



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Karakterisering av fettsyrer i *L. hyperborea*, *S. latissima*, *A. esculenta* og *P. palmata* med GS-MS

Characterization of fatty acids in *L. hyperborea*, *S. latsissima*, *A. esculenta* and *P. palmata* with GC-MS

Ingeborg Natvik

Kjemi og Bioteknologi

Forord

Arbeidet presenter i denne masteroppgaven er utført ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM), ved Norges miljø og biovitenskapelige universitetet (NMBU) på Ås.

Jeg vil takke min hovedveileder Dag Ekeberg for godt samarbeid, god veiledning og deling av hans kunnskaper innenfor analytisk kjemi. Takk til min medveileder Hanne Devle for god opplæring av GC-MS, veiledning på lab og for å svare på alle mulige spørsmål. Du har gitt meg hjelp til å løse problemer og veilede meg i skriveprosessen. Jeg vil og takke min andre medveileder Lena Foseid for opplæring av metode, konstruktive tilbakemeldinger og for å dele sin kunnskap om hele emnet. Jeg vil også takke deg for generelle støtte og motivasjon, og for at du har lest gjennom både resultater og hele oppgaven. Jeg vil og takke Carl Fredrik Næss-Hansen for retting av innledning, teori, materialer og metoder.

Jeg vil takke mine medstudenter på MS-gruppa for gode, konstruktive og motiverende samtaler.

Jeg vil takke foreningen min, DÅs, for å gi meg glede, bevegelse, noe annet å tenkte på og et pusterom når det trengs. Takk for deres støtte og engasjement rundt min master.

Jeg vil til sist takke familie, samboer og venner for tålmodighet når jeg ikke har hatt tid til dem og gode støtte.

Ås, 13 mai 2019

Ingeborg Natvik

Sammendrag

Men en stigende verdensbefolkning som vil nå 9,1 milliarder innen år 2050, er det viktig å etablere flere gode kilder til mat og fôr (FAO, 2013). Makroalger er flercellede alger som vokser i strandsonen og på grunt vann (Egeland and Thronsdén, 2018). De er rike på n-3 fettsyrer og langkjedede, flerumettede, fettsyrer. Inntak av makroalger kobles sammen med lavere forekomst av sykdommer og helseplager som kreft, hjerte og karsykdommer, overvekt, høyt blodtrykk og diabetes (Brown et al., 2014; Mohamed et al., 2012; Xu et al., 2017). Dyrking av makroalger er i dag en ny industri i Norge, men en meget stor industri i østasiatiske land. Rundt 99% av all dyrking og høsting av makroalger foregikk i Asia i 2011 (FAO, 2019). Det er stort potensiale for dyrking av makroalger i Norge, sammen med mikroalger, kan en slik industri generere en omsetning på rundt 40 millioner kroner i nær fremtid (Olafsen et al., 2012).

Brunalgene *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima* og *Laminaria hyperborea*, og rødalgen *Palmaria palmata* ble valgt ut for analyse i denne studien.

I denne studien ble det identifisert 40 ulike fettsyrer i de ulike algene. Totalt lipidinnhold varierte fra 1,03 % ± 0,12, til 2,8% ± 0,11 av tørrvekt. De elleve fettsyrene med høyest konsentrasjon i alle algeprøvene var C14:0, C16:0, C16:1 *cis*9, C18:1 *cis*9, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3), C18:4 (n-3), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3). n-6:n-3 forholdene var alle lave, og mellom 3,46:1 og 0,06:1. *A. esculenta* har høyest konsentrasjon av de essensielle fettsyrene LA og ALA. LA og ALA er veldig viktige for oppbygging av cellevegger og signalstoffet. *P. palmata* har lavest n-6:n-3 forhold og høyest innhold av flerumettede fettsyrer var å finne i *L. hyperborea* (blad) med 58,2 % av totalt fettsyreinhold. Med et innhold på opptil 11 % av essensielle fettsyrer, et høyt innhold av langkjedede flerumettede fettsyrer som EPA og AA, og lave n-6:n-3 forhold, gjør alle algeartene til gode kandidater for videre utvinning av mat-, fôr-, legemiddel- og kosttilskudd-industrien.

Abstract

The world population is expected to increase to 9.1 billion by year 2050, more food and feed resources are thus required (FAO, 2013). Macroalgae are multicellular algae that grow on the shoreline and in shallow water (Egeland and Throndsen, 2018). These algae are rich in n-3 fatty acids and long chained, poly unsaturated, fatty acids (PUFAs). Consumption of macroalgae is linked to a lower risk of diseases such as cancer, cardiovascular disease, high blood pressure, obesity and diabetes (Brown et al., 2014; Mohamed et al., 2012; Xu et al., 2017). In Norway, growing macroalgae is a new industry, but in east-Asia this is already an established industry. In 2011 99% of all produce of macroalgae was located in Asia (FAO, 2019). There is a large industrial potential for macroalgae production in Norway. Together with microalgae, such an industry can generate 40 million Norwegian kroner (NOK) (Olafsen et al., 2012).

The brown algae *A. esculenta*, *S. latissima* and *L. hyperborea*, and the red algae *P. palmata* were selected for this study. *P. palmata*, *A. esculenta* and *S. latissima* were provided by Seaweed Energy Solutions (Trondheim, Norway) and *L. hyperborea* was from FMC Biopolymers (Vormedal, Hordaland, Norway).

A total of 40 different fatty acid were identified. The total lipid content ranged from 1,03 % \pm 0,12 to 2,8% \pm 0,11. The ten fatty acids with the highest concentrations were C14:0, C16:0, C16:1 *cis* 9, C18:1 *cis* 9, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3), C18:4 (n-3), C20:4 (n-6) and C20:5 (n-3). The n-6:n-3 ratios were 3,46:1, at the highest and 0,06:1 at the lowest. *A. esculenta* had the highest content of the essential fatty acids LA and ALA. LA and ALA are important for cell membrane and signaling molecules. *P. palmata* had the lowest n-6:n-3 ratio and *L. hyperborea* (blade) had the highest percentage of PUFA with 58,2 %. With a content of the essential fatty acids up to 11 %, a high content of long chained PUFAs (like EPA and AA) and low n-6:n-3 ratios, make all the macroalgae good candidates for food and feed industries.

Forkortelser

ALA	α -linolensyre (18:3 (n-3))
AA	Arakidonsyre (C20:4 (n-6))
DHA	Dokosaheksaensyre (C22:6 (n-3))
DW	Tørrvekt (Dry Weight)
EPA	Eikosapentaensyre (C20:5 (n-3))
FAO	FNs organisasjon for ernæring og landbruk (Food and agriculture Organization og the United Nations)
FFA	Frie fettsyrer (Frie fatty acid)
GC	Gasskromatografi (Gas chromatography)
IS	Interstandard
LA	Linolsyre (C18:2 (n-6))
LC	Væskeskromatografi (Liquid chromatography)
MS	Massespektrometri (Mass spectrometry)
MUFA	Enumettet fettsyre (Mono unsaturated fatty acid)
NIST	National institute of standards and technology
NL	Nøytrale lipider
PL	Polare lipider
PUFA	Flerumettet fettsyre (Poly unsaturated fatty acid)
RRF	Relativ responsfaktor
SD	Standardavvik (Standard deviation)
SDA	Stearidonsyre (C18:4 (n-3))
SFC	Superkritiskvæskeskromatografi (Super fluid chromatography)
SPE	Fastfaseekstraksjon (Solid phase extraction)
SFA	Mettet fettsyre (Saturated fatty acid)

Liste over figurer

<i>Figur 1: Illustrasjon av de elleve fettsyrene som utgjør størst prosentdel av fettsyreprofilen, samt summen av alle fettsyrer som utgjør mindre enn 2 % av total fettsyreinnhold i L. hyperborea (stilk), L. hyperborea (blad) (n=4), S. latissima (n=4), A. esculenta (n=4) og P. palmata (n=3). Figuren viser også summen av alle andre fettsyrer. Prosentandelen fra hver fraksjon (NL, FFA, PL) er summert til en total prosentandel for hele makroalgen.</i>	<i>41</i>
<i>Figur 2: Figuren illustrer prøveoppsettet på SPE og tilhørende kolonner etter bruk. Det var et eksempel fra analysen av L. hyperborea (blad). Rekkefølge; rad 1: ekstraksjons-blank, ren kloroform, ren kloroform, ren kloroform, rad 2: Replika 1, replika 2, replika 3, replika 4.</i>	<i>43</i>

Liste over tabeller

<i>Tabell 1: Lister over navn på utvalgte fettsyrer.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabell 2: Oversikt over rapporterte verdier av viktige næringsstoffer, samt væskeinnhold og akseinnhold, i de utvalgte makroalgene. Fra (Holdt and Kraan, 2011) (a) og (Mæhre et al., 2014) (b). Verdiene fra Mæhre et al. (2014) er regnet om fra g/kg DW til %.</i>	<i>19</i>
<i>Tabell 3: Tabellen gir en oversikt over kjemikaliene benyttet i metodene beskrevet i dette kapittelet.</i>	<i>24</i>
<i>Tabell 4 : Oversikt over internstandarder og eksterne standarder brukt for å identifisere fettsyrer i algartene. Tre ulike C19:0 ble brukt som internstandarder, en for hver lipidfraksjon. FAME-miks er fra (food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA). Alle andre standarder er fra Larodan (Sverige).</i>	<i>25</i>
<i>Tabell 5: Totalt lipidinnhold for P. palmata (n=3), A. esculenta (n=4), S. latissima(n=4), L. hyperborea (blad) (n=4) og L. hyperborea (stilk) (n=4), beregnet slik det er beskrevet i formel 2</i>	<i>28</i>
<i>Tabell 6: Totalt vanninnhold i P. palmata, A. esculenta, S. latissima, L. hyperborea (blad) og L. hyperborea (stilk) (n=4), beregnet som beskrevet i formel 1. Innholdene er gitt som gjennomsnitt av fire replika ± standardavvik for alle makroalger.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabell 7: Oversikt over n-6:n-3 forhold, prosentandel av NL, FFA og PL, samt sum SFA, MUFA og PUFA i L. hyperborea (stilk) (n=4), L. hyperborea (blad) (n=4), S. latissima (n=4), A. esculenta (n=4) og P. palmata (n=3).</i>	<i>29</i>
<i>Tabell 8: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i µg/g DW til fettsyrene i P. palmata (n=3). Sum av NL, FFA og PL, samt sum av SFA, MUFA og PUFA. I tillegg er sum omega 3 og 6 også gitt (µg/g DW). n.d. (not detected) - fettsyren ble ikke funnet. Fettsyrer markert med * er kun funnet i NIST biblioteket. Fettsyrene er listet opp i elueringsrekkefølge.</i>	<i>29</i>
<i>Tabell 9: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i µg/g DW til fettsyrene i A. esculenta (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt i µg/g DW. I ruter markert med n.d. (not detected) er hvor fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket. Fettsyrene er listet opp i elueringsrekkefølge.</i>	<i>31</i>
<i>Tabell 10: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i % av total fettsyreinnhold i S. latissima (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt % av total fettsyreinnhold. I ruter markert med n.d. (not detected) indikerer at fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket.</i>	<i>33</i>
<i>Tabell 11: Fettsyreprofilen viser fettsyrer funnet i fraksjonene, gitt i % av total fettsyreinnhold i L. hyperborea (blad) (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt % av totalfettsyreinnhold. Ruter markert med n.d. (not detected) er fettsyren ikke ble detektert. Fettsyrer markert * er kun funnet i NIST biblioteket.</i>	<i>36</i>
<i>Tabell 12: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt % av totalt fettsyreinnhold i L. hyperborea (stilk) (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt i % av totalt fettsyreinnhold. I ruter markert med n.d. (not detected) er hvor fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket.</i>	<i>38</i>
<i>Tabell 13: Tørrvekten til algepulver veid ut, med tre eller fire replikaer.</i>	<i>52</i>

Tabell 14: C (slutt) = C (IS) = sluttkonsentrasjonen av IS i prøven, V (slutt) = sluttvolum til prøven, n = stoffmengde, m = masse, V (start) = tilsatt volum av IS i prøven, C (start) = nøyaktig konsentrasjon av IS, M_m = molekylmasse.

..... 52

Tabell 15: Relative responsfaktorene og molekylvekt var gitt av Devle H. (2019). Relative referansefaktorer.

[epost]. 53

Liste over formler

(Formel 1) 26

(Formel 2) 27

(Formel 3) 54

(Formel 4) 54

Innholdsliste

1. INTRODUKSJON	12
2. MÅLET TIL STUDIEN	13
3. TEORI	14
3.1 TIDLIGERE FORSKNING	14
3.2 LIPIDER	14
3.2.1 Fettsyrer	14
3.2.2 Nomenklatur	15
3.3 HELSEEFFEKTER AV FETTSYRER	15
3.3.1 Mettede og umettede fettsyrer	15
3.3.1 n-3 og n-6 fettsyrer	16
3.3.2 n-6:n-3 forhold	16
3.4 MAKROALGER	17
3.4.1 Mikroalger	17
3.4.2 Utvalgte makroalger	17
3.4.2 Makroalger som mat og fôr	18
3.5 METODIKK	19
3.5.1 Lipidekstraksjon	19
3.5.2 Kromatografi	20
3.5.3 SPE	21
3.5.3 Massespektrometri	22
3.5.4 Metylering	23
4. MATERIALER OG METODER	24
4.1 KJEMIKALER OG STANDARDER	24
4.2 PRØVER OG PRØVEPREPARERING	25
4.3 BESTEMMELSE AV VANNINNHold	26
4.4 LIPID EKSTRAKSJON	26
4.5 BESTEMMELSE AV TOTALT LIPIDINNHold	27
4.5 FASTFASEEKSTRAKSJON	27
4.6 OMESTRING AV NØYTRALE OG FOSFOLIPIDER OG FORESTRING AV FRIE FETTSYRER	27
5. RESULTATER OG DISKUSJON	28
5.1 TOTALT LIPIDINNHold	28
5.2 TOTAL VANNINNHold	28
5.3 OVERSIKT OVER FETTSYRESAMMENSETNINGER I <i>P. PALMATA</i> , <i>A. ESCULENTA</i> , <i>S. LATISSIMA</i> , <i>L. HYPERBOREA</i> (BLAD) OG <i>L. HYPERBOREA</i> (STILK)	29
5.4 FETTSYREPROFIL FOR <i>P. PALMATA</i>	29
5.5 FETTSYREPROFIL TIL <i>A. ESCULENTA</i>	31
5.6 FETTSYREPROFIL TIL <i>S. LATISSIMA</i>	33
5.6 FETTSYREPROFIL TIL <i>L. HYPERBOREA</i> (BLAD)	36
5.7 FETTSYREPROFIL TIL <i>L. HYPERBOREA</i> (STILK)	38
5.8 SAMMENLIGNING AV BLAD OG STILK I <i>L. HYPERBOREA</i>	40
5.9 SAMMENLIGNING AV ALGEARTENE	41
5.11 FORBEDRING AV METODE	42
6. KONKLUSJON	45
6.1 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	46
7. REFERANSER	48

VEDLEGG	52
VEDLEGG 1 TØRRVEKT	52
VEDLEGG 2 INTERNSTANDARDE	52
VEDLEGG 3 RELATIV RESPONSAKTOR OG MOLEKYLVEKT TIL FAME	52
VEDLEGG 4 BEREGNING AV KONSENTRASJON TIL FETSYRENE	54

1. Introduksjon

I dag er det kornprodukter som er den mest spiste matgruppen i verden, hvor ris, mais og hvete utgjør alene rundt 60 % av verdens energiinntak (FAO, 2019). Dyrking av denne matgruppen krever store ressurser; som store landareal og mye ferskvann. De har høyt innhold av karbohydrater og n-6 fettsyrer, men lavt innhold av n-3 fettsyrer og antioksidanter sammenlignet med grønne grønnsaker. I en nylig artikkel fra «EAT-lancet» kommisjonen, en del av den anerkjente medisinske journalen «the Lancet», ble makroalger (havplanter) presentert som en av de nye og innovative kildene til sunn og bærekraftig mat og fôr (Willett, 2019). Med en verdensbefolkning som kan nå rundt 9,1 milliarder innen 2050, er alternative næringskilder viktig å etablere (FAO, 2013). Makroalger har blitt mer og mer populært på verdens matmarked de siste tiårene. Mellom 1993 og 2013 økte konsumet i verden fra 0,87 til 2,04 kg/person/år (FAO, 2019). I 2011 foregikk 99% av all dyrking og høsting av makroalger i Asia, med Kina, Sør-Korea, Filipinene og Japan som de største konsumentene (FAO, 2019). Disse asiatiske landene har lange tradisjoner med å bruke makroalger i mat. En diet rik på makroalger har blitt korrelert med lavere forekomst av kroniske sykdommer som kreft og hjerte og karsykdommer, samt overvekt, høyt blodtrykk og diabetes (Brown et al., 2014), (Mohamed et al., 2012; Xu et al., 2017). Fettsammensetningen til alger er mer lik den for villfisk enn den for landplanter (Mæhre et al., 2014). Dette kan tyde på at man kan forvente en fettsyresammensetning i oppdrettsfisk mer lik sin ville motpart, dersom vi bytter ut kornprodukter i fôret, med alger (Mæhre et al., 2014; Schiener et al., 2015). Norge har et samlet areal av indre farvann på 125 313 km², hvor 89 091 km² er langs fastlands-Norge (Kartverket, 2018). Omtrent 10 000 km² av norskekysten er bevokst med makroalger, som gjør den til Europas største (Havforskningsinstituttet, 2019). Det er estimert at man kan oppnå en omsetning på rundt 40 millioner ved dyrking av makroalger i Norge (Olafsen et al., 2012). For å kunne utnytte makroalger til sitt fulle potensiale er det grunnleggende å vite hva de inneholder.

