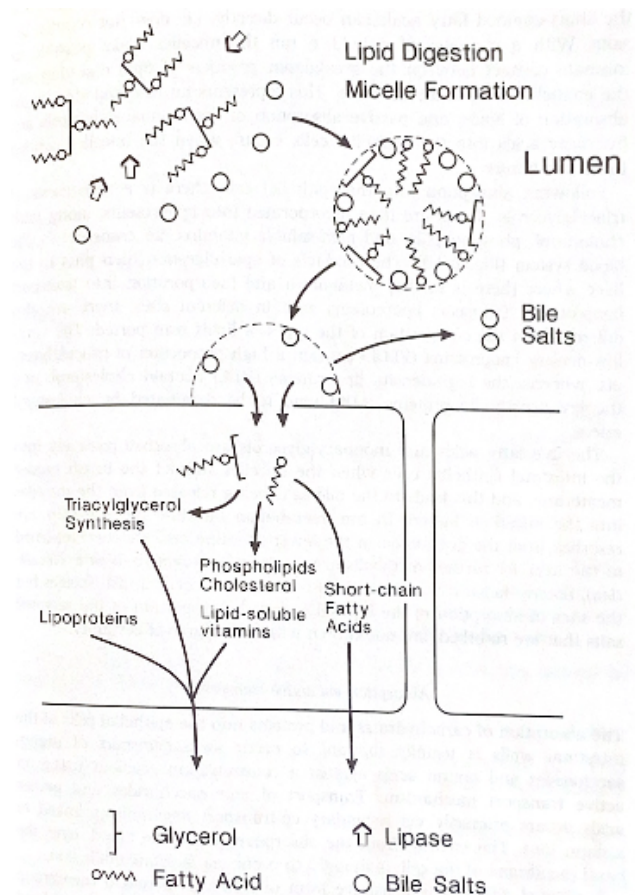
Tarmstrukturen til karnivore fisk er utviklet for en energitett diett som inneholder mye proteiner og fett, samt lite karbohydrater (Buddington *et al.*, 1997). Det er sammenheng mellom tarmen til fisken og leveområde, fisk som lever i kalde temperaturer har ofte lengre tarm enn fisk som lever ved varmere temperaturer (Houpe *et al.*, 1996). Metabolismen og matlysten til fisken kan reduseres under kalde temperaturer, men dette er artsavhengig (Foster *et al.*, 1992). Det er også en sammenheng mellom lengden på tarmen og kroppslengden, men er forskjellig fra art til art ut ifra kosthold. Eksempelvis har herbivore arter relativt lengre tarm enn karnivore arter. Funksjonen til tarmen er å fullføre fordøyelsen og absorpsjonen av fordøyde næringsstoffer, samtidig som den spiller en stor rolle i absorpsjonen av vann og elektrolytter.

Tarmen til karnivore fisk består i hovedsak av fire hovedtyper celler. Tre av disse celletypene, enterocytter, slimceller (goblet cells) og enterokromaffine celler, flytter seg ut av kryptene i tynntarmen og ut i tarmtottene. Panethceller som er den fjerde celletypen i tarmen til karnivore fisk, skiller ut antimikrobielle peptider og har en immun funksjon i tarmen (Buddington *et al.*, 1997)

2.3 Lipid fordøyelse

Fettet må fordøyas, det vil si brytes ned til mindre molekyler, inkludert frie fettsyrer for at fisken skal kunne ta det opp fra tarmen. Galle har en viktig funksjon i fordøyelsen og absorpsjon av lipider. Mesteparten av fett i dietten til fisk er triacylglyseroler som er en ester av glyserol og medium lengde og/eller langkjedede fettsyrer Enzymene som har ansvaret for hydrolyse av nøytrale lipider, spesielt triacylglyseroler – er lipaser. De skiller ut fra bukspyttkjertelen, men hos noen arter skiller lipidspaltede enzymer også ut i magesekken. Lipasene er aktive når lipider og vann blandes og emulgeres med gallsalter og fosfolipider. Små lipidmiceller gir et stort

overflateareal for lipasene å angripe. Gallesaltet har en viktig emulgerende og avgjørende betydning for micelledannelsen (figur 6).



Figur 6: Mekanismen av lipid fordøyelse og absorpsjon fra tarmen til fisk. (Hentet fra Jobling, 1995).

Pancreatisk lipase (1,3-spesifikk lipase) blir aktivert av kalsiumioner og kofaktoren kolipase som gjør at lipase kan binde seg til emulsjonsdråpene. Prokolipase produseres også i bukspyttkjertelen og aktiveres til kolipase av trypsin i tarmen. Den aktive lipasen hydrolyserer triacylglyserolene til frie fettsyrer (FFA) og monoacylglyserol (MAG) dvs. esterbindingene i 1 og 3 posisjon blir spaltet. Micellene er så små at det blir en tett kontakt mellom nedbrytningsproduktene fra lipidfordøyelsen og tarmens epitelvegg. Når micellene kommer i kontakt med tarmepitelets «brush-border» blir monoacylglyserol og frie fettsyrer absorbert av enterocytene (figur 6). Tilsvarende måte blir fosfolipider spaltet av fosfolipase til en fri fettsyre og lysofosfolipid som absorberes av tarmcellene. Fisk har også ha en såkalt uspesifikk lipase som kan spalte fettsyren i 2 posisjon av MAG og hydrolysere voksesterer til en fri fettsyre og en fettalkohol som så kan absorberes.

Etter absorpsjon i epitelcellene skjer det en nysyntese av triacylglyseroler og fosfolipider i enterocytene. Disse blir innlemmet i lipoproteiner og sammen med kolesterol og

lipidløselige vitaminer transportert i blodsystemet (figur 6). Lipoproteinene passerer deretter videre til leveren hvor ytterligere metabolisme foregår.

3 Materialer og metoder

Tran (Møller's) ble kjøpt på en lokal helsekostbutikk og mens frossen (-20°C) *Porosira glacialis* var fra Finnfjord AS. Olje fra *P. glacialis* ble ekstrahert som beskrevet senere. Lakseslo var fra Lerøy Aurora AS, Skjervøy.