2. Målet til studien

Målet til denne studien var bestemme totalt lipidinnhold og lage en total fettsyreprofil for de ulike fettfraksjonene av *Palmaria Palmata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina Latissima*, *Alaria Esculenta* og, samt bestemme deres totale lipidinnhold. Dette er makroalger som vokser langs den norske kysten. Ved å identifisere hvilke fettsyrer som var i disse algartene kan det gi en indikasjon på hvorvidt disse algene var egnet i mat, fôr eller for andre bruksområder.

3. Teori

3.1 Tidligere forskning

Til nå var det gjort lite forskning på lipider fra tang og tare langs norskekysten. I tidligere publiserte arbeid av Mæhre et al. (2014) ble det sett på lipider fra artene *Palmaria palmata*, *Vertebrata lanosa*, *Cladophora rupestris*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca*, *Alaria Esculenta*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Fucus vesiculosus* og *Pelvetia canaliculata*. I denne artikkelen ble ti tang og tare arter sammenlignet basert på innhold av flere næringsstoffer. Her ble totalt 16 fettsyrer identifisert. I en annen tidligere artikkel av Foseid et al. (2017) ble algen *Laminaria hyperborea* studert. I denne artikkelen ble *L. hyperborea* delt opp i stilk og blad, og total fettsyreprofil ble bestemt i tre fraksjoner; nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Det ble funnet 42 ulike fettsyrer i denne artikkelen.

3.2 Lipider

Lipider er i hovedsak definert ut fra sine hydrofobiske egenskaper. Lipider er delt opp i hovedgruppene glyserider (fett), fosfolipider, steroler, voks og sphingolipider (Halver, 2005). Glyseridene er nøytrale lipider, hvor fettsyrene er festet til en glyserolgruppe med esterbindinger. Det kan sitte opptil tre fettsyrer på en glyserolgruppe og disse kalles derfor mono-, di- og triglyserdier. Glyserider utgjør en viktig del av fettceller, som anses å være energilageret hos fleste dyr (Moran et al., 2014). Fosfolipider er en gruppe amfipatiske lipider, som består av en alkoholgruppe, en fosfatgruppe, et glyserol og en eller to fettsyrer. Det er fosfatgruppen, sammen med alkoholgruppen, som utgjør den polare delen av molekylet og fettsyren(e) som utgjør den upolare. Fosfolipider er spesielt viktige da de hovedbestanddelen av celleveggene i kroppen (Moran et al., 2014).

3.2.1 Fettsyrer

Fettsyrer er definert som hydrokarbonkjeder med en karboksylsyre, og lavt oksidasjonstrinn. En fettsyre kan ha en karbonkjede på mellom fire og 36 karboner med ingen, én eller flere dobbeltbindinger. Antall dobbeltbindinger bestemmer grad av metthet, og brukes til å dele fettsyrer inn i mindre grupper; mettede fettsyrer (Saturated Fatty Acids, SFA), enumettede fettsyrer (Mono Unsaturated Fatty Acids, MUFA) og flerumettede fettsyrer (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA). Dobbeltbindingene kan ha én av to ulike konfigurasjoner, *cis*- eller *trans*-konfigurasjon. Ved en *cis*-konfigurasjon vil de naboliggende karbonene ha samme romlige konfigurasjon, mens i *trans*-konfigurasjon vil de naboliggende karbonene ha motsatt romlig konfigurasjon.

3.2.2 Nomenklatur

Navngiving av fettsyrer gjøres på ulike måter. Fettsyrer blir navngitt etter antall karboner i fettsyren, syregruppen, antall dobbeltbindinger og hvilken konfigurasjon dobbeltbindingen har. Når en fettsyre er umettet blir den navngitt enten etter avstanden fra α -karbonet eller fra det siste karbonet i kjeden (n-karbonet). En fettsyre med 18 karboner og én dobbeltbinding kan f.eks. navngis slik C18:1 (Δ^{15}) eller slik *cis*-15-octadecenoic acid når en teller fra α -karbonet (Moran et al., 2014). Noen vanlige plasseringer av dobbeltbindinger er mellom C9 og C10 (Δ^9), C12 og C13 (Δ^{12}), og C15 og C16 (Δ^{15}). Når en navngir med hensyn på n-karbonet, kan en f.eks. oppgi karbonskjelletet med kun hvor dobbeltbindingen sitter i forhold til n-karbonet. I stedet for C18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) kan en da skrive C18:3 (n-3) eller C18:3 (n-3) (Moran et al., 2014). I denne studien vil fettsyrer bli navngitt slik; C18:3 (n-3) eller med forkortelser.

Tabell 1: Lister over navn på utvalgte fettsyrer.

Systematisk navn	Trivial navn	Forkortelser	Karbonskjellet
n-tetradekansyre	Myristinsyre	-	C14:0
n-heksadekansyre	Palmitinsyre	-	C16:0
<i>cis</i> -9-oktadecan-syre	Oljesyre	-	C18:1 (Δ^9)
<i>alle-cis</i> -6,9,12-oktadecan-syre	Linolsyre	LA	C18:3 ($\Delta^{6,9,12}$)
<i>alle-cis</i> -9,12,15-oktadecan-syre	α -linolensyre	ALA	C18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)
<i>alle-cis</i> -6,9,12,15-oktadecan-syre	Stearidonsyre	SDA	C18:4 ($\Delta^{6,9,12,15}$)
<i>alle-cis</i> -isosa-5,8,11,14,17-eikosen-syre	Timnodonsyre	EPA	C20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$)
<i>alle-cis</i> -isosa-5,8,11,14-eikosen-syre	Arakidonsyre	AA	C20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$)
<i>alle-cis</i> -4,7,10,13,16,19-eikosen-syre	Dokosaheksaensyre	DHA	C22:6 ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)

3.3 Helseeffekter av fettsyrer

3.3.1 Mettede og umettede fettsyrer

Det sies at umettede fettsyrer er sunnere enn mettede fettsyrer, men dette gjelder kun umettede fettsyrer med *cis*-bindinger (Ditlefsen, 2016). Umettede fettsyrer med *cis*-konfigurasjon vil, på grunn av deres romlige struktur, ikke kunne danne intermolekulære bindinger. Fettsyrer med *cis*-bindinger har derfor lavt smeltepunkt, og er som regel i flytende form ved romtemperatur. Umettede fettsyrer med *trans*-konfigurasjon vil kunne pakkes tett og tas opp i kroppen på samme måte som mettede fettsyrer. De negative helseeffektene ved å spise *trans*-fettsyrer, som økt risiko for hjerte og karsykdommer. Helseeffektene er så store at det anbefalt av det norske helsedirektoratet å begrense inntaket av *trans*-fettsyrer så mye som mulig, og at det ikke bør overstige 1 % av kostens energiinnhold (Helsedirektoratet, 2018). Det er ingen tydelig forskjeller i helseeffekter mellom enumettede fettsyrer (monounsaturated fatty acid, MUFA) og flerumettede fettsyrer (polyunsaturated fatty acid,

PUFA). Det eneste som skiller dem er at det er blant de flerumettede fettsyrene finner man de essensielle fettsyrene, og andre viktige fettsyrer. Helsedirektoratet har en anbefaling på hvor stor andel av kostens energiinnhold hver fettsyregruppe bør utgjøre. PUFA bør utgjøre mellom 5 og 10 energiprosent. MUFA bør bidra med mellom 10 og 20 energiprosent og SFA bør ikke bidra med enn 10 energiprosent (Helsedirektoratet, 2018).

3.3.1 n-3 og n-6 fettsyrer

For mennesker er det to fettsyrer som er essensielle, α -linolensyre (Maciel et al. 2016) og linolsyre (LA). Disse gir opphav til viktige signalstoffer. I tillegg er de viktige for dannelse av membranlipider og de påvirker kolesterolstoffskiftet (Store norske leksikon, 2019). Viktigheten av ALA er blant annet beskrevet i en artikkel av Bourre et. al. (1989), hvor et lavt nivå av ALA i kosten linkes til en tidlig død. Det anbefales i denne artikkelen at minimum 0,4 % av kostens energiinnhold kommer fra ALA og det norske helsedirektoratet (Helsedirektoratet, 2018) anbefaler et minimum 0,5% av kostens energiinnhold kommer fra ALA. ALA kan bli dannet om i kroppen til EPA og DHA. EPA og DHA har viktige funksjoner i cellene våre (Moran et al., 2014, Rioux et al., 2017) Blant annet inngår det begge i cellemembraner, EPA er betennelsesdempende og DHA er spesielt viktig for fostre, premature og nyfødte (Store norske leksikon, 2019; Malt, 2019). Dessverre har helsedirektoratet ingen anbefalinger på hvor mye av EPA og DHA vi burde få i oss (Helsedirektoratet, 2018). ALA kan også omdannes til SDA. Til sammen anbefales det at rundt 1 % av kostens energiinnhold kommer fra n-3 fettsyrer. Linolinsyre er en n-6 fettsyre. Helsedirektoratet anbefaler at minimum 3 % av energiinnholdet i kosten kommer fra LA og ALA (Helsedirektoratet, 2018). I tillegg til høyt innhold av mange n-3 fettsyrer, er n-6 fettsyren AA, vanlig i makroalger (Rioux et al., 2017).

3.3.2 n-6:n-3 forhold

Det sies at en balanse mellom n-3 og n-6 fettsyrer påvirker helsen vår. Ett optimalt n-6:n-3 forhold er mellom 1:1 og 4:1 (Moran et al., 2014; Simopoulos, 2002). I denne studien vil et forhold $\leq 4:1$ bli regnet som et lavt n-6:n-3 forhold. Dersom forholdet er høyere enn dette, f.eks. rundt 10:1, vil det føre til en økt risiko for hjerte og karsykdommer (Moran et al., 2014). A.P.Simopoulos (2002) argumenterer for viktigheten av forholdet mellom n-6:n-3 fettsyrer i boken *Biomedicine & pharmacotherapy* (2002) der hun nevner flere sykdommer som et lavt n-6:n-3 forhold kan ha en positiv effekt på. Blant annet blir en reduksjon i n-6:n-3 forhold assosiert med lavere risiko for brystkreft, et forhold redusert til 2-3:1 reduser inflammasjon hos pasienter med leddgikt og et forhold redusert til rundt 5:1 ansees å være best for pasienter med astma, hvor et forhold på 10:1 var normalt (Simopoulos, 2002). I en studie hvor rotter ble foret med en kost med n-6:n-3 forhold på 4:1 eller mindre sier at et lavt n-6:n-3 (altså $\leq 4:1$)

forhold kan være viktig for hukommelsen og toleranse av smerte (Yehuda and Carasso, 1993). Det er viktig å merke seg at det norske helsedirektoratet ikke har noen anbefalinger på n-6:n-3 forhold, og FAO (FNs organisasjon for ernæring og landbruk) mente i 2010 at dette ikke er et viktig nok til å gi en anbefalt daglig mengde (Helsedirektoratet, 2018) (FAO, 2013)

3.4 Makroalger

Alger defineres tradisjonelt sett som organismer med fotosyntese. Makroalger er flercellede alger som vokser i strandsone eller på grunt vann (Egeland and Throndsen, 2018). De deles inn i tre grupper basert på pigmentering og kjemisk sammensetning; *Rhodophyta* (rødalger), *Chlorophyta* (grønnalger) og *Phaeophyta* (brunalger) (Xu et al., 2017). Makroalger består av en rot, stilk og et bladlignende organ. Store festede alger, som brunalger, blir ofte kalt tang og tare, mens flercellede grønnalger blir kalt grønske (Egeland and Throndsen, 2018). Av et område på 89 091 km² (Kartverket, 2018), er omtrent 10 000 km² av norskekysten er bevokst med makroalger, som gjør den til Europas største (Havforskningsinstituttet, 2019). I Norge høstes rundt 150 00 tonn i året og eksporteverdien for stortare og grisetang er 1-1,5 milliarder kroner i året (Andersen, 2015).

3.4.1 Mikroalger

De fleste alger i verden er mikroalger, også kalt planteplankton. Dette er encellede organismer som enkeltvis kun kan ses gjennom et mikroskop, men i store mengder gi farge på vannet.

3.4.2 Utvalgte makroalger

Palmaria palmata (norsk: søl) er bladformet rødalger som vokser i grunt vann på substrat (fjell eller steinbunn) eller på stilken til andre makroalger. De kan bli inntil 50 cm lang og er godt utbredt langs den norske kysten. De er svært næringsrike og brukes som i mat på Island, Grønland og i Canada (Egeland, 2009).

Alaraia esculenta (norsk: butare), er brunalger. Over roten sitter sporebærende blader og stilken fortsetter oppover som en rygg til toppen av bladet. Bladet kan bli opptil 4 meter lang og 25 cm bred. De vokser på steiner i grunt vann og er vanlige å finne på kysten av Vestlandet og Nord-Norge (M.D. Guiry in Guiry, 2019; Egeland, 2009).

Saccharina latissima (norsk: sukkertare), tidligere kjent som *Laminaria saccharina*, er brunalger som vokser langs hele norskekysten. Sukkertare består av et festeorgan kalt hapter, en tynn stilk som blir ikke lengre enn 100 cm og et udelt blad. Bladet vokser 1 cm i døgnet i vekstsesongen, blir inntil 4 meter langt og mellom 10-75 cm bredt. Vekstsesongen er i sen vinter og tidlig vår, mens sommer og høst brukes til produksjon av sporer. Sukkertare vokser

gjørne i tareskoger på harde overflater i rolig sjø. Bestanden av sukkertare i Norge er lav og overvåkes av Miljødirektoratets program «Økosystemovervåking i kystvann – ØKOKYST» (Andersen, 2015).

Laminaria hyperborea (norsk: stortare) er en brunalge bestående av tre deler. En rot, en stilk som kan bli opptil 3 m lang og ytterst er det et blad som til sammen kan bli opptil 1 m². Bladet fornyes hvert år, mens stilken kan bli opptil 20 år gammel. Stortare er den mest utbredte, festede arten langs norskekysten og danner store tareskoger ned mot 30 meters dyp. Ettersom den trives med stor bevegelse i vannet, er den sjelden å se inne i fjorder. Det er vist at stortare blir større jo mer usatt for bølger de er (Pedersen et al., 2012). Med høyt innhold av karbohydrater, hvor alginat utgjør opp til 40 % av tørrmassen, blir den i dag brukt mye i alginatproduksjon (Horn et al., 1999).