3.1 Kjemikalier

Heptan ($\geq 99\%$), svovelsyre; H_2SO_4 (95-97%), heptadekansyre (IS) ($\geq 98\%$), natriumdeoxycholate ($\geq 97\%$), Gum Arabicum, Natriumbikarbonat, Triton x-100, 4-nitrophenyl palmitat, galle fra svin, pancreatin fra svin, natriumacetat, isooktan (LC-klasse), etylacetat (LC-klasse), aceton (LC-klasse) og isopropanol (LC-klasse) var fra Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Metanol (100,0%) og natriumklorid var fra VWR International S.A.S. (Rador, Pennsylvania, USA). Diklormetan; DCM ($\geq 99.9\%$), eddiksyre ($\geq 99.8\%$), kloroform (99,0-99,4%) var produsert av Honeywell Fluka (Muskegon, MI, USA). Fettsyrestandardene (metylerte) PUFA-1, PUFA-2 og PUFA-3 var fra Supelco Analytical (Bellefonte, PA, USA) mens GLC411 var fra Nu-Chek Prep. Inc. (Elysian, MN, USA). Fettklassestandardene brukt ved HPLC analysene var fra Larodan AB, Solna, Sverige: Fosfatidylglyserol (PG), monogalaktosyldiacylglyserol (MGDG), digalaktosyldiacylglyserol (DGDG), triacylglyserol (TAG; triolein), diacylglyserol (DAG; diolein), monoacylglyserol (MAG; monoolein). 11-eicosenol (FA1c; C20 fettalkohol) var fra Nu-Chek Prep mens heptadekansyre (17:0) ble brukt som fri fettsyre (FFA).

3.2 Vann- og askeinnhold

Vanninnhold

Veide ut nøyaktig cirka 1 gram tint *P. glacialis* i forhåndsveide aluminiumsbegre i 5 paralleller. Prøvene ble så tørket i varmeskap på 105°C i 48 timer. Prøvene ble veid på nytt etter tørking og det prosentvise vanninnholdet ble beregnet ved bruk av formel 1.

Formel 1:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt (før tørking)}(g) - \text{Vekt (etter tørking)}(g)}{\text{Vekt (før tørking)}(g)} * 100 \%$$

Askeinnhold

De tørkede prøvene ble videre forasket i en forbrenningsovn (Nabertherm GmbH Lilienthal, Tyskland) 540°C i 16 timer. Etter avkjøling ble prøvene veid og askeinnholdet (våtvektsbasis) ble beregnet ved å bruke formel 2.

Formel 2:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt (etter tørking og forbrenning) (g)}}{\text{Vekt (før tørking og forbrenning) (g)}} * 100 \%$$

3.3 Frysetørking

Frysetørkingen av *P. glacialis* ble gjort med Vir-Tis Genesis 35EL frysetørker (SP Industries, Gardiner, NY, USA). Knuste en blokk med alger i mindre deler. Frysetørkingen av *P. glacialis* gikk over 2 døgn.

3.4 Isolering av enzymer i blindsekk til laks

Fettvevet som omgir blindsekkene (figur 7) ble fjernet ved hjelp av skalpell og pinsett. Blindsekkene ble så lagt i zip-låsposer og fryselagret (-20°C) før isolering av enzym.



Figur 7: Fiskeslo fra oppdrettslaks. Blindsekker omfavnet av fettvev.

Enzymer ble ekstrahert fra tinte blindsekker med en modifisert metode beskrevet av Vizcaíno *et al.* (2019). Blindsekkene ble homogenisert i MilliQ-vann ved bruk av en stavmikser hvor forholdet mellom biomasse og vann var 1:2. Løsningen ble så sentrifugert med en Eppendorf Centrifuge 5804 ved 8928 rpm i 20 minutter (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland).

Supernatanten som skulle inneholde bukspyttkjertelenzymer ble fordelt på Eppendorfrør og fryselagret (-50°C) før bruk.

3.5 Lipase assay

Lipaseaktiviteten i lakseekstraktet og i pancreatin ble forsøkt analysert ved å bruke 4-nitrophenyl palmitat som substrat etter en metode beskrevet av Gupta *et al.* (2002). Substrat (30 mg) ble løst i 10 ml isopropanol og tilsatt 90 ml 0,05 M natriumfosfatbuffer pH 8,0 som inneholdt 207 mg natriumdeoxycholate og 100 mg gum arabicum. 1 ml av denne substratløsningen ble tilsatt 20 µl Triton X-100 og deretter 50 µl enzymløsning eller vann som kontroll. Dette ble blandet og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved at det ble tilsatt 1 ml 2 M NaOH og deretter avlest spektrofotometrisk ved 405 nm (Olsen *et al.*, 1991).

3.6 Fettekstraksjon

For å bestemme fettinnhold ble fett ekstrahert fra frysetørket *P. glacialis* beregnet ved å bruke en modifisert metode utviklet av Folch *et al.* (1957). Frysetørket *P. glacialis* ble homogenisert ved bruk av morter og 6 prøver (å nøyaktig cirka 0,5 gram) ble veid ut i 50 ml polypropylen Falconrør med skrukork. 9,5 ml diklormetan:metanol (DCM:MeOH) (2:1, v/v) ble tilsatt rørene. I 3 av de 6 prøvene ble det tilsatt 0,5 ml intern standard, heptadekansyre (17:0) (IS) løst i DCM:MeOH til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Alle rørene ble deretter ristet i 20-30 minutter ved å benytte en Multi Reax ristemaskin (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland) i avtrekkskap.

Foldefilter (Whatman, GE, healthcare, England) og trakt ble benyttet for å filtrere løsningen i nye Falconrør, slik at partikler ble fjernet. 2 ml 0,9% natriumklorid (NaCl) ble tilsatt Falconrørene, og rørene ble blandet forsiktig før sentrifugering i en Heraeus Multifuge sentrifugemaskin 1 S_R (Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) ved 2000g i 10 minutter.

Etter sentrifugering ble den nederste fasen (diklormetan med oppløste lipider) overført til forhåndsveide glassrør og inndampet til tørrhet med en Sample Concentrator SBHCONC/1 nitrogeninndampemaskin (Stuart Scientific, Staffordshire, England). Rørene ble så veid på nytt og fettinnholdet ble beregnet ved bruk av formel 3. Rørene ble så fryselagret (-50°C) før analyse av fettsyre- og fettclassesammensetning.

Formel 3:

$$\% \text{ Fett} = \frac{\text{Glassrør med innhold (g)} - \text{Glassrør tom (g)}}{\text{Innveid mengde prøve (g)}} * 100 \%$$

Fett ble også ekstrahert fra tint *P. glacialis* og brukt i *in vitro* fordøyelsesforsøkene. Nøyaktig 1,5 gram våt kiselalge (4 paralleller) i 50 ml Falconrør med skrukork ble tilsatt 30 ml DCM:MeOH (2:1, v/v) før de ble ristet kraftig og satt på ristemaskin (Multi Reax) i 30 minutter i avtrekkskap.

Foldefilter og trakt ble også her benyttet for å filtrere løsningen over i nye rør. 20 ml 0,9% NaCl ble tilsatt og blandet forsiktig før sentrifugering i en Heraeus Multifuge sentrifugemaskin 1 S_R ved 2000g i 10 minutter.

Etter sentrifugering ble den nederste fasen (DCM + oppløste lipider) overført til et oppsamlingsrør. Deretter ble det tilsatt 5 ml DCM til toppfasen og sentrifugert på nytt. Dette ble gjort en gang til. Til slutt ble oppsamlingsrøret med den organiske fasen tilsatt 5 ml s 0,9% NaCl og sentrifugert enda engang før lipidfasen ble overført til forhåndveide glassrør. Disse ble inndampet til tørrhet med en Sample Concentrator SBHCONC/1 nitrogeninndampemaskin (Stuart Scientific, Staffordshire, England). Rørene ble deretter veid på nytt og fettinnholdet ble beregnet ved bruk av formel 1.

3.7 Fettsyresammensetning

Metode utviklet av Stoffel *et al.* (1959) ble brukt for å fastslå fettsyresammensetningen i fett ekstrahert fra frysetørket *P. glacialis*. Prøvene med internstandard ble tilsatt diklormetan:metanol (2:1 v/v) slik at konsentrasjonen ble 10 mg/ml. Tilsvarende ble gjort for tran. 100 µl prøve i Kimax-rør ble tilført 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2% H₂SO₄ i metanol. Korkene ble skrudd godt igjen før prøvene ble inkubert i en Drybath Stdrd varmeblokk (Thermo Scientific Osterorde, Tyskland) på 100°C i cirka 1 time. Prøvene med de metylerte fettsyrene ble så tilsatt 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5% NaCl og blandet godt. Den øverste fasen ble overført til nye forhåndsveide glassrør og satt til damping i en Sample Concentrator SBHCONC/1 nitrogeninndampemaskin.

De 3 prøvene som inneholdt intern standard (IS) ble løst i 100 µl heptan og overført til GC-rør. Prøvene ble så analysert i en gasskromatograf (GC) fra Agilent 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) utstyrt med en 7683B autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor (FID). I gasskromatografien ble GC-kolonne: CP7419 Kapillærkolonne (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) benyttet for å separere de ulike

fettsyrene. Helium ble benyttet som bæregass. Injektoren hadde en temperatur på 240°C og detektoren 250°C. Deretter ble følgende temperaturprogram benyttet: GC-ovnen ble holdt ved 60°C i ett minutt, for så å øke til 130°C (30°C/min), videre til 195°C (1,3°C/min) og til slutt opp til 240°C (30°C/min) i 10 minutter. De ukjente fettsyrene ble identifisert ved å sammenligne retensjonstiden med en kjent standard. Andelen av de enkelte fettsyrene ble bestemt som arealprosent og mengde fettsyre pr. gram prøve. Formel 4 og 5 ble brukt for å regne ut arealprosent og mengde fettsyre pr. gram prøve.

Formel 4:

$$\text{Areal} - \% = \frac{\text{Arealet av den enkelte fettsyretoppen i kromatogrammet}}{\text{Totale arealet av alle fettsyretoppene}} * 100 \%$$

Formel 5:

$$\text{Mengde fettsyre (mg) pr. g prøve} = \left(\frac{\text{Arealtopp FA}}{\text{Arealtopp IS}} * \frac{\text{Tilsatt IS (g)}}{\text{Vektprøve (g)}} \right) * 1000 \text{ g}$$

3.8 Lipidklassesammensetning

Fett ekstrahert fra frysetørket *P. glacialis* ikke tilsatt internstandard, tran og fett ekstrahert under fordøyelsesforsøkene ble analysert for fettklassesammensetning. Fett ble fortynnet med mobilfase A (Isooktan/etylacetate; 99,8:0,2)/kloroform (4:1, v/v) til en konsentrasjon på 1 mg/ml og 0,1 mg/ml i 1,5 ml glassrør. Prøvene ble så analysert ved å bruke en HPLC-metode basert på Abreu *et al.* (2017). HPLC-analyser ble utført på en Waters e2795 separasjonsmodul ved bruk av en Supelcosil™ LC-SI 5 mm (25 cm x 4,6 mm) kolonne (Supelco HPLC produkter, Bellefonte, PA, USA) satt til en temperatur på 40°C og 40 ml injeksjonsvolum. Lipidene ble kvantifisert ved å benytte en Waters 2424 ELS-detektor med følgende innstillinger: forsterkning 100, nebulizer 30% oppvarmingseffekt, drivrør 45°C og trykket på 40 PSI. Kjøre tiden var 41 minutter, og gradientprofilen kan ses i tabell 1.

Tabell 1. Gradientprofil for HPLC-programmet. Mobilfase A = Isooktan/etylacetate (99,8:0,2, v/v), Mobilfase B = Aceton/etylacetat (2:1) 0,15% eddiksyre og Mobilfase C = isopropanol/H₂O (85:15).

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfase C (%)	Flow (ml/min)
0.0	100	0	0	1.5
1.5	100	0	0	1.5
1.6	97	3	0	1.5
6.0	94	6	0	1.5
8.0	50	50	0	1.5
8.1	46	39	15	1.5
14.0	43	30	27	1.5
14.1	43	30	27	1.5
18.0	40	0	60	1.5
23.0	40	0	60	1.5
24.0	0	100	0	1.5
25.0	0	100	0	2.0
27.0	0	100	0	2.0
27.1	100	0	0	2.0
36.0	100	0	0	2.0
36.1	100	0	0	1.5

3.9 *In vitro*-fordøyelse av tran

Pancreatin ble brukt til *in vitro*-fordøyelsen av tran som kontroll. Her ble samme metode som Dalheim *et al.* (2021) brukte, utarbeidet av Aarak *et al.* (2013). Oppløste olje fra tran i en konsentrasjon på 15 mg/ml i 0,15 M NaHCO₃ som inneholdt 0,9% NaCl (8,0 ml) tilsatt 11,8 mM galle og 13,6 mg/ml pancreatin. Ved å tilsette 0,1 M HCl ble pH-en justert til 7. Prøvene ble så inkubert i 30, 60 og 180 minutter ved 37°C under konstant miksing ved bruk av LABINCOLD79 digital reagensrørsrotator (Breda, Nederland). Reaksjonen ble så stoppet ved å ekstrahere lipidene ved bruk av DCM:MeOH (2:1, v/v).

Lakseenzym ble brukt til *in vitro*-fordøyelse av tran for å se om det var enzymaktivitet i lakseenzymekstraktet. Her ble en modifisert metode utarbeidet av Aarak *et al.* (2013) brukt. Oppløste oljene (tran og olje fra *P. glacialis*) i en konsentrasjon på 15 mg/ml i 0,15 M NaHCO₃

som inneholdt 0,9% NaCl (8,0 ml) tilsatt 11,8 mM galle og 25 ml lakseenzymekstrakt. Tilsatte HCl for å justere pH-en til 7. I likhet med *in vitro*-fordøyelse med pancreatin, ble disse prøvene inkubert i 30, 60 og 180 minutter, men ved 25°C under konstant miksing ved bruk av LABINCOLD79 digital reagensrørsrotator (Breda, Nederland). Også her ble reaksjonene stoppet ved å ekstrahere lipidene ved bruk av DCM;MeOH (2:1, v/v).