3.4.2 Makroalger som mat og fôr

Makroalger som mat er ikke noe nytt, og er populært i store deler av verden, spesielt i asiatiske land som Kina, Japan, Filipinene og Sør-Korea. Brunalgene *Undaria pinnatifida* (wakame) og *Saccharina japonica* (ma-kombu) samt rødalgeslekten *Porphyra* (nori) er mye brukt i tradisjonell mat (Taboada et al., 2013), og er de mest spiste algartene (dyrket og høstet) i dag (Rioux et al., 2017). Mellom 1993 og 2003 har forbruket av makroalger som mat, økt på verdensbasis fra 0,87 til 2,04 (kg/innbygger/år) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019). I Norge har makroalger tidligere blitt brukt til gjødsel og som fôr, men i dag brukes de i hovedsak til utvinning av alginat og produksjon av tangmel (Mæhre et al., 2014). Alginat og tangmelindustrien i Norge baseres på en årlig høsting av rundt 200 000 tonn stortare og grisetang (Olafsen et al., 2012). Det anslås at det kan dyrkes og høstes opp til 20 millioner tonn makroalger i Norge innen 2050, til mange ulike industrier innenfor f.eks. biodrivstoff, kjemikalier og bioaktive forbindelser, samt mat og fôr, som sammen med mikroalger kan gi en omsetning på 40 millioner kroner (Olafsen et al., 2012). Eksperimenter med rotter viser at det å spise makroalger kan bidra til å redusere kroppsvekt og forebygge hjerte og karsykdommer (Matanjun et al., 2010).

Søl er en tradisjonsrik matalge nevnt i tekster helt tilbake til 900-tallet og brukes i dag i matlagning på Island, Grønland og i Canada (Egeland, 2009). I en artikkel av Mæhre et al. i 2014 ble søl valg ut som det beste alternativet til kornprodukter i mat og fôr (Mæhre et al., 2014). Søl selges i dag både tørket og kvernet i Norge fra Frøya Tare (Frøya Tare AS, 2016).

I tabell 2, under er det gitt en oversikt over rapporterte verdier for viktige næringsstoffer, samt væskeinnhold og askeinnhold.

Tabell 2: Oversikt over rapporterte verdier av viktige næringsstoffer, samt væskeinnhold og akseinnhold, i de utvalgte makroalgene. Fra (Holdt and Kraan, 2011) (a) og (Mæhre et al., 2014) (b). Verdiene fra Mæhre et al. (2014) er regnet om fra g/kg DW til %.

Makroalge	Polysakkarider (%)	Proteiner (%)	Lipider (%)	Væskeinnhold (%)	Askeinnhold (%)
<i>P. palmata</i>	38 - 74 ^a	8 - 35 ^a	0,2 - 3,8 ^a	85,4 ^b	12 - 37 ^a
<i>A. esculenta</i>		11,0 ± 1,4 ^a	1,3 ^b	82,6 ^b	25,3 ± 5,8 ^a
<i>S. latissima</i>	38 - 61 ^a	3 - 21 ^a	0,3 - 2,9 ^a	73 - 94 ^a	15 - 45 ^a
<i>L. hyperborea</i>	38 - 61 ^a	3 - 21 ^a	0,3 - 2,9 ^a	73 - 94 ^a	15 - 45 ^a

Marine alger er ansett som den viktigste kilden til biologisk aktive forbindelser (Xu et al., 2017). Det har blitt foreslått at det høye innhold av polare lipider (glykolipider, fosfolipider osv.) bidrar med store deler av den biologisk aktivitet man observerer i makroalger (Maciel et al., 2016). Innhold av PUFA og n-6:n-3 forhold endrer seg gjennom året (Brown et al., 2014, Marinho et al., 2015). Innholdet vil også variere med vekstforhold, lystilgang, bevegelse i vannet og lignende. De positive helseeffektene ved å spise makroalger er mange og er dokumentert i en oppsummeringsartikkel av Brown et al. (2014). Her nevnes bl.a. motvirkende effekter på kreft, overvekt, diabetes og hjerte og karsykdommer (Brown et al., 2014). Det må her poengteres at de fleste studier som har kommet frem til sammenhengen mellom inntak av makroalger og positive helseeffekter er forøk med rotter og/eller cellemodeller. Det mangler store, godt organiserte studier på mennesker (Brown et al., 2014).

3.5 Metodikk

3.5.1 Lipidekstraksjon

Det er to metoder for lipidekstraksjon som er de mest brukte i dag; «Folch's metode» (Folch, Lees and Sloane, 1957) og «Blight&Dyer's metode» (Bligh and Dyer 1959). Ekstraksjon brukes for å separere forbindelser i et tofasesystem ut ifra forbindelsene sine egenskaper. Begge metodene tar i bruk kloroform, metanol og vann for å ekstrahere ut lipid fra prøver.

Folch's metode benytter en løsning med et forhold mellom kloroform og metanol på 2:1 (ofte kalt «Folch's løsning»), som lipidene homogeniseres i. Deretter filtreres prøven, før prøven vaskes ved å tilsette vann med et volum på 0,2 ganger benyttet volumet av Folchs løsning. Dette vannet kan tilsettes ulike salter, ut ifra behov. I denne studien ble natriumklorid brukt.

Det blir da dannet et tofasesystem, hvor det vannfasen ligger øverst og inneholder for det meste strandin, og det organiske laget blir liggende nederst og vil inneholde lipidene. Denne metoden er en enkel og rask måte å ekstrahere lipidene på, uten at det dannes skum ved tørking (Folch et al., 1957).

I Bligh&Dyer's metode starter man med å homogenisere en prøve i 2 min i en 1:2 blanding av kloroformmetanol, f.eks. 100 ml kloroform og 200 ml metanol. Så tilsettes 100 mL kloroform etter 30 sekunder, til et nytt forhold 2:2. 100 mL vann blir tilsatt etter nye 30 sekunder. Prøven er nå løst opp i et tofasesystem, hvor forholdet nå er 2:2:1 av henholdsvis kloroform, metanol og vann. Løsningen filtreres, helles over i en sylindere og las stå i et par minutter, slik at fasene blir separert. Den organiske fasen vil her, som i Folch's metode, inneholde lipidene (Bligh and Dyer, 1959).

Begge metodene enkle og raske, og kan tilpasses prøvetypen. I denne studien/masteroppgaven ble det valgt å benytte Folch's metode.

3.5.2 Kromatografi

Kromatografi er et samlebegrep på separasjonsmetoder, basert på prinsippet at ulike forbindelser har ulik affinitet til en stasjonære og en mobil fase. Ved fullstendig separasjon har man en tilstand hvor det er fullstendig isolasjon av alle de kjemiske forbindelsene i en blanding. Det er flere måter å navngi og å dele kromatografi inn i mindre grupper. En måte er å navngitt dem etter valg av mobilfase, som med superkritiskvæskrokromatografi, væskrokromatografi og gaskromatografi. En annen metode for å navngi dem er etter valg av kolonne. Man benytter ulike kolonner og ulike prinsipper avhengig av analytt. Noen av disse har navn som adsorpsjonskromatografi, fordelingskromatografi, ionebyttekromatografi og eksklusjonskromatografi.

Gaskromatografi er en mye bruk kromatografisk metode, og er en meget vanlig kromatografi når man ønsker å benytte seg av et massespektrometer som detektor. Instrumentene består av en injektor, en kolonne og en detektor. Injektoren er ofte en «split»/«splitless» injektor, hvor en av to injeksjonsteknikker kan utføres. Med en «split»-teknikk blir kun en liten, forutbestemt mengde av prøven påført kolonnen, mens resten kastes. Med «splitless» teknikk blir all prøve injisert inn på kolonnen. Man bruker som regel kun «splitless» når man har små mengder prøve. Prøven blir påsatt på i en oppvarmet injektor, slik at den fordampes, og så sendes den videre til kolonnen. Det er på kolonnen separasjonen skjer. Det er flere typer kolonner for ulike formål, som preparative kolonner, forkolonner og analytiske kolonner med kapillær og pakkede kolonner. Forkolonner brukes for å rense prøven og for å beskytte den

analytiske kolonnen. Preperative kolonner brukes når man har stor mengde analytt. Pakkede kolonner er i bruk mest til forbedende arbeid. Disse inneholder små partikler (ofte silika) som enten er stasjonærfase eller er dekket av stasjonærfase. Analytiske kolonner brukes til både kvantitative og kvalitative analyser og har mellom 2000 og 3000 teoretiske plater. Antall teoretiske plater er et mål på hvor god separasjonsmetoden er, flere teoretiske plater gir bedre separasjon. Kapillærkolonner er i dag de mest vanlige kolonnene med rundt 3000 teoretiske plater pr meter. Det er tre ulike typer kapillærkolonner; veggdekt åpen kolonne (WCOT, wall-coated open tubular column), delvis dekt åpen kolonne (SCOT, Support-coated open tubular column) og porøslag åpen kolonne (PLOT, Porous-layer open tubular column). WCOT er den vanligste og kan brukes til det meste. Kolonnenveggen er dekket med en stasjonærfase. I gasskromatografi kan denne være en væske eller et fast stoff, der væsker er mest vanlig. Mobilfaen i gasskromatografi er en inert gass, kalt bæregass. Bæregassen er som regel helium ($\text{He}_{(g)}$), hydrogen ($\text{H}_{2(g)}$) eller nitrogen ($\text{N}_{2(g)}$). $\text{H}_{2(g)}$ er populær fordi den gir ofte raskere separasjon enn de andre, er billig og lett å skaffe ren. Faren med $\text{H}_{2(g)}$ er at det er eksplosivt i kombinasjon med oksygen og at det derfor må en del sikkerhetstiltak til for å bruke det som bæregass. Helium har høyere viskositet og er bedre egnet som bæregass da den er en edelgass. Når man velger mobilfase er det vanlig å basere valget på hvilken hastigheten man ønsker å analysere ved, samt sikkerhetsvurderinger. Det er flere ulike typer detektorer å velge mellom, hvor de vanligste er en flammeioniseringsdetektor (FID, flame ionization detector) og massespektrometre (MS).

Den relative responsfaktoren (RRF) er instrumentet sin respons på analytt i forhold til en internstandard. RRF brukes i kombinasjon med internstandarder til å beregne konsentrasjon av analytt og må bestemmes på forhånd ved bruk av standarder. En responsfaktor er forholdet mellom konsentrasjon av en analytt og responsen som blir detektert i analysen (Rome and McIntyre, 2012).

3.5.3 SPE

Fastfaseekstraksjon (solid phase extraction, SPE) er en ekstraksjonsmetode for å isolere, vaske og/eller oppkonsentrere analytt. SPE bruker de samme prinsippene som adsorpsjonskromatografi, for å kunne utføre disse oppgavene. I adsorpsjonskromatografi blir de ulike analyttene eluert ut ved ulike tidspunkt pga. ulike affinitet til stasjonærfasen. Man må bruke ulike mobilfaser å eluere ut de ulike analyttene. I SPE skjer ekstraksjonen på en pakket kolonne, ofte bestående silika. Silika er ofte brukt som sorbent da det ikke krymper eller sveller i ulike løsningsmidler. SPE utføres i fire steg; kondisjonering, påføring av prøve, vask og eluering. I første steg kondisjoneres kolonnen med et passende løsningsmiddel. I steg to påføres prøven på kolonnen. I steg tre blir uønskede forbindelser vasket bort. I steg fire

elueres analytten ut. Alternativt kan analytten eluere ut, mens de uønskede forbindelsene sitter igjen på kolonnen. Om analytten sitter på sorbenten (stasjonærfasen) eller er i væskefasen (mobilfasen) avhenger av analyttens affinitet til de to fasene. Det er mulig å eluere ut flere, ulike, analytter ved å endre elueringsmidlet. Forbindelser med ulike affiniteter til sorbenten vil da eluere ut når affiniteten til elueringsmidlet blir høyere enn affiniteten til sorbenten.

3.5.3 Massespektrometri

I massespektrometri blir analytten ionisert av en ionekilde og separert i henhold til ionenes masse til ladning forhold (m/z , mass to charge ratio). Massespektrometri (MS) har både kvalitative og kvantitative bruksområder. MS kan brukes til å finne og identifisere analytter, samt brukes som et reaksjonskammer. Et massespektrometer består av en ionekilde, et massefilter og en detektor. I tillegg har den en eller flere pumper for å skape lavt trykk inn i instrumentet. Analyttene må være i gassfase for å kunne analyseres. Prøven kommer enten direkte inn i ionekilden eller gjennom et kromatografisk system. I ionekilden omdannes analyttene til ioner. Det er flere typer ioniseringsteknikker, men den mest brukte i kombinasjon med gass kromatografi er elektronionisering (EI). I EI blir analyttene, i gassfase, bestrålt av elektroner. Elektronene korresponderer med frekvensen til analytten, hvor et elektron blir eksitert og «slått ut» av molekylet. Molekylet er nå et radikalt kation. Kationen går så videre inn i massefilteret pga. spenningsforskjeller i ionekilden. I massefilteret skjer separasjonen av analyttene. Det er mange ulike massefiltre hvor de mest vanlige er kvadrupoler (Q, Quadrupole), sektorinstrumenter, ionefeller (IonTrap), «Time of Flight (TOF) og «orbitrap». Her blir analyttionene separert ut ifra deres m/z forhold.

Det er vanlig å kombinere flere massefiltre sammen. For eksempel består et dobbeltforkuserende sektorinstrumenter av et elektrostatisk felt (E) og et magnetisk felt (B). Ionene blir skutt ut i en retning med samme moment og bøyes av først av det elektrostatiske feltet, så av magnetfeltet hvor de lengden på kurven de lager, og dermed separasjonen, avhenger av analyttens kinetiske energi (Hoffman and Stroobant, 2007).

Det er flere detektorer å velge mellom, men det er elektron- og fotomultiplikatorer som er de vanligste. I et fotomultiplikator blir en fotonstråle omgjort til elektor gjennom en fotokatode. Dette primærelektronet går så gjennom en fokusenede elektrode og treffer den første dynoden. Dynodene har sterk strøm knyttet til seg og den første dynoden vil skyte ut sekundære elektroner, når primærelektronen treffer. Denne prosessen repeteres til sekundærelektronene treffer en anode. Signalet fra anoden blir målt av et «output meter» og signalet blir sendt til en PC (Hoffman and Stroobant, 2007).

Man bruker egnede analyseprogrammer på en PC til å bestemme hva analytten er ved bruk av eksterne standarder kombinert med biblioteksøk (NIST). Internstandarder brukes for å korrigere for tap av analytt (underveis i prøveopparbeidingen og analysen) og dermed kunne bestemme konsentrasjon av analytt i kombinasjon med RRF.

3.5.4 Metylering

For å kunne benytte GC-MS som analyseinstrument må lipidene først metyleres, slik at de er mer flyktige. De blir omdannet til fettsyremetylestere gjennom metyleres ved omesting eller forestring. Nøytrale og polare lipider omesteres, mens fire fettsyrer foresteres. Under forestring byttes hydrogenet i syregruppen på fettsyren ut med en metylgruppe. Ved omestring brytes først de eksisterende esterbindingene til glyceridet eller fosfatet, før syregruppen til hver enkel fettsyre blir metylert.

4. Materialer og metoder

4.1 Kjemikaler og standarder

I tabell 3 gis det en oversikt over benyttede kjemikalier.

Tabell 3: Tabellen gir en oversikt over kjemikaliene benyttet i metodene beskrevet i dette kapittelet.

Kjemikalie	Renhet	Produkt nr	Produsent	Land
Kloroform	≥99,8 %	83627.320	VWR Chemicals	Frankrike
Metanol	≥99,9 %	83638.320	VWR Chemicals	Polen
Na (s)			Merck	Tyskland
Natriumklorid	≥99,9 %	27810.295	VWR Chemicals	Belgia
Dietyleter	≥99,9 %	32203-2.5L	Sigma-Aldrich	Polen
Eddiksyre	100 %	20103.330	VWR Prolab	Frankrike
2-propanol	100 %	20839.297	VWR Chemicals	Frankrike
n-heptan	≥99,9 %	101827591	Acros Organics	Belgia
Bortrifluorid (BF ₃ MEOH)	14 %	B1252-250mL	Aldrich Chemistry	Sveits
Nitrogen(l)	99.999 %		AGA, the Linde Group	Tyskland

Folch's løsning som ble benyttet til lipidekstraksjon ble laget ved å blande kloroform og metanol i forhold 2:1 (v/v %). Natriummetanolat som ble benyttet i omestring av NL og PL til FAME ble laget ved å løse Na(s) i metanol til en konsentrasjon på 3,3 mg/mL. En blanding av dietyleter og eddiksyre ble benyttet i eluering av frie fettsyrer under fastfaseekstraksjon. Denne ble laget ved å blande dietyleter og eddiksyre i et 98:2 (v/v %) forhold.