3.10 *In vitro*-fordøyelse av *P. glacialis*

Pancreatin ble deretter brukt til *in vitro* fordøyelse av våt og frysetørket *P. glacialis*. Aarak *et al.* (2013) sin metode ble brukt. Oppløste nøyaktig cirka 1 gram frysetørket *P. glacialis* og nøyaktig cirka 2 gram våt *P. glacialis* i en konsentrasjon på 15 mg/ml i 0,15 M NaOH₃ som inneholdt 0,9% NaCl (8,0 ml) tilsatt 11,8 mM galle og 13,6 mg/ml pancreatin. Tilsatte HCl for å justere pH-en til 7. I likhet med de to andre *in vitro*-forsøkene, ble også disse prøvene inkubert i 30, 60 og 180 minutter, ved 37°C under konstant miksing ved bruk av LABINCOLD79 digital reagensrørsrotator (Breda, Nederland). Også her ble reaksjonene stoppet ved å ekstrahere lipidene ved bruk av DCM;MeOH (2:1, v/v).

4 Resultater

4.1 Fett, vann- og askeinnhold

På tørrvektbasis inneholdt *P. glacialis* $6,3 \pm 0,2\%$ (tabell 2). Vanninnholdet i tint prøve var $91 \pm 0,4\%$, mens askeverdien var $4,2 \pm 0,3\%$ i våt *P. glacialis*.

Tabell 2. Fett- (n=3), vann- (n=5) og askeinnhold (n=5) av *P. glacialis*.

	<i>P. glacialis</i>
Fettinnhold (% TS)	$6,3 \pm 0,2$
Vanninnhold (% vv)	$91,0 \pm 0,4$
Askeinnhold (%vv)	$4,2 \pm 0,3$

4.2 Fettsyresammensetning av oljene

Fett ekstrahert fra *P. glacialis* inneholdt 34,9% av de langkjeda omega-3 fettsyrene (LC-PUFA n-3) (tabell 3). EPA og DHA utgjorde henholdsvis 29,9 og 5,0% i *P. glacialis*.

Tabell 3. Fettsyresammensetning (areal %) av ekstrahert fett fra frysetørket *P. glacialis* og i tran. ND = ikke påvist.

Fettsyrer	<i>P. glacialis</i>	Tran
C14:0	$4,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,07$
C16:0	$4,0 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,03$
C18:0	ND	$2,4 \pm 0,02$
Σ SFA	$8,5 \pm 0,3$	$16,5 \pm 0,12$
C12:1	$1,7 \pm 0,2$	ND
C16:1 n-7	$9,1 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,01$
C18:1 n-7	ND	$4,9 \pm 0,03$
C18:1 n-9	$32,4 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,02$
C20:1 n-9	ND	$15,2 \pm 0,04$
Σ MUFA	$43,2 \pm 0,6$	$45,1 \pm 0,1$
C16:2 n-4	$2,8 \pm 0,01$	ND
C16:3 n-4	$6,9 \pm 0,04$	ND
C18:2 n-6 (LA)	ND	$2,5 \pm 0,01$
C18:3 n-3 (ALA)	ND	$1,0 \pm 0,0$
C18:4 n-3	$3,7 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,01$
C20:4 n-3	ND	$8,5 \pm 0,03$
C20:5 n-3 (EPA)	$29,9 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,03$
C22:5 n-3 (DPA)	ND	$1,3 \pm 0,01$
C22:6 n-3 (DHA)	$5,0 \pm 0,1$	$13,0 \pm 0,03$
Σ PUFA	$48,3 \pm 0,5$	$38,4 \pm 0,12$
Σ FA	$100,0 \pm 1,4$	$100,0 \pm 0,34$
PUFA n-3	$38,6 \pm 0,4$	$34,9 \pm 0,11$
LC-PUFA n-3	$34,9 \pm 0,35$	$23,2 \pm 0,07$

I tran var det 23,2% LC-PUFA n-3 med 8,9% EPA; 1,3% DPA og 13,0% DHA. I tran var 16,5% SFA, 45,1% MUFA og 38,4% PUFA. I fett ekstrahert fra *P. glacialis* var det 8,5% SFA; 43,2% MUFA og 48,3% PUFA. Særegent for dette fett var det relativt høye innholdet av C16 PUFA; 2,8% 16:2 n-4 og 6,9% 16:3 n-4.

Fett ekstrahert fra *P. glacialis* inneholdt 12,8 mg pr gram prøve av LC-PUFA n-3 (tabell 4). EPA og DHA utgjorde henholdsvis 11,0 og 1,8 mg pr. gram prøve i *P. glacialis*. I tran var det 155,6 mg LC-PUFA n-3 pr gram prøve med 59,7 mg EPA; 8,6 mg DPA og 87,3 mg DHA. I tran var det 110,9 mg SFA, 303,6 mg MUFA og 258,7 mg PUFA. I fett ekstrahert fra *P. glacialis* var det 3,2 mg SFA, 15,7 mg MUFA og 17,6 mg PUFA. Det totale fettsyreinnholdet i tran og i *P. glacialis* var henholdsvis 673,2 mg og 36,5 mg per gram prøve.

Tabell 4. Fettsyresammensetning (mg fett pr. gram prøve) av ekstrahert fett fra frysetørket *P. glacialis* og i tran. ND = ikke påvist.

Fettsyrer	<i>P. glacialis</i>	Tran
C14:0	1,7 ± 0,04	26,7 ± 1,2
C16:0	1,5 ± 0,01	68,1 ± 3,4
C18:0	ND	16,1 ± 0,7
Σ SFA	3,2 ± 0,05	110,9 ± 5,3
C12:1	0,6 ± 0,08	ND
C16:1 n-7	3,3 ± 0,09	63,3 ± 3,0
C18:1 n-7	ND	33,2 ± 1,5
C18:1 n-9	11,8 ± 0,6	105,1 ± 5,1
C20:1 n-9	ND	102,0 ± 5,0
Σ MUFA	15,7 ± 0,77	303,6 ± 14,6
C16:2 n-4	1,0 ± 0,04	ND
C16:3 n-4	2,5 ± 0,09	ND
C18:2 n-6 (LA)	ND	17,9 ± 0,8
C18:3 n-3 (ALA)	ND	6,8 ± 0,3
C18:4 n-3	1,3 ± 0,07	21,4 ± 1,0
C20:4 n-3	ND	57,0 ± 2,8
C20:5 n-3 (EPA)	11,0 ± 0,5	59,7 ± 2,8
C22:5 n-3 (DPA)	ND	8,6 ± 0,4
C22:6 n-3 (DHA)	1,8 ± 0,09	87,3 ± 4,0
Σ PUFA	17,6 ± 0,8	258,7 ± 12,1
Σ FA	36,5 ± 1,6	673,2 ± 32,0
PUFA n-3	14,1 ± 0,7	240,8 ± 11,3
LC-PUFA n-3	12,8 ± 0,6	155,6 ± 7,2

4.3 Lipidklassesammensetning

I tran ble det bare påvist triacylglyserol (98,8%) og 1,2% diacylglyserol (tabell 5). Fettet ekstrahert fra frysetørket *P. glacialis* hadde et mye mer variert innhold av fettklasser. De to

dominerende klassene var fosfatidylglyserol (28,0%) og monogalaktosyldiacylglyserol (20,8%). I tillegg var det mye av frie fettsyrer (14,6%), diacylglyserol (15,9%), monoacylglyserol (6,2%) og fettalkoholer (7,8%). Triacylglyserol og digalaktosyldiacylglyserol var til stede i mindre mengder, henholdsvis 4,3 og 2,3%.

Tabell 5. Lipidklassesammensetning (areal %) i fett fra *P. glacialis* og i tran. TAG (triacylglysero), FAlc (fettalkoholer), DAG (diacylglyserol), FFA (frie fettsyrer), MAG (monoacylglyserol), MGDG (monogalaktosyldiacylglyserol), DGDG (digalaktosyldiacylglyserol) PG (fosfatidylglyserol). ND = ikke påvist.

Fettsyrer	<i>P. glacialis</i>	Tran
TAG	4,3 ± 1,3	98,8 ± 0,6
FAlc	7,8 ± 0,7	ND
DAG	15,9 ± 1,6	1,2 ± 0,6
FFA	14,6 ± 0,9	ND
MAG	6,2 ± 0,5	ND
MGDG	20,8 ± 0,1	ND
DGDG	2,3 ± 0,02	ND
PG	28,0 ± 4,2	ND

4.4 *In vitro* fordøyelse med pancreatin

Tabell 6 viser lipidklassesammensetning (vekt %) av tran og endringer under *in vitro* fordøyelse med pancreatin. Resultatet viser at det ved 0 minutter var størst andel av TAG (99,7%) påvist, samtidig at det ikke var frie fettsyrer (FFA) til stede. Ved 180 minutter utgjorde FFA 56,4%, mens TAG var redusert til 37,1%. Diacylglyserol og monoacylglyserol ble dannet under fordøyelsen, men ingen tydelige økninger på samme måte som for FFA ble observert.

Tabell 6. Lipidklassesammensetning (vekt %) i tran (tid 0) og endringer under *in vitro* fordøyelse (n=3) med pancreatin. TAG (triacylglyserol), DAG (diacylglyserol), FFA (frie fettsyrer) og MAG (monoacylglyserol). ND = ikke påvist.

Tid (min)	0	30	60	180
TAG	99,7 ± 0,4	77,5 ± 21,5	57,8 ± 4,6	37,1 ± 1,3
DAG	0,3 ± 0,4	3,1 ± 0,1	5,5 ± 2,6	4,7 ± 0,8
FFA	ND	16,8 ± 18,1	34,5 ± 7,4	56,4 ± 1,1
MAG	ND	2,6 ± 2,8	2,3 ± 0,3	1,8 ± 1,6

Frysetørket *P. glacialis* ble hydrolysert med pancreatin som beskrevet i Materialer og Metoder (tabell 7). Resultatene viste at TAG-innholdet ble redusert fra 9,8 til 0,2% i løpet de første 30 minuttene. I denne perioden av hydrolysen skjedde det en viss økning i DAG og MAG samtidig som at innholdet av FFA ble redusert fra 42,9 til 28,3%. Nivåene av MGDG, DGDG og PG derimot viste alle en økning de først 30 minuttene. Etter 180 minutter hydrolyse var ikke TAG eller DGDG påvisbar, mens MGDG og PG var redusert til henholdsvis 1,1 og 5,7%. FFA utgjorde 67,7% av fettklassene. Fettalkoholene viste tilsynelatende en prosentvis økning under hydrolysen.

Tabell 7. Lipidklassesammensetning (vekt %) av intakt frysetørket *P. glacialis* (tid 0) og endringer under *in vitro* fordøyelse (n=3) med pancreatin. TAG (triacylglysero), FAlc (fettalkoholer), DAG (diacylglyserol), FFA (frie fettsyrer), MAG (monoacylglyserol), MGDG (monogalaktosyldiacylglyserol), DGDG (digalaktosyldiacylglyserol) PG (fosfatidylglyserol). ND = ikke påvist.

Tid (min)	0	30	60	180
TAG	9,2 ± 1,5	0,2 ± 0,00	0,1 ± 0,05	ND
FAlc	1,6 ± 0,3	5,2 ± 1,01	3,6 ± 0,02	16,7 ± 10,2
DAG	8,2 ± 2,6	11,6 ± 0,2	16,0 ± 1,7	6,8 ± 1,2
FFA	42,9 ± 12,2	28,3 ± 4,07	45,7 ± 4,3	67,7 ± 14,9
MAG	2,8 ± 0,9	4,2 ± 0,05	6,0 ± 1,6	2,1 ± 0,6
MGDG	10,9 ± 2,3	15,9 ± 0,1	12,8 ± 1,5	1,1 ± 0,2
DGDG	3,5 ± 0,8	8,7 ± 1,1	5,3 ± 0,8	ND
PG	21,0 ± 4,5	26,0 ± 2,0	10,6 ± 2,03	5,7 ± 2,6

Lipidklassesammensetning (vekt %) av våt *P. glacialis* (tid 0) og endringer under *in vitro* fordøyelse med pancreatin er vist i tabell 8. Allerede etter 30 minutters hydrolyse ble TAG-innholdet redusert fra 4,2 til 0,1%, mens FFA hadde en økning fra 35,6 til 59,1%. I perioden hadde DAG gått ned fra 20,3 til 13,7%, mens tilsvarende tall for MAG er 6,8 og 1,8%. DGDG ble redusert fra 6,8 til 2,5%. Innhold av fettalkoholer er relativt fra 8,5 i starten og 7,8 etter 180 minutter.

Ved avslutningen av forsøket var prosentandelen av lipidklassene TAG, DAG, MAG og DGDG blitt kraftig redusert samtidig som at FFA-innholdet nesten utgjorde 80% av lipidklassesammensetningen.

Tabell 8. Lipidklassesammensetning (vekt %) av våt *P. glacialis* (tid 0) og endringer under *in vitro* fordøyelse (n=3) med pancreatin. TAG (triacylglyserol), FAlc (fettalkoholer), DAG (diacylglyserol), FFA (frie fettsyrer), MAG (monoacylglyserol), MGDG (monogalaktosyldiacylglyserol), DGDG (digalaktosyldiacylglyserol) PG (fosfatidylglyserol). Analyse etter 30 minutter er bare basert på 1 parallell.