Det ble brukt en rekke standarder gjennom metoden. Det ble benyttet tre ulike C19:0 som internstandarder, til hver av fraksjonene. Trinonadecanoid ble brukt for NL fraksjonen, nonadecanoic acid ble brukt for FFA fraksjonen og 1,2- dinoadecanoyl-sn-glyceo-3-phosphatidylcholin ble brukt i PL fraksjonen. Det ble også brukt en rekke eksterne standarder for å identifisere de ulike fettsyrene. En oversikt over disse er gitt i tabell 4 under.

Tabell 4 : Oversikt over internstandarder og eksterne standarder brukt for å identifisere fettsyrer i algeartene. Tre ulike C19:0 ble brukt som internstandarder, en for hver lipidfraksjon. FAME-miks er fra (food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA). Alle andre standarder er fra Larodan (Sverige).

Internstandarder	Forkortelser
1,2- dinoadecanoyl-sn-glyceo-3-phosphatidylcholin	C19:0
nonadecanoic acid	C19:0
trinonadecanoid	C19:0
Eksterne standarder	Forkortelser
FAME miks	R37
<i>cis</i> -11-oktadekansyre	C18:1, <i>cis</i> 11
alle- <i>cis</i> -7,10,14,16-oktadekansyre	18:4, <i>cis</i> 7,10,13,16
alle- <i>cis</i> -5,11,14 - propenosyre	C20:3, <i>cis</i> 5,11,14
alle- <i>cis</i> -8,11,14,17- butenosyre	C20:4, <i>cis</i> 8,11,14,17

Automatpipetter (Finnipipette™ ,100-1000µl, ThermoFisher Scientific) ble brukt under forsøkene. Hamelton® sprøyter ble brukt til å tilsette internstandarder (50 µL) og til å reløse replikaene i kloroform.

Alle eksperimenter ble utført på laboratorier ved fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet, Ås.

4.2 Prøver og prøvepreparering

P. palmata, *A. esculenta* og *S. latissima* kom fra Seaweed Energy Solutions (Trondheim, Norge). *A. esculenta* og *S. latissima* ble dyrket på Taraskjæret (Sør-Trøndelag, Norge) og høstet i henholdsvis i juni og mai 2018. Viltvoksende *P. palmata* ble høstet for hånd fra båt ved Taraskjæret sent i mai. *L. hyperborea* ble skaffet av FMC Biopolymers (Vormedal, Norge). Den ble høstet 13. mai 2018 i Vikna/Horta (Nord-Trøndelag, Norge). Alle algene ble fryst og lagret ved -20°C.

Før analyse ble algene tint og kuttet opp. Stilk og blad fra *L. hyperborea* ble behandlet som separate prøver. Rundt 40 g av hver alge ble lagt til side for bestemme vanninnhold. Algene ble sjokkfryst med flytende nitrogen N₂ (99.999%, AGA, the Linde Group, Munich, Germany) i separate digeler og brukket opp i mindre biter. De ble så tørket i en frysetørker (Alpha 2–4 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) ved -50°C i ca. 4 døgn. Algene ble kvernet opp til grovt pulver (1x1 mm) med en kuttemølle (Retsch, SM 2000, F. Kurt RETSCH GmbH & Co. KG). Prøve-pulverene ble oppbevart ved -20°C frem til prøveopparbeiding/analyse.

4.3 Bestemmelse av vanninnhold

Fire digler per alge ble tørket i varmeskap ved 105°C i en time og kjølt ned i en eksikator, i minimum 45 min for å nå romtemperatur. Eventuelt overflatevann på algene ble fjernet med papirservietter (Kimtech Science av Kimberly-Clark Professional). Digelene ble veid alene (m_0), med rundt 10 g alger (m_1), med fire desimaler, før algene ble tørket i varmeskap i minimum 6 timer. Etter 6 timer ble digelene igjen avkjølt til romtemperatur, før de ble veid på nytt (m_2). Vanninnholdet ble beregnet i prosent (%/v) ut ifra formel 1, under. Med fire desimaler gir dette en nøyaktighet på 0,1% (%/v).

$$W_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} * 100\% \quad (\text{Formel 1})$$

4.4 Lipid ekstraksjon

Til lipidekstraksjonene ble det benyttet en væske-væske ekstraksjon tilpasset fra Folch's metode (Folch et al., 1957) slik som beskrevet av Foseid et al. (Foseid et al., 2017). Fire replikater på $5 \pm 0,03$ g algepulver ble veid ut og overført til 250 mL blåkorkflasker (Schott Duran, 250 mL, Borosilicate 3.3, VWR). En femte, tom blåkorkflaske fungerte som blank. 100 mL Folchs løsning ble tilsatt, i tillegg ble 50 μ L av hver internstandard tilsatt. Blåkorkflaskene ble ristet på en orbitalrister (BIOSAN Ltd, PSU-10i) ved 220 rpm i 20 minutter. Løsningene ble overført til 250 mL skilletrakter og tilsatt 20 mL 0,9 % NaCl(aq). Skilletraktene ble ristet manuelt og sto så i 20 min. Den organisk fasen ble overført til inndampingsrør (Evaporation glass tubes for rack R-12, Butch). Blåkorkflaskene ble vasket med kloroform (66 mL) som deretter overført til skilletraktene (som fortsatt innehold vannfasen). Prøvene ble dermed reekstrahert, etter tilsvarende metode som over. Denne reekstrasjonen ble gjennomført én gang til. Den organiske fasen til hvert replika ble fordelt på to inndampingsrør, både for å forhindre støtkoking og øke væskeoverflaten. Rørene ble deretter satt i en vakuuminndamper (Vacuum Pump, v-700, BÜCHI og Vacuum controller, v-855, BÜCHI). Rotasjon ble satt til 190 rpm, 40°C og trykket ble først satt til 430 mbar, for så å bli senket ned til 207 mbar over 5-15r. Etter rundt en og en halv time ble delte replikaene slått sammen til en løsning for hvert replika og tørket videre i én ny time. Under rekombinasjonen ble det tomme røret vasket med ca. 5 mL kloroform, som så ble overført til røret med den kombinerte løsningen. Da løsningene hadde tørket inn ble hvert av rørene tilsatt 5 mL kloroform, overført til reagensrør, og dampet inn til tørt med $N_2(g)$ ved 40°C på varmeblokk (Cri-Block DB-3, HOUM).

Replikaene ble etterpå løst i 1 mL kloroform og overført til mikrorør (Microtubes, MCT-150-C, 1,5 mL clear, Axygen, USA). Rørene ble sentrifugert i en mircosentrifuge (Sigma

Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Germany) på 14000 rpm i fem minutter. Deretter ble supernatanten overført til nye, markerte og veide mikrorør.

4.5 Bestemmelse av totalt lipidinnhold

Supernatanten ble tørket med N_{2(g)} ved 40°C. Ved tørrhet ble rørene veid på nytt. Vekt før og etter ble brukt til å beregne totalt lipidinnhold etter formel 2, under. Etter dette ble 1 mL kloroform tilsatt, rørene ristet godt, før løsningen ble overført til LC-vials.

Formel 2 under, beskriver hvordan totalt lipidinnhold ble beregnet. Lipidinnholdet ble korrigert med blank, som også inneholdt internstandard. m₁ = mikrotube 1, ml₁ = mikrotube 1 med lipid, m_b = mikrotube blank, ml_b = mikrotube blank med lipid, p₁ = tørrvekt til replika 1.

$$\text{Lipidinnhold (\%)} = \frac{(ml_1 - m_1) - (ml_b - m_b)}{p_1} * 100\% \quad (\text{Formel 2})$$

4.5 Fastfaseekstraksjon

De ekstraherte lipidprøvene ble fraksjonert med en SPE robot (GX-274, ASPEC) for å separere lipidene inn i tre fraksjoner, bestående av nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. SPE-kolonnene brukt var av type Chromabond NH₂ polypropylen, Machery-Nagel, 500 mg. Kolonne ble kondisjonert med 7,5 mL heptan, mens 5 mL kloroform, 5 mL dietyleter:etansyre (98:2 v/v%) og 5 mL metanol ble brukt til å eluere ut henholdsvis nøytrale lipider, frie fettsyrer og polare lipider. Isopropanol ble brukt til å vaske og gjøre klar SPE-robotsystemet. Vask ble manuelt utført før hver ekstraksjon. Flythastigheten var 1,0 mL/min og programmet var satt til «batch run». Etter endt program ble eluatene dampet inn med N_{2(g)} ved 40°C til tørrhet.

4.6 Omestring av nøytrale og fosfolipider og forestring av frie fettsyrer

Nøytrale- og polarlipidfraksjon ble løst opp i 2 mL heptan og overført til rør med skrukork. Deretter ble 1,5 mL natriummetanolat [3,3 mg/mL] tilsatt og rørene ristet horisontalt på en orbitalrister (BIOSAN ltd, PSU-10i) i 30 min ved 350 rpm. Rørene sto så vertikalt i 10 min, før det øverste laget ble overført til GC-vials (Crimp vial 1,5 mL 32x11.6mm CI Wide Label, W.Öffnung, VWR).

Lipidfraksjonen med frie fettsyrer ble løst i 1 mL BF₃-MeOH (14%). Prøvene sto så fem minutter i vannbad ved 70°C. 1 mL heptan ble tilsatt og løsningene ble blandet på vortexmikser (Yellow-Line, IKA). Heptanfasen ble overført til GC-vials (Crimp vial 1,5 mL 32x11.6mm CI Wide Label, W.Öffnung, VWR) og lagret ved -20 °C frem til analyse på GC-MS.

5. Resultater og diskusjon

5.1 Totalt lipidinnhold

I tabell 5, under, er totalt lipidinnhold for de ulike algene oppgitt. Det totale lipidinnholdet er innenfor det forventede området på 0,2 – 3,8 % (se tabell 2, side 16). Variasjoner innenfor disse områdene antas å skyldes ulike høstingstidspunkt og ulike vekstvilkår (som mengde lys, temperatur i vannet, konkurranse om plass, antall planteetere i området og næringsinnhold i vannet). I tillegg må det antas å være noe variasjon mellom de i ulike artene. De utvalgte algartene i denne studien er høstet på samme tidspunkt på året, i samme område av Norge. *P. palmata* og *S. latissima* er algartene med størst lipidinnhold (> 2 %). Dette stemmer godt over ens med verdiene oppgitt i tabell 2, hvor *P. palmata* har høyest lipidinnhold av alle de utvalgte artene, og *S. latissima* er nummer 2 (sammen med *L. hyperborea*).

Tabell 5: Totalt lipidinnhold for *P. palmata* (n=3), *A. esculenta* (n=4), *S. latissima*(n=4), *L. hyperborea* (blad) (n=4) og *L. hyperborea* (stilk) (n=4), beregnet slik det er beskrevet i formel 2.

Makroalger	Totalt lipidinnhold [% lipid]
<i>P. palmata</i>	2,85 ± 0,11
<i>A. esculenta</i>	1,13 ± 0,15
<i>S. latissima</i>	2,43 ± 0,30
<i>L. hyperborea</i> (blad)	1,03 ± 0,12
<i>L. hyperborea</i> (stilk)	1,28 ± 0,21

5.2 Total vanninnhold

I tabell 6, under, er det oppgitt beregnede innhold av væske i hver makroalge. Man kan se at vanninnholdet varierer fra rundt 76 % til 87 %. Disse verdiene stemmer over ens med verdiene oppgitt i tabell 2, side 14 (Holdt and Kraan, 2011; Mæhre et al., 2014).

Tabell 6: Totalt vanninnhold i *P. palmata*, *A. esculenta*, *S. latissima*, *L. hyperborea* (blad) og *L. hyperborea* (stilk) (n=4), beregnet som beskrevet i formel 1. Innholdene er gitt som gjennomsnitt av fire replika ± standardavvik for alle makroalger.

Makroalge	Totalt vanninnhold (%) ± SD
<i>P. palmata</i>	76,56 ± 0,52
<i>A. esculenta</i>	78,17 ± 0,94
<i>S. latissima</i>	87,16 ± 0,19
<i>L. hyperborea</i> (blad)	83,13 ± 0,44
<i>L. hyperborea</i> (stilk)	85,92 ± 0,06

5.3 Oversikt over fettsyresammensetninger i *P. palmata*, *A. esculenta*, *S. latissima*, *L. hyperborea* (blad) og *L. hyperborea* (stilk)

I tabell 7, under, er en oversikt over viktige forhold gitt for alle makroalgene. Disse forholdene vil bli diskutert for hver makroalge i deres egne delkapitler, og i resten av dette kapitlet.

Tabell 7: Oversikt over n-6:n-3 forhold, prosentandel av NL, FFA og PL, samt sum SFA, MUFA og PUFA i *P. palmata* (n=3), *A. esculenta* (n=4), *S. latissima* (n=4), *L. hyperborea* (blad) (n=4), og *L. hyperborea* (stilk) (n=4).

	<i>L. hyperborea</i> (stilk)	<i>L. hyperborea</i> (blad)	<i>S. latissima</i>	<i>A. esculenta</i>	<i>P. palmata</i>
n-6:n-3 forhold	3,46:1	0,57:1	1,05:1	0,63:1	0,06:1
SFA (%)	28,4	25,9	43,0	33,5	62,7
MUFA (%)	33,9	15,8	19,5	22,5	14,3
PUFA (%)	33,1	58,2	37,4	44,0	23,0
NL (%)	19,8	22,3	27,7	60,9	40,0
FFA (%)	4,5	50,6	51,4	9,0	21,0
PL (%)	75,8	27,1	20,9	30,1	39,0

5.4 Fettsyreprofil for *P. Palmata*

Det ble laget en totalt fettsyreprofil for *P. palmata*, delt opp i tre fraksjoner. Fettsyreprofilen er gitt i tabell 8 under.

Tabell 8: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i $\mu\text{g/g DW}$ til fettsyrene i *P. palmata* (n=3). Sum av NL, FFA og PL, samt sum av SFA, MUFA og PUFA. I tillegg er sum omega 3 og 6 også gitt ($\mu\text{g/g DW}$). n.d. (not detected) - fettsyren ble ikke funnet. Fettsyrer markert med * er kun funnet i NIST biblioteket. Fettsyrene er listet opp i elueringsrekkefølge.

Fettsyre	NL \pm SD	FFA \pm SD	PL \pm SD
C10:0	1,08 \pm 0,14	n.d.	n.d.
C11:0	100,72 \pm 4,86	n.d.	n.d.
C12:0	4,99 \pm 0,31	0,84 \pm 0,10	0,46 \pm 0,01
C14:0	29,44 \pm 4,39	25,91 \pm 1,01	26,69 \pm 0,98
C15:0	n.d.	1,78 \pm 0,03	1,03 \pm 0,07
C16:0	161,09 \pm 21,53	132,49 \pm 4,75	261,42 \pm 3,42
C16:1, <i>cis</i> 9	11,07 \pm 1,23	12,96 \pm 0,62	3,50 \pm 0,59
C16:1, <i>cis</i> 11	2,27 \pm 0,49	0,77 \pm 0,01	n.d.
C17:0	n.d.	0,79 \pm 0,02	1,41 \pm 0,41

C18:0	7,10 ± 0,85	31,06 ± 1,68	6,02 ± 0,25
C18:1, <i>cis</i> 9	27,55 ± 1,46	16,77 ± 0,65	66,04 ± 1,81
C18:1, <i>cis</i> 11*	4,25 ± 0,33	5,43 ± 0,30	4,60 ± 0,07
C18:2, <i>cis</i> 9,12	2,88 ± 0,48	4,06 ± 0,04	2,79 ± 0,10
C18:3, <i>cis</i> 6,9,12	0,93 ± 0,48	n.d.	0,65 ± 0,20
C18:3, <i>cis</i> 9,12,15	1,03 ± 0,17	4,92 ± 0,22	0,56 ± 0,06
C20:1, <i>cis</i> 11	1,63 ± 0,47	1,16 ± 0,10	1,23 ± 0,22
C18:4, <i>cis</i> 6,9,12,15	0,73 ± 0,16	4,22 ± 0,37	3,19 ± 0,44
C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14	2,11 ± 0,07	2,26 ± 0,40	1,55 ± 0,22
C22:1, <i>cis</i> 13	2,00 ± 0,28	1,24 ± 0,04	0,93 ± 0,20
C20:5, <i>cis</i> 5,8,11,14,17	138,21 ± 7,36	12,76 ± 0,55	108,71 ± 0,61
C24:1, <i>cis</i> 15	7,88 ± 0,31	7,28 ± 1,57	2,85 ± 0,29
Total i fraksjonen	506,94 ± 45,39	266,70 ± 12,45	493,63 ± 9,95
Σ SFA	304,41 ± 65,71	192,88 ± 54,35	297,04 ± 113,59
Σ MUFA	56,65 ± 9,26	45,61 ± 6,30	79,14 ± 25,93
Σ PUFA	145,88 ± 55,80	28,21 ± 4,10	117,45 ± 43,68
Σ n-3	139,97 ± 79,29	21,90 ± 4,74	112,46 ± 61,69
Σ n-6	5,91 ± 0,98	6,31 ± 1,27	4,99 ± 1,08

I tabell 8 ble fettsyreprofilen til *P. palmata* presentert. Totalt fettsyreinnhold var 1267 µg FAME/g DW, eller 1,26 mg FAME/g DW. Fettsyrene som utgjør størst andel av fettsyreinnholdet er C11:0, C14:0, C16:0, C18:1, *cis*9 og C20:5 (n-6). Det var en ganske jevn fordeling av fettsyrene i de tre fraksjonene, med lavest innhold av frie fettsyrer. Tidligere studier har funnet høyt innhold av først og fremst C16:0, C18:1, *cis*9 og C20:5 (n-3), men også C14:0, C20:4 (n-6) og C18:0 (Fleurence et al., 1994; Sánchez-Machado et al., 2004; Holdt and Kraan, 2011; Schmid et al., 2014; Mæhre et al., 2014). I denne studien er C20:4 (n-6) og C18:0 ikke funnet i like stor grad.