Tid (min)	0	30	60	180
TAG	4,2 ± 0,9	0,1	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,0
FAlc	8,5 ± 8,2	4,8	4,0 ± 0,6	7,8 ± 2,2
DAG	20,3 ± 4,6	13,7	14,6 ± 0,1	3,3 ± 0,3
FFA	35,6 ± 13,4	59,1	60,5 ± 1,7	78,6 ± 3,9
MAG	6,8 ± 7,5	1,8	2,5 ± 0,2	1,1 ± 0,0
MGDG	8,7 ± 7,6	9,0	8,1 ± 0,4	2,9 ± 0,6
DGDG	6,8 ± 8,3	2,5	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2
PG	9,1 ± 7,0	8,8	8,3 ± 0,8	5,0 ± 0,6

4.5 *In vitro* fordøyelse med lakseekstrakt

I et forsøk på å måle innholdet av lipase enzymer i ekstraktet fra blindsekker hos laks ble det kunstige substratet 4-nitrophenyl palmitat brukt. Teorien bak er at lipase enzym spalter substratet til palmitat og fritt 4-nitrophenol som i basisk løsning er gul på farge og kan derfor kvantiteres med et spektrofotometer. Resultatet var negativ. Ingen gul farge ble målt etter inkubasjon med enzymekstraktet som beskrevet i Materialer og Metoder.

Nedbryting av lipidklassene i tran analysert med HPLC ble også undersøkt ved å bruke lakseekstrakt fra blindsekkene. Tabell 9 viser lipidklassesammensetning (vekt %) i tran og endring under *in vitro* fordøyelse med lakseekstrakt. Resultatene viser at det ikke har skjedd en reduksjon av TAG og heller ikke en frigjørelse av FFA i forsøket.

Tabell 9. Lipidklassesammensetning (vekt %) av tran (tid 0) og endringer under *in vitro* fordøyelse (n=3) med lakseezym. TAG (triacylglyserol), FAlc (fettalkoholer), DAG (diacylglyserol) og FFA (frie fettsyrer).

Tid (min)	0	30	60	180
TAG	95,4 ± 1,4	96,3 ± 0,9	96,2 ± 0,0	97,0 ± 1,7
FAlc	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,1
DAG	1,7 ± 0,8	1,3 ± 0,07	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,6
FFA	2,2 ± 0,9	2,1 ± 0,8	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,9

5 Diskusjon

Det har blitt undersøkt om mikroalger dyrket i lukkede dyrkningssystemer kan være et alternativ til LC-PUFA n-3 fra fiskeolje ettersom oppdrettsnæringen og helsekostbransjen har økt kraftig de siste årene. Innledningsvis ble fett-, vann og askeinnholdet beregnet i kiselalgen *Porosira glacialis* dyrket industrielt i fotobioreaktorer ved bedriften Finnfjord AS (Svenning *et al.*, 2020). Vanninnholdet var som forventet ganske høyt i den våte biomassen (tabell 2), noe som betyr at det er lite tørrstoff (TS) pr. 100 gram prøve, bare 9%. Askeinnholdet på våtvektsbasis var høyt (4,3%) og dette betyr at andelen organisk tørrstoff (protein, fett og karbohydrat) bare utgjør litt over halvparten. Kieselskallet utgjør mesteparten av asken (hovedsakelig mineralet silisium). Et tørt laksefôr inneholder ofte cirka 10% aske som også inneholder en rekke ulike mineraler nødvendig for fiskens vekst (Jobling & Bendiksen, 2003). Dette betyr at mengden av kiselalger som kan inkluderes i et fôr må begrenses for ikke å hemme veksten av fisken. For mye mineraler i fôret kan også gi forgiftning (Lorentzen *et al.*, 2001).

Fettinnholdet i frysetørket *P. glacialis* ble funnet å være bare 6,3% (tabell 2). Det vil si bare cirka 0,6% på våtvektsbasis som tilsvarer det man finner i torskemuskel som er en mager fisk. Denne biomassen av *P. glacialis* har et så lavt fettinnhold at denne neppe kan sies å være en god kilde til LC-PUFA n-3. Dette kan imidlertid ha med vekstfasen å gjøre. Som nevnt innledningsvis vil mikroalger først akkumulere fett (TAG) når veksten stagnerer på grunn av dårlig næringstilgang (Reitan *et al.*, 1994). Svenning *et al.* (2020) rapporterte at *P. glacialis* inneholdt cirka 20% fett målt som askefritt tørrstoff, det vil si cirka 10% på tørrstoffbasis som er noe mer enn i denne masteroppgaven.

Det prosentvise innholdet av LC-PUFA n-3 i fett fra *P. glacialis* var høyere enn i tran (tabell 3). På vektbasis var forskjellen den andre veien stor (tabell 4). Et gram *P. glacialis* inneholdt 12,8 mg, mens 1 gram tran inneholdt 155,6 mg LC-PUFA n-3. En slående forskjell mellom disse to råstoffene var at LC-PUFA n-3 i mikroalgen bestod av cirka 30% EPA og bare 5% DHA (tabell 3) tilsvarende det publisert av Dalheim *et al.* (2020). I tran var det cirka 9% EPA og 13% DHA. I enkelte tranprodukter fra torskelever har andre rapportert om noe høyere innhold av EPA enn DHA (McGill & Moffat, 1992). Spesielt for fett i *P. glacialis* og antakelig unikt for mikroalger, sammenlignet med fett fra fisk er det høye innholdet av C16 PUFA (tabell 3). Grunnen til dette vet vi ikke, men det kan tenkes at fettsyrene ikke akkumulerer i så stor grad videre oppover i næringskjeden, men heller bidrar til energiproduksjon. Det er ikke blitt gjort funn av disse fettsyrene i tran (tabell 3) og heller ikke i laks, til tross for at laksen spiser

zooplankton som også har et lavt innhold av C16 PUFA (Vang *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2012). Det er ikke overraskende at C16 PUFA blir påvist i zooplankton, da disse beiter på mikroalger.

Tran består i hovedsak av triacylglyserol og inneholder ikke polare membranlipider (tabell 5). Årsaken er først og fremst innholdet av TAG, som er svært høyt sammenlignet med membranlipider i den fettrike torsk leveren. Dessuten blir torsk leveroljen raffinert før den selges som tran. Under raffineringen fjernes blant annet spormengder membranlipider (fosfolipider) og eventuelle frie fettsyrer. Fettclassesammensetningen i *P. glacialis* var mye mer variert og inneholdt blant annet mer enn 50% membranlipider (MGDG, DGDG og PG) fra kloroplastene. Innholdet av TAG var lavt, delvis forårsaket av det lave fettinnholdet. Noe TAG er også hydrolysert til frie fettsyrer, diacylglyserol og monoacylglyserol. Noe av FFA kommer antakelig fra nedbrutte fosfolipider i cellemembraner. Fordi slike fosfolipider, for eksempel fosfatidylkolin og fosfatidyletanolamin, ikke ble påvist. Det er et høyt nivå av frie fettsyrer i fett ekstrahert fra *P. glacialis* og andre mikroalger som tidligere er blitt undersøkt av andre (Svenning *et al.*, 2020; Dalheim *et al.*, 2021). Dannelsen av FFA (lipolyse) er katalysert av endogene enzymer og kan skje både under høsting, (fryse)lagring og eventuelt tørking av mikroalgene (Berge *et al.*, 1995; Ryckeboesch *et al.*, 2011; Balduyck *et al.*, 2016).