C11:0 skiller seg ut blant fettsyrene detektert. Den var ikke funnet i studiene referert til her (Fleurence et al., 1994; Sánchez-Machado et al., 2004; Holdt and Kraan, 2011 Schmid et al., 2014; Mæhre et al., 2014). I denne studien var C11:0 kun funnet i NL fraksjonen og den utgjør så mye som 8 % av totalt lipidinnhold i algen og bidrar en del til det høye innholdet av mettede fettsyrer. Over 62 % av alle lipidene i *P. palmata* var mettede fettsyrer (se tabell 5). Et høyt innhold av mettede fettsyrer i rødalger var tidligere bekreftet i en artikkel av Sánchez-Machado et al. (Sánchez-Machado et al., 2004), hvor verdiene for SFA, MUFA og PUFA var henholdsvis 60,48%, 10,67 % og 28,86 %. Disse stemmer godt med verdiene for *P. palmata*,

som man kan se i tabell 6. C16:0 som bidro mest til det høye nivået av mettede fettsyrer, da den utgjorde nesten 46% av totalt fettsyreinhold algen. Det var funnet mer jevn fordeling mellom SFA og PUFA tidligere i en studie av Schmid *et. al.* (2014) fordelingen mellom SFA, MUFA og PUFA henholdsvis slik; $42,2 \pm 4,3\%$, $7,8 \pm 0,6 \%$, $49,8,4 \pm 3,6 \%$. Forskjellene kan ha kommet av høsting ved ulike steder (Irland og Norge) og i ulike år.

P. palmata har svært høyt innhold av n-3 fettsyrer, og lavt innhold av n-6 fettsyrer. Her var C20:5 (n-3) den største bidragsyteren med ca. 13,5 % av total lipidinnhold. EPA er en veldig viktig fettsyre, som bl.a. inngår i cellemembraner og forhindrer betennelser. Dette høye innholdet av n-3 og lavt innholdet av n-6, gir et veldig lavt n-6:n-3 forhold på 0,063:1. Det lave forholdet stemmer overens med tidligere studier, hvor n-6:n-3 forhold var funnet mellom 0,05:1 (van Ginneken *et al.*, 2011), 0,1:1 (Holdt and Kraan, 2011) og 0,13:1 (Sánchez-Machado *et al.*, 2004). Et så lavt n-6:n-3 forhold vil senke risikoen for mange helseplager og sykdommer som høyt blodtrykk, overvekt, hjerte og karsykdommer (Simopoulos, 2002).

Av de essensielle fettsyrene så utgjorde LA kun 0,77 % og ALA kun 0,51 % av totalt fettsyreinhold. Dette er litt lavt innhold, kun 1,23 % til sammen, da man ønsker så høyt innhold av disse fettsyrene som mulig, pga. deres livsviktige funksjoner.

P. palmata er i dag alt bruk i matlaging og er anbefalt som et godt alternativ til kornprodukter. Dette ble begrunnet med artens høye innhold av proteiner, men kan også støttes av den lave n-6:n-3 forhold (Mæhre *et al.*, 2014). Denne studien bygger opp under dette, da det er funnet høyt innhold av n-3 fettsyrer som gir et lavt n-6:n-3 forhold. Den høye innhold av mettede fettsyrer bør tas i betraktning når den vurderes som mat, fôr eller tilskudd i mat og fôr.

5.5 Fettsyreprofil til *A. esculenta*

Det ble bestemt en totalt fettsyreprofil for *A. esculenta*. Den er delt opp i tre fraksjoner og inneholder sum av alle fettsyrer, SFA, MUFA, PUFA, n-3 og n-6 i hver fraksjon. Fettsyreprofilen er gitt i tabell 9 under.

Tabell 9: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i $\mu\text{g/g DW}$ til fettsyrene i *A. esculenta* (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt i $\mu\text{g/g DW}$. I ruter markert med n.d. (not detected) er hvor fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket. Fettsyrene er listet opp i elueringsrekkefølge.

Fettsyre	NL \pm SD	FFA \pm SD	PL \pm SD
C12:0	$0,68 \pm 0,21$	$0,54 \pm 0,08$	n.d.
C13:0	n.d.	$0,29 \pm 0,03$	n.d.

C14:0	112,16 ± 4,88	17,41 ± 2,50	71,74 ± 8,05
C15:0	2,76 ± 0,21	0,77 ± 0,15	2,41 ± 0,34
C16:0	399,27 ± 14,92	72,56 ± 11,10	115,18 ± 12,26
C16:1, <i>cis</i> 9	115,82 ± 5,50	11,01 ± 2,86	17,33 ± 1,95
C16:1, <i>cis</i> 11	1,18 ± 0,08	0,54 ± 0,06	0,70 ± 0,10
C17:0	2,57 ± 0,17	0,51 ± 0,05	0,66 ± 0,18
C17:1, <i>cis</i> 10*	1,89 ± 0,25	0,69 ± 0,23	1,58 ± 0,22
C18:0	35,01 ± 1,35	17,00 ± 1,27	4,11 ± 0,41
C18:1, <i>cis</i> 9	331,98 ± 13,23	28,80 ± 3,77	71,57 ± 5,35
C18:1, <i>cis</i> 11*	3,11 ± 1,00	2,41 ± 0,24	2,62 ± 0,36
C16:4, <i>cis</i> 6,9,12,15	1,99 ± 0,13	0,98 ± 0,23	2,96 ± 0,17
C18:2, <i>cis</i> 9,12 (n-6)	136,48 ± 6,90	7,61 ± 1,10	52,02 ± 4,82
C18:3, <i>cis</i> 6,9,12 (n-6)	13,30 ± 0,68	1,02 ± 0,13	8,73 ± 0,76
C20:0	11,30 ± 0,62	1,45 ± 0,17	3,15 ± 0,31
C18:3, <i>cis</i> 9,12,15 (n-3)	63,60 ± 3,35	9,27 ± 1,56	23,97 ± 2,79
C20:1, <i>cis</i> 11	1,36 ± 0,10	1,13 ± 0,10	1,23 ± 0,11
C18:4, <i>cis</i> 6,9,12,15 (n-3)	68,04 ± 5,74	12,51 ± 2,41	131,04 ± 12,15
C20:2, <i>cis</i> 11,14 (n-6)	1,15 ± 0,09	0,39 ± 0,06	1,19 ± 0,33
C20:3, <i>cis</i> 8,11,14 (n-6)	6,05 ± 0,47	0,16 ± 0,03	3,67 ± 0,17
C22:0	n.d.	10,68 ± 1,44	n.d.
C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14 (n-6)	109,42 ± 10,99	0,64 ± 0,08	106,34 ± 10,76
C20:4, <i>cis</i> 8,11,14,17 (n-3)	7,69 ± 0,32	0,76 ± 0,14	3,53 ± 0,57
C20:5, <i>cis</i> 5,8,11,14,17 (n-3)	177,38 ± 12,51	31,21 ± 4,90	161,97 ± 17,55
C24:0	1,46 ± 0,20	0,28 ± 0,03	1,23 ± 0,24
C22:6, <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19 (n-3)	4,42 ± 0,38	6,12 ± 0,67	7,26 ± 0,56
Total i fraksjonen	1310,07 ± 84,27	236,75 ± 35,40	796,19 ± 80,50
Σ SFA	565,22 ± 138,07	121,49 ± 22,36	198,47 ± 46,23
Σ MUFA	455,33 ± 133,48	44,58 ± 11,20	95,02 ± 28,03
Σ PUFA	589,53 ± 62,80	70,68 ± 9,28	502,70 ± 59,32
Σ n-3	321,13 ± 69,99	59,87 ± 11,59	372,79 ± 75,10
Σ n-6	266,41 ± 64,46	9,83 ± 3,17	171,95 ± 45,26

Totalt fettsyreinnhold var på 2643 µg FAME/g DW, dvs. rundt 2,6 mg FAME/g DW. Fettsyrer med høy konsentrasjon var C14:0 C16:0, C16:1 *cis*9, C18:0, C18:1, *cis*9, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3), 18:4 (n-3) og C20:5 (n-6). Dette stemmer godt med tidligere forskning hvor også 18:4 (n-3) og C20:4 (n-6) har blitt funnet i høye konsentrasjoner, men ikke C16:1, *cis*9 (Schmid and Stengel, 2015; Mai et al., 1996; Mæhre et al., 2014). I *A. esculenta* var de fleste fettsyrer å

finne i NL fraksjonen. NL utgjorde så mye som 60,9 %, PL utgjorde 30,1 %, mens FFA utgjorde kun 9 %.

A. esculenta har høyest innhold av flerumettede fettsyrer og dette gjenspeiles av fettsyrene vi har mest av i tabell 9. Høye verdier av de essensielle fettsyrene LA (7,4 %) og ALA (3,7 %), den viktige fettsyren EPA (12,5%) og fettsyrene SDA (7,2 %) og AA (6,3 %). I enumettede fettsyrer var det C16:1, *cis*9 (8,0%) og C18:1, *cis*9 (20,4 %), som de største bidragsyterne, mens i mettede fettsyrer var det C16:0 (11,1 %) og C14:0 (9,8 %) som utgjør den største delen. I tidligere studier var det rapportert SFA andel på 29,1-32,8 %, MUFA andel på 16,8-32,8 % og PUFA andel på 41,3-50,5% (Schmid and Stengel, 2015).

Både innholdet n-3 og n-6 fettsyrer var høyt, grunnet den store andelen flerumettede fettsyrer. Innholdet av n-3 fettsyrer var på 25,3% av det totale fettsyreinneholdet, mens andelen n-6 fettsyrer utgjør 15,4 %. Dette gir et lavt n-6:n-3 forhold på 0,63:1. Dette er et godt, lavt forhold da det er nedenfor 4:1, som senker risikoen for negative helseeffekter (Simopoulos, 2002). I *A. esculenta* har det tidligere blitt funnet n-6:n-3 forhold mellom 0,6:1 og 1,0:1 (Schmid and Stengel, 2015).

Innholdet av de essensielle fettsyrene var i denne makroalgen høye, med LA som utgjorde 7,42 % og litt mindre ALA som utgjorde 3,66 %. Disse til sammen utgjør rundt 11 %. Dette er en god mengde, da disse har viktige funksjoner i kroppen.

Med høyt nivå av PUFA og et lavt n-6:n-3 forhold, burde *A. esculenta* kunne vurderes som et godt alternativ og tilskudd til mat og fôr.

5.6 Fettsyreprofil til *S. latissima*

Det ble bestemt fettsyreinnehold og laget en fettsyreprofil for *S. latissima*. Profilen er delt opp i tre fraksjoner og inneholder sum av alle fettsyrer, SFA, MUFA, PUFA, n-3 og n-6 i hver fraksjon. Fettsyreprofilen er gitt i tabell 10, under.

Tabell 10: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt i % av total fettsyreinnehold i *S. latissima* (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt % av total fettsyreinnehold. I ruter markert med n.d. (not detected) indikerer at fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket.

Fettsyrer	NL ± SD	FFA ± SD	PL ± SD
C12:0	0,14 ± 0,05	0,24 ± 0,03	n.d.
C13:0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,002	n.d.
C14:0	1,96 ± 0,08	12,77 ± 0,42	4,18 ± 0,15

C14:1, <i>cis</i> 11	0,02 ± 0,0004	0,09 ± 0,002	n.d.
C15:0	0,07 ± 0,002	0,99 ± 0,02	0,07 ± 0,01
C16:0	2,22 ± 0,14	20,04 ± 0,31	2,69 ± 0,16
C16:1, <i>trans</i> 9	0,01 ± 0,002	0,19 ± 0,01	n.d.
C16:1, <i>cis</i> 9	0,71 ± 0,02	6,73 ± 0,14	0,53 ± 0,03
C16:1, <i>cis</i> 11	0,03 ± 0,002	0,14 ± 0,003	0,04 ± 0,002
C17:0	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,003	0,01 ± 0,003
C16:2, <i>trans</i> 7,10 (n-6)	0,03 ± 0,002	0,17 ± 0,004	0,03 ± 0,002
C17:1, <i>cis</i> 10	0,01 ± 0,002	0,16 ± 0,01	n.d.
C18:0	0,11 ± 0,01	4,22 ± 0,31	0,09 ± 0,01
C18:1, <i>cis</i> 9	1,51 ± 0,10	9,47 ± 0,19	2,54 ± 0,14
C18:1, <i>cis</i> 11	0,02 ± 0,001	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,002
C16:4, <i>cis</i> 6,9,12,15	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,003
C18:2, <i>cis</i> 9,12 (n-6)	1,50 ± 0,09	3,07 ± 0,08	2,29 ± 0,15
C18:3, <i>cis</i> 6,9,12 (n-6)	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,005	0,06 ± 0,01
C20:0	0,08 ± 0,01	n.d.	0,03 ± 0,002
C18:3, <i>cis</i> 9,12,15 (n-3)	0,88 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,37 ± 0,02
C18:4, <i>cis</i> 6, 9, 12, 15 (n-3)*	1,71 ± 0,11	1,34 ± 0,05	1,49 ± 0,10
C20:2, <i>cis</i> 11,14 (n-6)	0,02 ± 0,001	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,002
C20:3, <i>cis</i> 8,11,14 (n-6)	0,04 ± 0,001	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,01
C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14 (n-6)	2,24 ± 0,13	2,63 ± 0,03	2,27 ± 0,15
C20:4, <i>cis</i> 8,11,14,17 (n-3)	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01
C20:5, <i>cis</i> 5,8,11,14,17 (n-3)	2,73 ± 0,14	1,65 ± 0,04	1,65 ± 0,07
C22:2, <i>cis</i> 13,16 (n-6)	0,09 ± 0,01	n.d.	n.d.
C22:6, <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19 (n-3)	0,02 ± 0,001	0,12 ± 0,00	0,03 ± 0,002
Total i fraksjonen	27,65 ± 6,03	51,42 ± 21,2	20,93 ± 2,64
Σ SFA	6,71 ± 1,35	29,29 ± 60,5	7,02 ± 1,79
Σ MUFA	3,36 ± 0,87	12,92 ± 2,92	3,24 ± 1,16
Σ PUFA	17,58 ± 1,86	9,21 ± 1,07	10,66 ± 1,20
Σ n-3	10,22 ± 2,15	3,40 ± 0,73	4,65 ± 1,04
Σ n-6	7,33 ± 1,70	5,84 ± 1,37	5,98 ± 1,46

Fettsyrer som skiller seg ut med høyt prosentandel var C14:0 C16:0, C16:1, *cis*9, C18:1, *cis*9, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3), C18:4 (n-3), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3). Dette er stemmer fullstendig med tidligere funn (Fleurence et al., 1994; Holdt and Kraan, 2011; Marinho et al., 2015; Vilg et al., 2015; Schmid and Stengel, 2015). *S. latissima* hadde en stor andel frie fettsyre fraksjonen.

Frie fettsyrer utgjorde over halvparten av alle fettsyrene funnet (51,4 %), mens andelen av NL var på 27,7 % og PL fraksjonen utgjør 20,9 %.