Det ble gjennomført flere *in vitro* fordøyelsesforsøk med pancreatin for å undersøke nedbrytningen av fett i *P. glacialis*. Prøvene ble analysert med HPLC og det relative innhold av de ulike fettclassene ble bestemt etter 0, 30, 60 og 180 minutters fordøyelse. Innledningsvis ble det gjennomført et fordøyelsesforsøk med tran og resultatene viste at pancreatin fra svin fungerte godt (tabell 6). Innholdet av TAG ble kraftig redusert samtidig med at mengden frie fettsyrer økte omtrent tilsvarende. Under hydrolysen ble det bare påvist små mengder med DAG og MAG som tyder på at også den 3. fettsyren er spaltet av. Det si at noe TAG er blitt fullstendig hydrolysert til FFA og glyserol.

Dalheim *et al.* (2021) har nylig vist at pancreatin hydrolyserer TAG, MGDG og PG i fett ekstrahert fra *P. glacialis*. Resultatene i denne oppgaven viste at pancreatin også fordøyer fett i frysetørket og våt intakt *P. glacialis*. Fettet i våt *P. glacialis* syntes å bli lettere fordøyd enn fett i frysetørket *P. glacialis* (tabell 8 og 9). I frysetørket materiale var det tilsynelatende ingen økning i FFA i løpet av de første 60 minuttene, mens det ble sett en økning fra cirka 35 til 59% i våt *P. glacialis*. Etter 180 minutter analyse var det nesten 10% mer FFA i våt *P. glacialis* enn i frysetørket, enda det var et lavere innhold av FFA fra start i våt *P. glacialis*. Begge materialene hadde et høyt innhold av FFA i utgangspunktet og det kan forklares slik som beskrevet tidligere. De frie fettsyrene kan muligens i utgangspunktet virke hemmende på videre dannelse av FFA, kanskje spesielt fra polare lipider. TAG syntes i begge hydrolysene å bli

effektivt brutt allerede etter 30 minutter. Dette er kanskje ikke overraskende fordi TAG er den absolutt største fettklassen i fôr til svin og dermed er fordøyelsen antakelig spesialisert på nedbrytning av TAG. De polare lipidene MGDG, DGDG og PG er i utgangspunktet lokalisert i kloroplastmembranene og kan derfor være mindre tilgjengelig for fordøyelsesenzymene. Nedbrytningen av disse så man først i hovedsak i begge tilfellene i løpet de siste 2 timene av fordøyelsen. Hvis man i senere tid skal utføre et fôringsforsøk med fisk hvor man produserer pellets med intakte mikroalger, kan det være best å inkludere det i våt form. Det ville da vært spennende å sammenligne fettklassefordelingen i fiskens avføring og i fôret. Dette vil for eksempel kunne si noe om de polare kloroplastlipidene blir fordøyd og utnyttet av fisken. Et tilsvarende forsøk ble gjort for å undersøke nedbrytning av voksesterrike olje fra raudåte i mus (Pedersen *et al.*, 2014).

Utgangspunktet i oppgaven var egentlig å undersøke *in vitro* fordøyelse av ekstrahert fett fra *P. glacialis* med enzymer ekstrahert fra blindsekkene hos laks. Resultatene var negative. Lakseekstraktet ga ingen spaltning av det kunstige fettsyresubstratet 4-nitrophenyl palmitat. Som en kontroll ble tran forsøkt spaltet med lakseekstraktet, men ingen nedbrytning av TAG ble observert (tabell 9). Dette betyr at man ikke har klart å ekstrahere lipidnedbrytende enzymer fra blindsekkene. Dersom mer tid hadde vært tilgjengelig kunne det kanskje ha vært en idé gjøre en ekstraksjon på fettfritt helt tarmsystem fra laks.

6 Konklusjoner

Enzymer fra bukspyttkjertel (pancreatin) i svin fordøyer fett i frysetørket og våt intakt *P. glacialis*. Dannelsen av frie fettsyrer syntes å gå raskere i vått materiale og dette kan være fordelaktig med hensyn på bruk i fiskefôr fordi frysetørring er en kostbar prosess. Det ble også observert at triacylglyserol ble brutt ned tidligere i hydrolyseprosessen enn de polare kloroplastlipidene monogalaktosyldiacylglyserol, digalaktosyldiacylglyserol og fosfatidylglyserol. På grunn av vanskeligheten ved å ekstrahere fett med polare lipider fra mikroalger, vil det antakelig være enklere å bruke den marine kiselalgen *P. glacialis* i våt form direkte i et eventuelt fiskefôr.

I den begrensede tiden tilgjengelig var det ikke mulig å ekstrahere lipidspaltende enzymer fra blindsekkene til laks for å bruke i *in vitro* fordøyelsesforsøk av *P. glacialis*.

7 Referanseliste

- Aas, T.S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2019) Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports*, **15**, art nr. 100216.
- Aarak, K.E., Kirkhus, B., Holm, H., Vogt, G., Jacobsen, M. & Vegarud, G.E. (2013) Release of EPA and DHA from salmon oil – a comparison of *in vitro* digestion with human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, **110**, 1402-1410.
- Abreu, S., Solgadi, A. & Chaminade, P. (2017) Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *Journal of Chromatography A*, **1514**, 54-71.
- Armbrust, E.V. (2009) The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, **459**, 185-192.
- Artamonova, E.Y., Svenning, J.B., Vasskog, T., Hansen, E. & Eilertsen, H.C. (2017) Analysis of phospholipids and neutral lipids in three common northern cold water diatoms: *Coscinodiscus concinnus*, *Porosira glacialis*, and *Chaetoceros socialis*, by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, **29**, 1241-1249.
- Balduyck, L., Bjittebier, S., Bruneel, C., Jacobs, G., Voorspoels, S., Durme, J.V., Muyleart, K. & Foubert, I. (2016) Lipolysis in *T-Isochrysis lutea* during wet storage at different temperatures. *Algal Research*, **18**, 281-287.
- Betancor, M.B, Li, K., Bucerzan, V.S., Sprague, M., Sayanova, O., Usher, S., Han, L., Norambuena, F., Torrissen, O., Napoer, J.A., Tocher, D.R. & Olsen, R.E. (2018) Oil from transgenic *Camelina stavia* containing 25% n-3 long-chain PUFA as the major lipid source in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition*, **119**, 1378-1392.
- Berge, J.-P., Gouygou, J.-P., Dubacq, J.-P. & Durand, P. (1995) Reassessment of lipid composition of the diatom. *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry*, **39**, 1017-1021.
- Bou, M., Berge, G.M., Beaverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T-K., Romarheim, O.H., Halten, B., Leeuwis, R., Venegas, C. & Ruyter, B. (2017) Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity. *British Journal of Nutrition*, **117**, 30-47.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A. & Bakke-Mckellep A.M. (1997) The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavia*, **638**, 67-80.
- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M.A. & Maréchal, E. (2014) Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1837**, 470-480.
- Dalheim, L. (2021) *Porosira glacialis* as a possible source of lipids for human consumption and aquaculture feed. PhD avhandling, UiT Norges arktiske universitet.
- Dalheim, L., Svenning, J.B., Eilertsen, H.C., Vasskog, T. & Olsen, R.L. (2020) Stability of lipids during wet storage of the marine diatom *Porosira glacialis* under semi-preserved conditions at 4 and 20 °C. *Journal of Applied Phycology*, **33**, 385-395.
- Dalheim, L., Svenning, J.B. & Olsen, R.L. (2021) *In vitro* intestinal digestion of lipids from the marine diatom *Porosira glacialis* compared to commercial omega-3 products. PLOS One, in press.
- Degerlund, M. & Eilertsen, H.C. (2010) Main species characteristics of phytoplankton spring blooms in NE Atlantic and Arctic waters (68-80° N). *Estuaries and Coasts*, **33**, 242-269.
- FAO (2020) The state of the world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Roma, Italia.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.