Det var detektert to *trans*-fettsyrer i *S. latissima*, C16:1, *trans*9 og C16:2, *trans*7,10. Disse ble kun identifisert ved hjelp av søk i NIST biblioteket. I Holdt *et. al.* (2011) var det rapportert C16:2, *cis*(n-6) i en annen brunalge (*Undaria*), men ikke med *trans*-konfigurasjonen. Dette kan tyde på at C16:2 det var en mulighet for at denne fettsyren var i *cis*-konfigurasjon. Dette kan ikke bekreftes uten en ekstern standard. I den samme artikkelen var det rapportert C16:1 *trans*, men kun for en rødalge; *Gracilaria*. Ingen av disse fettsyrene utgjør ikke mer enn 0,2 % av total fettsyreinnehold, men bør tas hensyn til ved evt. kommersielt bruk.

S. latissima har lavt innhold av MUFA, høyt innhold av SFA og PUFA, der SFA var høyst. MUFA utgjorde 19,5 %, PUFA utgjorde 37,4 % og SFA utgjorde 43,0 %. De største bidragsyterne i SFA var C14:0 (18,9 %), C16:0 (25,0 %) og i PUFA var LA (6,9 %), ALA (4,5 %), EPA (6,0 %) og AA (7,1 %). *S. latissima* har rapporterte verdier av prosentandel SFA, MUFA og PUFA fra Sverige og Danmark på henholdsvis 26,8 % - 39,0 %, 17,6 % - 22,7 % og 30,2 % - 44,0 % (Vilg *et al.*, 2015); Marinho *et al.*, 2015). I artikkelen av Marinho *et al.* (2017), ble fettsyreprofilen til *S. latissima* ble analysert annenhver måned ved to områder i Danmark, resultatene viste at arten har størst mengde PUFA i juli. Dette kan da indikere at prøven i denne studien kunne hatt høyere verdier av PUFA, dersom den ble høstet en og en halv måned senere.

Med et n-6 innhold på 14,9% og et n-3 innhold på 12,6 % av total fettsyreinnehold, ble n-6:n-3 forholdet på 1,05:1. Dette er et lavt n-6:n-3 forhold da det er mindre enn 4:1 forholdet som skal til for å redusere risikoen for flere negative helseeffekter. Den store andelen LA med 8,7 % og AA med 9,9 %, bidrar mest til den store andelen n-6 fettsyrer. For andelen av n-3 fettsyrer var det SDA (4,5 %) og EPA (6,0 %) som bidro. Mest. Tidligere studier har rapporterte n-6:n-3 forhold mellom 0,34:1 og 1,19:1 (Vilg *et al.*, 2015; Holdt and Kraan, 2011; Marinho *et al.*, 2015). Forholdet funnet i denne studien var høyere enn tidligere rapporterte forhold, men var likevel under den anbefalte grensen for inntak av n-6:n-3 forhold (4:1) (Simopoulos, 2002).

Av de essensielle fettsyrene utgjorde de til sammen rundt 10 % av totalt fettsyreinnehold. LA utgjorde 8,17 % og ALA utgjorde 2,21 %. Dette anses i denne studien som et god prosentandel.

Det har tidligere blitt poengtert at *S. latissima* var en bedre kilde til flerumettede fettsyrer enn tradisjonelle grønnsaker (Marinho *et al.*, 2015). Med høyt innhold av fettsyrer og det faktum at en så stor andel av fettsyrene var essensielle eller viktige fettsyrer, bør *S. latissima* vurderes

som mat og fôr og/eller for tilskudd. Det bør da tas hensyn til den nå lave bestanden langs norskekysten.

5.6 Fettsyreprofil til *L. hyperborea* (blad)

Det ble bestemt total fettsyreprofil til *L. hyperborea* (blad). Fettsyreprofilen er delt inn i tre fraksjoner; NL, FFA og PL. Det er oppgitt som av alle fettsyre, SFA, MUFA, PUFA n-3 og n-6 i alle fraksjonene. Fettsyreprofilen er gitt i tabell 11, under.

Tabell 11: Fettsyreprofilen viser fettsyrer funnet i fraksjonene, gitt i % av total fettsyreinnhold i *L. hyperborea* (blad) (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt % av totalfettsyreinnhold. Ruter markert med n.d. (not detected) er fettsyren ikke ble detektert. Fettsyrer markert * er kun funnet i NIST biblioteket.

Fettsyre	NL ± SD	FFA ±SD	PL ± SD
C14:0	0,65 ± 0,13	6,27 ± 0,39	1,18 ± 0,12
C14:1	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,003	0,003 ± 0,001
C15:0	n.d.	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,001
C16:0	0,80 ± 0,15	16,91 ± 0,99	1,48 ± 0,16
C16:1, <i>trans</i> 9*	n.d.	0,04 ± 0,004	n.d.
C16:1, <i>cis</i> 9	0,38 ± 0,07	3,20 ± 0,23	0,49 ± 0,06
C16:1, <i>cis</i> 11*	n.d.	0,02 ± 0,002	0,005 ± 0,002
C17:0	0,37 ± 0,08	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001
C16:2, <i>trans</i> 7,10* (n-6)	n.d.	0,06 ± 0,005	n.d.
C16:2, <i>trans</i> isomer*	n.d.	0,03 ± 0,003	n.d.
C17:1, <i>cis</i> 10 (n-6)	n.d.	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,003
C18:0	0,02 ± 0,004	0,35 ± 0,03	2,58 ± 0,25
C18:1, <i>cis</i> 9	2,20 ± 0,40	13,95 ± 1,03	0,01 ± 0,004
C18:1, <i>cis</i> 11	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,01	n.d.
C16:4, <i>cis</i> 6,9,12,15	n.d.	0,02 ± 0,002	n.d.
C18:2, <i>cis</i> 9, 12 (n-6)	0,49 ± 0,10	2,69 ± 0,22	0,60 ± 0,07
C18:3, <i>cis</i> 6,9,12 (n-6)	0,42 ± 0,09	0,21 ± 0,02	0,03 ± 0,003
C20:0	0,01 ± 0,003	0,04 ± 0,004	0,02 ± 0,002
C18:3, <i>cis</i> 9,12,15 (n-3)	n.d.	4,99 ± 0,38	0,21 ± 0,02
C20:1, <i>cis</i> 11	n.d.	0,13 ± 0,01	0,02 ± 0,001
C18:4, <i>cis</i> 6,9,12,15 (n-3)	0,95 ± 0,19	10,28 ± 0,78	1,97 ± 0,03
C20:2, <i>cis</i> 11,14 (n-6)	0,02 ± 0,004	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
C20:3, <i>cis</i> 8,11,14 (n-6)	0,01 ± 0,004	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14 (n-6)	2,61 ± 0,49	6,04 ± 0,42	2,51 ± 0,27
C20:4, <i>cis</i> 5,11,14,17 (n-3)*	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00

C20:4, <i>cis</i> 8,11,14,17 (n-3)	0,12 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,25 ± 0,03
C20:5, <i>cis</i> 5,8,11,14,17 (n-3)	2,26 ± 0,44	7,72 ± 0,58	3,08 ± 0,31
C24:0	n.d.	0,01 ± 0,001	n.d.
C22:5, <i>cis</i> 7,10,13,16,19 (n-3)	0,04 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Total i fraksjonen	22,30 ± 10,07	50,61 ± 0,92	27,09 ± 11,27
Σ SFA	3,15 ± 0,57	14,43 ± 3,70	8,31 ± 1,68
Σ MUFA	4,02 ± 2,23	10,93 ± 3,11	0,81 ± 0,28
Σ PUFA	15,14 ± 2,17	25,22 ± 2,75	17,97 ± 2,36
Σ n-3	7,56 ± 2,08	18,12 ± 3,31	11,40 ± 2,55
Σ n-6	7,58 ± 2,37	7,10 ± 1,94	6,57 ± 2,17

Fettsyrer som skiller seg ut, med å utgjør stor andel av fettsyreinholdet, var C14:0 C16:0, C18:0 (kun i PL fraksjonen), C18:1, *cis*9, C18:2, (n-6), C18:3 (n-3), C18:4 (n-3), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3). Dette samsvarer en del med tidligere studier, hvor det også er funnet høyt innhold av C16:1 *cis*9, C18:0, (Foseid et al., 2017; (Holdt and Kraan, 2011).

Det var detektert tre *trans*-fettsyrer, hvor disse gav gode treff i NIST biblioteket. Som nevnt for *S. latissima* var det i en artikkel av Holdt et. al. 2011 var det rapportert C16:2, *cis*(n-6) i en annen brunalge (*Undaria*), men ikke med *trans*-konfigurasjonen. Dette kan tyde på at det er en mulig het for ar C16:2 funnet kan ha *cis*-konfigurasjon. Dette kan ikke bekreftes uten en ekstern standard. I den samme artikkelen var det rapportert C16:1 *trans*, men kun for en art av rødalge; *Gracilaria*. I denne studien utgjorde C16:1, *trans*9, C16:2, *trans*7,10 og C16:2, ukjent *trans*-isomer henholdsvis 0,02 %, 0,04 % og 0,02 % av totalt fettsyreinhold. Innholdet av *trans*-fettsyrer bør tas med i vurderingen av kommersielt bruk av *L. hyperborea* (blad).

Konsentrasjonene i tabell 10 har store standardavvik, utenom i frie fettsyrer. Dette kan være, som nevnt hos *S. latissima*, på grunn av utfelling i internstandardene. Det vil da gi ulike konsentrasjoner av internstandardene i de ulike replikantene og dermed stor variasjon i de beregnede konsentrasjonene. Ettersom det var en internstandard for hver fraksjon, vil det være ulik grad av homogenitet.

Som i *S. latissima* besto rundt halvparten av alle fettsyrene funnet i *L. hyperborea* (blad) av frie fettsyrer. Nøytrale lipider fraksjonen sto for 22,3 % og polare lipider fraksjonen utgjorde 27,1 % av alle fettsyrer. Dette skiller seg fra tidligere rapporterte verdier i artikkel av Foseid et. al. (2017), hvor FFA var den minste fraksjonen. Dette kan skyldes at prøven til Fosied ble høstet i oktober 2015, altså på høsten, mens planten i denne studien ble høstet juni 2018.

Prøvene her høstet i samme område, men bladet byttes ut hvert år, så årlige forskjeller vil påvirke innholdet.

Det var en stor andel PUFA i *L. hyperborea* (blad), med over 58 % av total fettsyreinhold, hvor de største bidragsyterne er SDA (13,2 %), EPA (13,1 %) og AA (11,2 %). Dette var alle fettsyrer med positiv helseeffekt hos konsumenten. Det er også en stor andel LA og ALA med henholdsvis 3,78 % og ALA 5,20 %. Dette er de to essensielle fettsyrene, hvor helsedirektorater anbefaler et inntak på min 3 % av kostens energiinnhold. Andel av PUFA i artikkel av Fosied *et al* (2017) kan beregnes fra oppgitte verdier til å være rund 34 %

Høyt innhold av n-3-fettsyrer som SDA, EPA og AA gir et lavt n-6:n-3 forhold på 0,57:1. Tidligere studier har rapportert forhold på 0,8-1,3 (Holdt and Kraan, 2011), 0,36 (van Ginneken *et al.*, 2011) og mellom 0,40 – 1,26 (Foseid *et al.*, 2017). Her bes leseren merke seg at i artikkelen av Foseid *et al.* 2017 var n-6:n-3 forholdene bestemt for hver fraksjon (NL, FFA, PL) for *L. hyperborea* (blad), mens de andre har beregnet n-6:n-3 forhold for hele planten. Man kan beregne gjennomsnittet av n-6:n-3 forholdene i hver fraksjon hos Foseid, og få et n-6:n-3 forhold på 0,73. I denne studien var n-6:n-3 forholdene for hver fraksjon på 1,00:1, 0,39:1 og 0,58:1 for henholdsvis NL, FFA og PL. Forholdet for hele planten var derfor innenfor det forventede området.

Høyt innhold av PUFA, essensielle fettsyrer og andre viktige fettsyrer kan bladdelen av *L. hyperborea* vurderes til mat og/eller fôr eller som tilsetning i mat og/eller fôr.

5.7 Fettsyreprofil til *L. hyperborea* (stilk)

Det ble bestemt total fettsyreprofil til *L. hyperborea* (blad). Fettsyreprofilen er delt inn i tre fraksjoner; NL, FFA og PL. Det er oppgitt som av alle fettsyre, SFA, MUFA, PUFA n-3 og n-6 i alle fraksjonene. Fettsyreprofilen er gitt i tabell 12, under.

Tabell 12: Fettsyreprofilen viser konsentrasjoner med standardavvik gitt % av totalt fettsyreinhold i *L. hyperborea* (stilk) (n=4). Sum av NL, FFA og PL, sum av SFA, MUFA og PUFA, og sum av omega 3 og 6 er også gitt i % av totalt fettsyreinhold. I ruter markert med n.d. (not detected) er hvor fettsyren ikke ble funnet. Fettsyrer markert med *er kun funnet i NIST biblioteket.

Fettsyre	NL ± SD	FFA ± SD	PL ± SD
C14:0	n.d.	1,77 ± 0,30	8,70 ± 0,62
C15:0	0,03 ± 0,004	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01
C16:0	2,73 ± 0,27	6,13 ± 1,08	7,75 ± 0,64
C16:1, <i>trans</i> 9*	n.d.	0,03 ± 0,01	n.d.
C16:1, <i>cis</i> 9	2,09 ± 0,23	2,07 ± 0,36	2,93 ± 0,25

C16:1, <i>cis</i> 11*	n.d.	0,04 ± 0,01	n.d.
C17:0	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,003
C17:1, <i>cis</i> 10 (n-6)	n.d.	0,04 ± 0,01	n.d.
C18:0	0,08 ± 0,01	1,17 ± 0,23	0,13 ± 0,02
C18:1, <i>cis</i> 9	7,83 ± 0,80	2,99 ± 0,49	15,68 ± 1,18
C18:1, <i>cis</i> 11	0,10 ± 0,01	0,44 ± 0,07	0,18 ± 0,02
C18:2, <i>cis</i> 9,12 (n-6)	1,42 ± 0,10	0,44 ± 0,07	2,15 ± 0,19
C18:3, <i>cis</i> 6,9,12 (n-6)	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,20 ± 0,02
C20:0	0,08 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,02
C18:3, <i>cis</i> 9,12,15 (n-3)	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,08 ± 0,01
C20:1, <i>cis</i> 11	n.d.	n.d.	0,13 ± 0,01
C18:4, <i>cis</i> 6,9,12,15 (n-3)	0,29 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,49 ± 0,05
C20:2, <i>cis</i> 11,14 (n-6)	0,08 ± 0,003	0,03 ± 0,01	0,22 ± 0,03
C20:3, <i>cis</i> 5,8,11	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,01
C20:3, <i>cis</i> 5,11,14 (n-6)	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,01
C20:3, <i>cis</i> 7,10,13 (n-6)	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,01
C20:3, <i>cis</i> 8,11,14 (n-6)	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,39 ± 0,04
C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14 (n-6)	11,81 ± 1,09	2,45 ± 0,41	7,90 ± 0,72
C20:4, <i>cis</i> 8,11,14,17 (n-3)	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,01	n.d.
C20:5, <i>cis</i> 5,8,11,14,17 (n-3)	3,82 ± 0,32	0,57 ± 0,10	2,32 ± 0,28
C22:2, <i>cis</i> 13,16 (n-6)	0,08 ± 0,02	n.d.	0,00 ± 0,00
C24:0	n.d.	0,09 ± 0,02	0,15 ± 0,02
C22:6, <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19 (n-3)	0,03 ± 0,003	0,10 ± 0,02	n.d.
Total i fraksjonen	19,77 ± 6,16	4,47 ± 1,64	75,77 ± 23,82
Σ SFA	2,81 ± 0,68	2,05 ± 0,49	23,58 ± 5,47
Σ MUFA	5,63 ± 1,69	1,23 ± 0,27	27,32 ± 8,04
Σ PUFA	10,76 ± 2,42	1,07 ± 0,23	21,27 ± 4,53
Σ n-3	2,94 ± 0,99	0,33 ± 0,06	5,16 ± 1,97
Σ n-6	8,67 ± 3,04	0,85 ± 0,28	19,61 ± 5,02

Fettsyrer som skiller seg ut var C14:0 C16:0, C16:1, *cis*9, C16:1, *cis*11 (kun i NL), C18:1, *cis*9, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3). Dette stemmer god med tidligere forskning hvor også høyt innhold av C18:0 er funnet (Foseid et al., 2017; (Holdt and Kraan, 2011)).