- Foster, A.R., Houlihan, D.F., Hall, S.J. & Burren, L.J. (1992) The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *Canadian Journal of Zoology*, **70**, 2095-2102.
- Gupta, P.L., Lee, S-M. & Choi, H-J. (2015) A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**, 1409-1417.
- Gupta, N. Rathi, P. & Gupta, R. (2002) Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, **311**, 98-99.
- Hale, M.S. & Mitchell, J.G. (2001) Functional morphology of diatom frustule microstructures: hydrodynamic control of Brownian particle diffusion and advection. *Aquatic Microbial Ecology*, **24**, 287-295.
- Houpe, K.L., Malo, C., Oldman, P.B. & Buddington, R.K. (1996) Thermal modulation of channel catfish intestinal dimensions, BBM fluidity, and glucose transport. *American Physiological Society*, **270**, 1037-1043.
- Jensen, I.J., Mæhre, H.K., Tømmerås, S., Eilertsen, K.E., Olsen, R.L. & Elvevoll, E.O. (2012) Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Bulletin*, **37**, 25-29.
- Jobling, M. (1995) Environmental Biology of fishes. Kap. 6. Chapman & Hall, London, England.
- Jobling, M. & Bendiksen, E.A. (2003) Dietary lipids and temperature interact to influence tissue fatty acid compositions of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Aquaculture Research*, **34**, 1423-1441.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M. & Ghirardi, M.L. (2010) Comparative energy
- Lopes da Silva, T., Moniz, P., Silva, C. & Reis, A. (2019) The dark side of microalgae biotechnology: A heterotrophic biorefinery platform directed to omega-3 rich lipid production. *Microorganisms*, **7**, art nr. 670.
- Lorentzen, M., Berntssen, M.H.G. & Måge, A. (2001) Mineraler og sporelementer. I: *Fiskeernæring*. (R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre & Lie, Ø, redaktører). Kap. 6. Kystnæringen Forlag og bokklubb.
- Mann, D.G. & Vanormelingen, P. (2013) An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **60**, 414-420.
- McGill, A.S. & Moffat, C.F. (1992) A study of the composition of fish liver and body oil triglycerides. *Lipids*, **27**, 360-370.
- Olsen, R.E., Strand, E., Melle, W., Nørstebø, J.T., Lall, S.P., Ringø, E., Tocher, D.R. & Sprague, M. (2020) Can mesopelagic mixed layers be used as feed for salmon aquaculture? *Deep-Sea Research Part II*, **180**, art nr. 104722.
- Olsen, R.L. & Hasan, M.R. (2012) A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture productions. *Trends in Food Science & Technology*, **27**, 120-128.
- Olsen, R.L., Øverbø, K. & Myrnes, B. (1991) Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): A dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **99**, 755-761.
- Olsen, R.L., Toppe, J. & Karunasagar, I. (2014) Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, **36**, 144-151.
- Pedersen, A.M., Salma, W., Höper, A.C., Larsen, T.S. & Olsen, R.L. (2014) Lipid profile of mice fed a high-fat diet supplemented with a wax ester-rich marine oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 1718-1726.
- Ru, I.T.K., Sung, Y.Y., Jusoh, M., Wahid, M.E.A. & Nagappan, T. (2020) *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *British Phycological Society*, **1**, 2-11.

- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Eeckhout, M., Ruysen, T. & Foubert, I. (2011) Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 11063-11069.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. & Bell, J.G. (2002) The lipids, I: *Fish Nutrition* (J.E. Halver & R.W. Hardy, redaktører), 3. utg., Kap. 4, Academic Press.
- Shah, M.R., Liang, U., Cheng, J.J. & Daroch, M. (2016) Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, **7**, art nr. 531.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M.A.K., Parsaeimehr, A., Liang, Y. & Daroch, M. (2018) Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, **30**, 197-213.
- Sissener, N.H., Torstensen, B.E., Stubhaug, I. & Rosenlund, G. (2016) Long-term feeding of Atlantic salmon in seawater with low dietary long chain n-3 fatty acids affects tissue status of the brain, retina and erythrocytes. *British Journal of Nutrition*, **115**, 1919-1929.
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E.H. (1959) Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **31**, 307-308.
- Svenning, J.B. (2021) Towards mass cultivation of diatoms as a source of marine lipids. PhD avhandling, UiT Norges arktiske universitet.
- Svenning, J.B., Dalheim, L., Vasskog, T., Matricon, L., Vang, B. & Olsen, R.L. (2020) Lipid yield from the diatom *Porosira glacialis* is determined by solvent choice and number of extractions, independent of cell disruption. *Scientific Reports*, **10**, 1-10.
- Svenning, J.B., Dalheim, L., Eilertsen, H.C. & Vasskog, T. (2019) Temperature dependent growth rate, lipid content and fatty acid composition of the marine cold-water diatom *Porosira glacialis*. *Algal Research*, **37**, 11-16.
- Tocher (2015) Omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, **449**, 94-107.
- Vang, B., Pedersen, A.M. & Olsen, R.L. (2013) Oil extraction from the copepod *Calanus finmarchicus* using proteolytic enzymes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **22**, 619-628.
- Vizcaíno, A.J., Sáez, M.I., Martínez, T.F., Acién, F.G. & Alarcón, F.J. (2019) Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research*, **37**, 145-153.
- Xu, L., Weathers, P.J., Xiong, X.R. & Liu, C.Z. (2009) Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, **9**, 363-368.
- Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Bassi, N., Biondi, N. & Tredici, M.R. (2013) Photobioreactors for microalgal biofuel production. I: *Algae for Biofuels and Energy*, (Borowitzka, M.A. & Moheimani N.R. red.) Springer, 115-131. (Hentet fra: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5479-9_7).