Det ble detektert en *trans*-fettsyre i *L. hyperborea* (stilk). Dette var C16:1, *trans*9, som var bekreftet med ekstern standard, den utgjør ikke mer enn 0,007 % av totalt fettsyreinnhold.

Likevel bør man ta med dette i betraktning, da *trans*-fettsyrer kan føre til hjerte og karsykdommer (Helsedirektoratet, 2018).

I denne studien var 75 % av totalt fettsyreinnehold i *L. hyperborea* (stilk) polare lipider, rundt 19% var nøytrale lipider og 4,5 % frie fettsyre. I artikkelen av Foseid *et. al.* (2017) var det funnet lav andel frie fettsyrer med 8,5 % og jevn fordeling av nøytrale lipider på 42,9 % og polare lipider på 48,5 %. Grunnen til forskjeller er her, som med *L. hyperborea* (blad), at Foseids prøve ble høstet på høsten og denne studien sin bli høstet på sommeren. Det kan også komme av hvor gammel planten er. Stilk til *L. hyperborea* kan bli opptil 20 år gammel (Pedersen *et al.*, 2012), og alder kan derfor ha noe å si på lipidinnholdet.

Man kan lett se at det var ganske jevn fordeling av SFA, MUFA og PUFA i denne delen av *L. hyperborea* med henholdsvis 28%, 34% og 38 %. Det var stort innhold av C14:0 og C16 i SFA, C16:1, *cis*9 og C18:1, *cis*9 i MUFA og C18:2 (n-6), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3) i PUFA. I artikkelen av Foseid *et al.* (2017) var fordelingen av SFA, MUFA og PUFA henholdsvis rundt 37,7 %, 33,6 % og 28,7 %. Forskjellene i fordelingen mellom SFA, MUFA og PUFA skyldes mest sannsynlig de ulike tidspunktene for høsting og alder.

De essensielle fettsyrene utgjorde rundt 4,5 % til sammen av totalt fettsyreinnehold. Her var det LA som utgjorde størst andel med 4,01 %, mens ALA utgjorde kun en liten andel med 0,54 %. Man ønsker større andeler av ALA og LA, da disse er viktige for funksjoner i kroppen.

Det ble bestemt et n-6:n-3 forhold på 3,46:1. Fettsyrene som utgjorde størst andel av n-6 andelen var LA og AA og andelen av n-3 var det EPA som utgjorde. Tidligere studier har rapportert forhold på 0,8:1-1,3:1 (Holdt and Kraan, 2011), 0,36:1 (van Ginneken *et al.*, 2011) og mellom 2,51:1 – 4,35:1 (gjennomsnitt: 3,61:1) (Foseid *et al.*, 2017). I Foseid *et al.* (2017) var n-6:n-3 forhold bestemt for hver fraksjon (NL, FFA, PL) for *L. hyperborea* (stilk), mens de andre har beregnet n-6:n-3 forhold for hele planten. n-6:n-3 forholdet for hver fraksjon i denne studien var 2,95:1, 2,55:1 og 3,80:1 i henholdsvis NL, FFA og PL. n-6:n-3 forholdet er lavere enn 4:1 og anes dermed i denne studien som lavt.

5.8 Sammenligning av blad og stilk i *L. hyperborea*

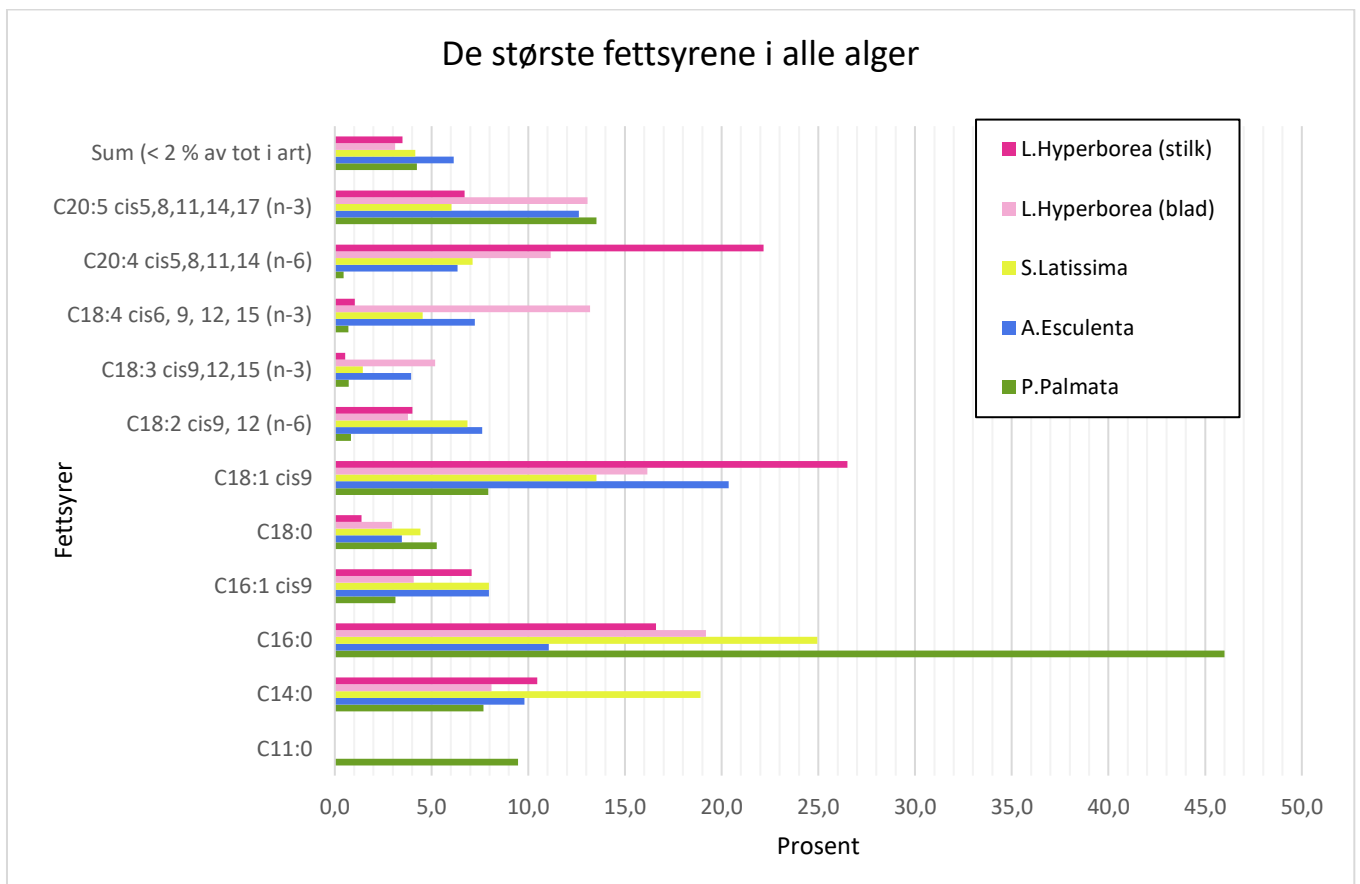
Van Ginneken *et al.* 2011 fant n-6:n-3 forhold i *L. hyperborea* til å være 0,36:1. Foseid *et al.* (2017) fant n-6:n-3 forhold i *L. hyperborea* var mellom 2,51:1 og 4,35:1 i stilk og mellom 0,40:1 og 1,26:1 i blad. Trenden med å lavere n-6:n-3 forhold i blad stemmer med funnene i denne studien. Det var viktig å merke seg at denne prøven ble høstet på våren, tre år senere i samme

området, mens Foseid sine prøver ble høstet i oktober. Da *L. hyperborea* skifter ut bladdelen hver år kan dette forklare noen av forskjellene. Tidspunktet på året kan også ha noe å si, da bladdelene vokser mye på våren (Kain and Jones, 1975). Stilken på *L. hyperborea* byttes ikke ut, og blir opptil 20 år gammel. Den kan likevel endre lipidkomposisjon mens den vokser.

Bladdelen har lavere n-6:n-3 forhold og høyere innhold av PUFA enn stilken. Dette gjør bladet til en mer ideell del av planten til mat og/eller fôr. En enkel sammenlignet med artikkelen av Foseid viser at deler som store andelen PUFA og lave n-6:n-3 forhold ser ut til å være konstant for arten i dette området

5.9 Sammenligning av algeartene

Det er elleve fettsyrer som utgjorde de største andelen (over 2 % hver) av alle fettsyrer i alle makroalgene. Disse og summen av alle andre fettsyrer (som utgjorde mindre enn 2 %) er gitt i figur 1, under.



Figur 1: Illustrasjon av de elleve fettsyrene som utgjør størst prosentdel av fettsyreprofilen, samt summen av alle fettsyrer som utgjør mindre enn 2 % av total fettsyreinhold i *P. palmata* (n=3), *A. esculenta* (n=4), *S. latissima* (n=4), *L. hyperborea* (blad) (n=4) og *L. hyperborea* (stilk). Figuren viser også summen av alle andre fettsyrer. Prosentandelen fra hver fraksjon (NL, FFA, PL) er summert til en total prosentandel for hele makroalgen.

I figur 1 ser vi summen av alle fettsyrer som utgjorde mindre av total fettsyreinnehold i hver sin makroalge, deretter vises innholdet av de flerumettede fettsyrene, inkludert EPA, AA, SDA, ALA og LA. De flerumettede fettsyrene inkluderer tre n-3 fettsyrer og to n-6 fettsyrer. Det oppgis så en MUFA; C18:1, *cis*9, en SFA; C18:0 og en MUFA til C16:1, *cis*9. Etterpå er det tre SFA. Den siste mettede fettsyren, C11:0, er tatt med selv om den er kun synlig *P. palmata*, fordi den utgjør hele 9 % av fettsyreinneholdet i *P. palmata*. Den utgjør større andel i *P. palmata* enn C16:1, *cis*9, C18:0, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3) og summen av alle fettsyrer under 2 % utgjør i noen andre makroalgene. Det er tre fettsyrer som utgjorde over 20 % av fettsyreinnehold; C16:0 i *P. palmata* og *S. latissima*, C18:1 *cis*9 i *A. esculenta* og *L. hyperborea* (stilk) og C20:4 (n-6) i *L. hyperborea* (stilk).

Tidligere rapporterte forskjeller mellom rødalger og brunalger, som også kan ses i denne studien. Høye mengder av C16:0, C18:1, *cis*9, C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3) var rapportert for både rød og brunalger (Sánchez-Machado et al., 2004; Fleurence et al., 1994), mens det er også tidligere gitt høyt innhold av C18:1 *cis*9, C18:2 (n-6) og C18:3 (n-3) i brunalger, og lavt nivå av C20:5 (n-3) (Fleurence et al., 1994). Lavt nivå av C20:5 (n-3) var ikke funnet i denne studien, men i stedet utgjorde denne fettsyren store andeler av totalt fettsyreinnehold i alle makroalgene. For rødalger var det funnet høyt innhold av C16:0, C20:5 (n-3) og andre C20-PUFA (Fleurence et al., 1994). Dette ble bekreftet i denne studien.

Det er stor forskjell i innhold av essensielle fettsyrer i makroalgene. Tre av makroalgene hadde en fin andel mellom 9 og 11 %, mens *L. hyperborea* (stilk) og *P. palmata* hadde henholdsvis kun 4,55 % og 1,23 %. Spesielt *P. palmata* har meget lav innhold av LA og ALA. Dette gjør den mindre attraktiv med tanke på bruk i mat- og fôr-industrien, da disse fettsyrene er essensielle.

DHA var funnet i små mengder og kun i tre av fem algearter (*L. hyperborea* (stilk), *S. latissima* og *A. esculenta*). DHA har viktige funksjoner i kroppen vår, og det hadde vært positivt å finne høyere konsentrasjoner denne fettsyren. I tidligere studier var DHA ikke blitt funnet eller kun funnet i små mengder (Holdt and Kraan, 2011; Mæhre, 2015). DHA kan bli syntetisert i kroppen fra ALA, som det til gjengjeld var store mengder av i de undersøkte makroalgene.

5.11 Forbedring av metode

Det var problemer med blanke prøvene i fire av fem algeprøver under SPE. Det var en indikasjon på at noe var galt da de blanke prøvene fikk en gul farge. For å finne ut av feilen ble muligheter eliminerte underveis. Det ble laget nye elueringsmiddel til hver runde av SPE og de

blanke prøvene ble satt i første rekke, med LC-vials fylt med kloroform for å fylle ut rekken. Da dette ikke hadde noe effekt tydet det på at eneste muligheten var at rester av prøvene hang igjen på SPE-nålene, når første elueringsmiddel (kloroform til NL fraksjon) ble påført. Dette stemmer også med observasjonen av at kloroform ble farget lyst gul. En mulig løsning ville ha vært å endre metoden litt slik at SPE brukte «sequence» i stedet for «batch». Dette hadde gjort at SPE roboten hadde eluert ut alle fraksjoner i et sett med prøver, før neste sett med prøver ble påsatt. Dermed ville det ikke være mulig å kontaminere. I *P. palmata* var dette ikke var problem, da det var det kun tre replikaer og én blank. Dette fylte opp første rekke på SPE-roboten, og en andre rad var ikke nødvendig å bruke Dette ble ikke endret under studien, men bør implementeres dersom metoden beskrevet her skal brukes igjen.



Figur 2: Figuren illustrer prøveoppsettet på SPE og tilhørende kolonner etter bruk. Det var et eksempel fra analysen av *L. hyperborea* (blad). Rekkefølge; rad 1: ekstraksjons-blank, ren kloroform, ren kloroform, ren kloroform, rad 2: replika 1, replika 2, replika 3, replika 4.

Et annet forslag til forbedring av metode var å senke sluttvolumet til 1 mL for alle fraksjonene. Dette kan gjøres ved å dampe inn heptanlaget som tas av på slutten av om-/forestringen til tørrhet, og så løse fraksjonene med FAME i 1 mL heptan. Dette vil øke konsentrasjonen, gi nøyaktig sluttkonsentrasjon av internstandard og gi likt og nøyaktig volum av alle tre fraksjonene.

Det ser ut til at det ble funnet flere og flere fettsyrer ettersom algene ble analysert. Rekkefølgen på analyse var: *P. palmata*, *A. esculenta*, *S. latissima*, *L. hyperborea* (blad) og *L. hyperborea* (stilk). Dette kan være tilfeldig eller en konsekvens av at utførselen av metoden

ble bedre over tid. Dette kan kontrolleres ved å utføre forsøkene på nytt. For å unngå dette ved eventuelt gjentakelse av denne studien bør man trene opp kandidaten enda mer, dersom det var tid til det.

6. Konklusjon

Det ble laget en total fettsyreprofil for *P. palmata*, *A. esculenta*, *S. latissima*, *L. hyperborea* (blad) og *L. hyperborea* (stilk). Det ble funnet store mengder (over 10 %) av C14:0, C16:0, C18:1, *cis*9, C18:4 (n-3), C20:4 (n-6) og C20:5 (n-3) i mange av algene. Det ble ikke detektert DHA i *L. hyperborea* (blad) og *P. palmata*, og kun lave verdier i *L. hyperborea* (stilk), *S. latissima* og *A. esculenta*. Alle alger hadde lave n-6:n-3 forhold, det vil si under 4:1 forholdet. Høyest innhold av flerumettede fettsyrer var å finne i *L. hyperborea* (blad) med 58,2 % av totalt fettsyreinhold, mens høyest innhold av mettede fettsyrer var i *P. palmata* med 62,7 %. Det var stor variasjon mellom algene hvilken fraksjon som inneholdt størst andel av fettsyrene. I *L. hyperborea* (stilk) var PL fraksjonen størst, i *L. hyperborea* (blad) og *S. latissima* var den FFA fraksjonen, i *A. esculenta* var NL fraksjonen størst og *P. palmata* hadde ganske lik fordeling mellom NL og PL fraksjonene. Det ble også bestemt totalt lipidinnhold for alle algeartene, for *L. hyperborea* (stilk), *L. hyperborea* (blad), og *A. esculenta* var inneholder rundt 1 % mens for *S. latissima* og *P. palmata* var det rund 2,5 %.

A. esculenta hadde høyest innhold av essensielle fettsyrer, *P. palmata* hadde lavest n-6:n-3 forhold og høyest innhold av flerumettede fettsyrer var å finne i *L. hyperborea* (blad). Høyt innhold av de essensielle fettsyrene, langkjedede PUFA (som EPA og AA), og lave n-6:n-3 forhold, gjør alle algeartene til gode kandidater til videre utvinning for mat-, fôr-, legemiddel- og/eller kosttilskudd-industrien. Denne studien fullførte sitt mål og identifiserte flere fettsyrer enn tidligere funnet for alle algeartene, utenom for *L. hyperborea*.

6.1 Forslag til videre arbeid

Denne studien kan brukes til videre studier av makroalger langs norskekysten og som utgangspunkt for å identifisere flere underklasser av lipider. Man kan gjennomføre det samme eksperimentet utført her, på de samme utvalgte prøvene og sammenligne resultater. Dersom man skal ta i bruk metoden beskrevet her bør man ta hensyn til problemet med SPE og prøve å oppkonsentrere prøven før analyse på GC-MS, slik som beskrevet i kapittel 4,5.

7. Referanser

- ANDERSEN, G. S. 2015. Store Norske Leksikon. [Internett] Available at: <https://snl.no/sukkertare> [Funnet 09 April 2019].
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37, 911-917.
- BROWN, E. M., ALLSOPP, P. J., MAGEE, P. J., GILL, C. I., NITECKI, S., STRAIN, C. R. & MCSORLEY, E. M. 2014. Seaweed and human health. *Nutrition Reviews*, 72, 205-216.
- Budjang Jaspar Sidrik, S. O. B. N. A. M., 2001. *Methods to measure macroalgal biomass and abundance in seagrass meadows*. s.l.:Elsevier.
- DITLEFSEN, A. 2016. Store medisinske leksikon: Webområde tilhørende Store norske leksikon.
- EGELAND, E. S. 2009. Store Norske Leksikon. [Internett] Available at: https://sml.snl.no/umettet_fettsyre [Funnet 26 mars 2019].
- EGELAND, E. S. & THRONSEN, J. 2018. Store Norske Leksikon. [Internett] Available at: <https://snl.no/alger> [Funnet 09 April 2019].
- FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2019. *fao*. [Internett] Available at: <http://cape-eaprac.co.za/projects/NMM101%20Marine%20Aquaculture/DEIR/Appendix%20F%20GlobalAquacultureProductionStatistics2011.pdf> [Funnet 25 mars 2019]
- FAO, 2013. *How to feed the world in 2050*. [Internett] Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf [Funnet 2 Mai 2019].
- FLEURENCE, J., GUTBIER, G., MABEAU, S. & LERAY, C. 1994. Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, 6, 527-532.
- Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, Januar, pp. 25-28.
- FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019. *fao*. [Internett] Available at: <http://www.fao.org/docrep/u8480e/U8480E07.htm#Thesourcesoffood>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. *Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation*, Roma: Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FOSEID, L., DEVLE, H., STENSTRØM, Y., NÆSS-ANDRESEN, C. F. & EKEBERG, D. 2017. Fatty Acid Profiles of Stipe and Blade from the Norwegian Brown Macroalgae Laminaria

- hyperborea with Special Reference to Acyl Glycerides, Polar Lipids, and Free Fatty Acids. *Journal of lipids*, 2017.
- Frøya Tare AS, 2016. *Guide: webområde for Frøya Tare*. [Internett] Available at: <http://froyatare.no/wp-content/uploads/2016/03/GuideAlger.pdf> [Funnet 1 Mai 2019].
- HALVER, J. E. 2005. fao. [Internett] Available at: <http://www.fao.org/3/x5738e/x5738e05.htm> [Funnet 12 April 2019].
- HAVFORSKNINGSINSTITUTTET, 2019. *Tema: Stortare*. [Internett] Available at: <https://www.imr.no/hi/temasider/arter/stortare> [Funnet 9 mai 2019].
- HELSEDIREKTORATET, 2018. *Helsedirektoratet: Kosthold og ernæring, Næringsstoffanbefalinger*. [Internett] Available at: <https://helsedirektoratet.no/folkehelse/kosthold-og-ernering/neringsstoffanbefalinger-#fett> [Funnet April 14 2019].
- HOFFMAN, D. E. & STROOBANT, V. 2007. *Mass Spectrometry, principles and applications*, West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd.
- HOLDT, S. L. & KRAAN, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 23, 543-597.
- HORN, S. J., MOEN, E. & ØSTGAARD, K. 1999. Direct determination of alginate content in brown algae by near infra-red (NIR) spectroscopy. *Journal of Applied Phycology*, 11, 9-13.
- KARTVERKET, 2018. *Areal tall for Norges sjøområder*. [Internett] Available at: <https://www.kartverket.no/kunnskap/fakta-om-norge/Sjoarealer/Sjoomrader/> [Funnet 10 mai 2019].
- KAIN, J. M. & JONES, N. 1975. The biology of *Laminaria hyperborea* VII. Reproduction of the sporophyte. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55, 567-582.
- M.D. GUIRY IN GUIRY, M. D. G., G.M. 2019. AlgaeBase. [Internett] Available at: <http://www.algaebase.org> [Funnet 09 April 2019].
- MACIEL, E., LEAL, M., LILLEBØ, A., DOMINGUES, P., DOMINGUES, M. & CALADO, R. 2016. Bioprospecting of marine macrophytes using MS-based lipidomics as a new approach. *Marine drugs*, 14, 49.
- MAI, K., MERCER, J. P. & DONLON, J. 1996. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture*, 139, 77-89.
- MALT, U. 2019. eikosapentaensyre. Internett] Available at: <https://sml.snl.no/eikosapentaensyre> [Funnet 10 mai 2019].

- MARINHO, G., HOLDT, S., JACOBSEN, C. & ANGELIDAKI, I. 2015. Lipids and composition of fatty acids of *Saccharina latissima* cultivated year-round in integrated multi-trophic aquaculture. *Marine drugs*, 13, 4357-4374.
- MATANJUN, P., MOHAMED, S., MUHAMMAD, K. & MUSTAPHA, N. M. 2010. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds, *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*, on high-cholesterol/high-fat diet in rats. *Journal of medicinal food*, 13, 792-800.
- MOHAMED, S., HASHIM, S. N. & RAHMAN, H. A. 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*, 23, 83-96.
- MORAN, L. A., HORTON, R. A., SCRIMGEOUR, K. G. & PERRY, M. D. 2014. *Principles of biochemistry*.
- MÆHRE, H. K., MALDE, M. K., EILERTSEN, K. E. & ELVEVOLL, E. O. 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 3281-3290.
- OLAFSEN, T., WINTHER, U., OLSEN, Y. & SKJERMO, J. 2012. Verdiskaping basert på produktive hav i 2050. *Det Kongelige*.
- PEDERSEN, M. F., NEJRUP, L. B., FREDRIKSEN, S., CHRISTIE, H. & NORDERHAUG, K. M. 2012. Effects of wave exposure on population structure, demography, biomass and productivity of the kelp *Laminaria hyperborea*. *Marine Ecology Progress Series*, 451, 45-60.
- RIOUX, L.-E., BEAULIEU, L. & TURGEON, S. L. 2017. Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food hydrocolloids*, 68, 255-265.
- ROME, K. & McIntyre, A. 2012. chromatographytoday. Available: https://www.chromatographytoday.com/news/gc-mdgc-gc-ms/32/breaking_news/what_is_a_response_factor/31169 [Accessed 1 Mai 2019].
- SÁNCHEZ-MACHADO, D., LÓPEZ-CERVANTES, J., LOPEZ-HERNANDEZ, J. & PASEIRO-LOSADA, P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food chemistry*, 85, 439-444.
- SCHIENER, P., BLACK, K. D., STANLEY, M. S. & GREEN, D. H. 2015. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27, 363-373.
- SCHMID, M., GUIHÉNEUF, F. & STENGEL, D. B. 2014. Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *Journal of applied phycology*, 26, 451-463.

- SCHMID, M. & STENGEL, D. B. 2015. Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales. *Journal of phycology*, 51, 25-36.
- SIMOPOULOS, A. P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Society for Clinical Nutrition*, pp. 560S-9S.
- SIMOPOULOS, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- STORE NORSKE LEKSIKON, 2009. *Store norske leksikon*. [Internett] Available at: <https://snl.no/butare> [Funnet 09 April 2019].
- STORE NORSKE LEKSIKON, 2014. *dokosaheksansyre*. [Internett] Available at: <https://sml.snl.no/dokosaheksaensyre> [Funnet 10 mai 2019].
- STORE NORSKE LEKSIKON, 2015. *Store norske leksikon*. [Internett] Available at: <https://snl.no/stortare> [Funnet 09 April 2019].
- STORE NORSKE LEKSIKON, 2019. *essensielle fettsyrer*. [Internett] Available at: https://snl.no/essensielle_fettsyrer [Funnet 7 Mai 2019].
- TABOADA, C., MILLAN, R. & MIGUEZ, I. 2013. Evaluation of marine algae *Undaria pinnatifida* and *Porphyra purpurea* as a food supplement: Composition, nutritional value and effect of intake on intestinal, hepatic and renal enzyme activities in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1863-1868.
- VAN GINNEKEN, V. J., HELSPER, J. P., DE VISSER, W., VAN KEULEN, H. & BRANDENBURG, W. A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in health and disease*, 10, 104.
- VILG, J. V., NYLUND, G. M., WERNER, T., QVIRIST, L., MAYERS, J. J., PAVIA, H., UNDELAND, I. & ALBERS, E. 2015. Seasonal and spatial variation in biochemical composition of *Saccharina latissima* during a potential harvesting season for Western Sweden. *Botanica marina*, 58, 435-447.
- XU, S.-Y., HUANG, X. & CHEONG, K.-L. 2017. Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine drugs*, 15, 388.
- YEHUDA, S. & CARASSO, R. L. 1993. Modulation of learning, pain thresholds, and thermoregulation in the rat by preparations of free purified alpha-linolenic and linoleic acids: determination of the optimal omega 3-to-omega 6 ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 10345-10349.

Vedlegg

Vedlegg 1 Tørrvekt

For hver makroalge ble det vei ut fire replikaene med algepulver, med unntak av *P. palmata* hvor det ble brukt kun tre replika. Oversikt over vekt av algepulvere i replikaene er gitt i tabell 13, under.

Tabell 13: Tørrvekten til algepulver veid ut, med tre eller fire replikaer.

	<i>L. hyperborea</i> (stilk)	<i>L. hyperborea</i> (blad)	<i>S. latissima</i>	<i>A. esculenta</i>	<i>P. palmata</i>
Replika 1	4,974	4,987	4,983	4,990	4,995
Replika 2	4,974	4,997	4,996	4,979	5,012
Replika 3	4,976	4,994	4,984	4,995	5,004
Replika 4	4,974	5,013	4,733	4,982	-

Vedlegg 2 Internstandarder

Det ble brukt internstandarder for å bestemme konsentrasjon i *P. palmata* og *A. esculenta*. Det ble brukt tre ulike internstandarder og konsentrasjonene i ferdig prøve (klar for analyse) er beregnet og gitt i tabell 14 under.

Tabell 14: $C(\text{slutt}) = C(\text{IS}) = \text{sluttkonsentrasjonen av IS i prøven}$, $V(\text{slutt}) = \text{sluttvolum til prøven}$, $n = \text{stoffmengde}$, $m = \text{masse}$, $V(\text{start}) = \text{tilsatt volum av IS i prøven}$, $C(\text{start}) = \text{nøyaktig konsentrasjon av IS}$, $Mm = \text{molekylmasse}$.

	IS (FFA)	IS (PL)	IS (NL)
Mm [g/mol]	298,29	818,2	933,56
C (start) [mol/mL]	10,004	10,066	10,000
V (start) [mL]	0,05	0,05	0,05
m [g]	5,0E-04	5,0E-04	5,0E-04
n [mol]	1,68E-06	6,15E-07	5,36E-07
V (slutt) [mL]	1	2	2
C (slutt) [mol/mL]	1,68E-06	6,15E-07	8,03E-07

Sluttkonsentrasjonen var korrigert for om det var et triglyserid eller et fosfolipid ved at det var ganget med henholdsvis tre og to.

Vedlegg 3 Relativ responsfaktor og molekylvekt til FAME

For å beregne konsentrasjon av de ulike fettsyrene funnet i prøvene ble RRF og molekylvekten til de de ulike fettsyrene bruk. Disse ble personlig gitt av Hanne Devle via mail, og er oppført i tabell 15, under.

Tabell 15: Relative responsfaktorene og molekylvekt var gitt av Devle H. (2019). Relative referansefaktorer. [epost].

FAME	IUPAC-navn	MW (g/mol)	RRF
C6:0	Hexanoic acid	116,16	0,67
C8:0	Octanoic acid	144,22	0,81
C9:0	Nonanoic acid	158,24	0,74
C10:0	Decanoic acid	172,27	0,85
C11:0	Undecanoic acid	186,3	1,03
C12:0	Dodecanoic acid	200,33	0,94
C13:0	Tridecanoic acid	214,35	1,11
C14:0	Tetradecanoic acid	228,38	1,01
C14:1	<i>cis-9</i> -tetradecanoic acid	226,38	1,24
C15:0	Pentadecanoic acid	242,41	1,22
C16:0	Hexadecanoic acid	256,43	1,09
C16:1 n-7	<i>cis-9</i> -hexadecanoic acid	254,43	1,18
C17:0	Heptadecanoic acid	270,46	1,22
C18:0	Octadecanoic acid	284,48	1,19
C18:1 n-9	<i>cis-9</i> -octadecanoic acid ME	282,48	1,16
C18:2 n-6 <i>cis</i>	<i>all cis-9,12</i> -octadecadienoic acid ME	280,48	1,01
C18:2 n-6 <i>trans</i>	<i>trans-9,12</i> - octadecadienoic	280,48	1,04
C18:3 n-6	<i>all cis-6,9,12</i> - octadecatrienoic	278,48	0,99
C19:0	Nonadecanoic acid ME	298,52	1,00
C18:3 n-3	<i>all cis-9,12,15</i> - octadecatrienoic ME	278,48	0,98
C20:0	Eicosanoic acid	312,54	1,17
C20:1 n-9	<i>cis-11</i> -eicosenoic acid	310,54	1,13
C20:2 n-6	<i>cis-11,14</i> -eicosenoic acid	308,54	1,06
C20:3 n-6	<i>all cis-8,11,14</i> - eicosatrienoic acid	306,53	1,17
C21:0	Heneicosanoic acid	326,57	1,18
C20:4 n-6	<i>all cis-5,8,11,14</i> -eicosatetraenoic acid	304,52	1,00
C20:3 n-3	<i>all cis-11,14,17</i> - eicosatrienoic acid	306,53	0,96
C20:5 n-3	<i>all cis-5,8,11,14,17</i> -eicosapentaenoic acid	302,52	0,96
C22:0	Docosanoic acid	340,59	1,18
C22:1 n-9	<i>cis-13</i> docosenoic acid	338,59	1,10
C22:2 n-6	<i>cis-13,16</i> docosenoic acid	336,57	1,03

C23:0	Tricosanoic acid	354,62	1,17
C24:0	Tetracosanoic acid	368,65	1,19
C22:6 n-3	<i>all cis-4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenoic acid</i>	328,57	1,01
C24:1 n-9	<i>cis-15 tetracosenoic acid</i>	366,65	1,01

Vedlegg 4 Beregning av konsentrasjon til fetsyrene

Denne beregningen av konsentrasjon lipid per g DW benytter responsfaktorer. Disse var gitt i vedlegg 2 under. Hvor RRF manglet, ble RRF verdien til molekylet som ligner mest. C (FAME)= konsentrasjon [mol/mL], A= areal, IS = internstandard, RRF = relativ responsfaktor, FAME = fettsyremetyler.

$$C(FAME) = \frac{A(FAME)*C(IS)}{A(IS)*RRF} \quad (\text{Formel 3})$$

Deretter omregnes konsentrasjonen til fra mol/mL til $\mu\text{g}/\text{g}$ DW.

$$C(FAME) \left[\frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right] * Mm \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * 10^6 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] * \frac{V_{slutt}[\text{mL}]}{m_{DW}[\text{g}]} = C(FAME) \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g DW}} \right] \quad (\text{Formel 4})$$



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway