

Isolering og karakterisering av helsefremmende lipider fra mikroalger

Marte Hulbaklien Bakke

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: mai 2016

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført over en periode på 10 måneder, med start i august 2015 og slutt i mai 2016. Laboratoriearbeidet ble utført på SINTEF Fiskeri og havbruk.

Min hovedveileder under arbeidet med masteroppgaven har vært professor Turid Rustad. Jeg vil rette en stor takk til henne for god veiledning og hjelp underveis. Jeg vil også takke min medveileder på SINTEF Fiskeri og havbruk, forsker Revilija Mozuraityte, for hennes gode veiledning og hjelp på laboratoriet.

Jeg ønsker også å takke flere av de ansatte på SINTEF Fiskeri og havbruk. Forsker Vera Kristinova må takkes for stor hjelp og opplæring i å kjøre HPLC og analysere disse resultatene, og for å alltid være tilgjengelig og åpen for spørsmål. Jeg vil takke ingeniør Merethe Selnes for hjelp underveis med laboratoriearbeidet og for å ha kjørt GC. Til slutt vil jeg rette en takk til ingeniør Marte Schei for å ha kjørt CN-analyse.

Aller sist vil jeg takke mine medstudenter på laboratoriet og på lesesalen, som har bidratt til et godt arbeidsmiljø.

Trondheim, 13.05.16

Marte Hulbaklien Bakke

Sammendrag

Langkjedete omega-3 fettsyrer, som EPA (eikosapentaensyre) og DHA (dokosaehxaensyre), er viktige for et balansert kosthold og kan gi gode helsemessige fordeler. Per dags dato får de fleste for lite av disse fettsyrene gjennom kosten. Fiskeolje er den viktigste kommersielle kilden til omega-3 PUFAs (flerumettede fettsyrer), men økningen i den globale produksjonen av fiskeolje har resultert i at en større andel av villfisk blir brukt til fiskefôr. Fôr er dyrt, og i tillegg er det en begrenset mengde fisk som kan høstes, da de fleste bestander er overutnyttet. Dette har ført til etterspørsel etter nye kilder til PUFAs, til bruk i fiskefôr. Mikroalger er en lovende kilde for dette formålet, da de har evne til å syntetisere og akkumulere store mengder lipider, med god lipidstabilitet. Mikroalger kan også brukes direkte til humant konsum. Imidlertid gjør mikroalgenes høye innhold av biologisk aktive forbindelser og deres robuste cellevegg det krevende å finne gode lipidekstraksjonsmetoder. Målet med denne oppgaven var å optimalisere slike metoder for to kommersielle mikroalger: *Chlorella* og *Spirulina*.

Ekstraksjonsmetodene som ble testet ut var tre varianter av Bligh and Dyer (B&D), samt modifisert Folch og etanolekstraksjon. Høyest lipidutbytte av tørrvekt ble oppnådd med modifisert Folch, og utbyttet var $16,3 \pm 1,1\%$ i *Chlorella* og $11,5 \pm 0,8\%$ i *Spirulina*. Etanolekstraksjon ser ut til å være en lovende og mer miljøvennlig metode da det unngås bruk av store mengder kloroform. Med denne metoden ble utbyttene $12,2 \pm 0,9\%$ i *Chlorella* og $8,8 \pm 0,8\%$ i *Spirulina*. Oppskalering av tørrstoffmengden i disse to metodene ga noe lavere prosentvis lipidutbytte.

Siden fosfolipider blant annet har vist seg å ha høyere innhold av omega-3 fettsyrer enn triglyserider, ble SPE (fast-fase-ekstraksjon) og acetonutfelling testet ut for å separere lipidekstraktet i nøytrale lipider og fosfolipider. Acetonutfelling viste seg å være en lovende isoleringsmetode, selv om utbyttet av fett i de to fraksjonene varierte mellom ekstraktene. HPLC-CAD ble brukt til å analysere lipidklassene i ekstraktene.

Fettsyresammensetningen i *Chlorella*- og *Spirulina*-ekstrakter ble analysert ved bruk av GC-FID. *Chlorella*-ekstraktene hadde en relativt lik fordeling av mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer, mens modifisert Folch-ekstraktet til *Spirulina* hadde en høyere andel mettede og en lavere andel flerumettede fettsyrer enn etanolekstraktet. *Chlorella* hadde en klart høyere andel av omega-3-fettsyrer enn *Spirulina*, som derimot hadde en høy andel av

omega-6-fettsyrer. Den dominerende omega-3-fettsyren var C18:3 (α -linolensyre), mens de dominerende omega-6-fettsyrene var C18:2 (linolsyre) og C18:3 (γ -linolensyre).

Det ble i tillegg kjørt proteinhydrolyse på prøver fra *Chlorella* for å sjekke om etanolekstraksjon i forkant av hydrolysen hadde betydning for proteinutbyttet. Resultatene kan tyde på at det utvinnes mer proteiner dersom hydrolyse kjøres etter ekstraksjon, men lipidutbyttet i *Chlorella*-pulveret var da lavere enn lipidutbyttet i sedimenter ved hydrolyse i forkant av etanolekstraksjon. Da ble ca. 40% av det totale innholdet av proteiner i *Chlorella*-pulveret hydrolysert.

Summary

Long chained omega-3 fatty acids, like EPA and DHA, are important for a balanced diet and can provide good health benefits. As of today, most of us do not get enough of these fatty acids through our diet. Fish oil is the most important commercial source of omega-3 PUFAs, but the increase in the global production of fish oil has resulted in an increase of wild fish used for fish feed. Feed is expensive and in addition a lot of fish stocks are overexploited. Microalgae is a promising alternative to PUFAs. Microalgae have the ability to synthesize and accumulate large amounts of lipids, which have high stability. Their robust cell wall, as well as their high content of biologically active compounds, make it difficult to find adequate extraction methods. The aim of this study was to optimize methods for lipid extraction for two commercial microalgae: *Chlorella* and *Spirulina*.

Three variants of Bligh and Dyer (B&D), as well as modified Folch and ethanol extraction, were tested. The highest lipid yield of dry weight was obtained with modified Folch, which was $16.3 \pm 1,1\%$ in *Chlorella* and $11.5 \pm 0,8\%$ in *Spirulina*. Ethanol extraction appears to be a promising and more environmentally friendly method because it avoids the use of large amounts of chloroform. This method gave yields of $12.2 \pm 0,9\%$ in *Chlorella* and $8.8 \pm 0,8\%$ in *Spirulina*. Extraction in slightly larger scale of dry weight gave a bit lower percentage lipid yields.

Since phospholipids have been shown to have higher omega-3 content than triglycerides, among other advantages, SPE (solid phase extraction) and acetone precipitation were tested for isolation of neutral lipids and phospholipids. Acetone precipitation appeared promising, although the lipid yields in the two fractions varied between the lipid extracts. HPLC-CAD was used to analyse lipid classes in the lipid extracts.

The fatty acid composition in *Chlorella* and *Spirulina* extracts were analysed by GC-FID. *Chlorella* extracts had a relatively equal composition of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, while the modified Folch extract of *Spirulina* had a higher proportion of saturated and a lower proportion of polyunsaturated fatty acids than the ethanol extract. *Chlorella* had a much higher proportion of omega-3 fatty acids than *Spirulina*, which on the other hand had a high ratio of omega-6 fatty acids. The predominant omega-3 fatty

acid were C18:3 (ALA), while the predominant omega-6 fatty acids were C18:2 (LA) and C18:3 (GLA).

Protein hydrolysis was also tested on samples from *Chlorella* to see if ethanol extraction ahead of the hydrolysis would influence the protein yield. The results may indicate that more proteins are recovered if the hydrolysis is run after lipid extraction. However, the lipid yield in *Chlorella* biomass was lower than the lipid yield in sediments when hydrolysis was run prior to ethanol extraction. 40% of the total protein amount in *Chlorella* biomass was then hydrolysed.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Summary	iv
Forkortelser	viii
1 Introduksjon	1
1.1 <i>Bakgrunn</i>	1
1.2 <i>Lipider</i>	2
1.3 <i>Mikroalger</i>	4
1.3.1 Generelt	4
1.3.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	5
1.3.3 <i>Spirulina platensis</i>	7
1.3.4 Dyrking av mikrolager	8
1.4 <i>Metoder for lipidekstraksjon</i>	9
1.4.1 Bligh and Dyer og Folch	9
1.4.2 Soxhlet-ekstraksjon	10
1.4.3 Etanolekstraksjon	10
1.5 <i>Metoder for isolering av fosfolipider</i>	11
1.5.1 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)	11
1.5.2 Acetonutfelling	13
1.6 <i>Metoder for lipidanalyser</i>	13
1.6.1 HPLC-CAD	13
1.6.2 NMR	14
1.6.3 Gasskromatografi (GC)	14
1.7 <i>Metoder for proteinhydrolyse</i>	15
1.8 <i>Formål med oppgaven</i>	16
2 Materialer og metoder	17
2.1 <i>Materiale</i>	17
2.2 <i>Kjemikalier</i>	17
2.3 <i>Oppbygning av oppgaven</i>	18
2.4 <i>Ekstraksjon</i>	20
2.4.1 Bligh and Dyer	21
2.4.2 Modifisert Folch	22
2.4.3 Etanolekstraksjon	22
2.5 <i>Isolering av fosfolipider</i>	23
2.5.1 SPE (fast-fase-ekstraksjon)	23
2.5.2 Acetonutfelling	24
2.6 <i>Analyse av lipidklasser: HPLC-CAD</i>	25
2.7 <i>Analyse av fettsyresammensetning: GC-FID</i>	26
2.8 <i>Hydrolyse av proteiner</i>	27
2.8.1 Hydrolyse av biomasse før lipidekstraksjon	27
2.8.2 Hydrolyse av biomasse etter lipidekstraksjon	28
2.8.3 Måling av proteininnhold	29
2.8.4 Måling av askeinnhold	29
2.9 <i>Statistisk analyse</i>	29
3 Resultat og diskusjon	30
3.1 <i>Bestemmelse av totalt lipidinnhold</i>	30

3.1.1	<i>Chlorella</i> (liten skala)	30
3.1.2	Effekt av ultralyd	32
3.1.3	<i>Spirulina</i> (liten skala)	33
3.1.4	Effekt av algeknusing med flytende nitrogen	35
3.1.5	Oppskalering av tørrstoffmengde	36
3.2	<i>Isolering av fosfolipid</i>	39
3.2.1	SPE (fast-fase-ekstraksjon)	39
3.2.2	Acetonutfelling	39
3.3	<i>Lipidanalyser</i>	44
3.3.1	Analyse av lipidklasser: HPLC-CAD	44
3.3.2	Analyse av fettsyresammensetning: GC-FID	48
3.4	<i>Hydrolyse av proteiner</i>	51
4	Forslag til videre arbeid	57
5	Konklusjon	58
	Litteraturliste	59
	Vedlegg A: Rådata Bligh and Dyer	I
	Vedlegg B: Rådata modifisert Folch	V
	Vedlegg C: Rådata etanolekstraksjon	VIII
	Vedlegg D: Rådata SPE (fast-fase-ekstraksjon)	XIV
	Vedlegg E: Rådata acetonutfelling	XVIII
	Vedlegg F: Rådata HPLC-CAD	XXVII
	Vedlegg G: Rådata GC-FID	XXXVIII
	Vedlegg H: Rådata proteinhydrolyse	XL

Forkortelser

ALA	α -linolensyre
B&D	Bligh & Dyer
CAD	Charged Aerosol Detector
DHA	Dokosahexaensyre
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EPA	Eikosapentaensyre
EtOH	Etanol
FAMEs	Fettsyremetylestere
FID	Flammeioniseringsdetektor
GC	Gasskromatografi
GL	Glykolipider
GLA	γ -linolensyre
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LA	Linolsyre
LDL	Low density lipoprotein
Mod.Folch	Modifisert Folch
MS	Massespektrometri
NL	Nøytrale lipider
NMR	Kjernemagnetisk resonans
PL	Fosfolipider
PUFAs	Flerumettede fettsyrer
SFE	Superkritisk væskeekstraksjon
SFH	SINTEF Fiskeri og havbruk
SPE	Fast-fase-ekstraksjon
TAG	Triacylglyserol
UV-stråling	Ultrafiolett stråling

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Langkjedete omega-3 fettsyrer, som EPA (eikosapentaensyre) og DHA (dokosahexaensyre), har vist seg å gi gode helsemessige effekter, og har i dag flere anvendelser innen kosttilskudd og legemidler. Patil et.al. har skrevet en artikkel om mikroalger som kilde til flerumettede fettsyrer, som omhandler bakgrunn for behov, produksjon av mikroalger og miljøeffekter som påvirker lipidsammensetning [1]. Omega-3 fettsyren ALA (α -linolensyre) og omega-6 fettsyren LA (linolsyre) er essensielle fettsyrer [1, 2]. Disse behøves blant annet for utvikling av hjerne og netthinne, og balansen mellom inntaket av omega-3 og omega-6 er viktig for utvikling av en rekke sykdommer. ALA og LA finnes i plante- og frøoljer, men nivået av LA er vanligvis høyere enn nivået av ALA. I tillegg er omdannelsen av ALA til EPA og DHA i kroppen begrenset [2]. Dette resulterer i at de fleste får for lite omega-3 gjennom kosten, og det er derfor nødvendig å utnytte de omega-3 kildene som finnes.

Som en konsekvens av stor befolkningsvekst, har den globale produksjonen av oppdrettsfisk og skaldyr mer enn doblet seg de siste to tiårene [3]. Fiskeolje er den viktigste kommersielle kilden til omega-3 PUFAs (flerumettede fettsyrer) [1]. Doblingen av produksjonen av oppdrettsfisk resulterer i økt etterspørsel etter villfisk brukt til fôr. Fiskefôr er den største produksjonskostnaden for kommersiell akvakultur. I tillegg er det en begrenset mengde fisk som kan høstes, da de fleste bestander er overutnyttet. Dette åpner for muligheter til å se på alternative kilder til PUFAs, til bruk i dyrefôr og til humant konsum.

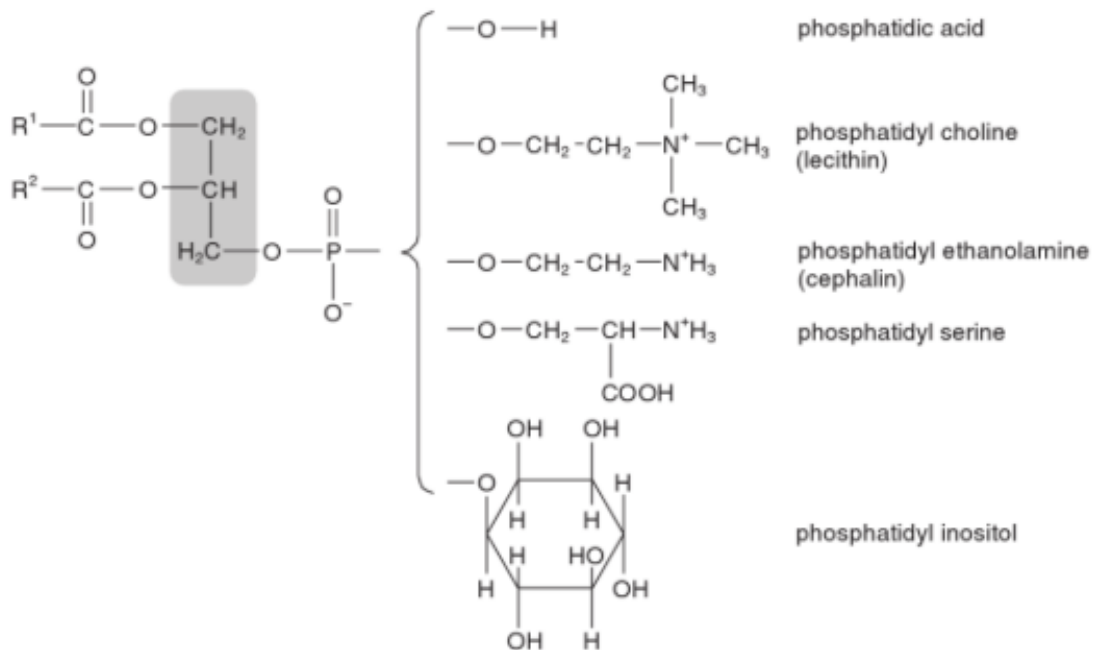
Da omega-3 fettsyrene i fiskeoljer opprinnelig stammer fra zooplankton, som igjen spiser mikroalger, vil mikroalger kunne være et godt alternativ til PUFAs [1]. Mikroalger har evne til å syntetisere og akkumulere store mengder PUFAs, og lipidene fra mikroalger er vist å ha god stabilitet sammenlignet med tradisjonelle PUFAs. Dette skyldes at mikroalger inneholder karotenoider og vitaminer, som kan virke antioksiderende, og at lipidene er mikroinnkapslet av en robust cellevegg [1].

1.2 Lipider

Lipider er en betegnelse på estere av langkjedete fettsyrer [4]. Lipider kan være nøytrale eller polare, men de fleste er nøytrale. Felles for fettsyrene er at de kan ha ingen eller flere dobbeltbindinger. Jo flere dobbeltbindinger en fettsyre inneholder, jo mer umettet er den. De fleste fettsyrer i mat har partall av karbonatomer, som varierer fra 12 til 18. Fettsyrer kategoriseres i hovedsak ut ifra kjedelengde, antall- og konfigurasjon av dobbeltbinding(er).

Nøytrale lipidklasser inkluderer voksestere, triacylglyseroler (TAG), diacylglyseroler, frie fettalkoholer og steroler [5]. Triacylglyseroler består av fettsyrer esterifisert på tre ulike posisjoner på et glyserolmolekyl. Posisjonene kalles for sn-1, sn-2 og sn-3. Fordelingen av fettsyrer på glyserolmolekylet er mer eller mindre unik for ulike typer fett. Spesielt fet og mager fisk har lipider lagret som triacylglyseroler i muskel- og fettvev, mens krill har lipider lagret som både triacylglyseroler og fosfolipider.

Fosfolipider er polare lipider, og de er både lipofile og hydrofile [4]. Det vil si at de har affinitet for upolare miljø og polare miljø. De fleste naturlig forekommende fosfolipidene er glycerofosfolipider. I motsetning til TAG, er det kun to langkjedete fettsyrer som er esterifisert til et glyserolmolekyl, på posisjon sn-1 og sn-2. På sn-3 posisjonen er det bundet en fosfatgruppe. Fosfatgruppen kan være esterifisert til organiske baser, aminosyrer eller alkoholer. Det er denne delen av fosfolipidet som utgjør den hydrofile, polare delen. Eksempler på glycerofosfolipider er fosfatidinsyre, fosfatidylkolin (lecitin), fosfatidyletanolamin (cefalin), fosfatidylserin og fosfatidylinositol. Den generelle strukturen til et glycerofosfolipid samt de nevnte hydrofile gruppene er presentert i figur 1.



Figur 1: Generell struktur til glycerofosfolipid med tilhørende hydrofile grupper som kan være bundet til fosfatgruppen på sn-3 [4].

Fosfolipider er viktige komponenter i cellemembraner, og påvirker cellulære egenskaper som signaloverføring, regulering av genuttrykk, cellulær metabolisme, næringsopptak og transport [6]. Fettsyrene som er inkorporert i fosfolipidene kan påvirke membranens fluiditet, permeabilitet og funksjon.

Spesielt flerumettede fettsyrer er assosiert med positive helseeffekter. Det har blant annet blitt gjort studier på hjerte- og karsykdommer, betennelses- og immunfunksjoner samt utvikling av sentralnervesystemet og mental helse, der omega-3 fettsyrene EPA og DHA har vist seg å kunne ha en positiv effekt [6]. Det har blitt gjort flere studier på omega-3 fettsyrer fra triglycider, men marine fosfolipider har i senere tid vist seg å være en vel så god kilde til omega-3 [7].

Det har også vist seg at fosfolipider fra marine kilder har flere fordeler fremfor triglycider fra samme kilde. Fosfolipidene er mindre utsatt for oksidasjon enn triglyciderne, de har bedre biotilgjengelighet, har høyere innhold av omega-3 fettsyrer, og har flere helsefremmende egenskaper [7]. Membranlipider i spesielt mikroalger har et høyt fettinnhold [8], og fosfolipidene kan utgjøre opp til 50% av det totale lipidinnholdet [9] (se tabell 2 i delkapittel 1.3.3). Dette gjør mikroalger til en lovende kilde for utnyttelse av flerumettede fettsyrer til flere formål.

1.3 Mikroalger

1.3.1 Generelt

Mikroalger er prokaryote eller eukaryote fotosyntetiske mikroorganismer [10]. De har evne til rask vekst og kan leve under tøffe forhold på grunn av deres enkle cellulære struktur. Mikroalger er kjent som en av de eldste livsformene på jorden, og har en rekke former og økologiske funksjoner [11]. Mangfoldet av disse funksjonene gjør at mikroalger kan være en verdifull ressurs for flere typer produkter [10]. Disse kan potensielt benyttes både til farmasøytiske formål, til mat og dyrefôr, og som energikilde.

Mikroalger har stor næringsverdi. Safi et.al. har skrevet en artikkel som omhandler morfologi, produksjon, sammensetning av næringsstoffer og bruksområder av *Chlorella vulgaris* [12]. Før i tiden ble den blågrønne mikroalgen *Spirulina* brukt som en viktig og næringsrik matkilde for aztekerne. *Chlorella* er en grønn mikroalge som har blitt tatt i bruk i nyere tid. I dag brukes begge mikroalgene til flere ulike formål: fargestoffer, kosttilskudd, legemidler, dyrefôr, fiskefôr og kosmetikk. Flere bruksområder har blitt aktuelle de siste tjue årene, på grunn av mangel på fossile drivstoffreserver, økningen i oljepriser og global oppvarming. Mikroalger anses som en lovende bærekraftig energikilde, da de har kapasitet til å lagre store mengder av lipider, som er egnet for biodieselproduksjon.

I tillegg til lipider er mikroalger også gode kilder til proteiner, karbohydrater, pigmenter, vitaminer og mineraler, som også kan gi gode helsemessige fordeler [12]. Blodtrykks-, blodsukker- og blodlipidsenkende effekter er bare noen av effektene de bioaktive forbindelsene kan ha [13]. Mikroalger fanger sollys og utfører fotosyntese. Under fotosyntesen blir omtrent halvparten av all oksygen på jorden blir produsert og massive mengder med karbondioksid absorberes [12]. Derfor kan det være av stor viktighet å dyrke mikroalger i nærheten av forbrenningsanlegg, slik at de kan forbruke karbondioksid og konvertere den til potensielt biodrivstoff, mat, fôr og høy-verdi produkter.

Proteiner fra mikroalger kan blant annet brukes til humant konsum og i dyrefôr, men per dags dato brukes det mer av disse proteinene i dyrefôr enn til humant konsum [14]. Grunner til dette er konsistensen til den tørkede biomassen, den mørkegrønne fargen og den svake

fiskelukten, som kan gjøre det vanskelig å inkorporere algematerialet i konvensjonelle matprodukter. I tillegg er produksjonskostnadene svært høye. Siden det er mer av proteiner enn lipider i mikroalger, vil storskalaproduksjon av lipider fra mikroalger i tillegg kunne produsere proteiner [15]. Det er derfor viktig å finne den mest lønnsomme metoden for produksjon av begge næringsstoffer. Metoder for hydrolyse av protein er beskrevet i delkapittel 1.7.

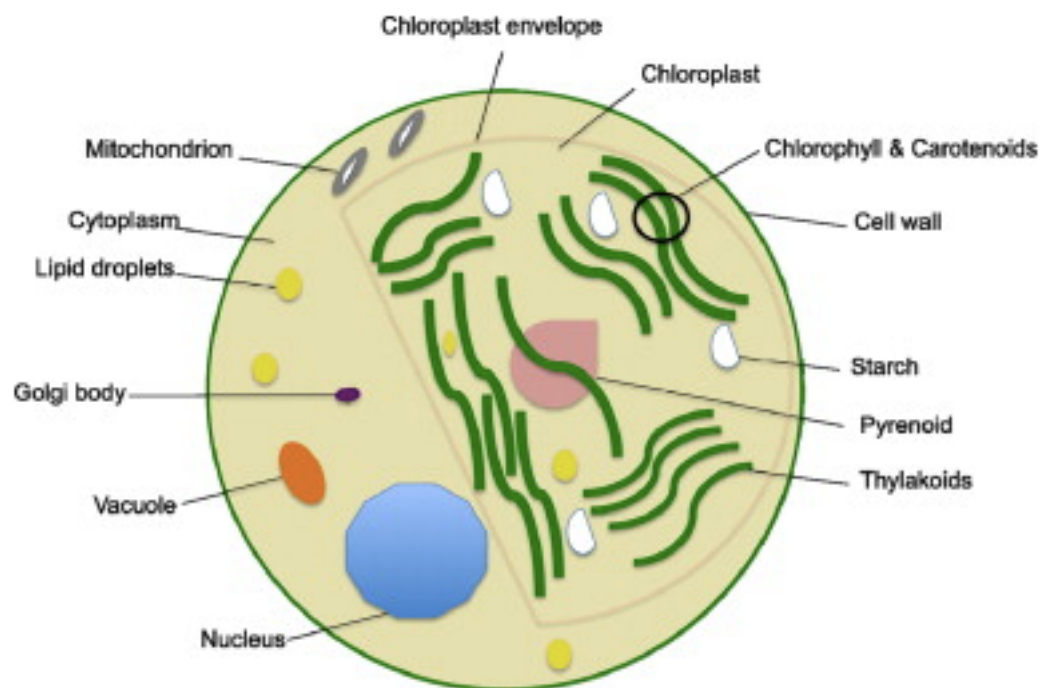
Mikroalger representerer en enorm biodiversitet, der to av de mest interessante er *Chlorella vulgaris* og *Spirulina platensis*. Den kjemiske sammensetningen til de to mikroalgene er presentert i tabell 1. Disse to mikroalgene er deretter beskrevet nærmere i delkapittel 1.3.2 og 1.3.3.

Tabell 1: Kjemisk sammensetning av proteiner, karbohydrater og lipider i *Chlorella vulgaris* og *Spirulina platensis*. Sammensetningen er angitt i prosent av tørrstoff [9].

Mikroalge	Proteiner	Karbohydrater	Lipider
<i>C. vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>S. platensis</i>	46-63	8-14	4-9

1.3.2 *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris tilhører gruppen Chlorophyta av grønne mikroalger, og er en sfærisk og eukaryot celle med 2-10 µm i diameter [12]. Mikroalgen har mange strukturelle elementer som tilsvarer planters. Den stive celleveggen bevarer cellens form og beskytter cellen mot inntrengere og ekstreme miljø. Dette gjør *C. vulgaris* ideell for produksjon av en rekke produkter. Celleveggens stivhet varierer med hver vekstfase, men øker gradvis i tykkelse etter hvert som cellen modnes. Når celleveggen har nådd 17-21 nm, dannes et kitosan-lignende lag bestående av glukosamin. Det er dette laget som sørger for celleveggens stivhet. Ellers består *C. vulgaris* av cytoplasma, der organeller som mitokondrie, kloroplast, kjerne, vakuoler og golgiapparatet befinner seg. Den ytre membranen til mitokondriet har en lik andel av proteiner og fosfolipider, mens den indre membranen har tre ganger så mange proteiner som fosfolipider. Kloroplasten har dobbel membran bestående av fosfolipider. En illustrasjon av den cellulære strukturen til *C. vulgaris* er presentert i figur 2.



Figur 2: Den cellulære strukturen til *C. vulgaris*, inkludert alle organeller [12].

C. vulgaris reproducerer seg aseksuelt og raskt [12]. Innen 24 timer vil én celle som har vokst under optimale forhold formere seg via autosporulering. Autosporulering er den vanligste aseksuelle reproduksjonsformen i alger. Fire datterceller med hver sin cellevegg dannes på innsiden av celleveggen til morcellen. Morcellen sin cellevegg vil ødelegges etter modning, og dattercellene vil frigjøres. Restene etter morcellen vil brukes som fôr for dattercellene.

C. vulgaris inneholder mye lipider [12]. Under optimale vekstforhold vil innholdet av lipider kunne nå 5-40% per tørrvekt biomasse. Lipidene består i hovedsak av glykolipider, voks, hydrokarboner, fosfolipider og små mengder frie fettsyrer. De syntetiseres av kloroplasten og er lokalisert på celleveggen og på membranene til organellene. Fettsyresammensetningen til lipidene kan endre seg med vekstforhold, og noen fettsyresammensetninger egner seg mer for visse formål enn andre. For eksempel vil mettede og enumettede fettsyrer egne seg bedre til biodrivstoffproduksjon, mens flerumettede fettsyrer egner seg bedre for ernæringsmessige anvendelser.

De viktigste faktorene som påvirker fettinnhold- og sammensetning i *C. vulgaris* er lys, temperatur og næringsstoffer [1]. Økt lysintensitet kan både øke og minke totalt fettinnhold i mikroalger. Vekstrate, fettsyre- og aminosyresammensetning i mikroalger har vist seg å være

avhengig av kulturtemperaturen. Det er vist at temperaturer under et optimumsnivå for vekst generelt øker graden av umettethet til lipider i membransystemer. Balansen mellom spesielt fosfor og nitrogen påvirker fettinnhold- og sammensetning. Næringsbegrensning gir redusert syntese av omega-3 PUFAs, og høyere nivå av mettede fettsyrer.

1.3.3 *Spirulina platensis*

Spirulina er en blågrønn cyanobakterie [16]. Cyanobakterier kan vokse i omtrent alle habitat, fra åpne havområder til fjellområder, og fra varme kilder til snødekte landskap. Mange cyanobakterier mangler distinkte morfologiske karakteristikk og fylogenen deres er lite kjent. Det er derimot kjent at *Spirulina* er fotosyntetisk, filamentøs, og spiralformet [14]. *Spirulina* består av flere celler, i motsetning til encellede *Chlorella*, og mikroalgen kan bli opptil 0,5 mm lang.

Det er pigmenter som klorofyll a, fykocyaniner og fykoerytrin som gir cellene en blågrønn farge [16]. De fleste cyanobakterier er obligat fototrofe, og noen få arter kan vokse mikсотroft eller heterotroft. Cyanobakterier tar opp og lagrer næringsstoffer svært raskt. Dette er grunnen til at cyanobakterier ofte dominerer algesamfunn. Reproduksjon av cyanobakterier skjer aseksuelt, via fisjon. Cyanobakterier produserer flere bioaktive forbindelser [17, 18]. Noen kan forårsake alvorlige helseproblemer, som nervegifter og forbindelser som kan gi skade på lever. Andre forbindelser kan gi helsemessige fordeler, som antivirale forbindelser eller cytostatika. Årlig produseres det på verdensbasis ca. 3000 tonn tørrstoff *Spirulina*, mens det produseres ca. 2000 tonn *Chlorella* [16].

Spirulina brukes verden over som helsekost og i dyrefôr [19]. *Spirulina* kan produsere store mengder med flere verdifulle forbindelser; fykocyanin og karotenoider brukt som antioksidanter [20, 21], og omega-6 fettsyrer, som linolsyre (LA) og γ -linolensyre (GLA) [22]. GLA har vist seg å kunne senke LDL (low density lipoprotein) hos pasienter med høyt blodtrykk [23], lindre premenstruelle symptomer [24] og lindre atopisk eksem [25]. GLA kan også ha antiviral effekt og har vist seg å selektivt drepe kreftceller [26].

Sammensetningen av lipider som er funnet i algeklassene som *C. vulgaris* og *S. platensis* tilhører er presentert i tabell 2.

Tabell 2: Grov sammensetning av lipidklasser i henholdsvis cyanobakterier og chlorophyceae. *Spirulina* tilhører førstnevnte klasse, mens *Chlorella* tilhører sistnevnte [9].

Algeklasse	Total lipid (%)	Andel av total lipid (%)		
		Nøytrale lipider	Glykolipider	Fosfolipider
Cyanobakterier	2-23	11-68	12-41	16-50
Chlorophyceae	1-70	21-66	6-26	17-53

1.3.4 Dyrking av mikrolager

Det er i hovedsak tre teknikker for dyrking av mikroalger som benyttes; åpne bassenger, lukkede fotobioreaktorer og fermentorer [1]. Førstnevnte er den mest vanlige måten å produsere mikroalger på. Dette er den billigste metoden for storskalaproduksjon. Det finnes flere typer åpne systemer, som varierer i størrelse, form, konstruksjonsmateriale, type omrøring og helning. Slike systemer krever streng miljøkontroll for å unngå kontaminering av sopp og bakterier samt vekst av andre mikroalger. Lukkede fotobioreaktorer beskytter algekulturen mot konkurrerende mikroorganismer og gir mer kontrollerte vekstforhold. Både åpne og lukkede systemer brukes til autotrof vekst. Fermentorer derimot brukes til heterotrof vekst, der det brukes en organisk karbonkilde, som glukose, til både karbon- og energikilde. Denne teknikken gir kontrollerte, optimale vekstvilkår til å maksimere biomasseproduktiviteten og akkumulere ulike komponenter, som lipider [12]. Ulemper med dette systemet er pris og tilgjengeligheten av organiske kilder. Det er også mulig å dyrke mikroalger miksotroft; algen kan vokse både foto- og heterotroft. *C. vulgaris* kan dyrkes på denne måten.

Etter produksjon av mikroalgekultur, må mikroalgecellene separeres fra dyrkingsmediet. Dette kalles høsting, og kan gjøres på flere måter: sentrifugering, flokkulering, flotasjon og filtrering [12]. Sentrifugering er den mest brukte høstingsmetoden av *C. vulgaris*. Etter produksjon og høsting av algekulturen, kan komponenter som proteiner og lipider ekstraheres og kvantifiseres. Det er flere mulige metoder for lipidekstraksjon, men de kan deles inn i to hovedkategorier: mekaniske metoder og kjemiske metoder [27]. Mekaniske metoder inkluderer blant annet trykking, homogenisering, fresing og ultralydassistert ekstraksjon. Kjemiske metoder inkluderer blant annet bruk av løsemidler og SFE (superkritisk væskeekstraksjon). Per dags dato brukes i hovedsak løsemiddelekstraksjon sammen med

mekanisk ødeleggelse til ekstraksjon av fett fra mikroalger [28]. Ulike metoder for fett ekstraksjon er beskrevet i nærmere detalj i delkapittel 1.4.

1.4 Metoder for lipidekstraksjon

Det er nødvendig å finne gode og effektive metoder for å ekstrahere lipider fra mikroalger. I de påfølgende avsnittene blir noen av metodene som brukes i dag presentert.

1.4.1 Bligh and Dyer og Folch

Bligh and Dyer [29] og Folch [30] er to av de eldste lipidekstraksjonsmetodene, som fortsatt brukes i stor grad. De baserer seg begge på bruk av løsningsmidlene kloroform og metanol, i tillegg til en vann- eller saltløsning, til å danne et to-fase-system. Lipidene vil befinne seg i kloroformfasen, og de andre bestanddelene vil befinne seg i metanolfasen. Forskjellen mellom metodene ligger i forholdet mellom løsningsmidlene. I Bligh and Dyer er forholdet mellom kloroform og metanol 1:1, mens i Folch er dette forholdet 2:1. Steg som inngår i begge metodene inkluderer homogenisering, filtrering og sentrifugering, men det er også mulig å gjøre modifiseringer. Når kloroformfasen som inneholder lipidene i løsningen er oppsamlet, kan lipidinnholdet kvantifiseres. Formelen som benyttes for beregning av lipidinnhold er presentert i formel (1) nedenfor.

$$\text{Total lipid} = \frac{\text{weight of lipid in aliquot} \times \text{volume of chloroform layer}}{\text{volume of aliquot}} \quad (1)$$

Både Bligh and Dyer- og Folch-metoden kan brukes til å ekstrahere alle lipidklasser (polare og nøytrale) fra alle typer celler som inneholder lipider, inkludert mikroalger [31]. Bruk av løsningsmidler og valg av ekstraksjonsmetode avhenger likevel av hvilke klasser av lipider som skal ekstraheres. For eksempel vil kjemiske metoder egne seg godt til å ekstrahere polare lipider, som fosfolipider og glykolipider, mens mekaniske metoder egner seg godt til å ekstrahere nøytrale lipider, som hydrokarboner og acylglyseroler. I mekanisk separasjon vil cellene ødelegges ved hjelp av blant annet høyt trykk eller ultralyd. Ultralyd kan ødelegge cellevegger og cellemembraner ved at det produseres mikrobobler som kan skape trykk på cellene [32] eller ved fasilitering av miksing av algekulturen [33]. Mekaniske metoder er effektive og det er mindre sannsynlighet for kontaminering av lipidekstraktet [31]. De krever

derimot mer energitilførsel enn kjemiske og enzymatiske metoder, og varmeutvikling under den mekaniske ødeleggelsen kan forårsake skade på sluttproduktet.

1.4.2 Soxhlet-ekstraksjon

Soxhlet-ekstraksjon er en annen veletablert og konvensjonell metode, der prinsippet ligner fremstilling av te [34]. Biomassen pakkes i en sylinder, og sylindere fylles med varmt løsningsmiddel. Løsningsmiddelet vil da filtreres gjennom biomassen, og trekke med seg løselige komponenter, som lipider, fra biomassen. Den filtrerte løsningen vil samles i en rundkolbe i bunnen av apparatet. Det brukes et spesielt ekstraksjonsapparat som kalles Soxhlet-ekstraktor. Filtreringen av løsningsmiddel gjennom biomassen kan ta opp til flere timer, og metoden er derfor tidkrevende.

1.4.3 Etanolekstraksjon

Etanolekstraksjon kan bli brukt på marine råstoffer som lodde-, sild- og torskerogn, og krill [35]. Det har også blitt utført etanolekstraksjon på mikroalger [36]. En måte å utføre ekstraksjonen på er å ekstrahere tre ganger etter hverandre ved å bruke en ratio på 5:1, 3:1 og 2:1 av etanol og tørket råstoff [35]. Etanolekstrakter fra mikroalger inneholder gjerne et stort antall av biologisk aktive forbindelser, som klorofyll, karotenoider, steroler og flerumettede fettsyrer [36]. Etanolekstraksjon gir typisk utbytte på 12-15% av biomassen til *C. vulgaris*. Fordeler ved å velge etanolekstraksjon fremfor andre ekstraksjonsmetoder er lav toksisitet og lave kostnader.

1.5 Metoder for isolering av fosfolipider

Det finnes flere metoder som kan brukes for å separere fettklassene og dermed isolere fosfolipidene fra nøytrale lipider. To av disse er beskrevet i dette delkapittelet.

1.5.1 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)

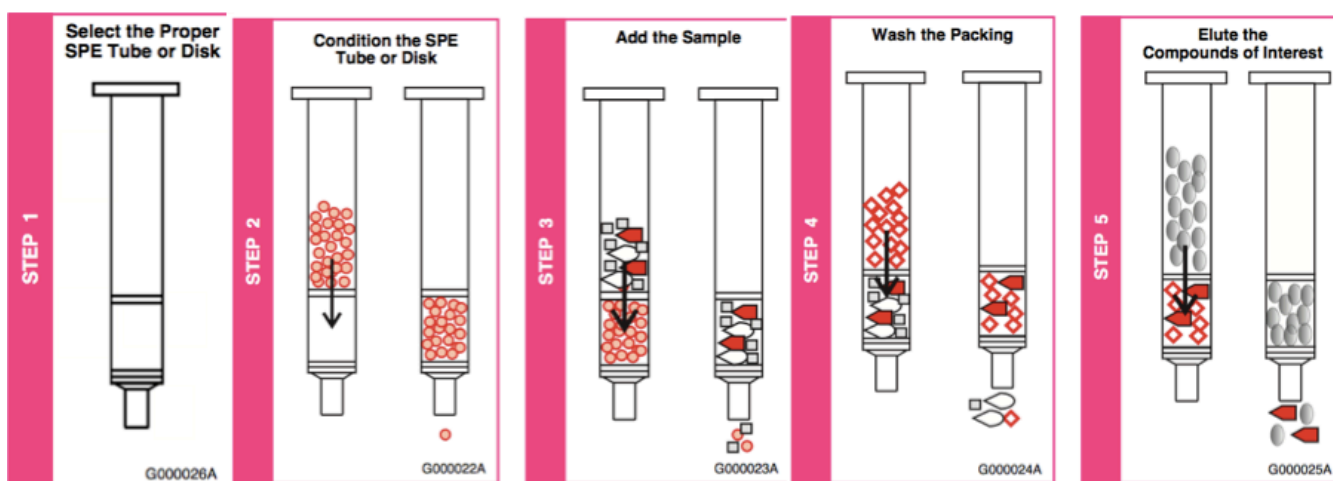
Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en prøveoppbeidelsesteknikk der flere av problemene tilknyttet væske-væske-ekstraksjon unngås [37]. Problemene kan være ufullstendige faseparasjoner, lav utvinning, bruk av dyrt og knuselig glassutstyr, og deponering av store mengder organiske løsemidler. I tillegg er SPE mer effektiv, gir kvantitative ekstraksjoner som er enkle og raske å utføre, og metoden kan automatiseres. Løsemiddelbruk og laboratorietid reduseres. SPE brukes mest til å preparere væskeprøver og ekstrahere semi-flyktige og ikke-flyktige analytter, men metoden kan også brukes på prøver som allerede er ekstrahert i løsemidler. SPE kan fungere utmerket på prøveekstraksjon, konsentrasjon og opprensing, og det er stor variasjon blant produktene som benyttes til ekstraksjonen.

Prinsippet bak SPE er at komponenter i en løsning fraksjonerer på bakgrunn av polaritet [37]. Forbindelsene i prøveløsningen holdes tilbake av en stasjonærfase, ved hjelp av ulike bindingsmekanismer, avhengig av hvor polare/upolare forbindelsene i prøven er eller om forbindelsene er ladde/uladde:

- I omvendt fase ekstraksjon er løsningsmiddelet (den mobile fasen) polart og stasjonærfasen er upolar. Analytten av interesse er vanligvis middels- eller ikke-polar. Retensjonen av forbindelsene i løsningen skyldes hydrofobe interaksjoner, som upolare-upolare interaksjoner og van der Waals- eller dispersjonskrefter.
- I normal fase ekstraksjon er den mobile fasen upolar, mens stasjonærfasen er polar. Analytten av interesse er gjerne polar. Retensjonen skyldes her hydrofile interaksjoner, som polare-polare interaksjoner, hydrogenbindinger, pi-pi interaksjoner, dipol-dipol interaksjoner og dipol-induserte dipolinteraksjoner.
- Ionebytting baserer seg på elektrostatisk tiltrekning av ladde grupper på forbindelsene til ladde grupper på stasjonærfasens overflate.

I normal fase SPE brukes gjerne polart bundne silika og polare adsorpsjonsmedia som stasjonærfase [37]. Eksempler på polart bundne silika er LC-CN, LC-NH₂ og LC-Diol, mens eksempler på adsorpsjonsmedia er LC-Si, LC-Florisil, ENVI-Florisil og LC-Alumina. En forbindelse elueres ved å tilsette et løsningsmiddel som ødelegger bindingsmekanismen mellom forbindelsen og stasjonærfasen, og dette er gjerne et løsningsmiddel som er mer polart enn den opprinnelige mobile fasen. De bundne silikaene har korte alkylkjeder med polare funksjonelle grupper bundet til overflaten. Denne typen pakking kan brukes til å adsorbere og selektivt eluere forbindelser med veldig lik struktur, som isomerer, eller komplekse blandinger eller klasser av forbindelser, som legemidler og lipider. LC-Si er uderivatisert silika som normalt brukes som basis ("backbone") for alle de bundne fasene. Denne silikaen er ekstremt hydrofil, og må holdes tørr.

Det er mulig at sekundære interaksjoner vil kunne oppstå når det brukes bundne silika [37]. Selv om bundne silika i normal fase SPE primært vil gi polare retensjonsmekanismer via den bundne funksjonelle gruppen, kan analytten danne sekundære upolare interaksjoner med den korte alkylkjeden som er bundet til den funksjonelle gruppen. I slike tilfeller vil et mer upolart løsningsmiddel eller en blanding av polare og upolare løsningsmidler trenes for eluering. I tillegg kan sekundære polare- eller kationbytterinteraksjoner oppstå mellom den adsorberte forbindelsen og silika-basisen. SPE består av fem steg. Disse er presentert i figur 3.



Figur 3: Oversikt over stegene som inngår i fast-fase-ekstraksjon: 1- Velg riktig kolonne, 2- Forbehandle kolonnen, 3- Påsett prøven, 4- Vask gjennom kolonnen, 5- Eluér forbindelse av interesse. (Modifisert figur fra [37]).

1.5.2 Acetonutfelling

Acetonutfelling er den enkleste og ofte den mest effektive prosedyren for å separere polare lipider, som glykolipider og fosfolipider, fra nøytrale lipider, inkludert pigmenter [38]. Prinsippet bak metoden er at polare lipider er uløselige i kald aceton, mens nøytrale lipider er løselige. Dermed vil de polare lipidene felles ut, mens nøytrale lipider vil forbli i løsningen. Metoden fungerer best på lipider fra bakterier og dyr, men kan også brukes på lipider fra planter. Grunnen til at metoden ikke nødvendigvis fungerer like godt på plantelipider, er at de har høyere andel av nøytrale lipider. Her regnes både glyserider, steroler, hydrokarboner og pigmenter, som klorofyll og karotenoider, som nøytrale lipider.

1.6 Metoder for lipidanalyser

Metoder som kan brukes til å analysere lipidekstrakter er kromatografiske metoder, som HPLC og GC, i tillegg til NMR. Disse metodene er beskrevet i de påfølgende avsnittene.

1.6.1 HPLC-CAD

HPLC (high performance liquid chromatography) er en kromatografisk metode som kan brukes til å analysere lipidklasser [39]. Ett eller flere løsningsmidler brukes som mobilfase til å separere de ulike komponentene i en prøveløsning på bakgrunn av polaritet [40]. De fleste lipider består av både mettede og umettede fettsyrer [39]. Derfor egner såkalte massedetektorer eller universelle detektorer seg til kvantifisering av lipidene. Slike detektorer kan være FID (flame ionization detector), ELSD (evaporative light scattering detector) og CAD (charged aerosol detector). Sistnevnte detektor er en relativt ny detektor som egner seg for lipidanalyse. CAD kan detektere mono-, di- og triacylglyseroler, glykolipider, fosfolipider, steroler og frie fettsyrer.

CAD fungerer på den måten at analytten danner partikler, som blir tørket, påført ladning og deretter detektert [39]. Ved hjelp av en strøm av nitrogen, dannes det aerosoler av eluenten, og deretter vil løsningsmidlene fordampe. De tørkede aerosolpartiklene blir så påført ladning ved hjelp av en ny strøm av nitrogen, og til slutt kvantifiseres de ladde partiklene ved hjelp av et elektrometer. Den målte strømmen vil detektere forbindelsene som topper i et

kromatogram. Jo større mengde av en forbindelse som elueres fra kolonnen, jo større er partiklene, og jo større er ladningen. Det er mange fordeler ved bruk av CAD. Den kan detektere ikke-flyktige forbindelser, responsen er uavhengig av de kjemiske egenskapene til analytten, den har et bredt dynamisk responsområde med høy sensitivitet, den har god presisjon for et stort område av analytter, og detektorsystemet er enkelt og pålitelig [41]. På en annen side varierer responsen til detektoren med mobilfasesammensetningen [42]. I tillegg er det ikke mulig å identifisere en spesifikk topp eller analysere toppen for renhet, da det ikke kreves noen spektralinformasjon [43].

1.6.2 NMR

NMR (nuclear magnetic resonance) kan, i likhet med HPLC, brukes til å analysere lipidklasser. NMR kan brukes innen flere områder, som medisin, biologi og næringsmiddelkemi [44]. Metoden kan gi verdifull informasjon om kjemisk sammensetning og struktur av biologiske systemer, på ulike nivåer. Metoden baserer seg på at atomkjerner har magnetiske egenskaper under påvirkning av et kraftig magnetisk felt. Det er i hovedsak tre NMR-metoder som brukes innen næringsmiddelkemi, og disse er delt inn på bakgrunn av utstyr. De tre metodene inkluderer høyoppløsnings-NMR-spektroskopi (HR-NMR), magnetisk resonansavbildning (MRI) og lavfelts-NMR ("relaxometry").

1.6.3 Gasskromatografi (GC)

GC kan brukes til å analysere fettsyresammensetning. Som i alle kromatografiske metoder, er prinsippet å separere og detektere komponentene i en prøveløsning. Mobilfasen er en gass, gjerne H₂, mens stasjonærfasen er en væske [45]. Prøven injiseres i gassfasen, der den fordampes og sendes videre til væskefasen. Da komponentene i prøven har ulik affinitet for stasjonærfasen, bruker de forskjellig tid gjennom en kolonne. Dette resulterer i ulike topper som kan detekteres, og dermed kan komponentene kvantifiseres. Flammeioniseringsdetektor (FID) kan detektere nesten alle organiske forbindelser, og er derfor svært mye brukt. Videre er massespektrometer (MS) en annen detektor som kan brukes til å analysere fettsyrer.

Omtrent alle de ulike dobbeltbindingene i mikroalger kan bli identifisert med polare og upolare høyoppløsningskapillærkolonner [46]. Detaljerte lipidanalyser kan utføres på veldig små prøver (submilligram). Før prøven påsettes GC-kolonnen må lipidekstraktet forestres. Da

blir fettsyrene metylert og skilt fra hverandre. Dette kan gjøres ved å behandle ekstraktet med metanol, og det vil bli dannet totale fettsyremetylestere (FAMEs). Metylestere har lavere kokepunkt enn triglyserider, og vil dermed fordampe lettere.

1.7 Metoder for proteinhydrolyse

Både kjemisk og enzymatisk hydrolyse kan brukes til produksjon av proteinhydrolysater [15, 47]. I enzymatisk hydrolyse katalyserer eksogene eller endogene enzymer spaltningen av peptidbindinger, slik at proteiner frigjøres. Denne metoden kan gi produkter med høyere kvalitet uten giftige stoffer. Enzymatisk hydrolyse utføres under mildere betingelser og lar seg lettere styre enn kjemisk hydrolyse. Det er anbefalt å utføre enzymatisk hydrolyse på mikroalger for å forbedre fordøyeligheten av celleproteinene, da proteiner i de fleste mikroalger er ufordøyelige for mennesker og monogastriske dyr på grunn av mikroalgens sterke cellevegg [36]. I tillegg til enzymatisk hydrolyse kan det være nødvendig å bruke metoder for å ødelegge cellene og frigjøre proteinene [15].

Det er viktig å velge riktig enzym og optimalisere betingelsene for prosessen [15]. Enzymet Alcalase er mye brukt til å hydrolysere proteiner fra vegetabilsk opprinnelse [48], dyrekilder [49] og biprodukter fra fisk [47]. Parametere som også trengs å optimaliseres er biomasse- og enzymkonsentrasjon [15]. Enzymer er dyrt og bør brukes i så lave konsentrasjoner som mulig, gjerne mellom 1% og 5%. En biomassekonsentrasjon på over 200 g/l kan minske utbyttet av den enzymatiske reaksjonen og dermed redusere graden av hydrolyse. Det kan også lønne seg å bruke fersk biomasse fremfor frysetørket materiale.

En effektiv metode å bestemme proteinkonsentrasjon i hydrolysater på er ved å måle UV-absorbans spektrofotometrisk [50]. Dette bør gjøres ved 260 og 280 nm, da aromatiske aminosyrer absorberer UV-stråling ved 280 nm. Fordeler med metoden er at den er rask og at proteinprøvene ikke ødelegges. Metoden fungerer best på rene proteinløsninger, da andre forbindelser som er tilstede i prøven også kan absorbere UV-stråling ved samme bølgelengde og dermed påvirke resultatet. I tillegg påvirker proteinstruktur, pH og ionestyrke absorbansspekteret.

1.8 Formål med oppgaven

Mikroalger inneholder signifikante mengder med lipider som kan være rike på flerumettede omega-3 fettsyrer. Disse har vist seg å ha positive helseeffekter, og kan blant annet brukes til humant konsum og i dyrefôr. Spesielt fosfolipider har vist seg å ha flere fordeler fremfor triglycider. Det er viktig å finne gode ekstraksjonsmetoder som i tillegg er milde nok til å preservere de gunstige fettsyrene, som er svært utsatt for oksidasjon. Da mikroalger har et høyt innhold av biologisk aktive forbindelser, som er mikroinnkapslet av en robust cellevegg, kan det være krevende å finne gode ekstraksjonsmetoder.

Formålet med oppgaven var derfor å optimalisere metoder for lipidekstraksjon og isolering av fosfolipider fra to kommersielle mikroalger; *Chlorella* og *Spirulina*. Effekten av ulike ekstraksjonsforhold på lipidutbytte og kvalitet har blitt studert. Lipidekstraktene har blitt karakterisert ved hjelp av HPLC-CAD og GC-FID. Med disse analysemetodene ble lipidklasser samt fettsyresammensetning analysert.

Både kjemiske og mekaniske ekstraksjonsmetoder har blitt undersøkt. Som kjemiske metoder ble Bligh and Dyer, en modifisert utgave av Folch-metoden og etanolekstraksjon testet ut. Som mekanisk metode ble ultralydassistert ekstraksjon undersøkt. I tillegg ble flytende nitrogen testet som algeknusingsmetode.

Et annet mål med oppgaven var å vurdere hvordan råstoffet i mikroalger kan utnyttes i høyest mulig grad. I en verden med økende befolkningsvekst er det kritisk å nyttiggjøre seg næringsstoffressursene til det fulle, og siden mikroalger inneholde store mengde lipider og proteiner har det blitt utført proteinhydrolyse av biomasse både før og etter lipidekstraksjon. På denne måten kunne utbyttene av protein og lipid sammenlignes.

2 Materialer og metoder

2.1 Materiale

Begge mikroalgene som er brukt i oppgaven er kommersielle produkter kjøpt via internett. Produktene er:

- 1) Rå og økologisk *Chlorella*-pulver fra AltShop.no, 250 gram fra Kina. Økologisk sertifisering.
- 2) Rå og økologisk *Spirulina*-pulver fra AltShop.no 250 gram fra Kina. Organisk sertifisering.

Det antas at *Chlorella*-pulveret blant annet inneholder *C. vulgaris* og at *Spirulina*-pulveret blant annet inneholder *S. platensis*, da disse er typiske arter som brukes kommersielt, og som det refereres mye til i litteraturen.

2.2 Kjemikalier

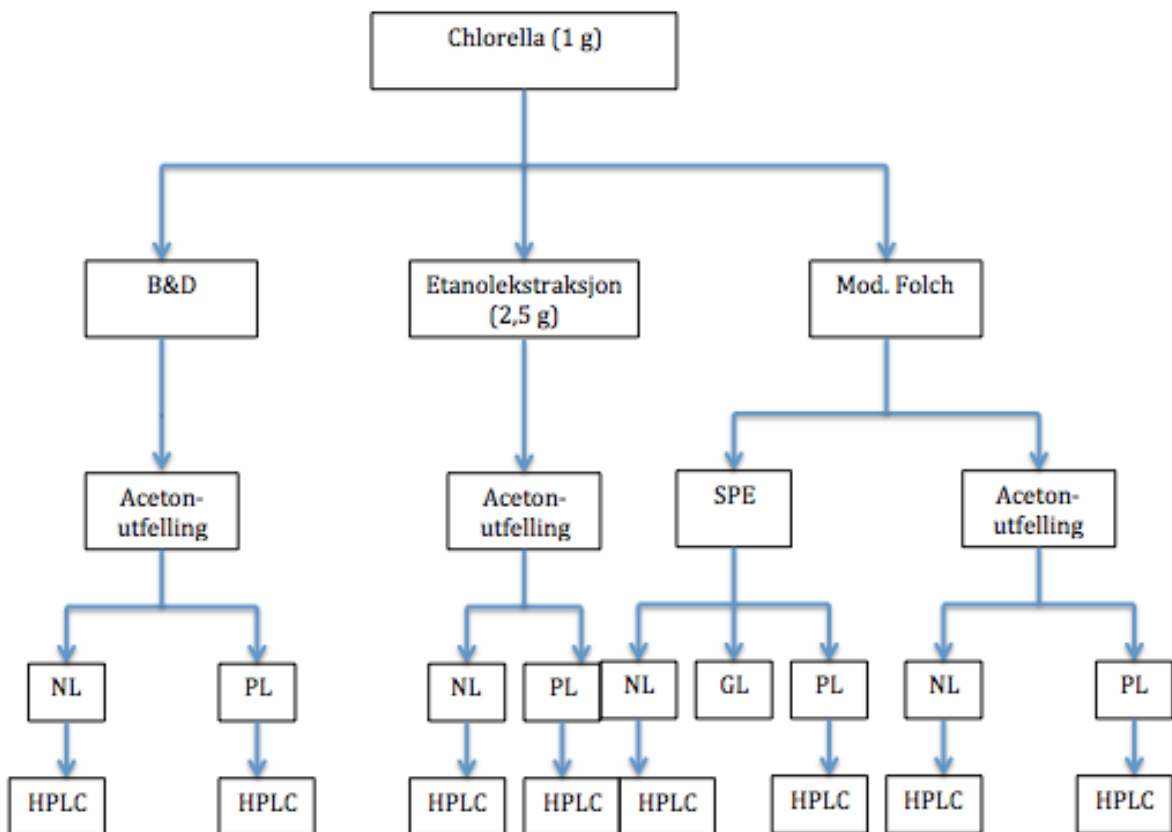
Kjemikaliene som er brukt i denne studien er presentert i tabell 3.

Tabell 3: Oversikt over kjemikalier som er brukt i studien.

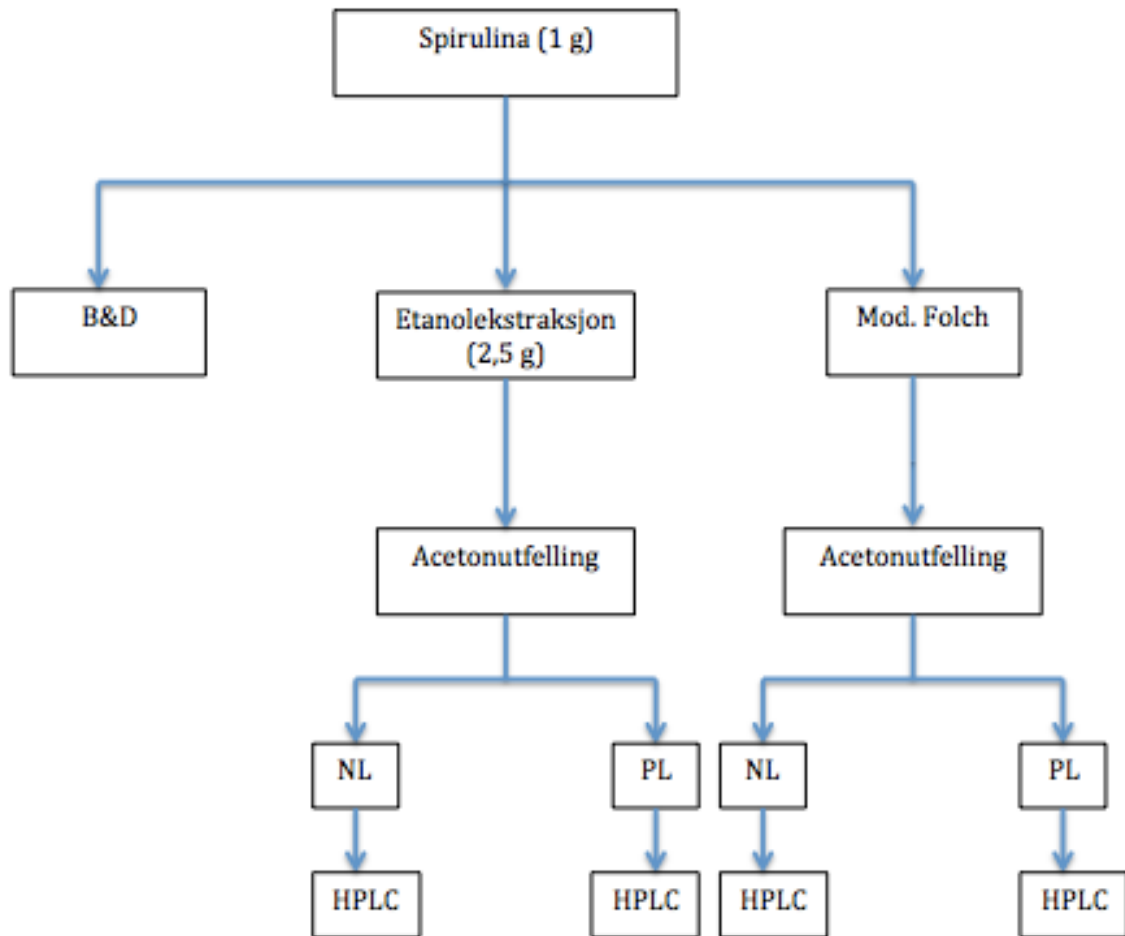
Kjemikalier	Produsent
Metanol	Merck
Kloroform	Merck
Aceton	Merck
KCl	Merck
Eddiksyre	Merck
Isooktan	Merck
Etanol (rektifisert sprit)	Kemetyl
Alcalase (2,4 L)	Novozymes
NaOH (0,5 M) løst i metanol	Merck
BF ₃ -metanol	Supelco
Heksan	Merck
Mettet NaCl	Merck

2.3 Oppbygning av oppgaven

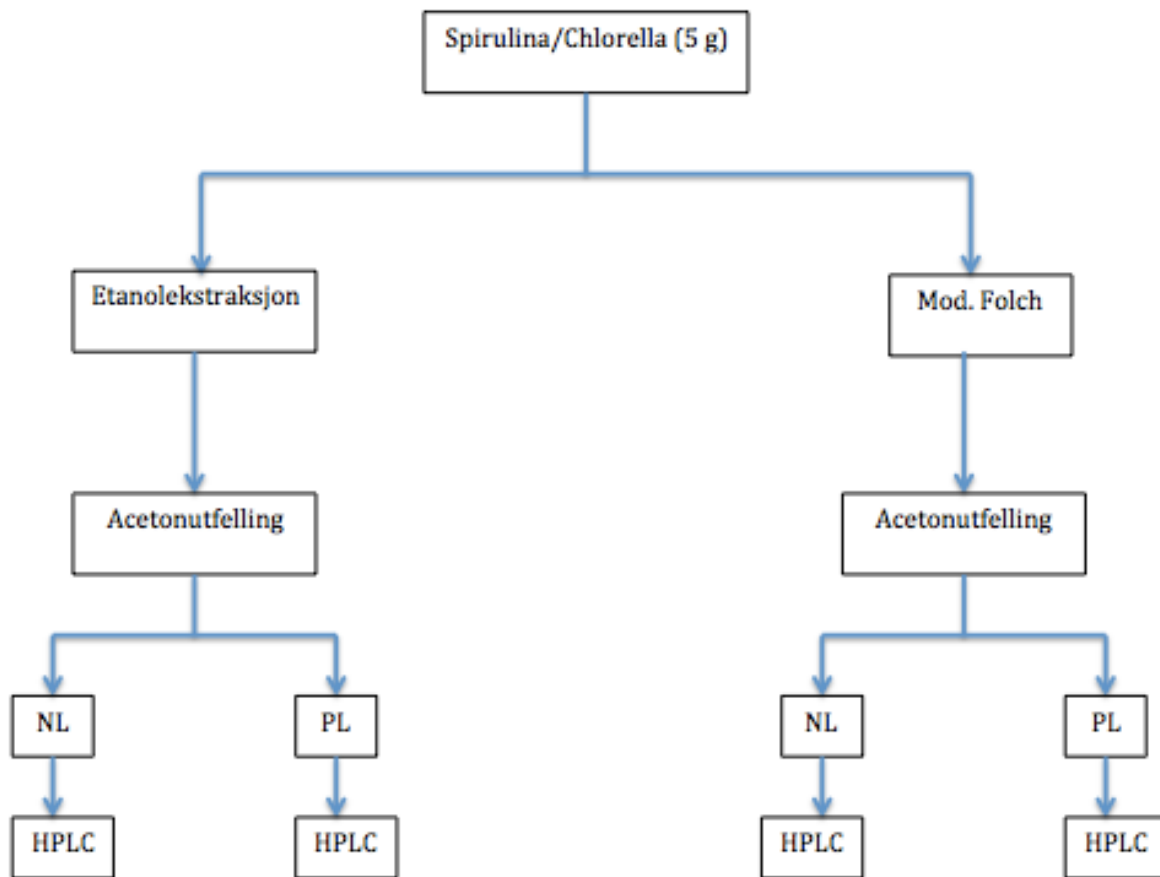
Første del av oppgaven er delt inn i to deler; ekstraksjon og isolering i liten skala og i større skala. I liten skala er det benyttet 1 gram tørrstoff (med unntak av etanolekstraksjon, der det er benyttet 2,5 g). Gangen i ekstraksjon- og isolering i liten skala for henholdsvis *Chlorella* og *Spirulina* er illustrert i figur 4 og 5. Videre er to ekstraksjonsmetoder samt én isoleringsmetode valgt til produksjon i større skala. Her er det brukt 5 g tørrstoff. Gangen i ekstraksjon- og isolering i større skala for både *Chlorella* og *Spirulina* er illustrert i figur 6.



Figur 4: Skjematisert fremstilling av ekstraksjon i liten skala for *Chlorella*. NL står for nøytrale lipider, GL står for glykolipider og PL står for fosfolipider.



Figur 5: Skjematisk fremstilling av ekstraksjon i liten skala for *Spirulina*. NL står for nøytrale lipider og PL står for fosfolipider.



Figur 6: Skjematisert fremstilling av ekstraksjon i større skala for *Chlorella* og *Spirulina*. NL står for nøytrale lipider og PL står for fosfolipider.

Lipidekstrakter og isolerte fraksjoner er analysert med HPLC-CAD. Videre er GC brukt til å analysere fettsyresammensetning i ekstraktene. I andre del av oppgaven er det utført hydrolyse av proteiner, både før og etter lipidekstraksjon av biomasse fra *Chlorella*. Alle metoder som er brukt vil bli forklart mer inngående i de påfølgende avsnittene.

2.4 Ekstraksjon

Ulike ekstraksjonsmetoder ble undersøkt på *Chlorella* og *Spirulina*. En oversikt over hvilke metoder som er utført på *Chlorella* og *Spirulina* er presentert i tabell 4. De utførte metodene er merket med "✓", mens metodene som ikke er utført er merket med "x". Metodene er deretter beskrevet i den rekkefølgen de er presentert i tabellen. Samme prosedyrer gjelder ekstraksjon i liten og større skala, med unntak av innveid tørrstoffmengde.

Tabell 4: Oversikt over ekstraksjonsmetoder utført på *Chlorella* og *Spirulina*. Alle ekstraksjoner ble utført i to paralleller, bortsett fra B&D m/ultralyd og mod. Folch, som ble utført i seks paralleller. B&D tilsvarer Bligh and Dyer, mens EtOH tilsvarer etanolekstraksjon.

Mikroalge	B&D m/ultralyd	B&D u/ultralyd	B&D x 3	Modifisert Folch	EtOH	EtOH med N ₂
<i>Chlorella</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Spirulina</i>	✓	x	x	✓	✓	✓

2.4.1 Bligh and Dyer

Det ble veid ut ca. 1 gram pulver mikroalge i en sentrifugekopp. Det ble tilsatt 16 ml vann, 20 ml kloroform og 40 ml metanol, og løsningen ble homogenisert i 2 minutter med Ultra-Turrax (T25, IKA, Staufen, Germany). Løsningen ble satt i ultralydbad (Sonorex RK 255 S, Bandelin electronic, Berlin, Germany) i 20 minutter (2x10). Løsningen ble tilsatt 20 ml kloroform og homogenisert i 1 minutt, og deretter tilsatt 20 ml vann og homogenisert i 2 minutter. Løsningen ble sentrifugert (KR 22 i, Jouan, France) i 10 minutter ved 4109 g, og kloroformfasen ble tatt ut. Kloroformfasen ble filtrert ved hjelp av vakuum og glassfilter (no.3) (büchnerfiltrering), og volumet av den filtrerte fasen ble målt. 2x2 ml av kloroformfasen ble overført til forhåndsveide Kimaxrør. Disse ble avdampet på varmeblokk (60 °C) med N₂-tilførsel. Rørene ble også veid etter avdamping, slik at lipidinnhold kunne beregnes. Resten av kloroformfasen ble inndampet på rotavapor (Laborota 4000, Heidolph Instruments, Germany) koblet til en vakuumpumpe (PC 511, Vacuubrand, Germany) (p: 250 mbar, rotering: 150 rpm, vannbad: 40 °C). Det konsentrerte lipidekstraktet ble lagret ved -20 °C for videre analyse.

Det ble også utført Bligh and Dyer uten bruk av ultralyd. Prosedyren var den samme som beskrevet over, med unntak av ultralydbadet.

Det ble også gjort forsøk der prøven ble ekstrahert med Bligh and Dyer-metoden tre ganger etter hverandre. Prosedyren for hovedekstraksjonen var den samme som før, men prosedyren for ekstraksjon av algerester i vannfasen var noe annerledes. Det ble tilsatt 40 ml kloroform til vannløsningen som var igjen etter oppsamlet kloroformfase, og løsningen ble homogenisert i 2 minutter. Løsningen ble satt i ultralydbad (Sonorex RK 255 S, Bandelin electronic, Berlin, Germany) i 10 minutter. Deretter ble løsningen sentrifugert (KR 22 i, Jouan, France) i 10 minutter ved 4109 g, og kloroformfasen ble tatt ut og filtrert på samme måte som før. Samme

prosedyre ble utført på vannløsningen som var igjen etter denne oppsamlede kloroformfasen. Alle kloroformfasene ble inndampet på varmeblokk og konsentrert på rotavapor, som beskrevet i forrige avsnitt. Rådata fra denne metoden finnes i vedlegg A.

2.4.2 Modifisert Folch

Det ble veid ut ca. 1 gram pulver mikroalge i en sentrifugekopp. Det ble tilsatt 48 ml kloroform og 24 ml metanol. Løsningen ble homogenisert i 2 minutter med Ultra-Turrax (T25, IKA, Staufen, Germany) og satt i ultralydbad (Sonorex RK 255 S, Bandelin electronic, Berlin, Germany) i 20 minutter (2x10). Løsningen ble så filtrert med büchnerfiltrering (vakuum og glassfilter no.3), og den filtrerte fasen ble helt over i ny sentrifugekopp. Løsningen ble tilsatt 18 ml 9% KCl-løsning, og sentrifugert (KR 22 i, Jouan, France) i 5 minutter ved 4109 g. Kloroformfasen ble tatt ut, og volumet ble målt. 2x2 ml av kloroformfasen ble overført til forhåndsveide Kimaxrør, som ble avdampet på varmeblokk (60 °C) med tilførsel av N₂-gass. Rørene ble veid igjen etter avdamping, og lipidinnholdet ble beregnet. Den resterende kloroformfasen ble avdampet på rotavapor, som beskrevet i delkapittel 2.4.1. Sluttekstraktet ble lagret ved -20 °C for videre analyse. Rådata fra denne metoden finnes i vedlegg B.

2.4.3 Etanolekstraksjon

Det ble veid ut ca. 2,5 g pulver mikroalge i en sentrifugekopp, og det ble tilsatt 50 ml etanol. Blandingen ble satt i ultralydbad (Sonorex RK 255 S, Bandelin electronic, Berlin, Germany) i 15 min og sentrifugert (KR 22 i, Jouan, France) i 10 min ved 4109 g. Løsningen ble filtrert med büchnerfiltrering (vakuum og glassfilter no.3), og det ble tatt ut 2x2 ml av etanolfasen til bestemmelse av lipidinnhold. Det resterende bunnfallet ble tilsatt 30 ml etanol, og prosedyren ble gjentatt. Det ble tilsatt 20 ml etanol til de resterende sedimentene, og prosedyren ble gjentatt en siste gang. Alle etanolfasene ble samlet og avdampet på rotavapor, som beskrevet i delkapittel 2.4.1 (vannbad: 65 °C). Det konsentrerte lipidekstraktet ble lagret ved -20 °C for videre analyse. Rådata fra denne metoden finnes i vedlegg C.

Det ble også utført etanolekstraksjon der algene først ble forsøkt knust med flytende nitrogen. N₂ ble helt over i en morter og 2-3 teskjeer mikroalge ble tilsatt. Det ble brukt en pistill til å knuse algene samtidig som det ble tilsatt N₂ underveis. Dette ble gjort i ca. 5 minutter. Deretter ble etanolekstraksjon utført som tidligere beskrevet.

2.5 Isolering av fosfolipider

Det ble testet ut to ulike metoder for å isolere fosfolipidene fra lipidekstraktene. En oversikt over hvilke ekstrakter isoleringsmetodene er utført på er presentert i tabell 5. Ekstraktene en metode er utført på er merket med ”✓”, mens ekstraktene en metode ikke er utført på er merket med ”x”. De to metodene er deretter beskrevet i nærmere detalj.

Tabell 5: Oversikt over isoleringsmetoder utført på *Chlorella* og *Spirulina*.

Isoleringsmetode	Ekstrakter fra <i>Chlorella</i>			Ekstrakter fra <i>Spirulina</i>	
	B&D	Mod.Folch	EtOH	Mod.Folch	EtOH
SPE	x	✓	x	x	x
Acetonutfelling	✓	✓	✓	✓	✓

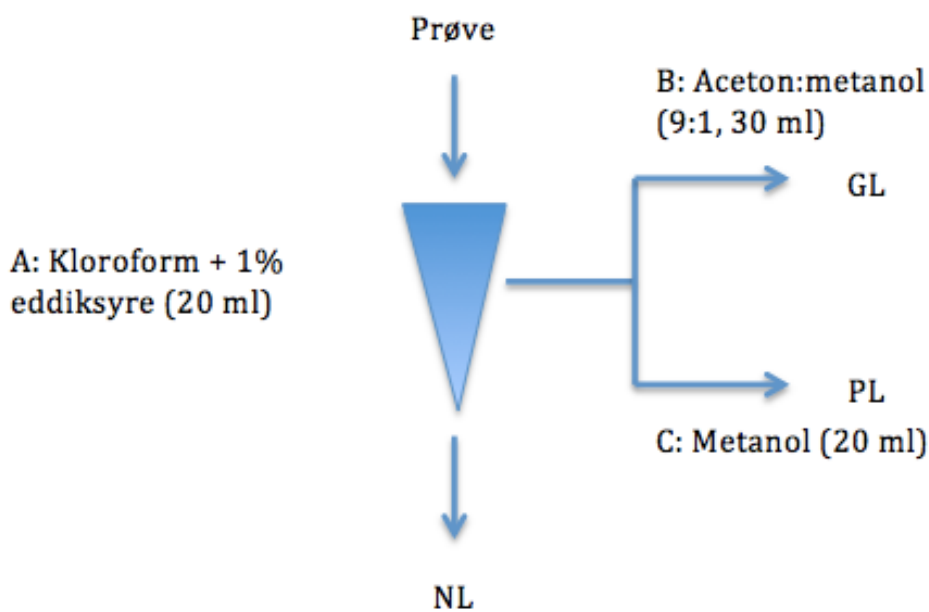
2.5.1 SPE (fast-fase-ekstraksjon)

SPE ble utført for å separere lipidekstraktet i nøytrale lipider, glykolipider og fosfolipider. Det ble brukt aminopropylbundede silikakolonner (1000 mg) fra SUPELCO koblet til en vakuumpumpe. Det ble utført SPE på tre paralleller samtidig, i henhold til Olmstead et.al. [51]. Metoden ble utført to ganger, to ulike dager, på *Chlorella*-ekstrakt fra modifisert Folch.

Tre kolonner med tilhørende reagensrør ble satt opp og vakuumpumpe ble koblet til. Kolonnene ble forbehandlet med en løsning bestående av kloroform med 1% eddiksyre (løsningsmiddel A). Tiden det tok for løsningsmiddelet å bevege seg gjennom kolonnen ble målt med stoppeklokke, og forbehandlingen ble avsluttet da hastigheten lå på ca. 1 ml/min. Før lipidprøven ble påsatt kolonnen, ble det tatt ut 0,5 ml av *Chlorella*-ekstrakt over i et veid Kimaxrør. Prøven ble avdampet med tilførsel av N₂ og røret ble veid igjen. Lipidmengde (mg) ble funnet, og kloroform:metanol (2:1) ble tilsatt slik at prøven fikk en konsentrasjon på 20 mg/400 µl.

400 µl av løsningen ble påsatt hver av kolonnene. 20 ml av løsningsmiddel A ble tilsatt litt etter litt til hver kolonne, og eluenten ble samlet opp og tatt vare på underveis. 30 ml av en løsning bestående av aceton:metanol (9:1) (løsningsmiddel B) ble tilsatt hver kolonne på samme måte som løsningsmiddel A. Eluentene ble satt til side og tatt vare på. Til slutt ble 20 ml metanol (løsningsmiddel C) tilsatt kolonnene på samme måte som for de andre

løsningsmidlene, og eluentene ble satt til side og tatt vare på. Det ble tatt ut 2x2 ml av hver av eluentene, og disse ble overført til forhåndsveide Kimaxrør. Prøvene ble avdampet på varmeblokk (60 °C) med tilførsel av N₂, avkjølt og veid igjen, slik at lipidinnholdet kunne beregnes. Det resterende innholdet fra hver parallell fra hver fraksjon ble slått sammen og avdampet på rotavapor, som beskrevet i delkapittel 2.4.1. De konsentrerte ekstraktene ble lagret ved -20 °C for videre analyse. En skisse av prosedyren er vist i figur 7. Rådata fra denne metoden finnes i vedlegg D.



Figur 7: Skisse av SPE- prosedyre. NL står for nøytrale lipider, GL står for glykolipider og PL står for fosfolipider.

2.5.2 Acetonutfelling

Acetonutfelling ble utført for å separere fosfolipider fra nøytrale lipider. Det ble utført to paralleller per lipidekstrakt. Det ble tatt utgangspunkt i metoden beskrevet av Mozuraityte [52].

Ca. 100-200 mg total lipid ble veid inn i et Kimaxrør. Det ble tilsatt kloroform til lipidinnhold på ca. 400 mg/ml, og aceton til lipidinnhold på ca. 20 mg/ml. Røret ble ristet godt, og satt i fryser over natten. Dagen etter ble acetonfasen forsiktig overført til en målesylinder, mens bunnfallet ble værende i røret. Bunnfallet ble løst i 5 ml kloroform. Det ble tatt ut 2x2 ml av

acetonfasen, og 2x0,5 ml av fosfolipidfasen, over i forhåndsveide Kimaxrør. Lipidinnholdet ble bestemt på samme måte som beskrevet tidligere. Det resterende av fraksjonene ble avdampet på rotavapor, som beskrevet i delkapittel 2.4.1. De konsentrerte ekstraktene ble lagret ved -20 °C for videre analyse. Rådata fra denne metoden finnes i vedlegg E.

2.6 Analyse av lipidklasser: HPLC-CAD

Lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina* ble analysert med HPLC-CAD for å bestemme sammensetningen av lipidklasser. En oversikt over prøvene som er analysert med HPLC-CAD er presentert i tabell 6. Prøvene som har blitt analysert er merket med ”✓”, mens prøvene som ikke er analysert er merket med ”x”.

Tabell 6: Oversikt over prøver som er analysert med HPLC-CAD.

Ekstrakt/fraksjon	Liten skala		Større skala	
	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>
B&D	✓	x	x	x
Mod.Folch	✓	✓	✓	✓
EtOH	✓	✓	✓	✓
Nøytral fase SPE (mod.Folch)	✓	x	x	x
PL-fase SPE (mod.Folch)	✓	x	x	x
Nøytral fase acetonutfelling (B&D)	✓	x	x	x
PL-fase acetonutfelling (B&D)	✓	x	x	x
Nøytral fase acetonutfelling (mod.Folch)	✓	✓	✓	✓
PL-fase acetonutfelling (mod.Folch)	✓	✓	✓	✓
Nøytral fase acetonutfelling (EtOH)	✓	✓	✓	✓
PL-fase acetonutfelling (EtOH)	✓	✓	✓	✓

Lipidekstrakt ble avdampet med tilførsel av N₂, og løst i isooktan slik at løsningen fikk en konsentrasjon på 1 mg/ml. Løsningen ble overført til HPLC-rør ved hjelp av 1 ml sprøyte. Løsningen ble deretter analysert med en HPLC-metode basert på Homan og Anderson [53], Lu et.al. [54] og Xiao et.al [55]. Analysen ble utført på Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, USA) koblet til Corona Ultra Charged Aerosol Detector (CAD) (ESA/Thermo Scientific/Dionex, USA). Løsningen ble separert på en LiChrosphere 100, 5

µm diolkolonne, 4 x 125 mm (Merck), med en kolonnetemperatur på 45 °C. Det ble brukt gradienteluering bestående av tre løsningsmidler; A = isooktan, B = aceton/diklormetan (1:2), C = isopropanol/metanol/eddiksyre-etanolamin-vann (7,5 mM etanolamin og 7,5 mM eddiksyre) (85:7,5:7,5). Gradientprofilen finnes i vedlegg F. Kromatogrammene ble behandlet i programvaren ChemStation.

2.7 Analyse av fettsyresammensetning: GC-FID

Lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina* ble analysert med GC-FID for å bestemme fettsyresammensetning. Prøvene som ble analysert med GC-FID er presentert i tabell 7. Prøvene som har blitt analysert er merket med "✓", mens prøvene som ikke er analysert er merket med "x".

Tabell 7: Oversikt over prøver som er analysert med GC-FID.

Lipidekstrakt	Småskala	
	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>
B&D	✓	x
Mod.Folch	✓	✓
EtOH	✓	✓

Først ble lipidekstraktene metylert. Lipidekstraktene ble avdampet på varmeblokk med nitrogentilførsel før det ble veid inn to paralleller av hver prøve på mellom 2 og 8 mg fett, i Kimaxrør. 1 ml NaOH (0,5 M) løst i metanol ble tilsatt hvert rør, som ble ristet og satt på varmeblokk i 15 minutter ved 100 °C. Prøvene ble avkjølt og deretter tilsatt 2 ml BF₃-metanol, og satt på varmeblokk i 5 minutter ved 100 °C. Løsningene ble avkjølt, tilsatt 1 ml heksan, og satt på varmeblokk i 1 minutt ved 100 °C. Løsningene ble avkjølt igjen, og tilsatt 1 ml heksan og 2 ml mettet saltløsning. Løsningene ble ristet og sentrifugert (Universal 16A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) i 3 minutter ved 1358 g. Toppfasen ble overført til et nytt Kimaxrør, og resten av løsningen ble tilsatt 1 ml heksan. Prøvene ble sentrifugert igjen i 3 minutter ved 1358 g. Toppfasen ble overført til samme Kimaxrør som tidligere, og resten av løsningen ble tilsatt 2 ml heksan. Prøvene ble sentrifugert for siste gang i 3 minutter ved 1358 G. Toppfasen ble overført til samme Kimaxrør som tidligere, og de oppsamlede heksanfasene ble lagret ved -20 °C.

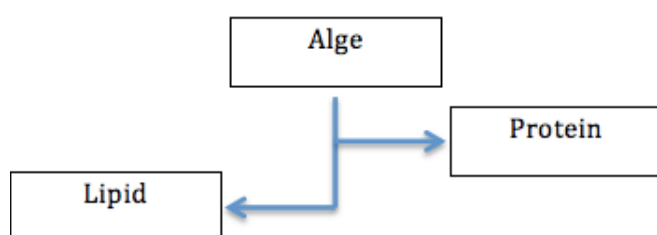
Fettsyremetylesterne ble analysert på Agilent 7890A GC System (Agilent Technologies, USA) koblet til en flammeioniseringsdetektor. Kolonnen som ble brukt var Agilent CP7713

(25 m x 250 µm x 0,2 µm). Injeksjonsvolum var 1,7 µl, injeksjonen var ”pulsed splitless” og hadde en temperatur på 250 °C. Nitrogen ble brukt som bæregass, og strømmingen var på 1,5 ml/min. Følgende temperaturprogram ble brukt: starttemperatur på 80 °C ble holdt i 1 minutt, deretter økte temperaturen med 25 °C/min til 180 °C, og denne temperaturen ble holdt i 8 minutter. Temperaturen økte så med 2,5 °C/min til 205 °C, som ble holdt i 2 minutter, etterfulgt av en økning med 2,5 °C/min til 215 °C, som ble holdt i 5 minutter. Detektortemperaturen var på 250 °C. Kromatogrammene ble behandlet i programvaren EZChrom. Toppene i kromatogrammene ble sammenlignet med standardblandinger (68D, 79 og 411) fra NuChecPrep. GC-analysen ble utført av Merethe Selnes.

2.8 Hydrolyse av proteiner

Det ble videre utført proteinhydrolyse av biomasse fra *Chlorella* både før og etter etanolekstraksjon for å sammenligne utbyttet av protein samt lipid. Metodene er beskrevet i denne rekkefølgen.

2.8.1 Hydrolyse av biomasse før lipidekstraksjon



Figur 8: Skjematisk fremstilling av proteinhydrolyse før etanolekstraksjon.

Proteinhydrolyse av biomasse før lipidekstraksjon er illustrert i figur 8, og ble utført på fem ulike prøver à to paralleller. Det som skiller hver av prøvene fra hverandre er presentert nedenfor i tabell 8. Tilsetning/behandling som er utført er merket med ”✓”, mens det som ikke er utført er merket med ”x”.

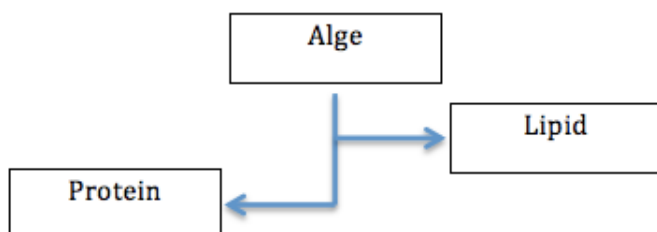
Tabell 8: Oversikt over hva som karakteriserer hver av prøvene til proteinhydrolyse før ekstraksjon.

Prøve	Alge	Vann	Enzym	Ultralyd	Inaktivering	Hydrolyse
Nullprøve 1	✓	✓	x	x	x	x
Nullprøve 2	✓	✓	x	x	✓	x
Kontroll	✓	✓	x	x	✓	✓
Enzym	✓	✓	✓	x	✓	✓
Ultralyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Det ble veid ut 3 gram alge og 27 gram vann, som ble overført til 50 ml sentrifugerør. Ultralydprøven ble satt i ultralydbad (Sonorex RK 255 S, Bandelin electronic, Berlin, Germany) i 20 minutter (2x10). 0,6 gram Alcalase (2,4 L, 9% enzym, 50% glyserol, 41% vann) ble tilsatt enzym- og ultralydprøven, og deretter ble disse prøvene samt kontrollprøven satt til hydrolyse i rotator (SB3, Stuart, Staffordshire, UK) i 120 minutter ved 50 °C. Prøvene ble oppvarmet til 90 °C i 10 minutter ved hjelp av mikrobølgeovn for å inaktivere enzymet. Dette gjaldt også nullprøve 2. Alle prøvene ble deretter sentrifugert (3K-2, Sigma, Germany) i 10 min ved 3913 g og en temperatur på 20 °C. Den oppnådde vannfasen ble dekantert over i et nytt 50 ml sentrifugerør, og vannfasen samt bunnfallet ble veid og notert. 2x2 g av hver vannfase og 2x0,5 g av hver faste fase ble overført til forhåndsveide dramsglass og digler. Disse ble satt til tørking ved 105 °C i 18-24 timer. Dramsglassene og diglene ble tatt ut og avkjølt i eksikator i 1 time, og deretter veid igjen for å bestemme tørrstoffmengde. Alle sentrifugerør med vannfaser og bunnfall ble lagret ved -80 °C. Rådata finnes i vedlegg H.

Sedimentene fra proteinhydrolysen ble frysetørket, og deretter ble det utført etanolekstraksjon på biomassen, som beskrevet i delkapittel 2.4.3, på to paralleller à 1 g. Rådata for dette finnes i vedlegg H.

2.8.2 Hydrolyse av biomasse etter lipidekstraksjon



Figur 9: Skjematisk fremstilling av lipidekstraksjon før proteinhydrolyse.

Det ble ekstrahert lipid fra 5 gram *Chlorella* som beskrevet i delkapittel 2.4.3. Sedimentene som var igjen fra etanolekstraksjonen ble frysetørket og det ble utført proteinhydrolyse som vist i figur 9. Proteinhydrolysen ble utført som beskrevet i delkapittel 2.8.1, men det ble kun laget én prøve à to paralleller, tilsvarende enzymprøven i tabell 8. Sentrifugerørene med hydrolysater og sedimenter ble lagret ved -80 °C. Rådata finnes i vedlegg H.

2.8.3 Måling av proteininnhold

Proteininnholdet i hydrolysatene ble forsøkt målt spektrofotometrisk (UV mini 1240, Shimadzu) ved 260 og 280 nm. Det ble brukt kvartskyvette. Hydrolysatene fra hydrolyse før lipidekstraksjon ble frysetørket og nitrogeninnholdet ble bestemt med CN-analyse av Marte Schei. Instrumentet som ble brukt var Elemental Combustion System 4010 (Costech Analytical Technologies, USA). Dette skulle også bli gjort på enzymhydrolysatet fra ekstraksjon før hydrolyse, men CN-apparatet ble dessverre ødelagt.

2.8.4 Måling av askeinnhold

Det ble målt askeinnhold i tørkede sedimenter og hydrolysater, både fra hydrolyse av biomasse før og etter etanolekstraksjon. Det ble også målt aske i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver. Prøver av sediment, hydrolysat og pulver ble veid inn i porselensdigler, som ble forasket ved 550 °C over natten, avkjølt i eksikator og veid neste dag. Rådata for dette finnes i vedlegg H.

2.9 Statistisk analyse

Usikkerheten i resultatene er oppgitt som standardavvik. Antall paralleller som er benyttet står i figurtekster. Standardavvikene er presentert som feilskranker i figurer. Det er beregnet statistisk signifikans med signifikansnivå $p < 0,05$ hvis ikke annet er oppgitt. All statistikk er utført i Microsoft Excel.

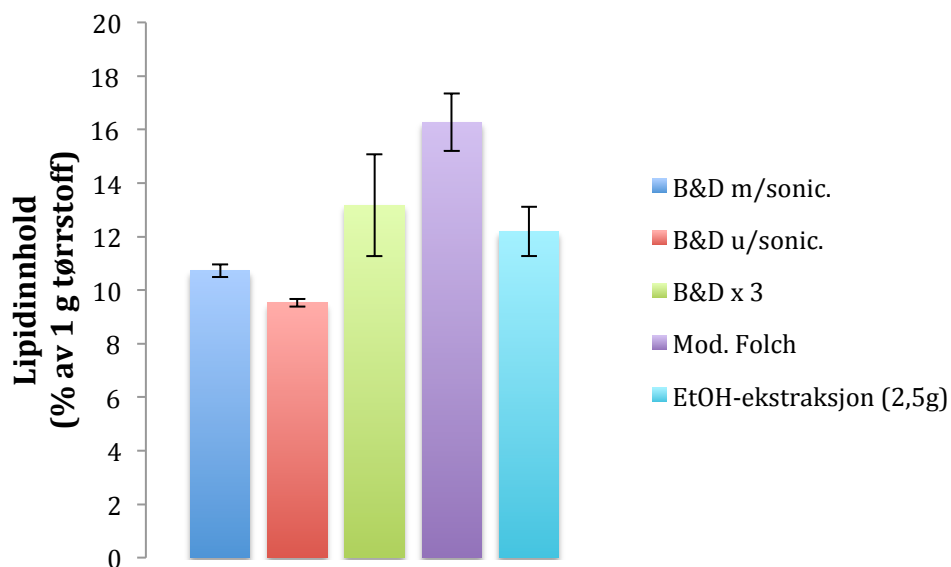
3 Resultat og diskusjon

Lipider og proteiner har vist seg å være verdifulle komponenter i mikroalger. Det er viktig å finne gode nok metoder for å utvinne disse komponentene slik at de kan brukes til passende formål, som i farmasøytiske produkter, til humant konsum, i dyrefôr eller som energikilde. Ekstraksjons- og isoleringsmetoder for lipid, samt ulike analysemetoder er derfor testet ut på mikroalgene *Chlorella* og *Spirulina*. Proteiner er forsøkt hydrolysert fra *Chlorella*.

3.1 Bestemmelse av totalt lipidinnhold

3.1.1 *Chlorella* (liten skala)

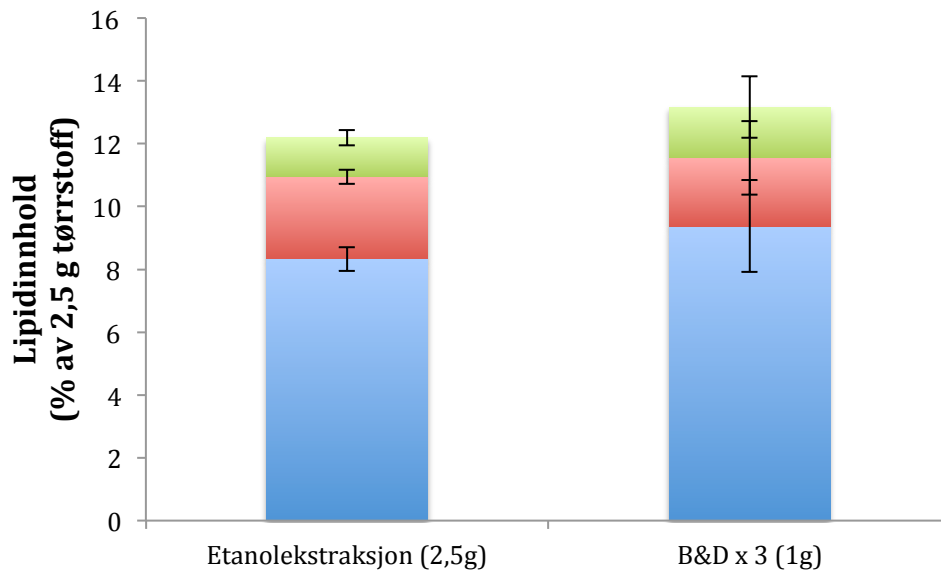
Fem lipidekstraksjonsmetoder ble testet ut på *Chlorella*. Det ble brukt 1 gram tørrstoff, bortsett fra i etanolekstraksjon, der det ble brukt 2,5 gram. Resultatene fra ekstraksjonene er presentert i figur 10.



Figur 10: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*-pulver ekstrahert med fem ulike metoder; B&D med ultralyd (1 fra venstre), B&D uten ultralyd (2 fra venstre), B&D tre ganger etter hverandre (3 fra venstre), modifisert Folch (4 fra venstre) og etanolekstraksjon (5 fra venstre). Det er brukt 1 gram tørrstoff i alle metodene bortsett fra etanolekstraksjon, der 2,5 gram er brukt. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller for 2, 3 og 5, og av seks paralleller for 1 og 4. Standardavviket til 3 og 5 er funnet ved å ta kvadratroten av summen til standardavvikene tilhørende hver ekstraksjon som inngår.

Figur 10 viser at B&D uten bruk av ultralyd ga lavest lipidutbytte ($9,5 \pm 0,1\%$), mens modifisert Folch ga klart høyest utbytte ($16,3 \pm 1,1\%$). Det høye utbyttet kan også skyldes

andre forbindelser som ekstraheres fra tørrstoffet. Modifisert Folch gir derfor ikke nødvendigvis mer fett enn de andre metodene, da en andel av utbyttet kan tilsvare andre forbindelser. B&D med ultralyd ga et utbytte på $10,7 \pm 0,2\%$, mens B&D utført tre ganger etter hverandre ga et utbytte på $13,2 \pm 1,9\%$. Etanolekstraksjon gav et relativt høyt utbytte på $12,2 \pm 0,9\%$. Da etanolekstraksjon og en variant av B&D er utført tre ganger etter hverandre, er utbyttene fra hver ekstraksjon presentert i figur 11.



Figur 11: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*-pulver ekstrahert med etanol og B&D. De stablede søylene viser utbyttet for hver av de tre ekstraksjonene som inngår i metodene. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 11 viser at det samlede lipidutbyttet øker signifikant, fra ca. 8 til 12% etter andre og tredje ekstraksjon når det gjelder etanolekstraksjon. Det er altså en økning på 50% av førstegangsekstraksjonen. I B&D øker utbyttet fra ca. 9 til 13% fra første til tredje ekstraksjon. Dette viser at det kan være av stor viktighet å utføre ekstraksjon tre ganger for å utvinne så mye lipid fra mikroalger som mulig. Leigh et.al. [35] har også benyttet seg av etanolekstraksjon tre ganger etter hverandre for å ekstrahere lipider. Her var forholdet mellom etanol og lodderognpulver 5:1, 3:1 og 2:1 i de tre ekstraksjonene, og utbyttet av lipid etter tre ekstraksjoner var på ca. 20%. Forholdet i denne studien var 20:1, 12:1 og 8:1 mellom etanol og *Chlorella*-pulver.

3.1.2 Effekt av ultralyd

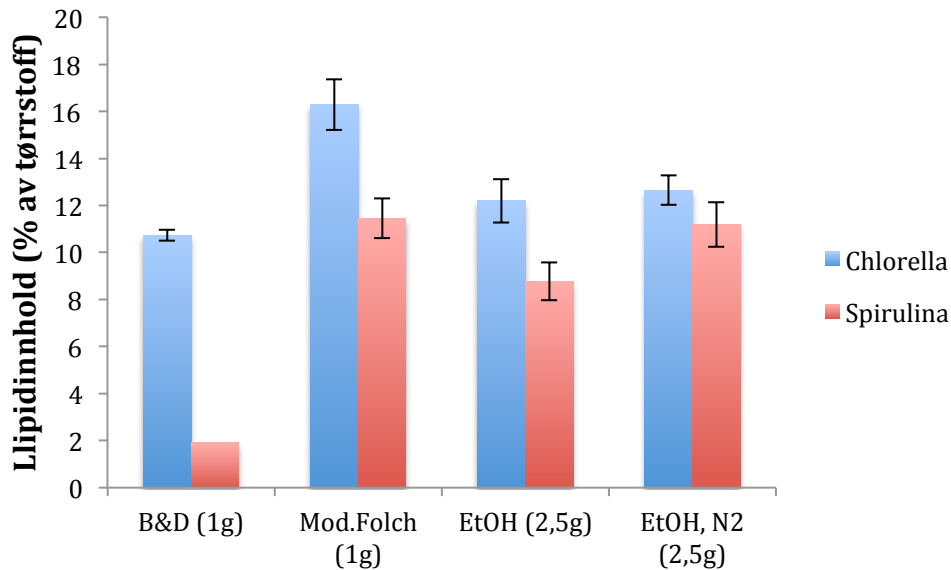
Bruk av ultralyd som mekanisk celleødeleggelsesmetode viser seg å fungere, da utbyttet fra B&D med ultralyd øker med i overkant av 1% sammenlignet med utbyttet fra B&D uten ultralyd (se figur 10 i delkapittel 3.1.1). Forskjellen er statistisk signifikant, noe som viser at ultralyd har en positiv innvirkning på lipidutbyttet. Ultralyd er også brukt i modifisert Folch og etanolekstraksjon. Flere studier har sett på hvordan ultralyd påvirker lipidutbyttet fra *Chlorella*.

Dos Santos et.al. [56] fant at Folch-metoden med bruk av ultralyd ga høyest lipidutbytte (ca. 19%), noe som også stemmer med resultatene i dette forsøket. En tidligere student ved Sintef Fiskeri og havbruk (SFH)/NTNU, Danilo Macri (upubliserede data), fant at B&D og Folch uten ultralyd ga lavest lipidutbytte (ca. 11%), mens Folch med ultralyd ga et utbytte på ca. 14%. Disse resultatene er med på å underbygge effekten av ultralydassistert ekstraksjon. Selv om ikke tallene fra ulike studier stemmer helt overens, da forholdet mellom tørrstoff og løsemiddel varierer mellom studiene, viser resultatene samme trend. Folch og modifiserte utgaver av denne metoden gir stort sett høyest lipidutbytte sammenlignet med andre metoder, og bruk av ultralyd gir høyere utbytte enn om det ikke blir brukt ultralyd. Det skal også nevnes at dyrking og høsting av mikroalger kan gjøres på mange måter, og er med på å påvirke sammensetningen og innholdet av næringsstoffer. Dette resulterer i ulike lipidutbytter. I denne studien er det brukt kommersielle mikroalger med ukjent dyrkings- og høstingsteknikk. I studien av dos Santos et.al. [56] er mikroalgene dyrket i et sterilt kulturmedium, høstet ved sentrifugering og deretter frysetørket.

Selv om B&D-metoden med tre påfølgende ekstraksjoner ga et høyere utbytte enn B&D utført én gang, ble sistnevnte metode valgt å bruke videre i studien. Denne metoden var enklere å utføre og tok kortere tid enn å gjøre ekstraksjonen tre ganger etter hverandre. I tillegg brukes det mindre mengder kloroform, og metoden er svært mye brukt. De to andre metodene som ble valgt å bruke videre til ekstraksjon av lipid fra *Spirulina* var modifisert Folch og etanolekstraksjon. Modifisert Folch ga klart høyest lipidutbytte, og brukes i hovedsak for å bestemme total mengde lipider. Etanolekstraksjon er sett på som en mer miljøvennlig metode, da bruk av store mengder kloroform unngås. Metoden er fremtidsrettet i den forstand at den kan brukes til å ekstrahere fett som etterpå eksempelvis kan brukes til human konsum. I tillegg ga etanolekstraksjon et relativt høyt utbytte på $12,2 \pm 0,9\%$.

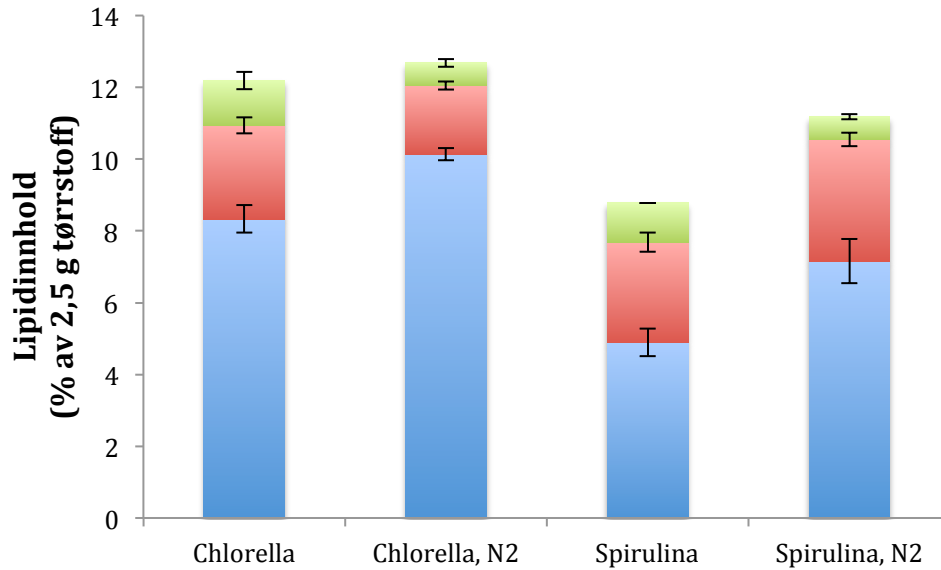
3.1.3 *Spirulina* (liten skala)

B&D med ultralyd, modifisert Folch og etanolekstraksjon ble testet ut på *Spirulina*. I tillegg ble en algeknusingsmetode testet på *Spirulina*, og senere på *Chlorella*. Her ble algene forsøkt knust med flytende nitrogen før etanolekstraksjon ble utført. Resultatene fra ekstraksjonsmetodene utført på *Spirulina* er presentert i figur 12.



Figur 12: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver ekstrahert med ulike metoder; B&D (1+2 fra venstre), modifisert Folch (3+4 fra venstre), etanolekstraksjon (5+6 fra venstre) og etanolekstraksjon med N₂-knusing (7+8 fra venstre). De blå søylene tilsvare *Chlorella*, mens de røde søylene tilsvare *Spirulina*. Det er brukt 1 gram tørrstoff i B&D og modifisert Folch, mens det er brukt 2,5 gram tørrstoff i begge etanolekstraksjonsvariantene. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller for 4, 5, 6, 7 og 8, og av seks paralleller for 1 og 3. Standardavviket til etanolekstraksjonene er funnet ved å ta kvadratroten av summen til standardavvikene tilhørende hver ekstraksjon som inngår.

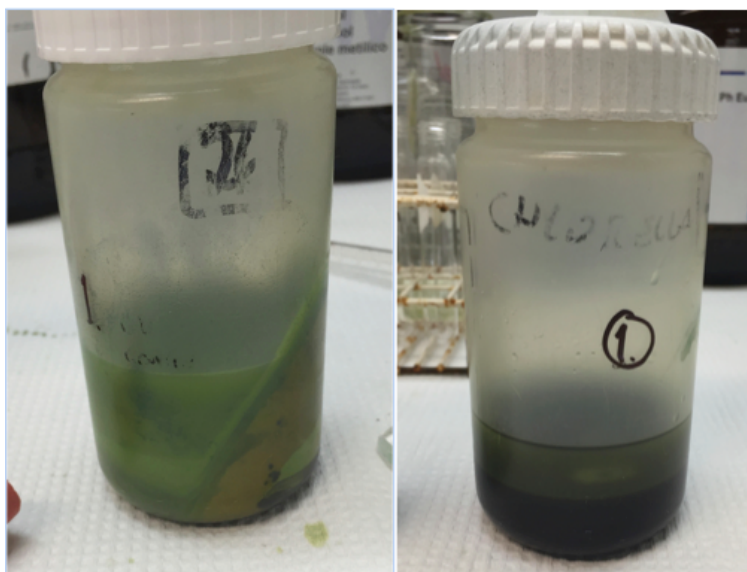
Figur 12 viser at lipidutbyttene jevnt over er høyere for *Chlorella* enn *Spirulina*. Når det gjelder modifisert Folch er verdiene henholdsvis $16,3 \pm 1,1\%$ og $11,5 \pm 0,8\%$. Etanolekstraksjon gir utbytter på henholdsvis $12,2 \pm 0,9\%$ og $8,8 \pm 0,8\%$. Forskjellene mellom modifisert Folch og etanolekstraksjon for *Chlorella* og *Spirulina* er signifikante. Utbyttet fra hver etanolekstraksjon, med og uten algeknusing med flytende N₂, er vist i figur 13.



Figur 13: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver ekstrahert med etanol og etanol med N₂-knusing. De stablede søylene viser utbyttet for hver av de tre ekstraksjonene som inngår i metodene. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figuren viser samme trend som figur 2, nemlig at lipidutbyttet øker betraktelig etter andre og tredje ekstraksjon, og at det derfor er nødvendig å ekstrahere med etanol tre ganger etter hverandre.

B&D viste seg vanskelig å utføre på *Spirulina*. Det ble ikke dannet noe tydelig tofasesystem, noe som gjorde det vanskelig å skille fasene fra hverandre. Emulsjoner kan ha oppstått, eller andre forbindelser som er spesielle for *Spirulina* kan ha påvirket ekstraksjonen. Dette ble derimot ikke undersøkt videre, men resultatet bidro til at modifisert Folch og etanolekstraksjon ble valgt å bruke videre til ekstraksjon i større skala. For å illustrere forskjellen mellom tofasesystemet i modifisert Folch og B&D for *Spirulina*, er bilder tatt etter sentrifugering vist i figur 14.



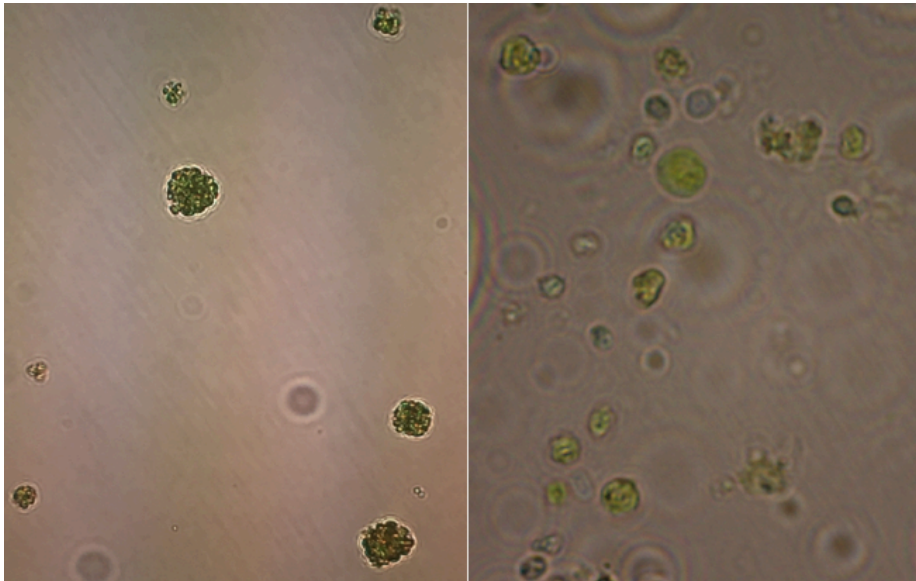
Figur 14: Sammenligning av tofasesystem hos *Spirulina* i B&D og modifisert Folch, etter sentrifugering. Koppene til venstre viser B&D, mens koppene til høyre viser modifisert Folch.

Trenden som viser at *Chlorella* gir høyere lipidutbytte enn *Spirulina* stemmer godt overens med teori og resultater fra tidligere studier. *S. platensis* har et lavere innhold av lipider enn *C. vulgaris* [9] (se tabell 1 i delkapittel 1.3.1). Selv om B&D ikke fungerte på *Spirulina* i denne studien, fant imidlertid Sajilata et.al. [57] at lipidutbyttet var 8,7% med B&D. En tidligere student ved SFH/NTNU, Danilo Macri (upubliserte data), fant at lipidutbyttet var 7% med B&D og ca. 9% med Folch med ultralyd. For *Chlorella* var utbyttene, som nevnt, henholdsvis 11 og 14%. Også her er det viktig å merke seg at dyrkings- og høstingsmetoder kan påvirke lipidutbyttet, og at sammenligningen mellom ulike studier kun er relativ. I studien av Sajilata et.al. [57] ble mikroalgene dyrket i et kulturmedium, høstet ved filtrering og deretter frysetørket.

3.1.4 Effekt av algeknusing med flytende nitrogen

Det viste seg at algeknusing med flytende nitrogen ga litt høyere lipidutbytte, både når det gjaldt *Chlorella* og *Spirulina*. Det var ingen signifikant økning for *Chlorella*, med lipidutbytter på $12,2 \pm 0,9\%$ og $12,7 \pm 0,6\%$ før og etter algeknusingen. For *Spirulina* økte utbyttet fra $8,8 \pm 0,8\%$ til $11,2 \pm 0,9\%$. Det er vanskelig å si hvorfor forskjellene er så store for *Spirulina*, men så små for *Chlorella*. Det er ikke signifikant forskjell mellom utbyttene med og uten flytende N₂-knusing for *Chlorella*, mens forskjellene er på grensen til å være signifikante (t-verdi = 1,93) for *Spirulina*. *Chlorella*-pulveret ble studert i mikroskop før og

etter algeknusing med N₂, for å se om og eventuelt hvor stor andel av cellene som var knust. Dette er vist i figur 15.

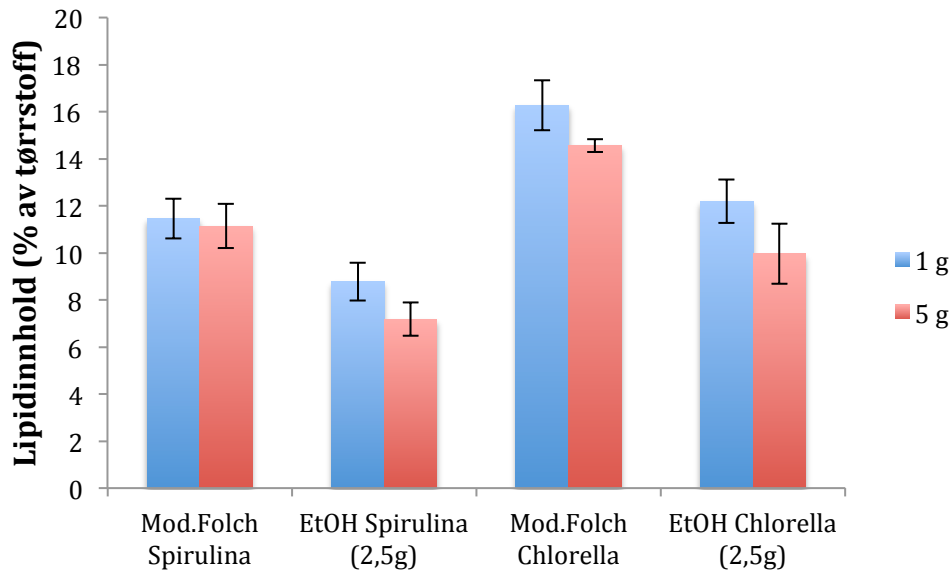


Figur 15: *Chlorella*-pulver sett i mikroskop før og etter knusing med flytende nitrogen. Venstre del av bildet viser celler før algeknusing, og høyre del av bildet viser celler etter algeknusing.

Det så ut til at noen av cellene hadde blitt knust, men ikke fullstendig. Dette hadde uansett svært liten innvirkning på ekstraksjonsresultatet. Selv om bruk av flytende nitrogen til algeknusing ga et høyere lipidutbytte, men så vidt ikke signifikant forskjell på signifikansnivå 5% (t -verdi = 1,93), når det gjaldt *Spirulina*, ble det valgt å ikke bruke denne algeknusingsmetoden videre i oppgaven.

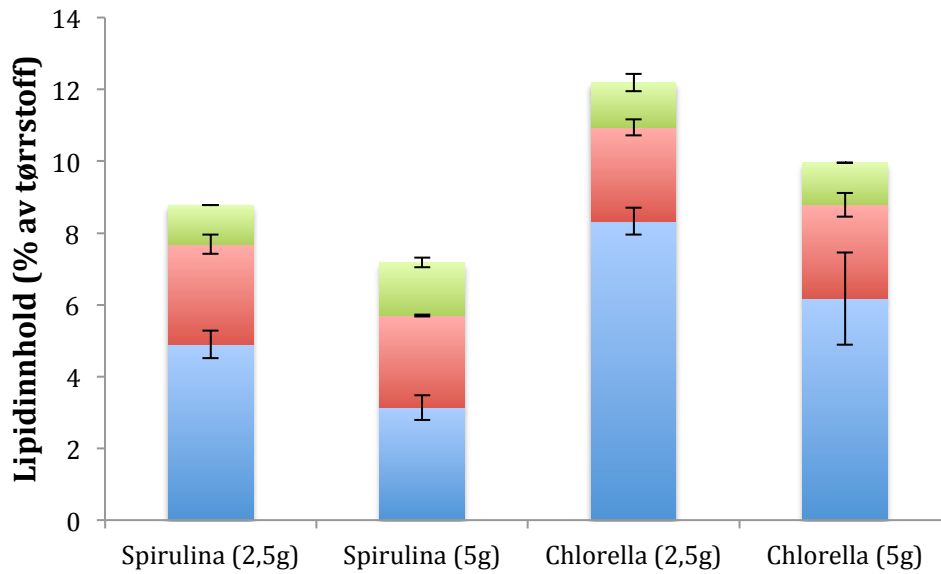
3.1.5 Oppskalering av tørrstoffmengde

Modifisert Folch og etanolekstraksjon ble valgt å benyttes til ekstraksjon i større skala. Det ble brukt 5 gram tørrstoff i begge metoder. Resultater fra ekstraksjon i større skala er presentert sammen med resultatene fra småskalaekstraksjon i figur 16, for å tydeliggjøre de eventuelle forskjellene.



Figur 16: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver ekstrahert med ulike metoder i liten og større skala. Metodene er modifisert Folch og etanolekstraksjon. De blå søylene tilsvarer ekstraksjon i liten skala, mens de røde søylene tilsvarer ekstraksjon i større skala. I liten skala er det brukt 1 gram tørrstoff i modifisert Folch og 2,5 gram tørrstoff i etanolekstraksjon, mens i større skala er det brukt 5 gram tørrstoff i begge metodene. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller for alle bortsett fra mod. Folch, *Chlorella*. Standardavviket til etanolekstraksjonene er funnet ved å ta kvadratroten av summen til standardavvikene tilhørende hver ekstraksjon som inngår.

Figur 16 viser at lipidutbyttet minker med ekstraksjon i større skala, både for *Chlorella* og *Spirulina*. For *Spirulina* ekstrahert med modifisert Folch minker utbyttet svært lite, og går fra $11,5 \pm 0,8\%$ til $11,1 \pm 0,9\%$. For etanolekstraksjon på *Spirulina* og *Chlorella* samt modifisert Folch på *Chlorella* minker utbyttet henholdsvis fra ca. 9 til 7%, 12 til 10% og 16 til 14%. Forskjellene mellom utbyttene i større og mindre skala er ikke statistisk signifikante for noen av mikroalgene. Selv om utbyttet minker med oppskalering av tørrstoffmengden, vil lipidene være mer konsentrert og det vil ekstraheres en større mengde lipid. Selv om tørrstoffmengden øker noe, er løsemiddelmengden brukt i ekstraksjonene konstant. Dersom metodene skal oppskaleres i enda større grad, bør antageligvis løsemiddelmengden også oppskaleres. Forskjellene mellom begge metoder for *Spirulina* og *Chlorella* i større skala er derimot signifikante, slik som forskjellene i liten skala. Dette tyder på at modifisert Folch er en bedre ekstraksjonsmetode enn etanolekstraksjon med tanke på lipidutbytte, og at *Chlorella* generelt inneholder mer lipider enn *Spirulina*, eller at både modifisert Folch og etanolekstraksjon fungerer bedre på *Chlorella* enn *Spirulina*. Utbyttet fra hver etanolekstraksjon er vist i figur 17.



Figur 17: Totalt lipidinnhold i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver ekstrahert med etanol i liten og større skala. De stablede søylene viser utbyttet for hver av de tre ekstraksjonene som inngår i metodene. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 17 viser igjen samme trend som vist tidligere i figur 11 og 13 når det gjelder lipidutbyttet per etanolekstraksjon. Spesielt ekstraksjon fra 5 gram *Spirulina* viser at over halvparten av lipidene utvinnes etter andre og tredje ekstraksjon. Det er også her det totale lipidutbyttet er lavest, noe som tilsier at det er svært nødvendig å ekstrahere fra restene av biomassen etter første ekstraksjon. Da forskjellene i lipidutbyttet mellom liten og større skala er størst etter første runde, kan det diskuteres om etanolmengden i første ekstraksjonsrunde bør økes i større skala, for å få ut enda mer lipid.

3.2 Isolering av fosfolipid

For å fraksjonere lipidekstraktene i nøytrale og polare lipider ble det testet ut to ulike metoder: SPE og acetonutfelling.

3.2.1 SPE (fast-fase-ekstraksjon)

To isoleringsmetoder ble forsøkt på *Chlorella*: først SPE og deretter acetonutfelling. SPE ble kun utført på ekstrakt fra modifisert Folch. Prosentandel lipid i de ulike lipidfraksjonene oppnådd etter SPE er presentert i tabell 9.

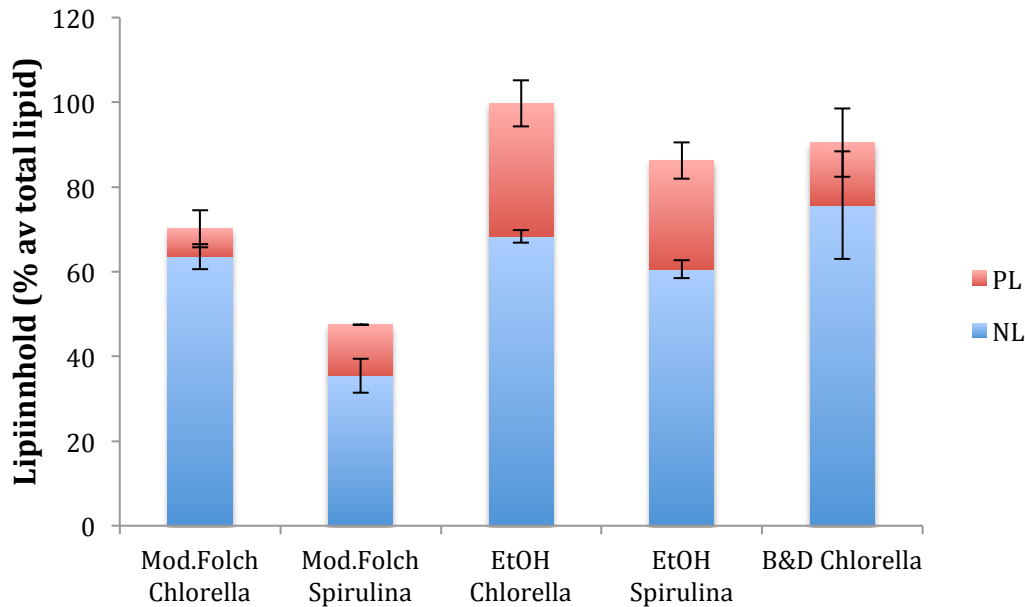
Tabell 9: Totalt lipidinnhold i ulike fraksjoner oppnådd etter fraksjonering av lipidekstrakter fra *Chlorella* ved hjelp av SPE. De tre fraksjonene er nøytrale lipider (NL), glykolipider (GL) og fosfolipider (PL). Usikkerheten er oppgitt som standardavvik av to paralleller.

Metode	Ekstrakt	NL (%)	GL (%)	PL (%)
SPE	Mod.Folch	51,9 ± 1,6	19,2 ± 4,2	12,4 ± 0,9

Hver av fraksjonene ble analysert med HPLC-CAD for å finne fordelingen av lipidklasser. Det viste seg at fosfolipidfraksjonen ikke inneholdt fosfolipider. Se kromatogram i vedlegg F. Derfor ble acetonutfelling valgt å bruke videre i studiet. I tillegg var acetonutfelling enklere å utføre og ga vellykket oppkonsentrering av fosfolipider i fosfolipidfraksjon. Se tabell 10 for HPLC-resultater.

3.2.2 Acetonutfelling

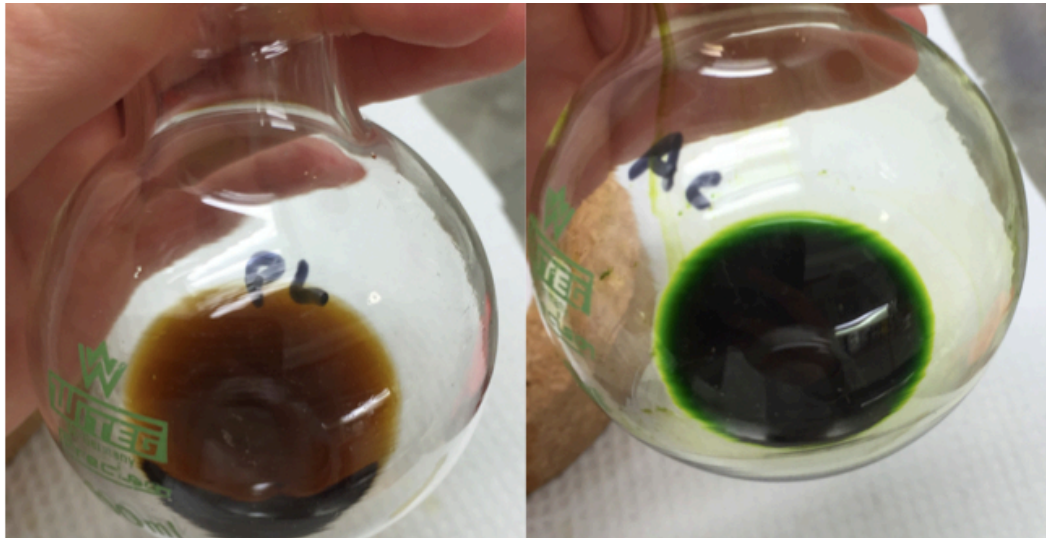
Acetonutfelling ble utført på *Chlorella*-og *Spirulina*-ekstrakt fra etanolekstraksjon og modifisert Folch. Det ble også utført acetonutfelling på B&D-ekstrakt fra *Chlorella*. Lipidutbyttet i de to lipidfraksjonene; nøytrale lipider og fosfolipider, er presentert i figur 18.



Figur 18: Lipidinnhold i de to ulike fraksjonene oppnådd etter acetonutfelling av *Chlorella*- og *Spirulina*-ekstrakter i liten skala. Ekstraktene er fra modifisert Folch, etanolekstraksjon og B&D. Den blå delen av søylene tilsvarer nøytrale lipider og den røde delen av søylene tilsvarer fosfolipider. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 18 viser relativt ulike lipidutbytter etter acetonutfellingen. Felles for ekstraktene er at de inneholder større mengder nøytrale lipider enn polare lipider. Dette stemmer relativt godt overens med litteratur (se tabell 2 i delkapittel 1.3.3). Renheten av de to fraksjonene er videre analysert med HPLC-CAD. De ulike utbyttene kan komme av flere grunner, og da acetonutfelling er en svært manuell metode med flere kilder til unøyaktighet, er det mye som kan påvirke resultatet. Spesielt *Spirulina* ekstrahert med modifisert Folch har et svært lavt lipidutbytte. Det er vanskelig å si eksakt hva dette skyldes, men faktorer som unøyaktig veiing av ekstrakter og Kimaxrør, utilstrekkelig avdamping av kloroform, unøyaktig avlesing av volum samt forhold mellom ekstrakt og kloroform:aceton kan ha påvirket resultatet.

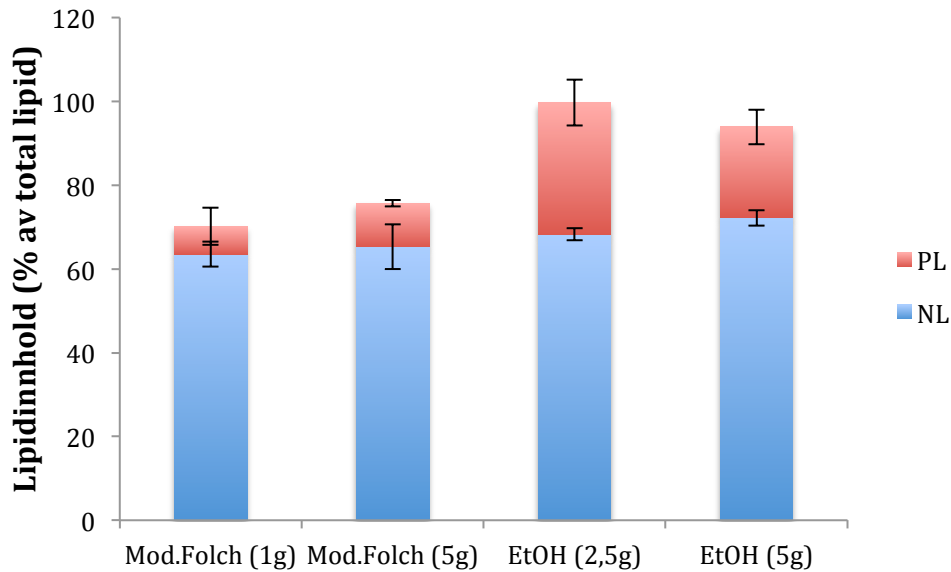
Da den acetonløselige fasen og den uløselige fosfolipidfasen var skilt fra hverandre, og bunnfallet ble løst i kloroform, fikk fasene to ulike farger, når det gjaldt *Spirulina*. Acetonfasen var mørk grønn, mens fosfolipidfasen var brun. Dette kan skyldes at forskjellige pigmenter har ulik løselighet i aceton og kloroform, og at de dermed har fordelt seg i de to fasene og forårsaket fargeendring. Dette gjaldt både modifisert Folch og etanolekstraksjon, i liten- og større skala, og er illustrert i figur 19.



Figur 19: Sammenligning av fosfolipidfraksjon etter tilsatt kloroform (til venstre) og nøytral lipidfraksjon (til høyre) i acetonutfelling av *Spirulina* ekstrahert med etanol i liten skala.

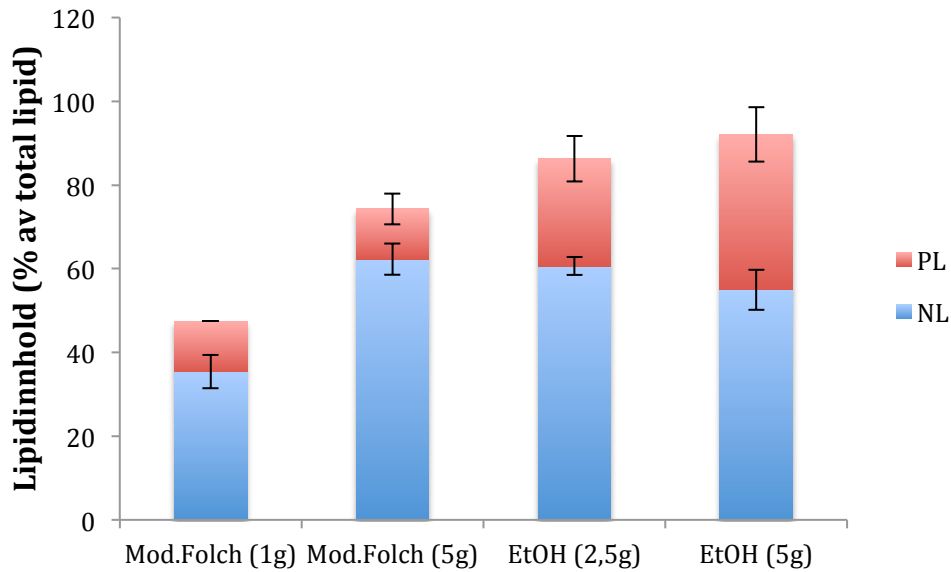
Det ser ut til at acetonutfelling på ekstrakter fra etanolekstraksjon generelt gir høyere utbytte enn acetonutfelling på ekstrakter fra modifisert Folch. Det viser seg at dette ikke nødvendigvis skyldes tilfeldigheter, da det er en signifikant forskjell mellom lipidutbyttene etter acetonutfelling av etanol- og modifisert Folch- ekstrakter, både når det gjelder *Chlorella* og *Spirulina*. I tillegg er det høyere utbytte av fosfolipider i etanolekstraktene. *Chlorella* har også generelt høyere utbytte enn *Spirulina*. Grunnen til at etanolekstrakter og *Chlorella*-ekstrakter gir høyere lipidutbytte etter acetonutfelling kan være løseligheten til ulike forbindelser i ekstraktene. Noen forbindelser kan ha vært vanskelige å løse i aceton og/eller kloroform og kan dermed ha hengt igjen på kanten av røret da acetonfasen ble overført til et nytt rør. I tillegg kan noe av bunnfallet ha fulgt med over i acetonfasen, ikke blitt løst og dermed ikke ha blitt kvantifisert. Det ble spesielt observert litt klumper i acetonfasen fra modifisert Folch-ekstrakter.

Det ble også utført acetonutfelling på modifisert Folch- og etanolekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*, der tørrstoffmengden var oppskalert til 5 gram. Lipidutbyttene i nøytral- og fosfolipidfraksjon etter acetonutfelling for *Chlorella* i større og liten skala er presentert i figur 20. Tilsvarende resultater for *Spirulina* er presentert i figur 21.



Figur 20: Lipidinnhold i de to ulike fraksjonene oppnådd etter acetonutfelling av *Chlorella*-ekstrakter i liten og større skala. Ekstraktene er fra modifisert Folch og etanolekstraksjon. Den blå delen av søylene tilsvarer nøytrale lipider og den røde delen av søylene tilsvarer fosfolipider. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 20 viser at lipidutbyttene er relativt konstante i liten og større skala. Det totale lipidutbyttet fra modifisert Folch-ekstraktet er noe høyere ($75,7 \pm 2,5\%$ mot $70,2 \pm 2,7\%$) etter acetonutfelling av lipidekstrakt i større skala. Med totalt lipidutbytte menes summen av lipidutbyttene i nøytral- og fosfolipidfraksjon. Når det gjelder etanolekstraktet, går lipidutbyttet noe ned etter acetonutfelling i større skala, men det utnyttes likevel godt over 90% av lipidekstraktet ($93,9 \pm 2,5\%$). Forskjellene mellom liten og større skala er ikke signifikante i noen av tilfellene.



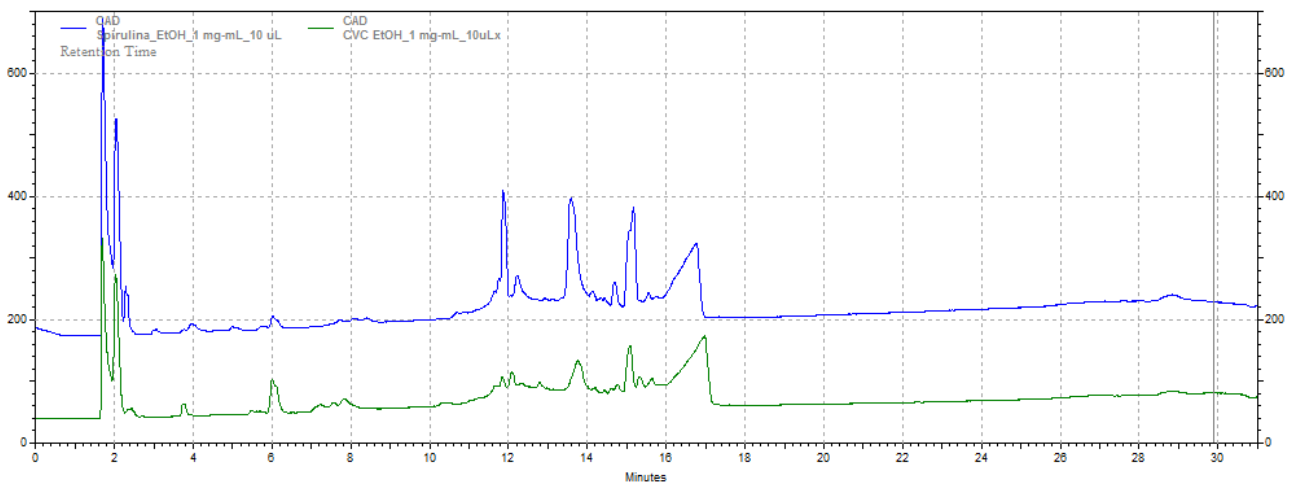
Figur 21: Lipidinnhold i de to ulike fraksjonene oppnådd etter acetonutfelling av *Spirulina*-ekstrakter i liten og større skala. Ekstraktene er fra modifisert Folch og etanolekstraksjon. Den blå delen av søylene tilsvarer nøytrale lipider og den røde delen av søylene tilsvarer fosfolipider. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Det totale lipidutbyttet av de to fraksjonene etter acetonutfelling av modifisert Folch-ekstrakt fra *Spirulina* var svært lavt i liten skala ($47,5 \pm 2,0\%$), men utbyttet øker betraktelig i større skala ($74,3 \pm 2,7\%$). Forskjellene er signifikante, og skyldes sannsynligvis unøyaktighet under utførelsen av acetonutfellingen. Utbyttet øker også etter acetonutfelling av etanolekstrakt i større skala, men ikke fullt så mye. Denne forskjellen er ikke statistisk signifikant. Samme trend gjelder større skala som liten skala, nemlig at det er høyere utbytte etter acetonutfelling av etanolekstrakter, og at det utvinnes større andel fosfolipider i etanolekstraktene. Alle fraksjoner ble analysert med HPLC-CAD (3.3.1), for å finne ut om acetonutfellingen førte til oppkonsentrering av fosfolipider.

3.3 Lipidanalyser

3.3.1 Analyse av lipidklasser: HPLC-CAD

Lipidekstrakter samt fraksjoner fra SPE og acetonutfelling ble analysert med HPLC-CAD. Med denne metoden kunne sammensetningen av lipidklasser studeres og det var mulig å se om fosfolipider hadde blitt oppkonsentrert med acetonutfelling, som var målet med isoleringen. Kromatogrammer fra *Spirulina* og *Chlorella* ekstrahert med etanol i liten skala er presentert i figur 22 for å illustrere kompleksiteten til lipidekstrakter fra mikroalger.



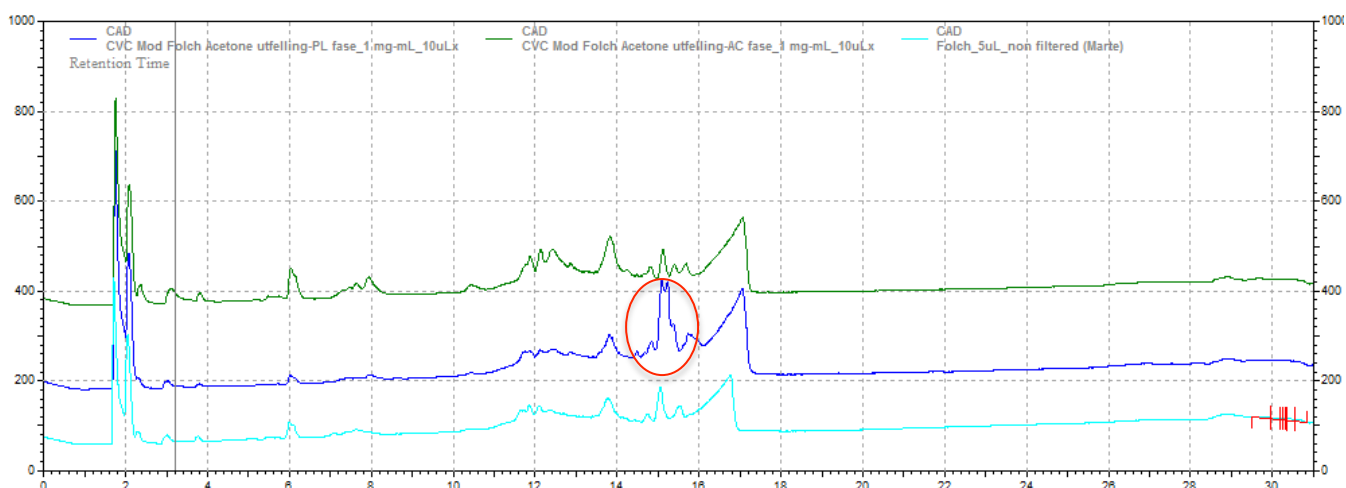
Figur 22 Kromatogram for *Chlorella* og *Spirulina* ekstrahert med etanol. Det grønne kromatogrammet viser *Chlorella*, mens det blå kromatogrammet viser *Spirulina*. Enhet x-akse er minutt, og enhet y-akse er mVolt.

Kromatogrammene viser at det er relativt lite som skiller *Chlorella* fra *Spirulina*, bortsett fra ulik konsentrasjon av toppene og toppen etter 12 minutter hos *Spirulina*. Figur 22 viser hvor kompliserte lipidekstrakter fra mikroalger viser seg å være, da de inneholder svært mange toppene. Det var altså mange lipidforbindelser som ble detektert med denne metoden. Metoden som ble kjørt på HPLC-CAD ligger i vedlegg F. Det er forsøkt å identifisere toppene i henhold til lipidstandarder, men det viste seg å bli vanskelig, da det kun ble kjørt noen standarder og flere av toppene ikke lot seg identifisere med standardene. Det ble kjørt standard med fem lipidklasser, nemlig kolesterolester, TAG, kolesterol, frie fettsyrer og fosfolipider (se vedlegg F). Toppene som var lettest å identifisere var fosfolipidene. Standarder for fosfatidyletanolamin og fosfatidylkolin ligger i vedlegg F. TAG skal være en av forbindelsene som elueres først, men ikke fullt så tidlig som de to høye toppene etter 2 minutter. Dette gjør det vanskelig å identifisere TAG i prøvene, men det kan diskuteres om

TAG likevel befinner seg blant de to tidlige toppene. Samme trend gjelder for alle andre kromatogrammer, både i liten og større skala. Disse finnes i vedlegg F.

Det er svært sannsynlig at noen av de første toppene i kromatogrammet i figur 22 kommer fra pigmenter, som klorofyll a og klorofyll b, da de har samme polaritet som noen av de nøytrale lipidene [58]. Som lipider, ekstraheres også fettløselige pigmenter med organiske løsemidler, og celleødeleggelsesmetoder, som homogenisering og ultralyd, fasiliterer ekstraksjonen av pigmentene [59]. Jones et.al. [58] studerte lipidekstraksjonsmetoder på *Chlorella* og analyserte ekstraktene med HPLC-ELSD/MS. De fant at flere komponenter ble eluert mellom dødtid (T_0) og TAG. Den høyeste av disse toppene ble identifisert som mettet hydrokarbon, mens neste topp ble identifisert som β -karoten. Det kan derfor tenkes at forbindelsene som ble eluert etter ca. to minutter tilsvarer noen av de samme forbindelsene. Kolesterolistere, som vanligvis elueres tidlig, kan også befinne seg blant de første toppene. I dette forsøket har det verken blitt kjørt hydrokarbon- eller pigmentstandarder, men dette er noe som kunne hjulpet med å oppklare kromatogrammene.

Folch-ekstraktene som ble analysert med HPLC i studien av Jones et.al. inneholdt lavere mengder av TAG (mulig vasket bort) enn ekstrakter fra 2-etoksyetanol. Videre fant de at innholdet av TAG og hydrokarbonlignende lipider i mikroalger avhenger betraktelig av vekstforhold. Det har dukket opp flere spørsmål knyttet til hydrokarboner i algeekstrakter. Det er usikkert hvor disse forbindelsene kommer fra og hvordan de lages, men dette vil være interessant å se nærmere på for å få en bredere forståelse av mikroalger og deres bruksområder. Figur 23 viser *Chlorella* ekstrahert med modifisert Folch (lyseblå linje), PL-fase fra acetonutfelling (blå linje) og nøytral fase fra acetonutfelling (grønn linje).



Figur 23: Kromatogram for *Chlorella* ekstrahert med modifisert Folch samt nøytral og polar fase fra acetonutfelling av dette ekstraktet. Det grønne kromatogrammet viser nøytral fase, det blå kromatogrammet viser fosfolipidfase, og det turkise kromatogrammet viser modifisert Folch-ekstraktet. Rød ring markerer fosfolipider. Enhet x-akse er minutt, og enhet y-akse er mVolt.

Figur 23 viser en oppkonsentrering av fosfolipider i PL-fasen etter acetonutfelling (blå linje). Det ser ut som de andre forbindelsene er mindre konsentrert i dette kromatogrammet enn i den nøytrale fasen (grønn linje), da toppene jevnt over er lavere. Dette viser at acetonutfellingen var vellykket, selv om det ikke ble isolert fosfolipider alene. For å oppnå dette er det nødvendig med mer kunnskap om mikroalger og forbindelsene de inneholder, slik at det kan utvikles mer nøyaktige isoleringsmetoder.

Siden det var vanskelig å identifisere alle toppene i kromatogrammene, ble det valgt å beregne den relative prosentandelen av fosfolipider i lipidekstraktene og tilsvarende PL-fraksjoner fra acetonutfelling, for å dokumentere fosfolipidoppkonsentreringen. Siden resten av toppene ikke har blitt identifisert, er det ikke beregnet konsentrasjon av fosfolipidene. Det har blitt tatt utgangspunkt i at fosfolipidene elueres rett før den brede toppen i baselinjen (ved 16 minutter i figur 22 og 23), og dermed består av en klynge med topper. Disse kan tilsvare en rekke fosfolipider, som fosfatidylkolin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, lysosfosfolipider og andre polare forbindelser. Det har kun blitt kjørt standarder for fosfatidylkolin og fosfatidyletanolamin. Prosentandel fosfolipider fra ekstraksjon og isolering i både liten og større skala er presentert i tabell 10. Integrasjonstabellene finnes i vedlegg F.

Tabell 10: Oversikt over prosentandel fosfolipider i lipidekstrakter og fosfolipidfraksjoner etter acetontutfelling for *Chlorella* og *Spirulina*, i liten og større skala. Prosentverdiene er funnet ved integrasjon av toppene i kromatogrammene.

Alge	Metode	Andel fosfolipider (%)			
		Liten skala		Større skala	
		Lipidekstrakt	PL-fraksjon	Lipidekstrakt	PL-fraksjon
<i>Chlorella</i>	B&D	17	20	-	-
	Mod.F	14	21	24	25
	EtOH	14	25	18	30
<i>Spirulina</i>	Mod.F*	39	64	51	59
	EtOH	12	22	21	35

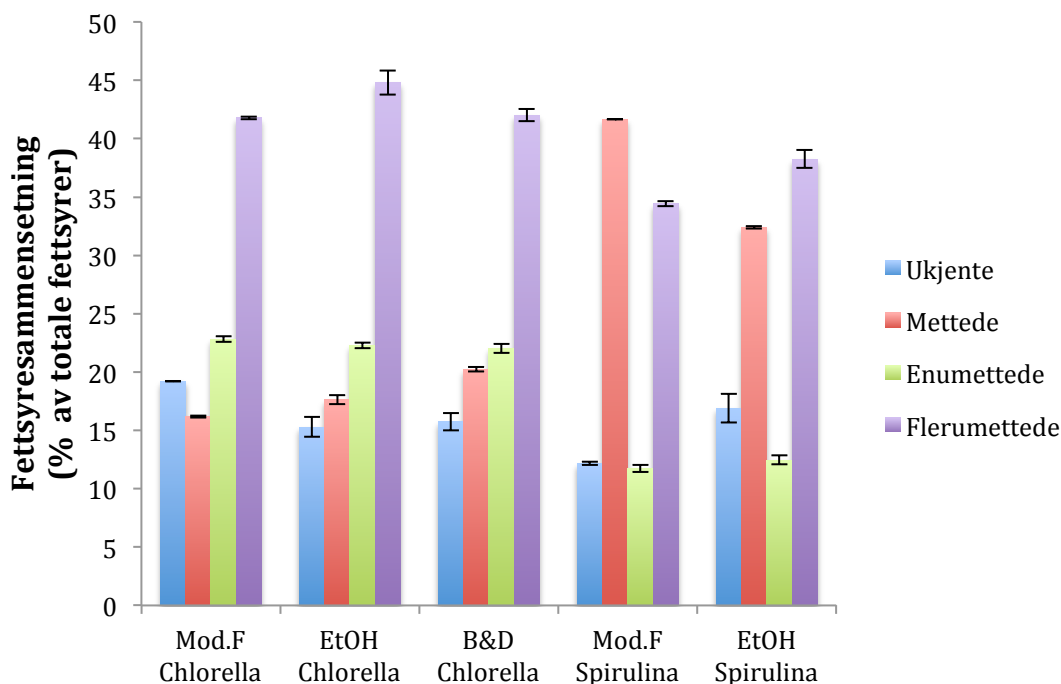
Mod. F er markert med en "*" i tabell 10. Det er fordi prosentandelen fosfolipider ble beregnet fra 8 minutter (liten skala) og 4 minutter (større skala) for *Spirulina* ekstrahert med denne metoden. Grunnen til dette er at det ikke ble observert noen høye toppe i begynnelsen av kromatogrammet til lipidekstraktet, som i alle de andre kromatogrammene. Kromatogrammene finnes i vedlegg F. Her er det tydeligvis noen forbindelser som enten har blitt vasket ut eller ikke blitt detektert.

Tabell 10 viser altså at fosfolipider har blitt oppkonsentrert i alle fosfolipidfraksjoner fra acetontutfelling, i både liten og større skala. Resultater fra B&D liten skala og modifisert Folch større skala (*Chlorella*) skiller seg ut, da oppkonsentreringen er svært liten. Her gikk prosentandelen fosfolipider opp fra henholdsvis 17 til 20% og 24 til 25%. Acetontutfelling som isoleringsmetode virker likevel lovende for oppkonsentrering av fosfolipider fra mikroalger.

Metoden som ble brukt til HPLC-CAD var ikke optimal, da det ikke var god nok separasjon mellom flere av toppene. Dette, i tillegg til en ujevn baselinje (se bred topp etter 16 min i figur 22 og 23), gjør det ekstra vanskelig å identifisere og kvantifisere toppene. Det er usikkert hva den brede toppen skyldes, men alle ledninger samt prekolonne og kolonne ble skiftet ut, uten at dette ga bedre resultat. En annen mulighet er at eddiksyre og etanolamin, som er bestanddeler i løsemiddel C, kan ha reagert og dannet denne toppen. Til videre arbeid bør andre metoder testes ut og flere standarder kjøres, slik at både identifiseringen og kvantifiseringen av forbindelsene blir lettere.

3.3.2 Analyse av fettsyresammensetning: GC-FID

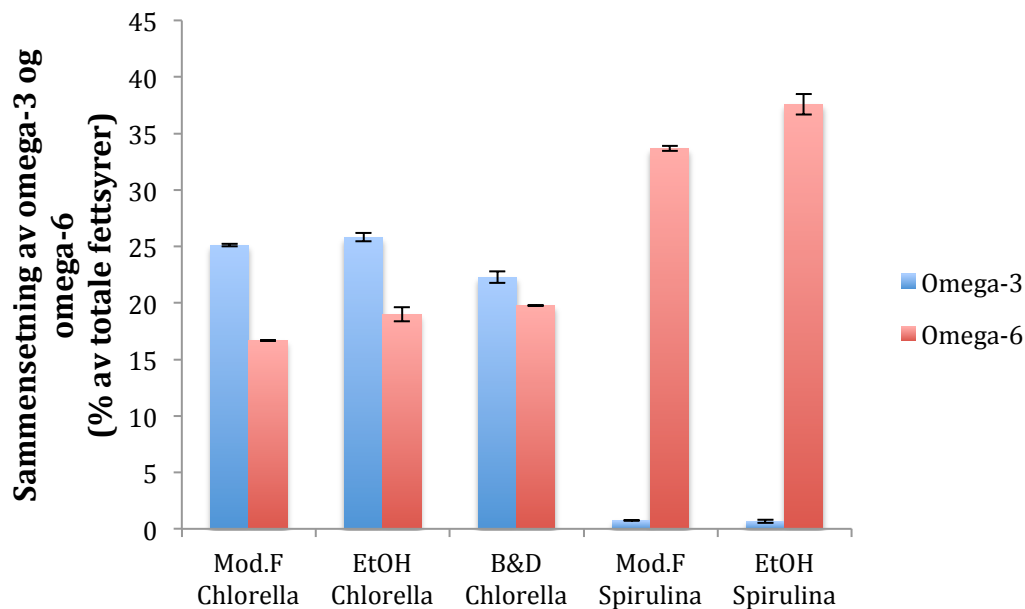
Fettsyresammensetningen i lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina* i liten skala ble analysert. Sammensetningen av mettede og umettede fettsyrer i ekstraktene er presentert i figur 24.



Figur 24: Sammensetning av mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer, samt ukjente fettsyrer, i ekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. *Chlorella*-ekstraktene inkluderer modifisert Folch, etanolekstraksjon og B&D, mens *Spirulina*-ekstraktene inkluderer modifisert Folch og etanolekstraksjon. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Sammensetningen av fettsyrer er relativt lik i de ulike ekstraktene fra *Chlorella*. *Chlorella* inneholder klart flest flerumettede fettsyrer enn både enumettede og mettede fettsyrer. Det er også en andel på mellom 15 og 20% av uidentifiserte fettsyrer i *Chlorella*-ekstraktene. *Spirulina* inneholder også en høy andel flerumettede fettsyrer, men har en omtrent like stor andel mettede fettsyrer. Her er det forskjell mellom de to ekstraktene, da det er større andel mettede enn flerumettede fettsyrer i modifisert Folch-ekstraktet, mens det er større andel flerumettede enn mettede fettsyrer i etanolekstraktet. Forskjellen mellom andelen mettede fettsyrer i de to ekstraktene samt mellom andelen flerumettede fettsyrer er signifikante. Dette viser at ekstraksjonsmetoden har betydning for fettsyresammensetningen til *Spirulina*. I *Spirulina*-ekstraktene ligger den ukjente andelen fettsyrer mellom 12 og 17%. Alle

ekstraktene hadde en andel av flerumettede fettsyrer mellom 34 og 45%. De flerumettede fettsyrene inkluderer omega-3- og omega-6- fettsyrer. Den totale sammensetningen av disse fettsyrene i ekstraktene er presentert i figur 25.



Figur 25: Sammensetning av omega-3- og omega-6- fettsyrer i ekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. *Chlorella*-ekstraktene inkluderer modifisert Folch, etanolekstraksjon og B&D, mens *Spirulina*-ekstraktene inkluderer modifisert Folch og etanolekstraksjon. De blå søylene viser omega-3, mens de røde søylene viser omega-6. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 25 viser at det er stor forskjell mellom innholdet av omega-3- og omega-6-fettsyrer i ekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. *Chlorella* inneholder ca. 25% omega-3, mens *Spirulina* omtrent ikke inneholder noe omega-3. *Spirulina* inneholder derimot en høy andel omega-6 (opptil 38%). *Chlorella* inneholder også omega-6-fettsyrer, men ikke fullt så mye som *Spirulina*. Dette stemmer godt med det som er rapportert i litteraturen, der spesielt *Spirulina* er vist å være en god kilde til omega-6 [19, 57], mens *Chlorella* er en god kilde til omega-3 [1]. Fettsyresammensetningen i mikroalger avhenger imidlertid av faktorer som temperatur og tilgang på lys og næringsstoffer [1]. Sammensetningen av omega-3- og omega-6-fettsyrene i *Chlorella*- og *Spirulina*-ekstraktene er presentert i henholdsvis tabell 11 og 12.

Tabell 11: Sammensetning av omega-3-fettsyrer i ekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. Alle verdier er oppgitt som % av totale fettsyrer. Usikkerheten er oppgitt som standardavvik av to paralleller.

Fettsyrer	Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer				
	Mod.F	EtOH	B&D	Mod.F	EtOH
	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Spirulina</i>
C18:3n3	24,61 ± 0,01	25,3 ± 0,19	21,74 ± 0,35	0,23 ± 0,03	0,30 ± 0,01
C18:4n3	0,15 ± 0,06	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,32 ± 0,25
C20:3n3	0,11 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,07 ± 0,09
C20:4n3	0,03 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	-
C20:5n3	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,01	-
C22:5n3	-	-	0,02 ± 0,03	-	-
C22:6n3	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,08	0,19 ± 0,12	0,13 ± 0,01	-
Sum	25,12 ± 0,11	25,82 ± 0,39	22,28 ± 0,53	0,74 ± 0,02	0,68 ± 0,15

I *Chlorella*-ekstraktene er det omega-3-fettsyren C18:3 (ALA) som dominerer. Det er en svært liten andel av de andre omega-3-fettsyrene (mellom 0,02 og 0,19%) som befinner seg i *Chlorella*. C22:5 befinner seg kun i B&D-ekstraktet, men i en svært liten mengde. *Spirulina* inneholder generelt svært lite omega-3, men det er forskjell mellom fettsyrene som er representert i modifisert Folch- og etanolekstraktet. C20:4, C20:5 og C22:6 befinner seg i modifisert Folch- ekstraktet, men ikke i etanolekstraktet.

Tabell 12: Sammensetning av omega-6-fettsyrer i ekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. Alle verdier er oppgitt som % av totale fettsyrer. Usikkerheten er oppgitt som standardavvik av to paralleller.

Fettsyrer	Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer				
	Mod.F	EtOH	B&D	Mod.F	EtOH
	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Spirulina</i>
C18:2n6	16,39 ± 0,06	18,86 ± 0,64	19,64 ± 0,02	16,38 ± 0,17	12,93 ± 0,18
C18:3n6	0,16 ± 0,01	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,00	16,86 ± 0,06	24,34 ± 0,58
C20:2n6	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,10 ± 0,14
C20:3n6	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,05	-	0,16 ± 0,00	0,20 ± 0,00
C20:4n6	0,03 ± 0,04	-	-	0,08 ± 0,01	-
Sum	16,66 ± 0,00	18,99 ± 0,64	19,76 ± 0,01	33,69 ± 0,23	37,57 ± 0,91

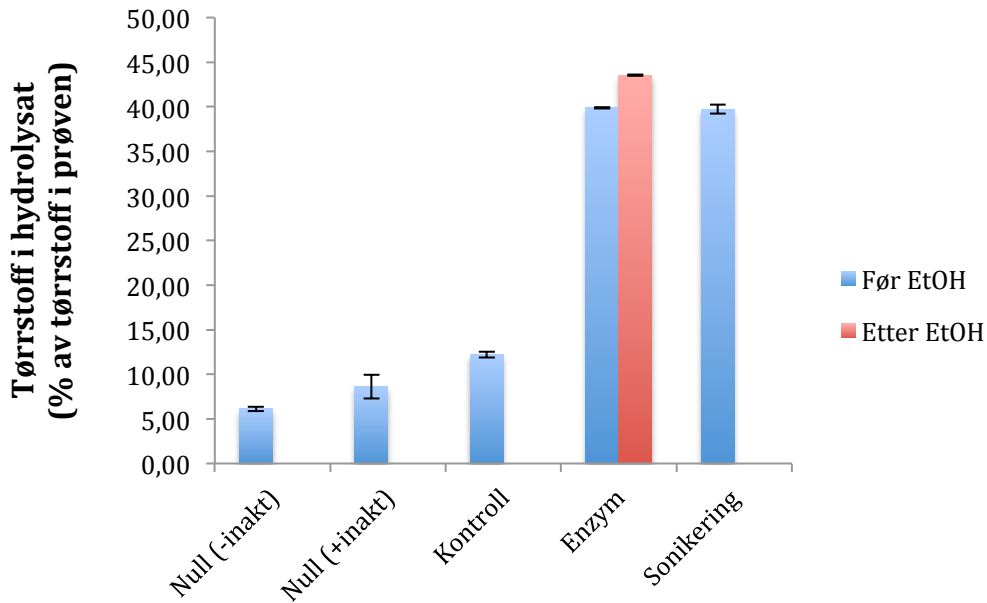
I både *Chlorella*- og *Spirulina*-ekstraktene dominerer omega-6-fettsyren C18:2 (LA). I tillegg utgjør C18:3 (GLA) en stor andel av omega-6-fettsyrene i *Spirulina*-ekstraktene. Det er flere studier som har fått lignende resultater når fettsyresammensetning har blitt analysert. Både Olmstead et.al. [51], dos Santos et.al. [56] og Lee et.al. [60] fant at LA dominerte i *Chlorella*.

Chaiklahan et.al. [19] og Sajilata et.al. [57] fant at LA og GLA utgjorde en stor andel av fettsyrene i *Spirulina*. Av mettede fettsyrer var det C16:0 (palmitinsyre) som dominerte i disse studiene, i både *Chlorella* og *Spirulina*. De samme resultatene kan sees i denne studien.

3.4 Hydrolyse av proteiner

Proteiner er andre verdifulle komponenter i mikroalger som kan være av interesse som ingrediens i dyrefôr eller til humant konsum. Det ble funnet at *Chlorella*-pulver inneholdt ca. 58% protein, 12% lipid og 6% aske i denne studien. Proteininnholdet ble funnet ved hjelp av CN-analyse, og lipidinnholdet som er valgt er fra etanolekstraksjon. Laurens et.al. [61] bestemte den generelle sammensetningen av bestanddelene protein, lipid, karbohydrat og aske i *Chlorella* til å være henholdsvis 38, 10, 18 og 4%. Her ble det brukt flere ulike metoder og de ble utført på tre ulike laboratorier. Det ble ikke målt karbohydratinnhold i denne studien, men det antas at noe av den ukjente andelen komponenter tilsvarer karbohydrater. Resten av biomassen kan blant annet bestå av pigmenter. Både CN-analyse og etanolekstraksjon kan gi unøyaktige resultater. CN-analyse måler alle nitrogeninnholdende forbindelser, og etanolekstraksjon kan ekstrahere andre forbindelser enn lipider, men også ekstrahere for lite lipid. Sammensetningen som er funnet kan fortsatt gi en god indikasjon på hva *Chlorella* består av.

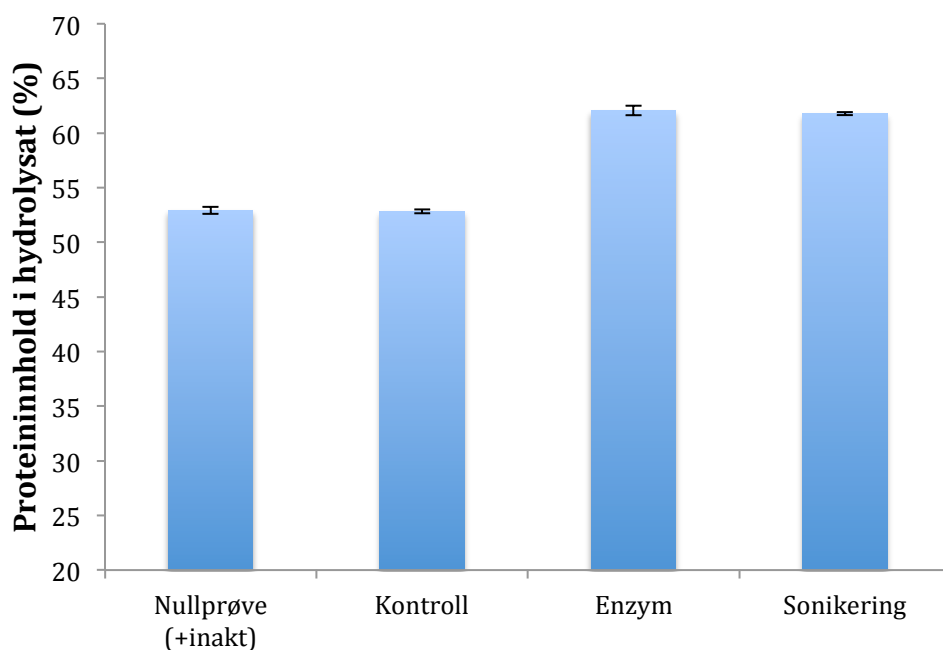
Det ble kjørt proteinhydrolyse på *Chlorella* for å se hvor mye protein det var mulig å utvinne. Dette ble gjort på *Chlorella*-pulver direkte og på frysetørkede sedimenter fra etanolekstraksjon, for å sammenligne utbyttet av protein samt lipid. Prosentandelen av tørrstoffet i prøvene som ble hydrolysert som ble gjenfunnet i vannfasen etter hydrolyse er presentert i figur 26.



Figur 26: Prosentandel av tørrstoff i prøvene som befinner seg i hydrolysat (vannfase). De blå søylene tilsvarer de fem ulike prøvene det ble kjørt proteinhydrolyse på før etanolekstraksjon, mens den røde søylen tilsvarer prøven som ble hydrolysert etter etanolekstraksjon. Tørrstoffmengden er i alle prøvene ca. 3 gram *Chlorella*. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

De blå søylene i figur 26 viser resultater fra hydrolyse før etanolekstraksjon, mens den røde søylen viser resultat fra hydrolyse etter etanolekstraksjon. Logisk nok viser de blå søylene at i nullprøvene samt kontrollprøven er en svært liten andel av biomassen blitt overført til vannfasen. Her er det ikke tilsatt Alcalase. Kontrollprøven ble satt til hydrolyse i to timer, og her kan den overførte andelen av tørrstoff skyldes eventuelle endogene enzymer. I både enzym- og ultralydprøven er i underkant av 40% av tørrstoffet blitt overført til vannfasen. Det er en liten, men ikke signifikant forskjell. Dette viser at ultralyd hadde svært lite å si for hydrolyseresultatet.

Enzymprøvene inneholdt Alcalase, men ble ikke utsatt for ultralyd før hydrolysen. I enzymprøven som ble hydrolysert etter at lipider var ekstrahert fra biomassen er i overkant av 43% av tørrstoffet blitt overført til vannfasen. Dette resultatet er signifikant forskjellig fra enzymprøven som ble hydrolysert før etanolekstraksjon, noe som tyder på at ekstrahering av lipider før proteinhydrolyse har betydning for hydrolysen. Når lipider fjernes fra tørrstoffet, vil proteinene bli mer oppkonsentrert og resultere i høyere utbytte ved hydrolyse. Hvor stor andel av tørrstoff i hydrolysat som var proteiner ble bestemt med CN-analyse, og er presentert i figur 27. Dessverre ble CN-apparatet ødelagt, og nitrogeninnholdet ble derfor ikke målt i enzymhydrolysat fra hydrolyse etter etanolekstraksjon.



Figur 27: Prosentandel protein i hydrolysat fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon, målt med CN-analyse. Det ble målt proteinmengde i fire av de fem prøvene som ble hydrolysert; nullprøve med inaktivering, kontrollprøve, enzymprøve og ultralydprøve. Feilskrankene viser standardavvik av fire paralleller.

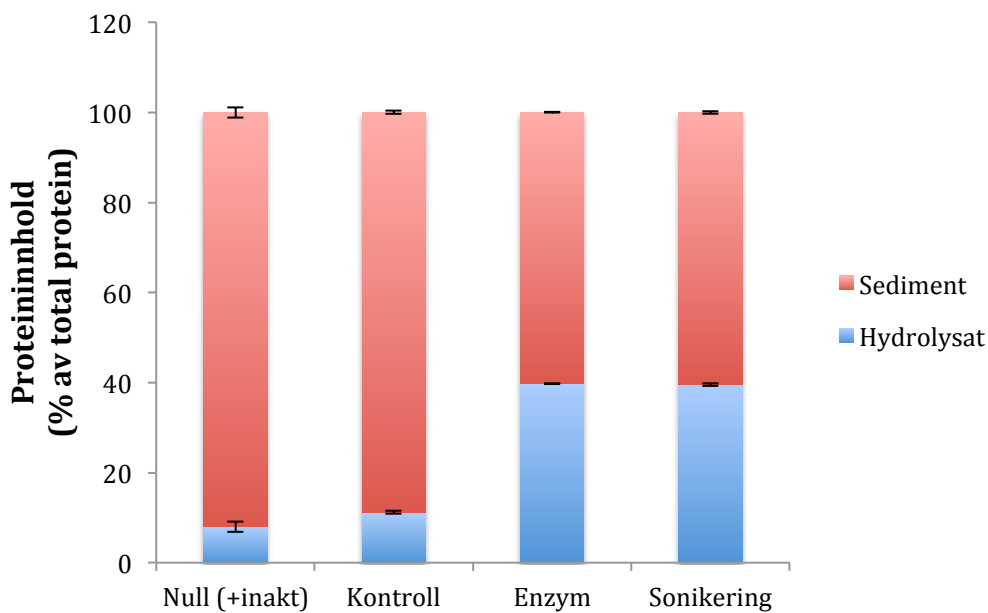
Figur 27 viser at $62,1 \pm 0,4\%$ av tørrstoffet i enzymhydrolysatet tilsvarer proteiner. Massebalansen av proteiner i prøver der biomasse ble hydrolysert før etanolekstraksjon er illustrert i figur 28. Hydrolysat til null- og kontrollprøven inneholder i overkant av 52% proteiner. Det resterende tørrstoffet i hydrolysatene kan være andre forbindelser, som aske, vannløselige karbohydrater og lipider. Andelen aske i hydrolysatene ble målt og er presentert i tabell 13.

Tabell 13: Askeinnhold i hydrolysatprøver fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon. Usikkerheten er oppgitt som standardavvik av to paralleller.

Prøver	Null (+inakt.)	Kontroll	Enzym	Ultralyd
Askeinnhold (%)	$22,44 \pm 0,02$	$21,42 \pm 0,15$	$7,48 \pm 0,05$	$7,56 \pm 0,03$

Askeinnholdet i null- og kontrollprøve er høyere enn i enzym- og ultralydprøve. Legges summen av protein og aske sammen derimot, fås en total andel av disse forbindelsene på ca. 70 til 75%. Det vil si at det gjenstår en ukjent andel av blant annet vannløselige karbohydrater på 25 til 30% i hydrolysatene.

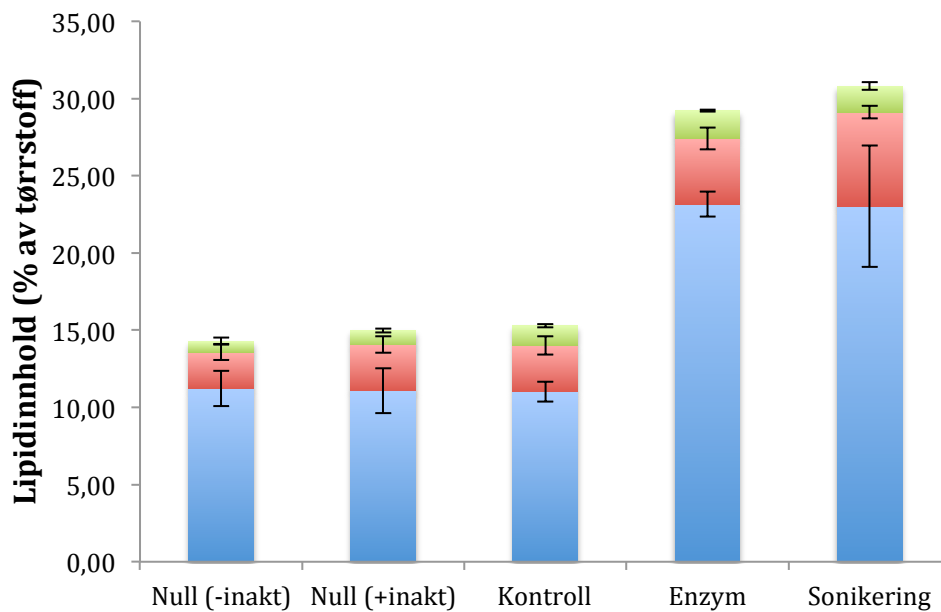
Som nevnt, er det ikke sikkert at CN-analyse er en optimal metode for proteinbestemmelse, og at proteininnholdet dermed kan være både høyere eller lavere enn den målte verdien tilsier. Alle nitrogeninnholdende forbindelser blir målt med denne metoden, også ikke-proteinforbindelser, og den generelle faktoren på 6,25 under beregningene kan være med på å gi unøyaktige resultater. Absorbansmålinger ved 260 og 280 nm ble også forsøkt for å bestemme proteininnhold i hydrolysater, men her dukket det opp flere problemer under beregningene, som førte til at resultatene ikke kunne brukes.



Figur 28: Massebalanse av protein i prøver fra hydrolyse før etanolekstraksjon. Proteininnholdet er målt i *Chlorella*-pulver og i hydrolysaterne, men ikke i sedimentene. Det er tatt hensyn til vanninnhold i *Chlorella*-pulver (6,4%) samt proteininnhold i Alcalase (9%) under beregning av massebalansen. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Figur 28 viser at ca. 40% av proteinene i *Chlorella*-pulveret har blitt hydrolysert, i enzym- og ultralydprøven. Det antas at de resterende proteinene befinner seg i sedimentene. Det er altså ikke alle proteinene som hydrolyseres med denne metoden, men en relativt stor andel. Det kan diskuteres om andre betingelser, som bruk av høyere temperatur (>50 °C) eller bruk av andre enzymer enn Alcalase, kunne ha påvirket hydrolysegraden. Romero García et.al. [15] brukte enzymene Flavourzyme og Alcalase, og fikk en hydrolysegrad på 59% når det ble utført to repetisjoner av hydrolysen. Det var derimot en annen mikroalge, *Scenedesmus almeriensis*, som ble brukt i denne studien.

Morris et.al. [36] brukte proteasene Pancreatin, Pepsin, Trypsin, Papain, Bromelain og en kultur fra *Bacillus subtilis* til å studere påvirkning av etanolekstraksjon på hydrolyse av biomasse fra *Chlorella*. Hydrolysegraden var 10% uten etanolekstraksjon, og gikk opp til 20% da etanol ble brukt til å ekstrahere lipider i forkant av hydrolysen. Proteininnholdet i hydrolysate der etanolekstraksjon ble kjørt i forkant av proteinhydrolyse ble altså ikke målt, men det kan likevel sees en trend i figur 26 og 27. Trenden kan tyde på at jo mer tørrstoff det er i hydrolysate, jo mer protein er det i hydrolysate. Dermed kan det tenkes at hydrolysegraden hadde økt noe dersom proteininnholdet hadde blitt målt i hydrolysate etter etanolekstraksjon, og at disse resultatene viser samme trend som Morris et.al. Økningen i hydrolysegrad kan skyldes at lipofile forbindelser fjernes, og dermed forbedres enzym-substratkontakten [36]. Lipidinnholdet i frysetørkede sedimenter fra proteinhydrolysen ble bestemt ved bruk av etanolekstraksjon. Resultatene er vist i figur 29.



Figur 29: Totalt lipidinnhold i sedimenter fra proteinhydrolyse. Det ble ekstrahert lipid fra 1 gram av sedimentene ved bruk av etanol. De stablede søylene illustrerer det totale lipidinnholdet i hver av de tre ekstraksjonene som inngår i metoden. Feilskrankene viser standardavvik av to paralleller.

Lipidutbyttene i enzym- og ultralydprøvene viser seg å være dobbelt så høye som utbyttene i null- og kontrollprøver. Dette er logisk, da enzym- og ultralydprøvene ble tilsatt Alcalase og satt til hydrolyse. Dermed ble en stor andel proteiner fjernet før ekstraksjonen. Dette fører til oppkonsentrering av lipider i den resterende biomassen. Massebalansen av lipider i prøver der biomasse ble hydrolysert før etanolekstraksjon er illustrert i tabell 14.

Tabell 14: Massebalanse av lipid i prøver fra hydrolyse før etanolekstraksjon. Lipidinnholdet er målt i *Chlorella*-pulver og i sedimentene, men ikke i hydrolysatene. Det er tatt hensyn til vanninnhold i *Chlorella*-pulver (6,4%) under beregning av massebalansen. Usikkerheten er oppgitt som standardavvik av to paralleller.

Prøve	Lipidinnhold (mg)		
	Pulver	Sediment	Hydrolysat
Null (-inakt)	383,7 ± 4,3	378,2 ± 15,3	5,5 ± 19,7
Null (+inakt)	345,3 ± 0,0	311,2 ± 28,2	34,1 ± 28,2
Kontroll	358,1 ± 2,3	369,2 ± 3,4	-
Enzym	372,2 ± 0,9	556,6 ± 18,8	-
Ultralyd	372,1 ± 12,1	555,7 ± 8,9	-

Tabell 11 viser at lipidutbyttet i *Chlorella*-pulver brukt i kontroll-, enzym- og ultralydprøve er lavere enn lipidutbyttet i sedimentene. Derfor har det ikke blitt beregnet hvor stor prosentandel av lipidene i pulveret som befinner seg i sedimentene, og det er ikke mulig å si noe om hvor mye lipid som befinner seg i hydrolysatene. Spesielt enzym- og ultralydprøven, som inneholdt Alcalase og ble hydrolysert i forkant av etanolekstraksjonen, inneholder mye mer lipid i sedimentene enn i pulveret. Dette kan blant annet skyldes at etanol ikke klarer å ekstrahere alt fett i *Chlorella*-pulveret, slik at denne verdien (antall mg lipid i pulver) er for lav. I tillegg vil hydrolysen føre til at forbindelsene i pulveret ”åpner seg”, og at dermed vil det ekstraheres mer lipid i sedimentene etter hydrolyse enn i pulveret. Lipidmengden som ble målt i sedimentene kan også inneholde andre småmolekylære forbindelser som er løselige i etanol.

Basert på protein- og lipidresultatene fra hydrolyse før og etter etanolekstraksjon, kan det diskuteres hvilken rekkefølge som bør velges. Selv om det ikke har blitt målt protein i enzymprøve der hydrolyse er kjørt etter etanolekstraksjon, kan trenden i figur 26 og 27 tyde på at proteininnholdet i hydrolysat etter etanolekstraksjon hadde vært høyere enn i hydrolysat før etanolekstraksjon. For lipid derimot fås det et høyere utbytte dersom hydrolyse utføres før ekstraksjon enn om hydrolyse utføres etter ekstraksjon. Rekkefølgen som egner seg best vil blant annet bestemmes av om det er proteinene eller lipidene som skal brukes videre. Selv om det fås en høyere andel lipider ved hydrolyse før ekstraksjon, vil lipidene ha bedre stabilitet hvis de slipper varmebehandling først. Da kan det argumenteres for om det vil være mer lønnsomt å utføre ekstraksjon før hydrolyse, da denne rekkefølgen antageligvis gir en litt høyere proteinandel og lipidene slipper varmebehandling.

4 Forslag til videre arbeid

Det er funnet lovende lipidekstraksjonsmetoder i denne studien, men metoder for lipidekstraksjon fra mikroalger bør fortsette å testes ut og optimaliseres, da det i tillegg til lipider ekstraheres andre forbindelser, som pigmenter. Dette, i tillegg til mikroalgers svært robuste cellevegg, gjør det utfordrende å finne optimale lipidekstraksjonsmetoder. Acetonutfelling og andre isoleringsmetoder bør også utvikles videre for å få en renere fosfolipidfraksjon. Det kan da være interessant å analysere fettsyresammensetningen til fosfolipidfraksjonen med GC. På denne måten kan det kartlegges hvilke fettsyrer som dominerer i fosfolipidfraksjonen i sammenligning med lipidekstraktet.

Da *Chlorella* og *Spirulina* viser seg å ha en kompleks sammensetning av lipidklasser, bør det gjøres grundigere identifiseringsarbeid av lipidklassene. Et forslag er å kjøre enda flere standarder, som pigmenter, hydrokarboner og flere fosfolipider, slik at identifiseringen og kvantifiseringen av lipidklassene blir lettere. Flere HPLC-metoder bør testes ut, for å få optimal separasjon av toppene. I tillegg kan NMR være en nyttig analysemetode for å oppklare hvilke forbindelser som faktisk ekstraheres ved lipidekstraksjon av mikroalger.

Det vil også være interessant å analysere proteininnhold i hydrolysater fra proteinhydrolyse etter at lipider er fjernet med etanolekstraksjon, da dette dessverre ikke lot seg gjøre i denne studien. Da kan det blir bekreftet om hydrolysegraden øker, og i så fall hvor mye den øker. Dette kan bidra til at metoder for utvinning av proteiner og lipider fra mikroalger kan utvikles videre.

5 Konklusjon

Av ekstraksjonsmetodene som ble testet ut var det modifisert Folch og etanolekstraksjon som ga mest lovende resultater, både med tanke på lipidutbytte og miljøvennlighet. Lipidinnholdet i *Chlorella* ble funnet å være $16,3 \pm 1,1\%$ med modifisert Folch, og $12,2 \pm 0,9\%$ med etanolekstraksjon. For *Spirulina* var lipidutbyttet ved bruk av de samme metodene henholdsvis $11,5 \pm 0,8\%$ og $8,8 \pm 0,8\%$. Bruk av ultralyd førte til økt lipidutbytte. Algeknusing med flytende nitrogen økte utbyttet svært lite i *Chlorella*, men noe mer i *Spirulina*. Ved oppskalering av tørrstoffmengde ble det prosentvise lipidutbyttet med de samme metodene noe lavere. Det viste seg at ved å ekstrahere fett tre ganger etter hverandre med etanol, økte lipidutbyttet signifikant, uansett om det var i liten eller større skala.

Acetonutfelling viste seg å være lovende for isolering av fosfolipider, siden analyse av lipidekstrakter og fosfolipidfraksjoner med HPLC-CAD viste at fosfolipider var blitt oppkonsentrert i samtlige prøver. Analyser med HPLC-CAD viste også at *Chlorella* og *Spirulina* har en svært kompleks sammensetning av lipidklasser.

Chlorella-ekstraktene viste seg å ha en relativt lik sammensetning av mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. I *Spirulina* derimot, var det en høyere andel mettede og en lavere andel flerumettede fettsyrer i modifisert Folch-ekstraktet enn i etanolekstraktet. *Chlorella* inneholdt en klart høyere andel omega-3-fettsyrer enn *Spirulina*, som derimot inneholdt en høy andel omega-6-fettsyrer. Omega-3-fettsyren som dominerte hos *Chlorella* var C18:3 (ALA), mens den dominerende omega-6-fettsyren, hos både *Chlorella* og *Spirulina*, var C18:2 (LA). I tillegg dominerte C18:3 (GLA) hos *Spirulina*.

Det er mulig å utvinne både proteiner og lipider fra mikroalger ved å kjøre hydrolyse av biomasse i forkant eller etterkant av ekstraksjon. Lipidutbyttet er lavere i *Chlorella*-pulver enn i sedimenter fra proteinhydrolyse. Da hydrolyse ble kjørt i forkant av etanolekstraksjon ble ca. 40% av proteinene i *Chlorella*-pulveret hydrolysert.

Denne studien har tatt for seg optimalisering av ulike lipidekstraksjonsmetoder og karakterisering av lipider i mikroalger. Videre optimalisering bør gjøres i fremtiden, da mikroalger kan være en lovende kilde til helsefremmende lipider.

Litteraturliste

1. Patil, V., Reitan, K.I., Knutsen, G., Mortensen, L.M., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., and Gislerød, H.R., *Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture*. Plant Biology, 2005. **6**.
2. Lunn, J. and Theobald, H.E., *The health effects of dietary unsaturated fatty acids*. Nutrition Bulletin, 2006. **31**(3): p. 178-224.
3. Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., and Troell, M., *Effect of aquaculture on world fish supplies*. Nature, 2000. **405**(6790): p. 1017-1024.
4. Coultate, T., *FOOD The Chemistry of its Components*. 5 ed. 2009, Cambridge, UK: RSC Publishing.
5. VKM, *Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oil* 2011.
6. VKM, *Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods*. 2011.
7. Lu, F.H., Nielsen, N.S., Timm-Heinrich, M., and Jacobsen, C., *Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications*. Lipids, 2011. **46**(1): p. 3-23.
8. Thompson, G.A., *Lipids and membrane function in green algae*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1996. **1302**(1): p. 17-45.
9. Becker, E.W., *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. 1994, Cambridge: Cambridge University Press.
10. Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S., *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. **14**(1): p. 217-232. (Ikke sett, sitert i [56])
11. Stengel, D.B., Connan, S., and Popper, Z.A., *Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application*. Biotechnol Adv, 2011. **29**(5): p. 483-501. (Ikke sett, sitert i [56])
12. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., and Vaca-Garcia, C., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014. **35**: p. 265-278.
13. Zhao, C., Wu, Y., Yang, C., Liu, B., and Huang, Y., *Hypotensive, hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of bioactive compounds from microalgae and marine microorganisms*. International Journal of Food Science & Technology, 2015. **50**(8): p. 1705-1717.
14. Becker, E.W., *Micro-algae as a source of protein*. Biotechnology Advances, 2007. **25**(2): p. 207-210.
15. Romero García, J.M., Acién Fernández, F.G., and Fernández Sevilla, J.M., *Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis*. Bioresource Technology, 2012. **112**: p. 164-170.
16. Pulz, O. and Gross, W., *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **65**(6): p. 635-48.
17. Chorus, I. and Bartram, J., *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1999: Spon Press. (Ikke sett, sitert i [16])
18. Skulberg, O.M., *Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research*. Journal of Applied Phycology. **12**(3): p. 341-348. (Ikke sett, sitert i [16])

19. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., and Bunnag, B., *Lipid and fatty acids extraction from the cyanobacterium Spirulina*. Sci. Asia, 2008. **34**: p. 299-305.
20. Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., and García, I., *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae*. Inflammation Research, 1998. **47**(1): p. 36-41. (Ikke sett, sitert i [19])
21. Herrero, M., Martín-Álvarez, P.J., Senorans, F.J., Cifuentes, A., and Ibáñez, E., *Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from Spirulina platensis microalga*. Food Chemistry, 2005. **93**(3): p. 417-423. (Ikke sett, sitert i [19])
22. Cohen, Z. and Vonshak, A., *Fatty acid composition of Spirulina and Spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy*. Phytochemistry, 1991. **30**(1): p. 205-206. (Ikke sett, sitert i [19])
23. Ishikawa, T., Fujiyama, Y., Igarashi, C., Morino, M., Fada, N., Kagami, A., Sakamoto, T., Nagano, M., and Nakamura, H., *Clinical features of familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis, 1989. **75**: p. 95-103. (Ikke sett, sitert i [57])
24. Horrobin, D., *The role of essential fatty acids and prostaglandins in the premenstrual syndrome*. The Journal of reproductive medicine, 1983. **28**(7): p. 465-468. (Ikke sett, sitert i [57])
25. Bordoni, A., Biagi, P., Masi, M., Ricci, G., Fanelli, C., Patrizi, A., and Ceccolini, E., *Evening primrose oil (Efamol) in the treatment of children with atopic eczema*. Drugs under experimental and clinical research, 1987. **14**(4): p. 291-297. (Ikke sett, sitert i [57])
26. Reddy, D., Prasad, V., and Das, U., *Intratumoural injection of gamma linolenic acid in malignant gliomas*. Journal of clinical neuroscience, 1998. **5**(1): p. 36-39. (Ikke sett, sitert i [57])
27. Kleivdal, H., Chauton, Mathilde S., Reitan, Kjell I., *Industrial production of marine microalgae as source of EPA and DHA rich raw material in fish feed- Basis, knowledge status and possibilities*. 2013.
28. Davis, R., Aden, A., and Pienkos, P.T., *Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production*. Applied Energy, 2011. **88**(10): p. 3524-3531. (Ikke sett, sitert i [27])
29. Bligh, E.G. and Dyer, W.J., *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian journal of biochemistry and physiology, 1959. **37**(8): p. 911-917.
30. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G., *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J biol chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
31. Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., and Arumugam, M., *Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review*. Frontiers in Energy Research, 2015. **2**: p. 61.
32. Suslick, K.S. and Flannigan, D.J., *Inside a collapsing bubble: sonoluminescence and the conditions during cavitation*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2008. **59**: p. 659-683. (Ikke sett, sitert i [31])
33. Khanal, S.K., Grewell, D., Sung, S., and Van Leeuwen, J., *Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: a review*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2007. **37**(4): p. 277-313. (Ikke sett, sitert i [31])
34. Jensen, W.B., *The Origin of the Soxhlet Extractor*. Journal of Chemical Education, 2007. **84**(12): p. 1913.
35. Leigh, S., Kung, E., Hoogevest, P.V., and Tiemessen, H., *Marine lipid compositions*. 2006: United States.
36. Morris, H.J., Almarales, A., Carrillo, O., and Bermúdez, R.C., *Utilisation of Chlorellavulgaris cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates*. Bioresource Technology, 2008. **99**(16): p. 7723-7729.

37. Sigma-Aldrich Co., *Guide to Solid Phase Extraction*. 1998.
38. Kates, M., *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. 2 ed. Vol. 3. 1986, Amsterdam: Elsevier. 464.
39. Moreau, R.A., *Lipid analysis via HPLC with a charged aerosol detector*. Lipid Technology, 2009. **21**(8-9): p. 191-194.
40. Lundanes, E., Reubsæet, L., and Greibokk, T., *Chromatography. Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. 2013: Wiley Academic.
41. Gamache, P.H., McCarthy, R.S., Freeto, S.M., Asa, D.J., Woodcock, M.J., Laws, K., and Cole, R.O., *HPLC analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection*. Lc Gc Europe, 2005. **18**(6): p. 345. (Ikke sett, sitert i [62])
42. Cobb, Z., Shaw, P.N., Lloyd, L.L., Wrench, N., and Barrett, D.A., *Evaporative light-scattering detection coupled to microcolumn liquid chromatography for the analysis of underivatized amino acids: Sensitivity, linearity of response and comparisons with UV absorbance detection*. Journal of Microcolumn Separations, 2001. **13**(4): p. 169-175. (Ikke sett, sitert i [62])
43. Vervoort, N., Daemen, D., and Török, G., *Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2008. **1189**(1): p. 92-100. (Ikke sett, sitert i [62])
44. Aursand, I.G., *Low-field NMR and MRI studies of fish muscle: Effects of raw material quality and processing*. 2009.
45. Christie, W.W., *Gas Chromatography and Lipids*. 1989: The Oily Press. 307.
46. Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., and Garland, C.D., *Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1989. **128**(3): p. 219-240.
47. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., and Shabanpour, B., *Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (Acipenser persicus) Visceral Protein*. Food and Bioprocess Technology, 2009. **5**(2): p. 460-465. (Ikke sett, sitert i [15])
48. Tang, C.-H., Wang, X.-S., and Yang, X.-Q., *Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates*. Food Chemistry, 2009. **114**(4): p. 1484-1490. (Ikke sett, sitert i [15])
49. Camacho, F., González-Tello, P., and Guadix, E.M., *Influence of enzymes, pH and temperature on the kinetics of whey protein hydrolysis / Influencia de los enzimas, pH y temperatura en la cinética de la hidrólisis de las proteínas del lactosuero*. Food Science and Technology International, 1998. **4**(2): p. 79-84. (Ikke sett, sitert i [15])
50. Dryer, R.L. and Lata, G.F., *Experimental biochemistry*. 1989, New York: Oxford University Press.
51. Olmstead, I.L., Hill, D.R., Dias, D.A., Jayasinghe, N.S., Callahan, D.L., Kentish, S.E., Scales, P.J., and Martin, G.J., *A quantitative analysis of microalgal lipids for optimization of biodiesel and omega-3 production*. Biotechnology and bioengineering, 2013. **110**(8): p. 2096-2104.
52. Mozuraityte, R., *Oxidation of marine phospholipids in liposomes*. 2007.
53. Homan, R. and Anderson, M.K., *Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **708**(1-2): p. 21-26.
54. Lu, F.S., Bruheim, I., Haugsgjerd, B.O., and Jacobsen, C., *Effect of temperature towards lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions in krill oil upon storage*. Food Chem, 2014. **157**: p. 398-407.

55. Xiao, L., Mjøs, S.A., and Haugsgjerd, B.O., *Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids*. Journal of Food Composition and Analysis, 2012. **25**(2): p. 198-207.
56. dos Santos, R.R., Moreira, D.M., Kunigami, C.N., Aranda, D.A.G., and Teixeira, C.M.L.L., *Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass*. Ultrasonics sonochemistry, 2015. **22**: p. 95-99.
57. Sajilata, M., Singhal, R., and Kamat, M., *Fractionation of lipids and purification of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis**. Food Chemistry, 2008. **109**(3): p. 580-586.
58. Jones, J., Manning, S., Montoya, M., Keller, K., and Poenie, M., *Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012. **89**(8): p. 1371-1381.
59. Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., and Danquah, M.K., *Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects*. International Journal of Chemical Engineering, 2010. **2010**: p. 11.
60. Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., and Oh, H.-M., *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. Bioresource technology, 2010. **101**(1): p. S75-S77.
61. Laurens, L.M.L., Dempster, T.A., Jones, H.D.T., Wolfrum, E.J., Van Wychen, S., McAllister, J.S.P., Rencenberger, M., Parchert, K.J., and Gloe, L.M., *Algal Biomass Constituent Analysis: Method Uncertainties and Investigation of the Underlying Measuring Chemistries*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(4): p. 1879-1887.
62. Vehovec, T. and Obreza, A., *Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217** (10): p. 1549-1556.

Vedlegg A: Rådata Bligh and Dyer

Tabell 1a viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella* med B&D, både med og uten bruk av ultralyd. Tabell 2a viser data for utveiging av Kimaxrørene.

Tabell 1a: Rådata fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med og uten ultralydbad (*Chlorella*)

Metode	Parallell	Vekt prøve (g)	Volum av ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
B&D m/ultralyd	1.1	1,0275	21,5	2,0	0,0104	10,88	10,73
	1.2	1,0275	21,5	2,0	0,0101	10,57	
	2.1	1,0338	20,0	2,0	0,011	10,64	10,79
	2.2	1,0338	20,0	2,0	0,0113	10,93	
	3.1	1,443	28,0	2,0	0,0106	10,28	10,33
	3.2	1,443	28,0	2,0	0,0107	10,38	
	4.1	1,2952	28,5	2,0	0,0108	11,88	10,84
	4.2	1,2952	28,5	2,0	0,0089	9,79	
	5.1	1,075	30,0	2,0	0,0076	10,60	10,60
	5.2	1,075	30,0	2,0	0,0076	10,60	
	6.1	1,3057	28,0	2,0	0,0101	10,83	11,05
	6.2	1,3057	28,0	2,0	0,0105	11,26	
B&D u/ultralyd	1.1	1,0729	27,0	2,0	0,0078	9,81	9,62
	1.2	1,0729	27,0	2,0	0,0072	9,43	
	2.1	1,0575	27,5	2,0	0,0072	9,36	9,43
	2.1	1,0575	27,5	2,0	0,0073	9,49	

Lipidinnhold i % er beregnet ved bruk av formel A-1:

$$\frac{a*b*100}{c*v} \quad (A-1)$$

Her er a gram inndampet fett, b ml av kloroformfase, c er ml inndampet kloroform og v er gram innveid prøve.

Tabell 2a: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med og uten ultralydbad (*Chlorella*)

Metode	Parallell	Vekt rør u/prøve (g)	Vekt rør m/prøve (g)	Differanse (g)
B&D m/ultralyd	1.1	10,9829	10,9933	0,0104
	1.2.	10,6798	10,6899	0,0101
	2.1	10,6653	10,6763	0,011
	2.2	10,8142	10,8255	0,0113
	3.1	10,8383	10,8489	0,0106
	3.2	10,8411	10,8518	0,0107
	4.1	11,1525	11,1633	0,0108
	4.2	10,9587	10,9676	0,0089
	5.1	10,9587	10,9327	0,0076
	5.2	10,8129	10,8205	0,0076
	6.1	11,081	11,0911	0,0101
	6.2	10,8878	10,8983	0,0105
B&D u/ultralyd	1.1	10,8469	10,8547	0,0078
	1.2	11,023	11,0305	0,0075
	2.1	10,9829	10,9901	0,0072
	2.2	10,8288	10,8361	0,0073

Eksperimentelle data fra B&D utført tre ganger etter hverandre er presentert i tabell 3a. Tabell 4a viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 3a: Rådata fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med ultralydbad tre ganger etter hverandre (*Chlorella*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum av ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0327	25,3	2,0	0,009	11,02	10,41
1.2	1,0327	25,3	2,0	0,008	9,80	
1.1.1	1,0327	32,5	2,0	0,0009	1,41	1,34
1.1.2	1,0327	32,5	2,0	0,0008	1,26	
1.2.1	1,0327	38,0	2,0	0,0006	1,10	0,92
1.2.2	1,0327	38,0	2,0	0,0004	0,74	
2.1	1,0707	19,0	2,0	0,0088	7,81	8,34
2.2	1,0707	19,0	2,0	0,01	8,87	
2.1.1	1,0707	39,0	2,0	0,0018	3,28	3,0
2.1.2	1,0707	39,0	2,0	0,0015	2,73	
2.2.1	1,0707	47,0	2,0	0,0012	2,63	2,31
2.2.2	1,0707	47,0	2,0	0,0009	1,98	

Tabell 4a: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med ultralydbad tre ganger etter hverandre (*Chlorella*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,7277	10,7367	0,009
1.2	10,9195	10,9275	0,008
1.1.1	10,7903	10,7912	0,0009
1.1.2	10,6947	10,6955	0,0008
1.2.1	10,8086	10,8092	0,0006
1.2.2	10,7412	10,7416	0,0004
2.1	10,6213	10,6301	0,0088
2.2	10,9436	10,9536	0,01
2.1.1	10,7732	10,775	0,0018
2.1.2	11,0017	11,0032	0,0015
2.2.1	10,9244	10,9256	0,0012
2.2.2	10,7925	10,7934	0,0009

Ekperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Spirulina* med B&D er vist i tabell 5a.

Tabell 6a viser data for utveiling av Kimaxrør.

Tabell 5a: Rådata fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med ultralydbad (*Spirulina*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum av ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0544	36,5	2,0	0,0013	2,25	1,91
1.2.	1,0544	36,5	2,0	0,0009	1,56	
2.1	1,1002	3,7	0,5	0,0018	1,21	1,28
2.2	1,1002	3,7	0,5	0,002	1,35	
3.1	1,2002	3,8	0,5	0,0001	0,063	0,19
3.2	1,2002	3,8	0,5	0,0005	0,32	

Tabell 6a: Resultater fra utveiging av Kimaxrør, fra ekstraksjon med Bligh and Dyer med ultralydbad (*Spirulina*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,7831	10,7844	0,0013
1.2.	10,9200	10,9209	0,0009
2.1	10,9227	10,9245	0,0018
2.2	10,9810	10,9830	0,002
3.1	10,7426	10,7427	0,0001
3.2	10,8839	10,8844	0,0005

Vedlegg B: Rådata modifisert Folch

Tabell 1b viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella* med modifisert Folch. Tabell 2b viser data for utveiing av Kimaxrørene. Lipidinnholdet er beregnet ved bruk av ligning A-1.

Tabell 1b: Rådata fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Chlorella*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0902	45,0	2,0	0,0065	13,41	14,34
1.2	1,0902	45,0	2,0	0,0074	15,27	
2.1	1,0451	52,0	2,0	0,0062	15,42	15,92
2.2	1,0451	52,0	2,0	0,0066	16,42	
3.1	1,1042	46,0	2,0	0,0086	17,91	17,50
3.2	1,1042	46,0	2,0	0,0082	17,08	
4.1	1,0647	50,0	2,0	0,0072	16,91	16,79
4.2	1,0647	50,0	2,0	0,0071	16,67	
5.1	1,097	47,0	2,0	0,0078	16,71	16,60
5.2	1,097	47,0	2,0	0,0077	16,49	
6.1	1,1213	50,0	2,0	0,0075	16,72	16,50
6.2	1,1213	50,0	2,0	0,0073	16,28	

Tabell 2b: Resultater fra utveiing av Kimax-rør fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Chlorella*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	11,0528	11,0593	0,0065
1.2	11,1124	11,1198	0,0074
2.1	10,92	10,9262	0,0062
2.2	11,1897	11,1963	0,0066
3.1	10,903	10,9116	0,0086
3.2	10,9565	10,9647	0,0082
4.1	10,8976	10,9048	0,0072
4.2	10,87	10,8771	0,0071
5.1	10,7428	10,7506	0,0078
5.2	10,899	10,9067	0,0077
6.1	12,5129	12,5204	0,0075
6.2	10,9107	10,918	0,0073

Tabell 3b viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Spirulina*. Tabell 4b viser data for utveiling av Kimaxrør.

Tabell 3b: Rådata fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Spirulina*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0931	47,0	2,0	0,0052	11,18	10,86
1.2	1,0931	47,0	2,0	0,0049	10,53	
2.1	1,1970	41,5	2,0	0,0072	12,48	12,05
2.2	1,1970	41,5	2,0	0,0067	11,61	

Tabell 4b: Resultater fra utveiling av Kimaxrør fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Spirulina*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,7911	10,7963	0,0052
1.2	10,7974	10,8023	0,0049
2.1	10,8497	10,8569	0,0072
2.2	10,9216	10,9283	0,0067

Tabell 5b viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella* med modifisert Folch, i større skala. Tabell 6b viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 5b: Rådata fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Chlorella*, 5g)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	5,1927	43,0	2,0	0,0347	14,37	14,37
1.2	5,1927	43,0	2,0	0,0347	14,37	
2.1	5,1795	46,0	2,0	0,0329	14,61	14,74
2.2	5,1795	46,0	2,0	0,0335	14,88	

Tabell 6b: Resultater fra utveiging av Kimaxrør fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Chlorella*, 5g)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,7477	10,7824	0,0347
1.2	10,8340	10,8687	0,0347
2.1	10,8464	10,8793	0,0329
2.2	10,3289	10,3624	0,0335

Tabell 7b viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Spirulina* med modifisert Folch, i større skala. Tabell 8b viser data for utveiging av Kimaxrørene.

Tabell 7b: Rådata fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Spirulina*, 5g)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i kloroform (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	5,0105	41,0	2,0	0,03	12,27	11,80
1.2	5,0105	41,0	2,0	0,0277	11,33	
2.1	5,1603	47,0	2,0	0,0227	10,34	10,47
2.2	5,1603	47,0	2,0	0,0233	10,61	

Tabell 8b: Resultater fra utveiging av Kimax-rør fra ekstraksjon med modifisert Folch (*Spirulina*, 5g)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8294	10,8594	0,03
1.2	10,7240	10,7517	0,0277
2.1	10,8820	10,9047	0,0227
2.2	10,8628	10,8859	0,0233

Vedlegg C: Rådata etanolekstraksjon

Tabell 1c viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella* med etanolekstraksjon. Tabell 2c viser data for utveiling av Kimaxrørene. Lipidinnholdet er beregnet ved bruk av ligning A-1.

Tabell 1c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	2,5222	44,5	2,0	0,0097	8,56	8,60
1.2	2,5222	44,5	2,0	0,0098	8,65	
1.1.1	2,5222	28,0	2,0	0,005	2,77	2,77
1.1.2	2,5222	28,0	2,0	0,005	2,77	
1.2.1	2,5222	17,5	2,0	0,003	1,04	1,08
1.2.2	2,5222	17,5	2,0	0,0032	1,11	
2.1	2,5395	46,0	2,0	0,0089	8,06	8,06
2.2	2,5395	46,0	2,0	0,0089	8,06	
2.1.1	2,5395	29,0	2,0	0,0042	2,39	2,46
2.1.2	2,5395	29,0	2,0	0,0044	2,51	
2.2.1	2,5395	19,5	2,0	0,0036	1,38	1,42
2.2.2	2,5395	19,5	2,0	0,0038	1,46	

Tabell 2c: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,841	10,8507	0,0097
1.2	10,2733	10,2831	0,0098
1.1.1	10,9328	10,9378	0,005
1.1.2	10,9207	10,9257	0,005
1.2.1	10,6941	10,6971	0,003
1.2.2	10,5904	10,5936	0,0032
2.1	10,7497	10,7586	0,0089
2.2	10,7978	10,8067	0,0089
2.1.1	10,9546	10,9588	0,0042
2.1.2	10,0808	10,0852	0,0044
2.2.1	10,6632	10,6668	0,0036
2.2.2	10,8369	10,8407	0,0038

Tabell 3c viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Spirulina*. Tabell 4c viser data for utveiling av Kimaxrør.

Tabell 3c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Spirulina*)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	2,5633	46,0	2,0	0,005	4,49	4,62
1.2	2,5633	46,0	2,0	0,0053	4,76	
1.1.1	2,5633	28,0	2,0	0,0055	3,0	2,98
1.1.2	2,5633	28,0	2,0	0,0054	2,95	
1.2.1	2,5633	17,0	2,0	0,0033	1,09	1,09
1.2.2	2,5633	17,0	2,0	0,0033	1,09	
2.1	2,5185	46,5	2,0	0,0055	5,08	5,17
2.2	2,5185	46,5	2,0	0,0057	5,26	
2.1.1	2,5185	28,5	2,0	0,0048	2,72	2,60
2.1.2	2,5185	28,5	2,0	0,0044	2,49	
2.2.1	2,5185	19,0	2,0	0,0029	1,09	1,09
2.2.2	2,5185	19,0	2,0	0,0029	1,09	

Tabell 4c: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Spirulina*)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8505	10,8555	0,005
1.2	10,7117	10,7170	0,0053
1.1.1	10,8298	10,8353	0,0055
1.1.2	10,9505	10,9559	0,0054
1.2.1	10,8219	10,8252	0,0033
1.2.2	10,7794	10,7827	0,0033
2.1	10,8001	10,8056	0,0055
2.2	10,7206	10,7263	0,0057
2.1.1	10,9088	10,9136	0,0048
2.1.2	10,8166	10,8210	0,0044
2.2.1	10,8475	10,8504	0,0029
2.2.2	11,0024	11,0053	0,0029

Eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella*, der algene først er forsøkt knust med flytende nitrogen, er presentert i figur 5c. Data for utveiling av Kimaxrør er vist i figur 6c. Tilsvarende data for *Spirulina* er presentert i figur 7c og 8c.

Tabell 5c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*). Algene ble først knust med flytende nitrogen.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	2,4997	43,0	2,0	0,0115	9,89	10,02
1.2	2,4997	43,0	2,0	0,0118	10,15	
1.1.1	2,4997	28,0	2,0	0,0034	1,90	1,99
1.1.2	2,4997	28,0	2,0	0,0037	2,07	
1.2.1	2,4997	15,5	2,0	0,0022	0,68	0,68
1.2.2	2,4997	15,5	2,0	0,0022	0,68	
2.1	2,5356	44,5	2,0	0,0118	10,35	10,27
2.2	2,5356	44,5	2,0	0,0116	10,18	
2.1.1	2,5356	29,0	2,0	0,003	1,72	1,83
2.1.2	2,5356	29,0	2,0	0,0034	1,94	
2.2.1	2,5356	19,0	2,0	0,0013	0,49	0,52
2.2.2	2,5356	19,0	2,0	0,0015	0,56	

Tabell 6c: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*). Algene ble først knust med flytende nitrogen.

Parallell	Vekt rør u/prøve (g)	Vekt rør m/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8221	10,8336	0,0115
1.2	10,7702	10,7820	0,0118
1.1.1	10,9553	10,9587	0,0034
1.1.2	10,9590	10,9627	0,0037
1.2.1	10,7423	10,7445	0,0022
1.2.2	10,9570	10,9592	0,0022
2.1	10,8778	10,8896	0,0118
2.2	10,9254	10,9370	0,0116
2.1.1	11,9892	11,9922	0,003
2.1.2	10,7064	10,7098	0,0034
2.2.1	10,6758	10,6771	0,0013
2.2.2	10,7983	10,7998	0,0015

Tabell 7c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Spirulina*). Algene ble først knust med flytende nitrogen.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	2,5116	43,0	2,0	0,0079	6,76	6,72
1.2	2,5116	43,0	2,0	0,0078	6,68	
1.1.1	2,5116	27,0	2,0	0,0067	3,60	3,52
1.1.2	2,5116	27,0	2,0	0,0064	3,44	
1.2.1	2,5116	14,5	2,0	0,0024	0,69	0,69
1.2.2	2,5116	14,5	2,0	0,0024	0,69	
2.1	2,5301	46,0	2,0	0,0082	7,45	7,59
2.2	2,5301	46,0	2,0	0,0085	7,73	
2.1.1	2,5301	30,0	2,0	0,0055	3,26	3,26
2.1.2	2,5301	30,0	2,0	0,0055	3,26	
2.2.1	2,5301	19,0	2,0	0,0018	0,68	0,58
2.2.2	2,5301	19,0	2,0	0,0013	0,49	

Tabell 8c: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Spirulina*). Algene ble først knust med flytende nitrogen.

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8699	10,8778	0,0079
1.2	10,8716	10,8794	0,0078
1.1.1	10,8928	10,8995	0,0067
1.1.2	11,1048	11,1112	0,0064
1.2.1	10,8452	10,8476	0,0024
1.2.2	10,5992	10,6016	0,0024
2.1	10,9321	10,9403	0,0082
2.2	10,7723	10,7808	0,0085
2.1.1	10,8628	10,8683	0,0055
2.1.2	10,8032	10,8087	0,0055
2.2.1	10,7980	10,7998	0,0018
2.2.2	10,9553	10,9566	0,0013

Tabell 9c viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Chlorella* med etanolekstraksjon, i større skala. Tabell 10c viser data for utveiging av Kimaxrørene.

Tabell 9c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 5 g)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	5,0191	41,0	2,0	0,0172	7,03	7,09
1.2	5,0191	41,0	2,0	0,0175	7,15	
1.1.1	5,0191	27,0	2,0	0,0106	2,85	2,85
1.1.2	5,0191	27,0	2,0	0,0106	2,85	
1.2.1	5,0191	17,0	2,0	0,0068	1,15	1,17
1.2.2	5,0191	17,0	2,0	0,007	1,19	
2.1	5,1217	41,0	2,0	0,0132	5,28	5,26
2.2	5,1217	41,0	2,0	0,0131	5,24	
2.1.1	5,1217	28,0	2,0	0,0088	2,41	2,38
2.1.2	5,1217	28,0	2,0	0,0086	2,35	
2.2.1	5,1217	19,0	2,0	0,0062	1,15	1,17
2.2.2	5,1217	19,0	2,0	0,0064	1,19	

Tabell 10c: Resultater fra utveiging av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 5 g)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8506	10,8678	0,0172
1.2	10,9053	10,9228	0,0175
1.1.1	11,0101	11,0207	0,0106
1.1.2	10,9690	10,9796	0,0106
1.2.1	10,7874	10,7942	0,0068
1.2.2	10,8969	10,9039	0,007
2.1	10,9908	11,0040	0,0132
2.2	10,8101	10,8232	0,0131
2.1.1	10,8163	10,8251	0,0088
2.1.2	10,9429	10,9515	0,0086
2.2.1	10,7342	10,7404	0,0062
2.2.2	10,9446	10,9510	0,0064

Tabell 11c viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i *Spirulina* med etanolekstraksjon, i større skala. Tabell 12c viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 11c: Rådata fra etanolekstraksjon (*Spirulina*, 5 g)

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum ekstrakt i etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	5,1661	42,5	2,0	0,0082	3,37	3,37
1.2	5,1661	42,5	2,0	0,0082	3,37	
1.1.1	5,1661	27,0	2,0	0,0095	2,48	2,59
1.1.2	5,1661	27,0	2,0	0,0103	2,69	
1.2.1	5,1661	17,5	2,0	0,0083	1,41	1,38
1.2.2	5,1661	17,5	2,0	0,008	1,35	
2.1	5,0605	41,5	2,0	0,007	2,87	2,89
2.2	5,0605	41,5	2,0	0,0071	2,91	
2.1.1	5,0605	29,0	2,0	0,0091	2,61	2,55
2.1.2	5,0605	29,0	2,0	0,0087	2,49	
2.2.1	5,0605	21,5	2,0	0,0074	1,57	1,57
2.2.2	5,0605	21,5	2,0	0,0074	1,57	

Tabell 12c: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Spirulina*, 5 g)

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8923	10,9005	0,0082
1.2	11,1559	11,1641	0,0082
1.1.1	10,8687	10,8782	0,0095
1.1.2	10,6745	10,6848	0,0103
1.2.1	10,8447	10,8530	0,0083
1.2.2	10,7759	10,7839	0,008
2.1	10,9191	10,9261	0,007
2.2	11,8731	11,8802	0,0071
2.1.1	10,8193	10,8284	0,0091
2.1.2	10,8878	10,8965	0,0087
2.2.1	10,9412	10,9486	0,0074
2.2.2	10,8795	10,8869	0,0074

Vedlegg D: Rådata SPE (fast-fase-ekstraksjon)

Tabell 1d viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de tre ulike fraksjonene oppnådd med SPE 02.10.15. Det er *Chlorella*-ekstrakt fra modifisert Folch som er brukt under isoleringen. Tabell 2d, 3d og 4d viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 1d: Rådata fra SPE, der lipidene er ekstrahert fra *Chlorella* med modifisert Folch (02.10.15)

Lipidfraksjon	Målinger	Kolonne 1	Kolonne 2	Kolonne 3
Nøytrale lipider	Volum eluent (ml)	19,5	19,5	19,0
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	0,95	1,0	1,1
	Mengde NL (mg)	9,2625	9,75	10,45
		Gjennomsnitt: 9,8		
	%-innhold av total mengde (18,5 mg)	53,0		
Glykolipider	Volum eluent (ml)	29,0	29,0	28,5
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	0,3	0,2	0,35
	Mengde GL (mg)	4,35	2,9	4,9875
		Gjennomsnitt: 4,1		
	%-innhold av total mengde (18,5 mg)	22,2		
Fosfolipider	Volum eluent (ml)	20,0	18,0	20,0
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	0,3	0,25	0,2
	Mengde PL (mg)	3	2	2
		Gjennomsnitt: 2,4		
	%-innhold av total mengde (18,5 mg)	13,0		

Utganging av % lipidinnhold i lipidfraksjonene er beregnet ved å bruke formel A-1. Her tilsvarer a mg fett i fraksjonen, b ml eluent, c ml inndampet løsemiddel (2 ml) og v mg innveid fett (18,5 mg). 18,5 mg kommer fra at det ble veid inn 60,2 mg fett, som ble løst i 1300 µl kloroform:metanol (2:1). Det ble overført 400 µl av løsningen til hver av kolonnene.

Tabell 2d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for nøytral lipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell NL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,9639	10,9650	0,0011	0,00095
1.2	10,7599	10,7607	0,0008	
2.1	10,8908	10,8918	0,001	0,001
2.2	10,9410	10,9420	0,001	
3.1	10,9664	10,9675	0,0011	0,0011
3.2	10,8933	10,8944	0,0011	

Tabell 3d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for glykolipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell GL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,7362	10,7366	0,0004	0,0003
1.2	10,9280	10,9282	0,0002	
2.1	10,8801	10,8804	0,0003	0,0002
2.2	11,1651	11,1652	0,0001	
3.1	11,0049	11,0053	0,0004	0,00035
3.2	10,6030	10,6033	0,0003	

Tabell 4d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for fosfolipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell PL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,9531	10,9534	0,0003	0,0003
1.2	10,7650	10,7653	0,0003	
2.1	10,7971	10,7973	0,0002	0,00025
2.2	10,8345	10,8348	0,0003	
3.1	11,0022	11,0025	0,0003	0,0002
3.2	10,6637	10,6638	0,0001	

Tabell 5d viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de tre ulike fraksjonene oppnådd med SPE 16.10.15. Det er *Chlorella*-ekstrakt fra modifisert Folch som er brukt under isoleringen. Tabell 6d, 7d og 8d viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 5d: Rådata fra SPE, der lipidene er ekstrahert fra *Chlorella* med modifisert Folch (16.10.15)

Lipidfraksjon	Målinger	Kolonne 1	Kolonne 2	Kolonne 3
Nøytrale lipider	Volum eluent (ml)	19,5	20,0	20,5
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	1,0	1,0	0,75
	Mengde NL (mg)	9,75	10,0	7,6875
		Gjennomsnitt: 9,1		
	%-innhold av total mengde (17,9 mg)	49,2		
Galaktolipider	Volum eluent (ml)	28,0	28,0	29,0
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	0,15	0,05	0,4
	Mengde GL (mg)	2,1	0,7	5,8
		Gjennomsnitt: 2,9		
	%-innhold av total mengde (17,9 mg)	15,7		
Fosfolipider	Volum eluent (ml)	19,0	20,0	19,0
	Konsentrasjon av lipider (mg/2 ml)	0,3	0,1	0,25
	Mengde PL (mg)	2,85	1,0	2,375
		Gjennomsnitt: 2,1		
	%-innhold av total mengde (17,9 mg)	11,4		

% lipidinnhold i fraksjonene ble beregnet på samme måte som ovenfor, ved bruk av ligning A-1. 17,9 mg kommer fra at det ble veid inn 58,3 mg fett, som ble løst i 1300 µl kloroform:metanol (2:1). Det ble overført 400 µl av løsningen til hver av kolonnene.

Tabell 6d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for nøytral lipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell NL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,9591	10,9601	0,001	0,001
1.2	11,0504	11,0514	0,001	
2.1	10,8760	10,8770	0,001	0,001
2.2	10,7982	10,7992	0,001	
3.1	10,9608	10,9615	0,0007	0,00075
3.2	10,7428	10,7436	0,0008	

Tabell 7d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for glykolipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell GL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,6703	10,6705	0,0002	0,00015
1.2	10,8296	10,8297	0,0001	
2.1	10,6727	10,6728	0,0001	0,00005
2.2	10,8947	10,8947	0	
3.1	10,9397	19,9396	-0,0001	0,0004
3.2	10,8886	10,8890	0,0004	

Tabell 8d: Resultater fra utveiling av Kimaxrør i SPE for fosfolipidfraksjon, ekstrahert med mod. Folch

Parallell PL	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)	Gjennomsnitt (g)
1.1	10,8702	10,8705	0,0003	0,0003
1.2	10,7858	10,7861	0,0003	
2.1	10,9900	10,9901	0,0001	0,0001
2.2	11,1194	11,1184	-0,001	
3.1	10,8820	10,8822	0,0002	0,00025
3.2	10,8416	10,8419	0,0003	

Vedlegg E: Rådata acetonutfelling

Tabell 1e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for B&D-ekstrakt, *Chlorella*. Tabell 2e viser data for utveiging av Kimaxrørene. Lipidinnholdet er beregnet ved bruk av ligning A-1.

Tabell 1e: Rådata fra acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra Bligh and Dyer

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	53,8	5,3	1,0	8,3	43,99	81,8
1.2		53,8	5,3	1,0	8,9	47,17	87,7
1.1	PL-fase	53,8	5,0	0,5	1,2	12	22,3
1.2		53,8	5,0	0,5	1,0	10	18,6
2.1	Acetonfase	99,3	5,3	1,0	12,6	66,78	67,3
2.2		99,3	5,3	1,0	12,4	66,78	67,3
2.1	PL-fase	99,3	5,0	0,5	0,9	9	9,1
2.2		99,3	5,0	0,5	0,9	9	9,1

Tabell 2e: Resultater fra utveiging av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra Bligh and Dyer

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,8797	10,888	0,0083
1.2		10,8027	10,8116	0,0089
1.1	PL-fase	10,9564	10,9576	0,0012
1.2		10,8111	10,8121	0,001
2.1	Acetonfase	10,9114	10,924	0,0126
2.2		10,8039	10,8163	0,0124
2.1	PL-fase	10,7845	10,7854	0,0009
2.2		10,7699	10,7708	0,0009

Tabell 3e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for modifisert Folch-ekstrakt, *Chlorella*. Tabell 4e viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 3e: Rådata fra acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra modifisert Folch

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	156,8	10,7	2,0	18,2	97,37	62,1
1.2		156,8	10,7	2,0	17,8	95,23	60,7
1.1	PL-fase	156,8	5,0	0,5	0,6	6	3,8
1.2		156,8	5,0	0,5	0,5	5	3,2
2.1	Acetonfase	184,7	10,5	2,0	22,3	117,08	63,4
2.2		184,7	10,5	2,0	23,9	125,48	67,9
2.1	PL-fase	184,7	5,0	0,5	1,8	18	9,7
2.2		184,7	5,0	0,5	1,8	18	9,7

Tabell 4e: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra modifisert Folch

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,8454	10,8636	0,0182
1.2		10,6207	10,6385	0,0178
1.1	PL-fase	10,8521	10,8527	0,0006
1.2		10,8085	10,8090	0,0005
2.1	Acetonfase	10,9439	10,9662	0,0223
2.2		10,9954	11,0193	0,0239
2.1	PL-fase	10,7276	10,7294	0,0018
2.2		10,7485	10,7503	0,0018

Tabell 5e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for etanolekstrakt, *Chlorella*. Tabell 6e viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 5e: Rådata fra acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra EtOH-ekstraksjon

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	104,6	4,9	1,0	14,6	71,54	68,4
1.2		104,6	4,9	1,0	15,0	73,5	70,3
1.1	PL-fase	104,6	5,35	0,5	3,4	36,38	34,8
1.2		104,6	5,35	0,5	3,5	37,45	35,8
2.1	Acetonfase	108,8	4,8	1,0	15,5	74,4	68,4
2.2		108,8	4,8	1,0	15,0	72	66,2
2.1	PL-fase	108,8	5,45	0,5	2,7	29,43	27,0
2.2		108,8	5,45	0,5	2,8	30,52	28,1

Tabell 6e: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,8367	10,8513	0,0146
1.2		10,9315	10,9465	0,015
1.1	PL-fase	11,1014	11,1048	0,0034
1.2		10,9666	10,9701	0,0035
2.1	Acetonfase	11,1973	11,2128	0,0155
2.2		10,9638	10,9788	0,015
2.1	PL-fase	10,9161	10,9188	0,0027
2.2		10,8345	10,8373	0,0028

Tabell 7e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for modifisert Folch-ekstrakt, *Spirulina*. Tabell 8e viser data for utveining av Kimaxrørene.

Tabell 7e: Rådata fra acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt fra modifisert Folch

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	168	10,0	2,0	15,1	75,5	44,9
1.2		168	10,0	2,0	10,6	53	31,5
1.1	PL-fase	168	5,5	0,5	1,7	18,7	11,1
1.2		168	5,5	0,5	2,0	22,0	13,1
2.1	Acetonfase	186,6	10,0	2,0	10,6	53	28,4
2.2		186,6	10,0	2,0	13,7	68,5	36,7
2.1	PL-fase	186,6	5,5	0,5	2,0	22,0	11,8
2.2		186,6	5,5	0,5	2,1	23,1	12,4

Tabell 8e: Resultater fra utveining av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt fra modifisert Folch

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,8464	10,8615	0,0151
1.2		10,8868	10,8974	0,0106
1.1	PL-fase	10,9397	10,9414	0,0017
1.2		10,7814	10,7834	0,002
2.1	Acetonfase	11,0004	11,0110	0,0106
2.2		10,7414	10,7551	0,0137
2.1	PL-fase	10,8036	10,8056	0,002
2.2		10,8181	10,8202	0,0021

Tabell 9e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for etanolekstrakt, *Spirulina*. Tabell 10e viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 9e: Rådata fra acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt fra EtOH-ekstraksjon

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	56,8	4,9	1,0	7,0	34,3	60,4
1.2		56,8	4,9	1,0	6,7	32,83	57,8
1.1	PL-fase	56,8	5,35	0,5	1,3	13,91	24,5
1.2		56,8	5,35	0,5	1,1	11,77	20,7
2.1	Acetonfase	53,1	5,0	1,0	6,6	33,0	62,1
2.2		53,1	5,0	1,0	6,6	33,0	62,1
2.1	PL-fase	53,1	5,25	0,5	1,4	14,7	27,7
2.2		53,1	5,25	0,5	1,5	15,75	29,7

Tabell 10e: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,9419	19,9489	0,007
1.2		10,8772	10,8839	0,0067
1.1	PL-fase	10,9334	10,9347	0,0013
1.2		10,8592	10,8603	0,0011
2.1	Acetonfase	10,6662	10,6728	0,0066
2.2		10,7650	10,7716	0,0066
2.1	PL-fase	10,9513	10,9527	0,0014
2.2		10,0530	10,0545	0,0015

Tabell 11e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for modifisert Folch-ekstrakt, *Chlorella*, i større skala. Tabell 12e viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 11e: Rådata fra acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt (5g) fra mod. Folch

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	155,7	10,5	2,0	20,6	108,2	69,5
1.2		155,7	10,5	2,0	20,4	107,1	68,8
1.1	PL-fase	155,7	5,0	0,5	1,8	18	11,6
1.2		155,7	5,0	0,5	1,6	16	10,3
2.1	Acetonfase	157,8	10,5	2,0	18,5	97,1	61,5
2.2		157,8	10,5	2,0	18,5	97,1	61,5
2.1	PL-fase	157,8	5,0	0,5	1,5	15	9,5
2.2		157,8	5,0	0,5	1,6	16	10,1

Tabell 12e: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Chlorella*-ekstrakt (5g) fra mod. Folch

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,7341	10,7547	0,0206
1.2		10,8520	10,8724	0,0204
1.1	PL-fase	10,9234	10,9252	0,0018
1.2		10,8342	10,8358	0,0016
2.1	Acetonfase	10,8718	10,8903	0,0185
2.2		10,8517	10,8702	0,0185
2.1	PL-fase	10,8945	10,8960	0,0015
2.2		10,8352	10,8368	0,0016

Tabell 13e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetontfelling for etanolekstrakt, *Chlorella*, i større skala. Tabell 14e viser data for utveiling av Kimaxrørene.

Tabell 13e: Rådata fra acetontfelling på *Chlorella*-ekstrakt (5g) fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	272,3	10,0	2,0	38,7	193,5	71,1
1.2		272,3	10,0	2,0	38,5	192,5	70,7
1.1	PL-fase	272,3	5,5	0,5	6,2	68,2	25,0
1.2		272,3	5,5	0,5	6,0	66,0	24,2
2.1	Acetonfase	275,1	10,0	2,0	41,0	205	74,5
2.2		275,1	10,0	2,0	39,0	199,5	72,5
2.1	PL-fase	275,1	5,5	0,5	4,7	51,7	18,8
2.2		275,1	5,5	0,5	4,7	51,7	18,8

Tabell 14e: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, ved acetontfelling på *Chlorella*-ekstrakt (5g) fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	11,1325	11,1712	0,0387
1.2		10,8746	10,9131	0,0385
1.1	PL-fase	10,9122	10,9184	0,0062
1.2		10,8214	10,9274	0,006
2.1	Acetonfase	10,7374	10,7784	0,041
2.2		10,8087	10,8486	0,0399
2.1	PL-fase	10,9113	10,9160	0,0047
2.2		11,0787	11,0834	0,0047

Tabell 15e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetonutfelling for modifisert Folch-ekstrakt, *Spirulina*, i større skala. Tabell 16e viser data for utveiging av Kimaxrørene.

Tabell 15e: Rådata fra acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt (5g) fra modifisert Folch

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetonfase	213,5	10,5	2,0	30,7	161,2	75,5
1.2		213,5	10,5	2,0	22,1	116	54,3
1.1	PL-fase	213,5	5,0	0,5	2,0	20	9,4
1.2		213,5	5,0	0,5	2,0	20	9,4
2.1	Acetonfase	217,9	10,0	2,0	29,7	148,5	68,2
2.2		217,9	10,0	2,0	22,3	111,5	51,2
2.1	PL-fase	217,9	5,5	0,5	2,9	31,9	14,6
2.2		217,9	5,5	0,5	2,9	31,9	14,6

Tabell 16e: Resultater fra utveiging av Kimaxrør, ved acetonutfelling på *Spirulina*-ekstrakt (5g) fra mod. Folch

Parallell	Fase	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetonfase	10,5678	10,5985	0,0307
1.2		10,9016	10,9237	0,0221
1.1	PL-fase	11,0051	11,0071	0,002
1.2		10,8799	10,8819	0,002
2.1	Acetonfase	10,8681	10,8978	0,0297
2.2		10,777	10,7993	0,0223
2.1	PL-fase	12,0379	12,0408	0,0029
2.2		10,7418	10,7447	0,0029

Tabell 17e viser eksperimentelle data for bestemmelse av lipidinnhold i de to fraksjonene oppnådd med acetontfelling for etanolekstrakt, *Spirulina*, i større skala. Tabell 18e viser data for utveining av Kimaxrørene.

Tabell 17e: Rådata fra acetontfelling på *Spirulina*-ekstrakt (5g) fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt ekstrakt (mg)	Volum fase (ml)	Volum inndampet kloroform (ml)	Vekt inndampet fett (mg)	Lipidinnhold (mg)	Lipidinnhold (%)
1.1	Acetontfase	78,2	4,8	1,0	9,6	46,1	58,9
1.2		78,2	4,8	1,0	9,4	45,1	57,7
1.1	PL-fase	78,2	5,45	0,5	3,0	32,7	41,8
1.2		78,2	5,45	0,5	3,0	32,7	41,8
2.1	Acetontfase	88,7	5,0	1,0	9,1	45,5	51,3
2.2		88,7	5,0	1,0	9,2	46	51,9
2.1	PL-fase	88,7	5,25	0,5	2,7	28,35	32,0
2.2		88,7	5,25	0,5	2,8	29,4	33,1

Tabell 18e: Resultater fra utveining av Kimaxrør, ved acetontfelling på *Spirulina*-ekstrakt (5g) fra EtOH

Parallell	Fase	Vekt rør u/prøve (g)	Vekt rør m/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	Acetontfase	10,9671	10,9767	0,0096
1.2		10,8681	10,8775	0,0094
1.1	PL-fase	10,982	10,985	0,003
1.2		10,8414	10,8444	0,003
2.1	Acetontfase	10,7555	10,7646	0,0091
2.2		10,9012	10,9104	0,0092
2.1	PL-fase	10,904	10,9067	0,0027
2.2		10,8844	10,8872	0,0028

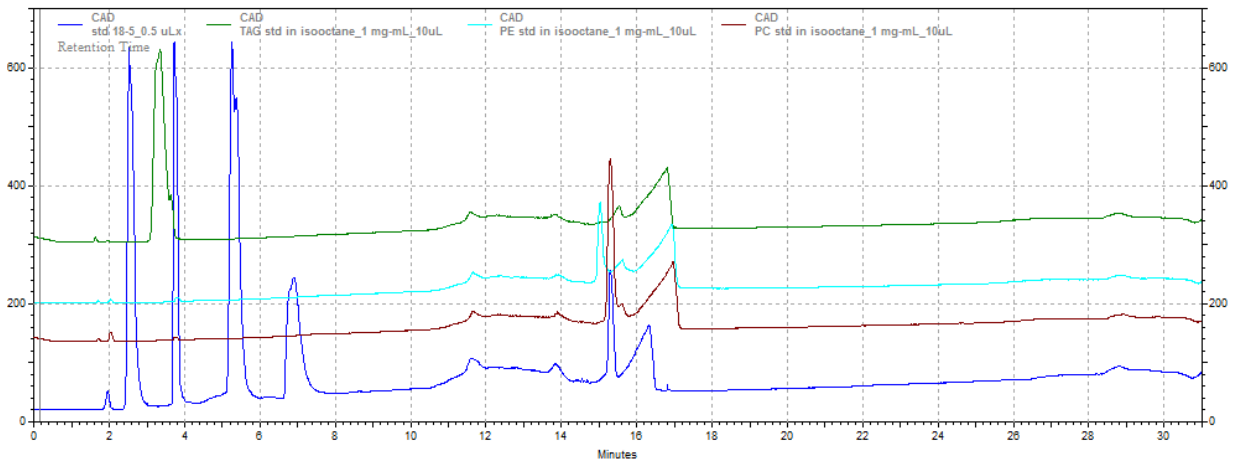
Vedlegg F: Rådata HPLC-CAD

Metoden med ulike parametere som ble kjørt på HPLC-CAD er presentert i tabell 1f. Videre er kromatogrammer i liten og større skala samt integrasjonstabeller presentert.

Tabell 1f: HPLC-CAD- metode med ulike parametere

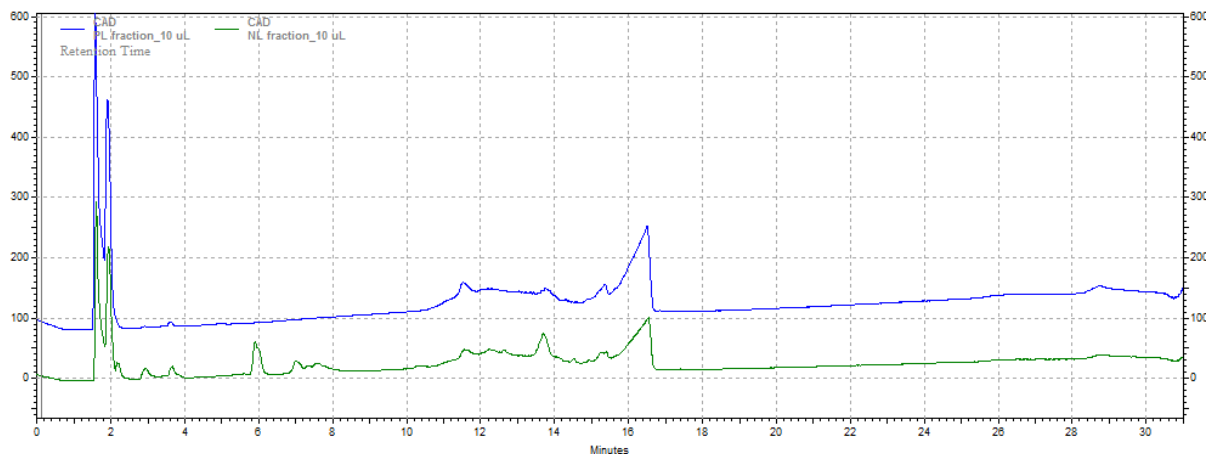
Gas	35 psi via nitrogen generator				
Filter	4				
Nebulizer temperature	30°C				
Range	500 pA				
Mobile phase A	isooctane				
Mobile phase B	acetone/dichloromethane (1 : 2)				
Mobile phase C	isopropanol/methanol/acetic acid-ethanolamine water (7.5 mM ethanolamine and 7.5 mM acetic acid) (85 : 7.5 : 7.5)				
Sample solvent	Isooctane (or chloroform)				
Sample concentration	1 mg/mL				
Gradient	time (min)	% A	% B	% C	Flow (mL/min)
	0.0	100	0	0	1.6
	1.0	90	10	0	1.6
	8.0	70	30	0	1.6
	11.0	40	50	10	1.6
	13.0	39	0	61	2.0
	26.3	40	0	60	2.0
	28.4	0	100	0	2.0
30.9	100	0	0	2.0	
Column	LichroCART 125-4 diol 5 µm, LiChrosphere 100				
Pre-column (guard)	LichroCART 4-4 diol 5 µm				
Column temperature	45°C				
Injection volume	5 – 20 µL				
Source	Oterhals et al. (2010) – NOFIMA				
Application	Lipid classes				

Figur 1f viser de ulike standardene som ble kjørt. Standardene er 18-5c, TAG, PE (fosfatidyletanolamin) og PC (fosfatidylkolin). Standard 18-5c inneholder fem lipidklasser, nemlig kolesterolester (etter 2 min), TAG (triacylglyserol) (ved 4 min), kolesterol (etter 5 min), FFA (frie fettsyrer) (ved 7 min) og PL (fosfolipider) (ved 15 min).



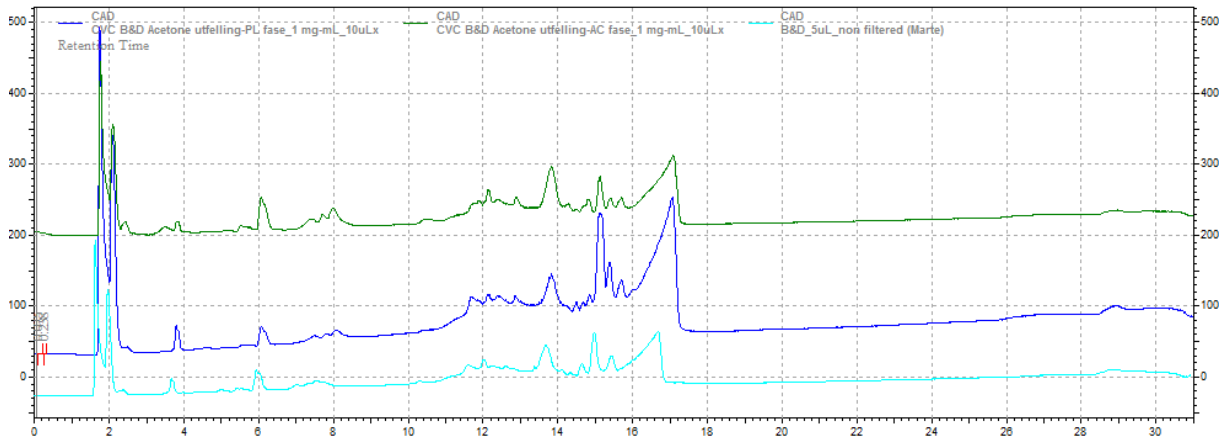
Figur 1f: Kromatogrammer til ulike standarder. Blå linje tilsvare 18-5c, brun linje tilsvare PC, turkis linje tilsvare PE og grønn linje tilsvare TAG. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

Figur 2f viser kromatogrammer fra SPE (fast fase ekstraksjon).

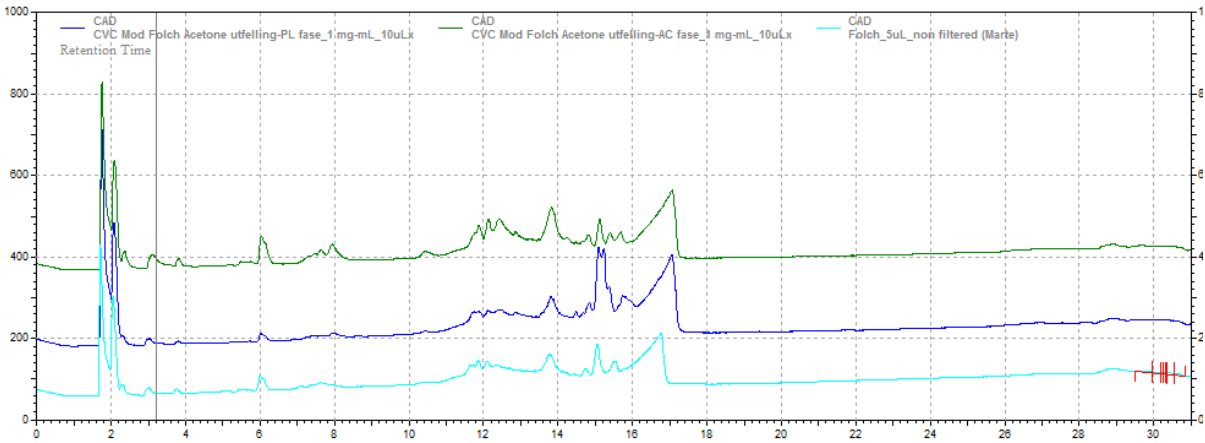


Figur 2f: Kromatogrammer fra SPE. Grønn linje tilsvare nøytral lipidfraksjon, mens blå linje tilsvare fosfolipidfraksjon. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

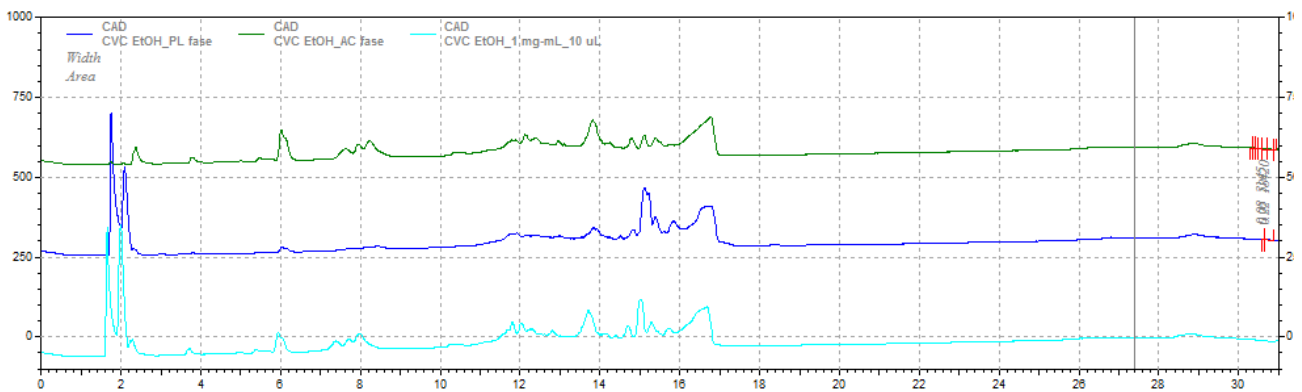
Kromatogrammer for *Chlorella*-ekstrakter (B&D, modifisert Folch og etanol) samt fraksjoner fra acetontutfelling er vist i figur 3f, 4f og 5f.



Figur 3f: Kromatogrammer fra B&D. Turkis linje tilsvarer B&D-ekstrakt, blå linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

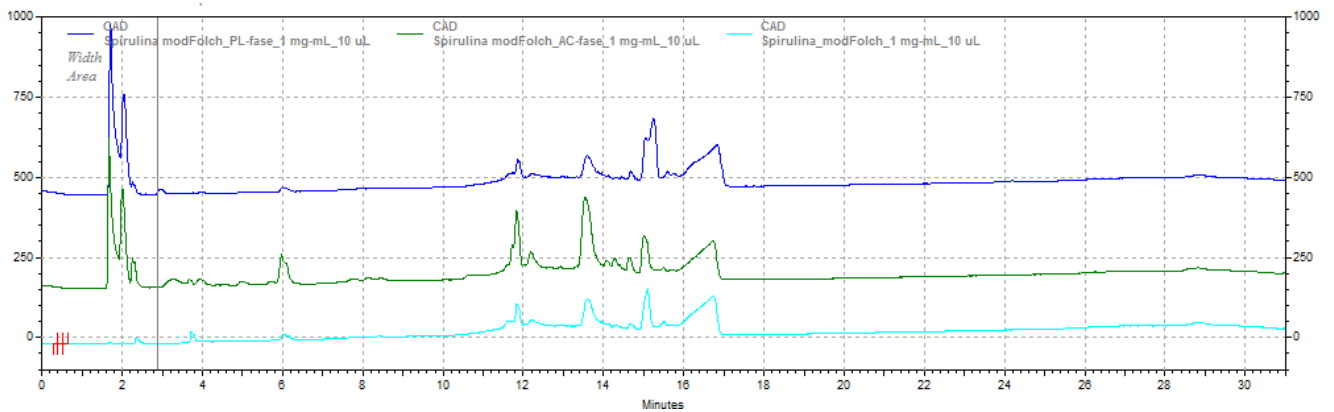


Figur 4f: Kromatogrammer fra modifisert Folch. Turkis linje tilsvarer mod.Folch-ekstrakt, blå linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

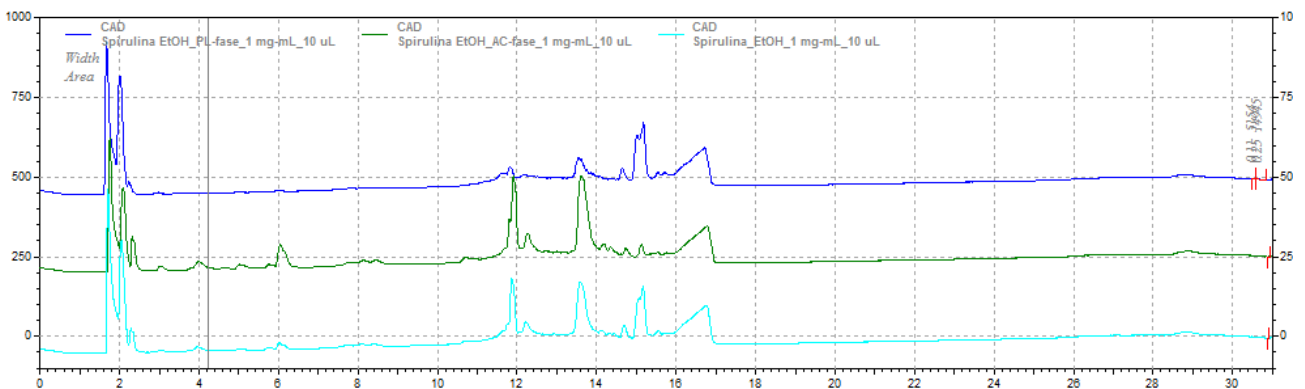


Figur 5f: Kromatogrammer fra etanolekstraksjon. Turkis linje tilsvarer etanolekstrakt, blå linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

Kromatogrammer for *Spirulina*-ekstrakter (modifisert Folch og etanol) samt fraksjoner fra acetonutfelling er vist i figur 6f og 7f.

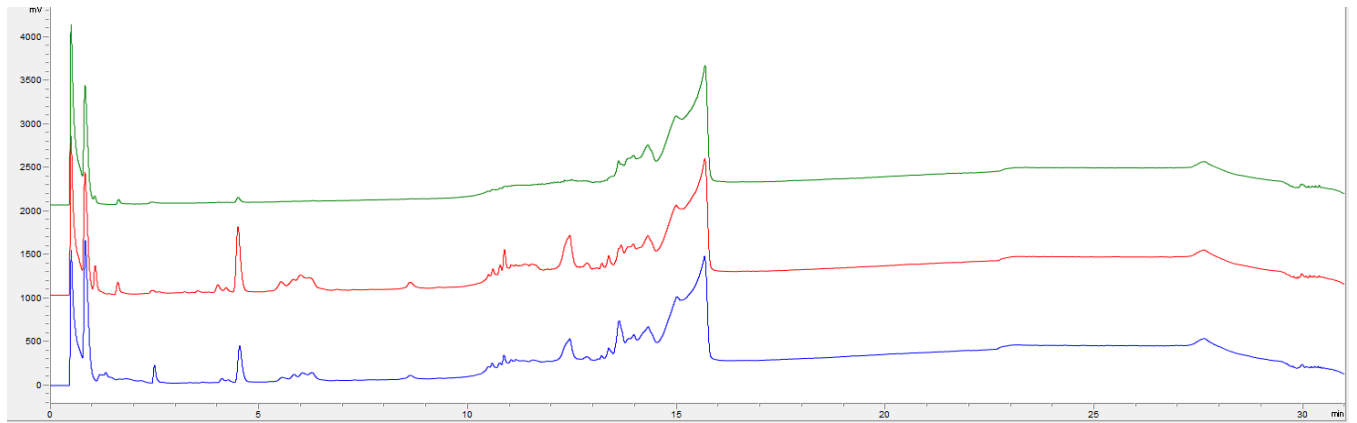


Figur 6f: Kromatogrammer fra modifisert Folch. Turkis linje tilsvarer mod.Folch-ekstrakt (uten de høye toppene i starten), blå linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

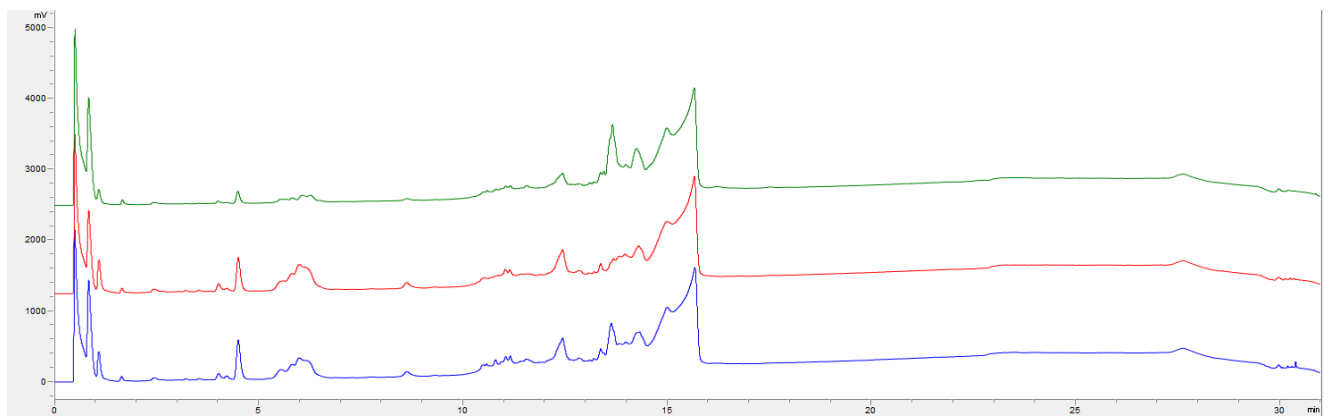


Figur 7f: Kromatogrammer fra etanolekstraksjon. Turkis linje tilsvarer etanolekstrakt, blå linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

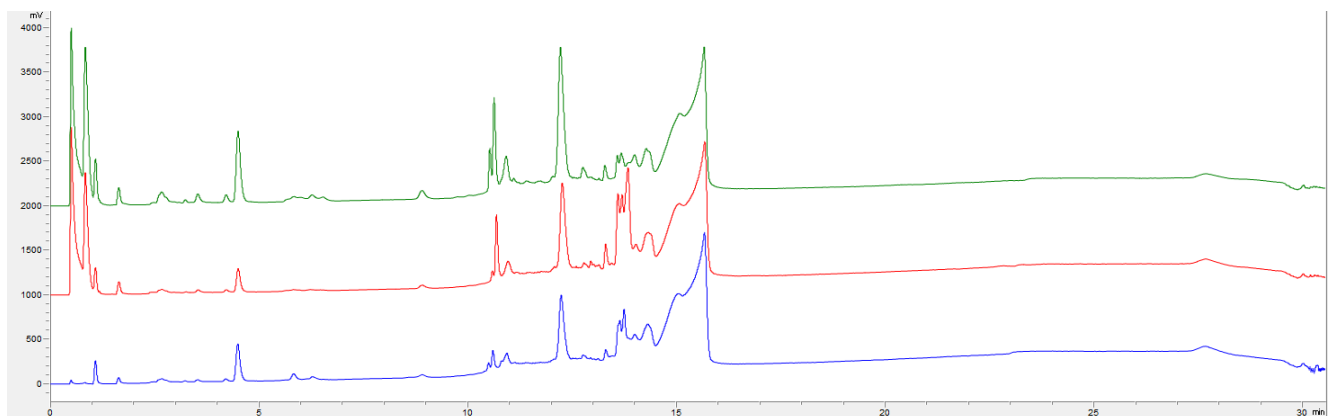
Tilsvarende kromatogrammer i større skala for både *Chlorella* og *Spirulina* er presentert i figur 8f, 9f, 10f og 11f. Programvaren for databehandling ble byttet mellom HPLC-kjøringene i liten og i større skala. Derfor ser kromatogrammene litt annerledes ut. Toppene eluerer heller ikke til eksakt samme tidspunkter, da kjøringene er gjort med flere måneders mellomrom og løsemiddel C har blitt laget og fylt på, i tillegg til at prekolonne og kolonne har blitt byttet ut. Derfor ble også standard 18-5c kjørt på nytt (figur 12f), for å kunne bruke i identifiseringsarbeidet av toppene.



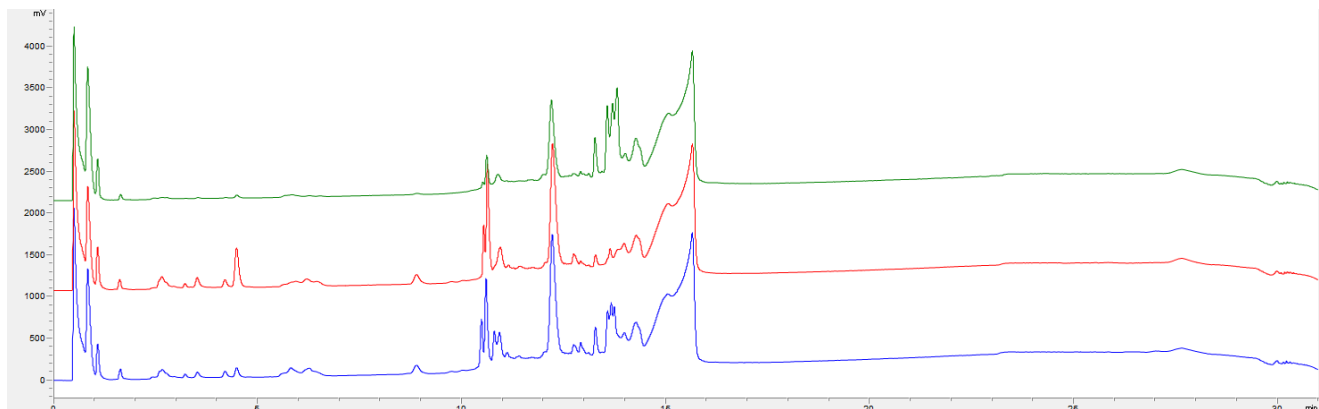
Figur 8f: Kromatogrammer fra modifisert Folch, *Chlorella*. Blå linje tilsvarer ekstrakt, rød linje tilsvarer acetonfase og grønn linje tilsvarer PL-fase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.



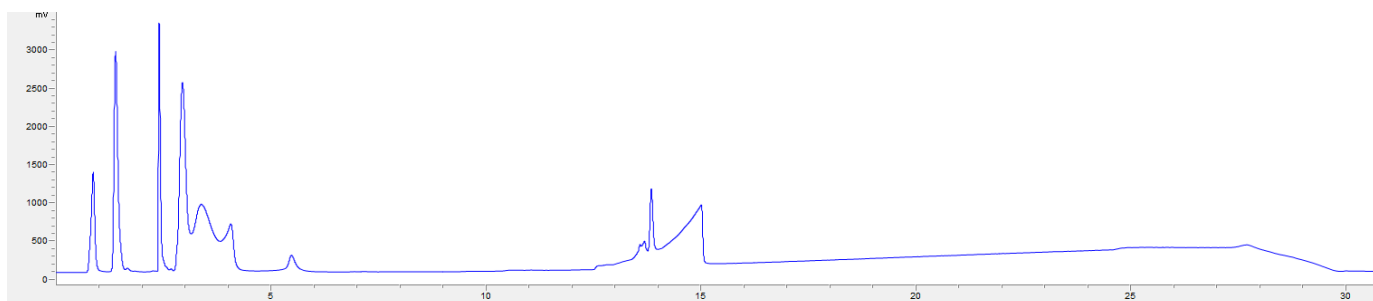
Figur 9f: Kromatogrammer fra etanolekstraksjon, *Chlorella*. Blå linje tilsvarer ekstrakt, rød linje tilsvarer acetonfase og grønn linje tilsvarer PL-fase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.



Figur 10f: Kromatogrammer fra modifisert Folch, *Spirulina*. Blå linje tilsvarer ekstrakt (uten de høye toppene i starten), rød linje tilsvarer PL-fase og grønn linje tilsvarer acetonfase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.



Figur 11f: Kromatogrammer fra etanolekstraksjon, *Spirulina*. Blå linje tilsvarer ekstrakt, rød linje tilsvarer acetonfase og grønn linje tilsvarer PL-fase fra acetonutfelling. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.



Figur 12f: Standard 18-5c. Standarden skal inneholde de samme fem lipidklasser som i figur 1. Enhet x-akse er minutter og enhet y-akse er mVolt.

Integrasjonstabeller for ekstrakter og fosfolipidfraksjoner i liten skala, for *Chlorella* og *Spirulina*, er presentert nedenfor.

Tabell 2f: Integrasjonstabell for *Chlorella* ekstrahert med B&D samt PL-fase. Toppene som tilsvarer fosfolipider er uthevet i fet skrift.

Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)	Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)
B&D	1	1,695	55,73	B&D (PL)	1	1,717	62,70
	2	3,726	2,58		2	3,763	2,28
	3	5,056	0,67		3	6,035	2,86
	4	5,483	0,17		4	8,026	2,16
	5	6,001	5,71		5	12,128	0,66
	6	7,605	4,91		6	12,393	0,82
	7	12,073	1,23		7	12,829	0,75
	8	12,686	0,32		8	13,794	6,85
	9	13,726	11,64		9	14,467	0,62
	10	14,392	0,36		10	14,632	0,28
	11	15,044	16,66		11	14,819	0,55
-	-	-	12		15,089	19,45	

Tabell 3f: Integrasjonstabell for *Chlorella* ekstrahert med modifisert Folch samt PL-fase. Toppene som tilsvare fosfolipider er uthevet i fet skrift.

Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)	Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)
Mod.F	1	1,683	61,66	Mod.F (PL)	1	1,710	58,37
	2	2,983	1,89		2	2,998	1,05
	3	3,745	0,93		3	3,778	0,41
	4	5,970	5,31		4	5,993	1,03
	5	7,610	4,64		5	7,931	2,09
	6	11,814	1,16		6	12,414	3,15
	7	12,056	1,35		7	12,848	0,65
	8	12,329	0,38		8	13,777	5,95
	9	13,772	8,31		9	14,454	0,57
	10	14,379	0,42		10	14,811	1,14
	11	15,026	13,95		11	15,061	21,38
	-	-	-		12	15,704	4,22

Tabell 4f: Integrasjonstabell for *Chlorella* ekstrahert med etanol samt PL-fase. Toppene som tilsvare fosfolipider er uthevet i fet skrift.

Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)	Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)
EtOH	1	1,958	52,49	EtOH (PL)	1	1,715	60,84
	2	3,690	1,07		2	3,003	0,29
	3	5,353	0,70		3	3,775	0,27
	4	5,901	5,42		4	5,995	1,53
	5	7,933	11,38		5	8,369	1,83
	6	10,258	0,35		6	12,133	0,98
	7	11,766	1,25		7	12,928	0,43
	8	11,994	1,43		8	13,799	4,68
	9	12,263	0,85		9	14,472	0,42
	10	13,677	8,66		10	14,786	1,59
	11	14,142	0,41		11	15,076	23,08
	12	14,366	0,26		12	15,569	0,16
	13	14,667	2,25		13	15,801	3,68
	14	14,981	11,52		-	-	-
	15	15,696	1,12		-	-	-

Tabell 5f: Integrasjonstabell for *Spirulina* ekstrahert med modifisert Folch samt PL-fase. Toppene som tilsvarer fosfolipider er uthevet i fet skrift.

Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)	Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)
Mod.F	1	11,809	13,39	Mod.F (PL)	1	11,819	6,43
	2	12,174	2,45		2	12,179	1,70
	3	13,566	40,80		3	13,549	24,22
	4	14,632	4,49		4	14,632	3,90
	5	15,077	38,87		5	15,214	63,75

Tabell 6f: Integrasjonstabell for *Spirulina* ekstrahert med etanol samt PL-fase. Toppene som tilsvarer fosfolipider er uthevet i fet skrift.

Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)	Ekstrakt	Toppnr.	Retensjonstid (min)	Areal (%)
EtOH	1	1,678	51,38	EtOH (PL)	1	1,632	65,72
	2	3,038	0,46		2	2,936	0,36
	3	3,921	1,38		3	3,703	0,13
	4	4,960	0,37		4	5,925	0,18
	5	5,988	1,72		5	11,778	1,52
	6	8,366	1,45		6	12,171	0,44
	7	11,833	9,95		7	13,507	6,35
	8	12,193	2,27		8	14,602	2,37
	9	13,559	15,62		9	15,142	22,36
	10	14,084	0,47		10	15,684	0,40
	11	14,299	0,53		-	-	-
	12	14,666	1,84		-	-	-
	13	15,141	12,14		-	-	-
	14	15,524	0,40		-	-	-

Integrasjonstabeller for ekstrakter og fosfolipidfraksjoner i større skala, for *Chlorella* og *Spirulina*, er presentert nedenfor.

Tabell 7f: Integrasjonstabell for *Chlorella* ekstrahert med modifisert Folch i større skala. Topp 11 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.833	23832.2	1642.6	0.2418	43.288	2.115
2	1.323	1689.1	115.4	0.244	3.068	1.306
3	2.495	940.7	209.3	0.0749	1.709	0.74
4	4.109	892.2	71.7	0.2073	1.621	0.358
5	4.536	3203.3	442	0.1208	5.818	0.595
6	6.26	4690.2	116.9	0.6686	8.519	4.751
7	8.635	620.8	61.6	0.168	1.128	0.766
8	10.588	802.6	94	0.1424	1.458	1.802
9	10.872	1232.2	146.8	0.1399	2.238	1.635
10	12.445	3805.6	267.5	0.2371	6.912	1.941
11	13.628	13346.5	430.1	0.5171	24.242	0.295

Tabell 8f: Integrasjonstabell for PL-fase fra acetonutfelling av modifisert Folch-ekstrakt, *Chlorella*, i større skala. Topp 4 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.493	26184.1	2097.2	0.2081	72.119	0.126
2	1.639	450.5	79.9	0.094	1.241	1.139
3	4.499	687.3	84.5	0.1355	1.893	0.752
4	14.322	8985.1	248.7	0.6021	24.748	4.95

Tabell 9f: Integrasjonstabell for *Chlorella* ekstrahert med etanol i større skala. Topp 11 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.493	30224.5	2168.5	0.2323	41.961	0.111
2	1.639	298.5	73.5	0.0677	0.414	1.233
3	2.423	871	75.6	0.192	1.209	0.544
4	4.013	1953.6	131	0.2485	2.712	0.353
5	4.495	4294.3	577.7	0.1239	5.962	0.749
6	6.001	10068.4	273.5	0.6135	13.978	1.222
7	8.627	1131.7	94.3	0.2001	1.571	0.564
8	11.163	4139.7	132.9	0.5193	5.747	25.675
9	12.443	5258.3	352.1	0.2489	7.300	1.799
10	12.842	633.8	71.6	0.1476	0.880	3.029
11	13.638	12996.3	488.6	0.4433	18.043	0.393

Tabell 10f: Integrasjonstabell for PL-fase fra acetonutfelling av etanolekstrakt, *Chlorella*, i større skala. Topp 8 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.494	30904.3	2505.8	0.2056	48.891	7.89E-2
2	1.661	437.5	87.2	0.0836	0.692	1.734
3	2.416	740.7	58.1	0.2124	1.172	0.533
4	4.487	1414.4	187.9	0.1255	2.238	0.832
5	6.256	4389.5	104.7	0.6985	6.944	5.115
6	11.167	3238.4	72.1	0.7489	5.123	10.396
7	12.448	3173.8	199.5	0.2652	5.021	1.796
8	13.67	18912.5	804.4	0.3918	29.920	0.53

Tabell 11f: Integrasjonstabell for *Spirulina* ekstrahert med modifisert Folch i større skala. Topp 6 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	4.483	2860.2	427.5	0.1115	9.519	0.806
2	5.822	659.5	81.3	0.1351	2.195	1.431
3	8.894	1048.4	68.3	0.2559	3.489	1.202
4	10.592	3688.7	244.4	0.2516	12.277	0.441
5	12.226	6604.5	749.1	0.1469	21.981	0.704
6	13.735	15184.7	540.7	0.468	50.538	0.554

Tabell 12f: Integrasjonstabell for PL-fase fra acetonutfelling av modifisert Folch-ekstrakt, *Spirulina*, i større skala. Topp 6 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	4.49	2258.8	293.5	0.1283	5.210	0.676
2	8.902	583.1	60.3	0.1612	1.345	1.247
3	10.676	4926.6	729.8	0.1125	11.363	0.51
4	12.252	8266	958.7	0.1437	19.065	0.667
5	12.935	1902.3	111.9	0.2833	4.387	0.863
6	13.825	25421.1	1097.8	0.386	58.631	1.446

Tabell 13f: Integrasjonstabell for *Spirulina* ekstrahert med etanol i større skala. Topp 13 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
3	2.657	1599.4	121.5	0.2195	1.894	0.972
4	3.222	397.1	71.8	0.0922	0.470	1.212
5	3.521	860.1	96.8	0.1481	1.018	1.07
6	4.484	2155.2	149.6	0.2401	2.552	2.409
7	5.815	5110.1	132.1	0.645	6.051	0.353
8	8.891	1410.1	122.2	0.1923	1.670	0.789
9	10.601	11204.9	1044.5	0.1788	13.268	0.637
10	11.119	530.5	96.7	0.0914	0.628	1.508
11	12.225	14504.5	1476.2	0.1638	17.176	0.79
12	12.923	2240	165.7	0.2253	2.652	1.344
13	13.672	17523.8	623.6	0.4683	20.751	0.547

Tabell 14f: Integrasjonstabell for PL-fase fra acetontfelling av etanolekstrakt, *Spirulina*, i større skala. Topp 7 tilsvarer fosfolipid.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.494	28961.1	2091.2	0.2308	43.926	0.108
2	1.641	290.2	80.8	0.0598	0.440	2.712
3	4.488	466	57.7	0.1345	0.707	1.481
4	10.618	2826.6	390.5	0.1206	4.287	0.545
5	12.204	8896.3	951.8	0.1558	13.493	0.872
6	12.921	1174.6	77.6	0.2524	1.782	1.172
7	13.817	23316.8	1004	0.3871	35.365	1.576

Vedlegg G: Rådata GC-FID

Fettsyresammensetningen til lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina* ble analysert med GC-FID. Fettsyrene ble identifisert ved å sammenligne med standarder. Arealene til hver topp er funnet ved integrasjon, og innholdet av hver fettsyre er funnet i % av den totale sammensetningen. En excel-fil med innholdet av fettsyrene i % ble tilsendt meg. Sammensetningen av ukjente, mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer er presentert i tabell 1g, sammensetningen av omega-3-fettsyrer er presentert i tabell 2g og sammensetningen av omega-6-fettsyrer er vist i tabell 3g.

Tabell 1g: Sammensetning av ukjente, mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer i lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*. Verdiene utgjør summen av alle mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer i ekstraktene.

Ekstrakt	Parallell	Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer			
		Ukjente	Mettede	Enumettede	Flerumettede
Mod.Folch <i>Chlorella</i>	1	19,23	16,26	22,65	41,86
	2	19,20	16,12	22,98	41,70
EtOH <i>Chlorella</i>	1	15,88	17,92	22,12	44,08
	2	14,68	17,35	22,44	45,53
B&D <i>Chlorella</i>	1	16,24	20,38	21,73	41,65
	2	15,21	20,10	22,28	42,41
Mod.Folch <i>Spirulina</i>	1	12,25	41,65	11,53	34,57
	2	12,07	41,68	11,97	34,28
EtOH <i>Spirulina</i>	1	17,78	32,32	12,19	37,71
	2	16,04	32,45	12,73	38,78

Tabell 2g: Sammensetning av omega-3-fettsyrer i lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*.

Ekstrakt	Parallell	Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer							
		C18:3	C18:4	C20:3	C20:4	C20:5	C22:5	C22:6	Sum
Mod.Folch <i>Chlorella</i>	1	24,60	0,19	0,14	0,05	0,08	-	0,14	25,2
	2	24,62	0,10	0,08	-	0,09	-	0,15	25,04
EtOH <i>Chlorella</i>	1	25,16	0,06	-	0,11	0,11	-	0,10	25,54
	2	25,43	0,06	0,06	0,13	0,20	-	0,21	26,09
B&D <i>Chlorella</i>	1	21,49	0,09	0,10	0,04	0,08	-	0,10	21,9
	2	21,99	0,10	0,04	0,05	0,16	0,04	0,27	22,65
Mod.Folch <i>Spirulina</i>	1	0,25	0,13	-	0,07	0,15	-	0,12	0,72
	2	0,21	0,13	0,03	0,08	0,16	-	0,14	0,75
EtOH <i>Spirulina</i>	1	0,29	0,49	-	-	-	-	-	0,78
	2	0,30	0,14	0,13	-	-	-	-	0,57

Tabell 3g: Sammensetning av omega-6-fettsyrer i lipidekstrakter fra *Chlorella* og *Spirulina*.

Ekstrakt	Parallell	Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer					
		C18:2	C18:3	C20:2	C20:3	C20:4	Sum
Mod.Folch <i>Chlorella</i>	1	16,34	0,16	0,08	0,03	0,05	16,66
	2	16,43	0,15	0,08	-	-	16,66
EtOH <i>Chlorella</i>	1	18,40	0,07	0,07	-	-	18,54
	2	19,31	-	0,06	0,07	-	19,44
B&D <i>Chlorella</i>	1	19,62	0,04	0,09	-	-	19,75
	2	19,65	0,04	0,07	-	-	19,76
Mod.Folch <i>Spirulina</i>	1	16,50	16,90	0,22	0,16	0,07	33,85
	2	16,26	16,81	0,22	0,16	0,08	33,53
EtOH <i>Spirulina</i>	1	12,80	23,93	-	0,20	-	36,93
	2	13,06	24,75	0,20	0,20	-	38,21

Vedlegg H: Rådata proteinhydrolyse

Proteinhydrolyse ble utført før og etter etanolekstraksjon på biomasse fra *Chlorella*. Eksperimentelle data fra proteinhydrolysen der hydrolyse er kjørt før ekstraksjon er presentert i tabell 1h. Tabell 2h viser data for utveining av dramsglass og digler, til bestemmelse av tørrstoffmengde i hydrolysat og sediment.

Tabell 1h: Oversikt over mengde tilsetninger før hydrolyse samt vekt av vannfase og sedimenter etter hydrolysing og sentrifugering. Tabellen viser også %-mengde tørrstoff i vannfase samt hvor mange % av den totale mengden tørrstoff i prøven som befant seg i vannfasen. Resultatene gjelder proteinhydrolyse før etanolekstraksjon.

Prøve	Parallell	Før hydrolyse			Etter hydrolyse			
		Vekt alger (g)	Vekt vann (g)	Vekt enzym (g)	Vekt vannfase (g)	Vekt sedimenter (g)	% tørrstoff i vannfase	% tørrstoff per total mengde tørrstoff
Null (-inakt.)	1	3,33	27,03	-	20,59	9,8	1,02	6,3
	2	3,39	27,03	-	20,73	9,79	0,97	5,9
Null (+inakt.)	1	3,02	27,00	-	17,5	7,46	1,32	7,7
	2	3,02	27,00	-	21,04	8,43	1,37	9,5
Kontroll	1	3,15	27,04	-	20,94	9,24	1,87	12,4
	2	3,12	27,02	-	20,3	8,75	1,84	12,0
Enzym	1	3,26	27,05	0,64	21,29	8,43	6,11	39,9
	2	3,27	27,07	0,60	22,03	8,61	5,91	39,8
Enzym+ ultralyd	1	3,18	27,01	0,60	21,64	8,85	5,9	40,1
	2	3,33	27,04	0,60	21,62	9,08	6,06	39,4

% tørrstoff i vannfase er beregnet slik:

$$(\text{Vekt dramsglass etter tørking (g)} * 100) / \text{Vekt dramsglass m/prøve før tørking (g)} \quad (\text{H-1})$$

Vekt dramsglass etter tørking tilsvarer differanse etter tørking (g), mens vekt dramsglass m/prøve før tørking tilsvarer differanse (g) i tabell 2h.

% tørrstoff i vannfase av total mengde tørrstoff er beregnet slik:

$$(\text{Vekt dramsglass etter tørking (g)} * \text{vekt vannfase (g)} * 100) / (\text{vekt dramsglass m/prøve før tørking} * \text{vekt alger (g)}) \quad (\text{H-2})$$

Tabell 2h: Resultater fra utveiling av dramsglass og digler før og etter tørking. Vannfase (W) ble overført til dramsglass, mens bunnfall ble overført til digler. Tabellen gjelder proteinhydrolyse før etanolekstraksjon.

Prøve	Parallell	Vekt u/prøve (g)	Vekt m/prøve (g)	Differanse (g)	Vekt etter tørking (g)	Differanse etter tørking (g)
Nullprøve (-mikro)	W1.1	11,6441	13,6462	2,0021	11,6641	0,02
	W1.2	11,4818	13,4855	2,0037	11,5026	0,0208
	W2.1	11,4859	13,4845	1,9986	11,5052	0,0193
	W2.2	11,5623	13,5681	2,0058	11,5819	0,0196
	122	28,0736	28,573	0,4994	38,2231	0,1495
	109	28,4226	28,9203	0,4977	28,5656	0,143
	16B	23,8968	24,3977	0,5009	24,0373	0,1405
	126	28,0063	28,5055	0,4992	28,1432	0,1369
Nullprøve (+mikro)	W1.1	13,0048	15,0058	2,001	13,0309	0,0261
	W1.2	11,5034	13,5092	2,0058	11,5303	0,0269
	W2.1	11,447	13,4433	1,9963	11,474	0,027
	W2.2	11,4425	13,4445	2,002	11,4703	0,0278
	D11	16,6209	17,1455	0,5246	16,7639	0,143
	D13	17,0265	17,525	0,4985	17,1623	0,1358
	D25	19,1949	19,6895	0,4946	19,329	0,1341
	D26	18,5359	19,039	0,5031	18,6749	0,139
Kontroll	W1.1	11,1235	13,1311	2,0076	11,1587	0,0352
	W1.2	11,4654	13,4693	2,0039	11,5052	0,0398
	W2.1	11,4932	13,5016	2,0084	11,5306	0,0374
	W2.2	11,4691	13,4691	2,0	11,5054	0,0363
	D17	17,4529	17,9496	0,4967	17,5892	0,1363
	D9	17,9724	18,4749	0,5025	18,1074	0,135
	D10	17,5611	18,0615	0,5004	17,7043	0,1432
	Blank	13,6701	14,1725	0,5024	13,8112	0,1411
Enzym	W1.1	11,383	13,3914	2,0084	11,5056	0,1226
	W1.2	11,4917	13,4922	2,0005	11,614	0,1223
	W2.1	11,6188	13,6187	1,9999	11,738	0,1192
	W2.2	11,4564	13,4593	2,0029	11,5738	0,1174
	128	20,738	21,2364	0,4984	20,8584	0,1204
	134	21,3679	21,8672	0,4993	21,4804	0,1125
	140	19,2869	19,7841	0,4972	19,4063	0,1194
	A13	27,6205	28,1213	0,5008	27,7397	0,1192
Ultralyd + enzym	W1.1	11,6209	13,6289	2,008	11,7394	0,1185
	W1.2	11,44	13,4492	2,0092	11,5581	0,1181
	W2.1	13,0129	15,0164	2,0035	13,1333	0,1204
	W2.2	11,382	13,3849	2,0029	11,5042	0,1222
	141	22,6165	23,1182	0,5017	22,721	0,1045
	A32	25,6017	26,1027	0,501	25,7129	0,1112
	C9	19,8536	20,3589	0,5053	19,9579	0,1043
	139	19,5367	20,0354	0,4987	19,6384	0,1017

Eksperimentelle data fra proteinhydrolysen der ekstraksjon ble kjørt før hydrolyse er presentert i tabell 3h. Tabell 4h viser data for utveiling av dramsglass og digler, til bestemmelse av tørrstoffmengde i hydrolysat og sediment. Beregninger er utført som vist i ligning H-1 og H-2.

Tabell 3h: Oversikt over mengde tilsetninger før hydrolyse samt vekt av vannfase og sedimenter etter hydrolysering og sentrifugering. Tabellen viser også %-mengde tørrstoff i vannfase samt hvor mange % av den totale mengden tørrstoff i prøven som befant seg i vannfasen. Resultatene gjelder proteinhydrolyse etter etanolekstraksjon.

Prøve	Parallell	Før hydrolyse			Etter hydrolyse			
		Vekt alger (g)	Vekt vann (g)	Vekt enzym (g)	Vekt vannfase (g)	Vekt sedimenter (g)	% tørrstoff i vannfase	% tørrstoff per total mengde tørrstoff
Enzym	1	3,04	27,06	0,62	21,53	8,69	6,16	43,61
	2	3,08	27,02	0,61	21,63	8,78	6,20	43,50

Tabell 4h: Resultater fra utveiling av dramsglass og digler før og etter tørking. Vannfase (W) ble overført til dramsglass, mens bunnfall ble overført til digler. Tabellen gjelder proteinhydrolyse etter etanolekstraksjon.

Prøve	Parallell	Vekt u/prøve (g)	Vekt m/prøve (g)	Differanse (g)	Vekt etter tørking (g)	Differanse etter tørking (g)
Enzym	W1.1	11,4352	13,4452	2,01	11,5592	0,124
	W1.2	11,4402	13,4443	2,0041	11,5636	0,1234
	W2.1	11,4663	13,4848	2,0185	11,5917	0,1254
	W2.2	11,3806	13,3905	2,0099	11,5048	0,1242
	D6	17,6723	18,1823	0,51	17,781	0,1087
	D29	17,8083	18,3161	0,5078	17,9245	0,1162
	D2	16,3357	16,8392	0,5035	16,4424	0,1067
	D1	17,6208	18,1272	0,5064	17,7342	0,1134

Proteininnholdet i frysetørkede hydrolysater fra hydrolyse før ekstraksjon ble målt ved hjelp av CN-analyse. Proteininnholdet i *Chlorella*-pulver ble også målt. Eksperimentelle data fra disse analysene er vist i tabell 5h.

Tabell 5h: Eksperimentelle data fra CN-analyse. Nullprøve 1 tilsvarer nullprøve med inaktivering.

Prøve	Parallell	Innveid (mg)	µgC/kapsel	µgC/mg innveid	µgN/kapsel	µgN/mg innveid	% protein
Nullprøve 1	1	2,9164	1033,52	354,382	247,929	85,012	53,13
	2	2,8576	1007,705	352,640	240,926	84,311	52,69
	3	2,0366	732,805	359,818	172,322	84,613	52,89
	4	2,5244	899,576	356,352	213,961	84,757	52,97
Kontroll	1	2,4373	862,733	353,971	206,622	84,365	52,73
	2	3,0957	1085,725	350,720	262,47	84,785	52,99
	3	2,3011	818,17	355,556	194,576	84,558	52,85
	4	3,0052	1054,716	350,964	254,052	84,537	52,84
Enzym	1	2,5946	1088,984	419,712	256,655	98,919	61,82
	2	3,6069	1487,779	412,481	360,302	98,892	62,43
	3	1,4973	646,948	432,076	148,138	98,937	61,84
	4	3,1962	1327,785	415,426	318,078	99,518	62,20
Ultralyd	1	1,6847	723,643	429,538	165,924	98,489	61,56
	2	2,132	905,868	424,891	210,633	98,796	61,75
	3	2,0773	885,781	426,410	205,977	99,156	61,97
	4	1,6859	726,597	430,985	166,886	98,989	61,87
<i>Chlorella</i> -pulver	1	1,907	942,212	494,081	176,555	92,583	57,86
	2	1,2928	649,89	502,700	119,003	92,051	57,53
	3	1,8906	925,414	489,482	173,387	91,710	57,32
	4	2,0749	1014,367	488,875	191,173	92,136	57,59

%-proteininnhold er beregnet slik:

$$(\mu\text{gN/kapsel} * 6,25 * 100) / (\text{innveid prøve (mg)} * 1000) \quad (\text{H-3})$$

Det ble kjørt etanolekstraksjon på 5 gram biomasse fra *Chlorella*, før proteinhydrolyse ble kjørt på den resterende biomassen. Eksperimentelle data fra denne ekstraksjonen er presentert i tabell 6h. Data fra utveiling av Kimaxrør er vist i tabell 7h. Ligning A-1 er brukt i beregningene av % lipidinnhold.

Tabell 6h: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 5 g), til bruk i proteinhydrolyse.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	5,0084	39,0	2,0	0,0179	6,97	6,84
1.2	5,0084	39,0	2,0	0,0172	6,70	
1.1.1	5,0084	27,0	2,0	0,0086	2,32	2,28
1.1.2	5,0084	27,0	2,0	0,0083	2,24	
1.2.1	5,0084	17,0	2,0	0,0065	1,10	1,12
1.2.2	5,0084	17,0	2,0	0,0067	1,14	
2.1	5,1564	44,0	2,0	0,0109	4,65	4,78
2.2	5,1564	44,0	2,0	0,0115	4,91	
2.1.1	5,1564	29,0	2,0	0,0099	2,78	2,74
2.1.2	5,1564	29,0	2,0	0,0096	2,70	
2.2.1	5,1564	19,0	2,0	0,0097	1,79	1,81
2.2.2	5,1564	19,0	2,0	0,0099	1,82	

Tabell 7h: Resultater fra utveing av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 5 g), til bruk i proteinhydrolyse.

Parallell	Vekt rør u/prøve (g)	Vekt rør m/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,9537	10,9716	0,0179
1.2	10,6782	10,6954	0,0172
1.1.1	10,8621	10,8707	0,0086
1.1.2	10,7851	10,7934	0,0083
1.2.1	10,7427	10,7492	0,0065
1.2.2	10,9416	10,9483	0,0067
2.1	10,924	10,9349	0,0109
2.2	10,8487	10,8602	0,0115
2.1.1	10,9132	10,9231	0,0099
2.1.2	10,835	10,8446	0,0096
2.2.1	11,1516	11,1613	0,0097
2.2.2	10,7116	10,7215	0,0099

Det ble kjørt etanolekstraksjon på alle frysetørkede sedimenter etter proteinhydrolyse. Eksperimentelle data fra disse ekstraksjonene er presentert nedenfor, sammen med data fra utveiing av Kimaxrør.

Tabell 8h: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser nullprøve uten inaktivering.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0123	42,0	2,0	0,006	12,45	12,03
1.2	1,0123	42,0	2,0	0,0056	11,62	
1.1.1	1,0123	24,5	2,0	0,0022	2,66	2,00
1.1.2	1,0123	24,5	2,0	0,0011	1,33	
1.2.1	1,0123	15,5	2,0	0,001	0,77	0,54
1.2.2	1,0123	15,5	2,0	0,0004	0,31	
2.1	1,0115	43,0	2,0	0,0048	10,20	10,42
2.2	1,0115	43,0	2,0	0,005	10,63	
2.1.1	1,0115	29,0	2,0	0,0018	2,58	2,72
2.1.2	1,0115	29,0	2,0	0,002	2,87	
2.2.1	1,0115	17,0	2,0	0,0012	1,01	0,88
2.2.2	1,0115	17,0	2,0	0,0009	1,76	

Tabell 9h: Resultater fra utveiing av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser nullprøve uten inaktivering.

Parallell	Vekt rør u/prøve (g)	Vekt rør m/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,7993	10,8053	0,006
1.2	10,9831	10,9887	0,0056
1.1.1	10,4581	10,4603	0,0022
1.1.2	11,9324	11,9335	0,0011
1.2.1	10,6684	10,6694	0,001
1.2.2	10,869	10,871	0,002
2.1	11,195	11,1998	0,0048
2.2	10,9592	10,9642	0,005
2.1.1	11,1006	11,1024	0,0018
2.1.2	10,869	10,871	0,002
2.2.1	10,858	10,8592	0,0012
2.2.2	10,7537	10,7546	0,0009

Tabell 10h: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser nullprøve med inaktivering.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0412	41,0	2,0	0,005	9,84	10,04
1.2	1,0412	41,0	2,0	0,0052	10,24	
1.1.1	1,0412	26,0	2,0	0,0021	2,62	2,62
1.1.2	1,0412	26,0	2,0	0,0021	2,62	
1.2.1	1,0412	16,0	2,0	0,0011	0,85	0,81
1.2.2	1,0412	16,0	2,0	0,001	0,77	
2.1	1,0092	44,0	2,0	0,0058	12,64	12,10
2.2	1,0092	44,0	2,0	0,0053	11,55	
2.1.1	1,0092	29,0	2,0	0,0024	3,45	3,38
2.1.2	1,0092	29,0	2,0	0,0023	3,30	
2.2.1	1,0092	18,5	2,0	0,0013	1,19	1,01
2.2.2	1,0092	18,5	2,0	0,0009	0,82	

Tabell 11h: Resultater fra utveiling av Kimax-rør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser nullprøve med inaktivering.

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	12,2765	12,2815	0,005
1.2	10,8202	10,8254	0,0052
1.1.1	10,9962	10,9983	0,0021
1.1.2	11,0874	11,0895	0,0021
1.2.1	10,972	10,9731	0,0011
1.2.2	10,8548	10,8558	0,001
2.1	10,9907	10,9965	0,0058
2.2	11,0407	11,046	0,0053
2.1.1	10,9524	10,9548	0,0024
2.1.2	10,6364	10,6387	0,0023
2.2.1	10,7946	10,7959	0,0013
2.2.2	10,8778	10,8787	0,0009

Tabell 12h: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser kontrollprøve.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0137	40,0	2,0	0,0056	11,05	10,56
1.2	1,0137	40,0	2,0	0,0051	10,06	
1.1.1	1,0137	27,0	2,0	0,0021	2,80	2,60
1.1.2	1,0137	27,0	2,0	0,0018	2,40	
1.2.1	1,0137	15,5	2,0	0,0013	0,99	1,19
1.2.2	1,0137	15,5	2,0	0,0018	1,38	
2.1	1,0512	43,0	2,0	0,0056	11,45	11,45
2.2	1,0512	43,0	2,0	0,0056	11,45	
2.1.1	1,0512	29,0	2,0	0,0025	3,45	3,45
2.1.2	1,0512	29,0	2,0	0,0025	3,45	
2.2.1	1,0512	19,0	2,0	0,0015	1,36	1,36
2.2.2	1,0512	19,0	2,0	0,0015	1,36	

Tabell 13h: Resultater fra utveiling av Kimaxrør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser kontrollprøve.

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8165	10,8221	0,0056
1.2	10,6651	10,6702	0,0051
1.1.1	10,9098	10,9119	0,0021
1.1.2	11,1055	11,1073	0,0018
1.2.1	10,9231	10,9244	0,0013
1.2.2	10,8346	10,8364	0,0018
2.1	11,901	11,9066	0,0056
2.2	10,8086	10,8142	0,0056
2.1.1	10,8051	10,8076	0,0025
2.1.2	10,8594	10,8619	0,0025
2.2.1	10,9607	10,9622	0,0015
2.2.2	10,8126	10,8141	0,0015

Tabell 14h: Rådata fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser enzymprøve.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0166	45,0	2,0	0,01	22,13	22,58
1.2	1,0166	45,0	2,0	0,0104	23,02	
1.1.1	1,0166	25,0	2,0	0,003	3,69	3,75
1.1.2	1,0166	25,0	2,0	0,0031	3,81	
1.2.1	1,0166	16,5	2,0	0,0023	1,87	1,74
1.2.2	1,0166	16,5	2,0	0,002	1,62	
2.1	1,0056	44,0	2,0	0,0109	23,85	23,74
2.2	1,0056	44,0	2,0	0,0108	23,63	
2.1.1	1,0056	29,5	2,0	0,0028	4,11	4,77
2.1.2	1,0056	29,5	2,0	0,0037	5,43	
2.2.1	1,0056	19,5	2,0	0,002	1,94	1,84
2.2.2	1,0056	19,5	2,0	0,0018	1,75	

Tabell 15h: Resultater fra utveining av Kimax-rør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser enzymprøve.

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,8363	10,8463	0,01
1.2	10,9181	10,9285	0,0104
1.1.1	10,7852	10,7882	0,003
1.1.2	10,7843	10,7874	0,0031
1.2.1	10,7927	10,795	0,0023
1.2.2	10,6022	10,6042	0,002
2.1	10,7907	10,8016	0,0109
2.2	10,8363	10,8471	0,0108
2.1.1	10,8133	10,8161	0,0028
2.1.2	10,7645	10,7682	0,0037
2.2.1	10,8644	10,8664	0,002
2.2.2	10,9191	10,9209	0,0018

Tabell 16h: Resultater fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser ultralyd- + enzymprøve.

Parallell	Vekt prøve (g)	Volum tilsatt etanol (ml)	Volum inndampet etanol (ml)	Vekt inndampet fett (g)	Lipidinnhold (%)	Gjennomsnitt (%)
1.1	1,0258	39,0	2,0	0,0106	20,15	20,25
1.2	1,0258	39,0	2,0	0,0107	20,34	
1.1.1	1,0258	27,0	2,0	0,0048	6,32	6,38
1.1.2	1,0258	27,0	2,0	0,0049	6,45	
1.2.1	1,0258	15,0	2,0	0,0021	1,54	1,50
1.2.2	1,0258	15,0	2,0	0,002	1,46	
2.1	1,0244	45,0	2,0	0,0116	25,48	25,81
2.2	1,0244	45,0	2,0	0,0119	26,14	
2.1.1	1,0244	28,0	2,0	0,0043	5,88	5,81
2.1.2	1,0244	28,0	2,0	0,0042	5,74	
2.2.1	1,0244	17,0	2,0	0,0023	1,91	1,87
2.2.2	1,0244	17,0	2,0	0,0022	1,83	

Tabell 17h: Resultater fra utveiing av Kimax-rør, fra etanolekstraksjon (*Chlorella*, 1 g), etter proteinhydrolyse. Tabellen viser ultralyd- + enzymprøve.

Parallell	Vekt røru/prøve (g)	Vekt rørm/prøve (g)	Differanse (g)
1.1	10,5815	10,5921	0,0106
1.2	10,9522	10,9629	0,0107
1.1.1	10,7656	10,7704	0,0048
1.1.2	11,0046	11,0095	0,0049
1.2.1	10,7866	10,7887	0,0021
1.2.2	11,0307	11,0327	0,002
2.1	11,0375	11,0419	0,0116
2.2	10,633	10,6449	0,0119
2.1.1	10,6944	10,6987	0,0043
2.1.2	10,911	10,9152	0,0042
2.2.1	10,946	10,9483	0,0023
2.2.2	10,7948	10,797	0,0022

Askeinnholdet ble målt i *Chlorella*- og *Spirulina*-pulver. Eksperimentelle data er vist i tabell 18h. Det ble også målt aske i hydrolysater og sedimenter i prøver fra proteinhydrolyse før og etter etanolekstraksjon. Disse eksperimentelle dataene er presentert i tabell 19h, 20h, 21h og 22h.

Tabell 18h: Resultater fra utveiling av digler til bestemmelse av askeinnhold i pulver fra *Chlorella* og *Spirulina*.

Digel		Vekt tom digel (g)	Vekt tørrstoff etter tørking (g)	Vekt digel m/aske (g)	Vekt aske (g)	% aske
<i>Chlorella</i>	C30	19,0350	0,4673	19,061	0,026	5,56
	A14	25,9328	0,4717	25,9592	0,0264	5,60
<i>Spirulina</i>	C18	19,1739	0,462	19,2053	0,0314	6,80
	C10	19,3032	0,4729	19,3357	0,0325	6,87

Askeinnhold ble beregnet slik:

$$(\text{Vekt aske (g)} * 100) / \text{Vekt tørrstoff (g)} \quad (\text{H-4})$$

Tabell 19h: Rådata fra bestemmelse av askeinnhold i hydrolysater fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon. Hydrolysen er utført på biomasse fra *Chlorella*.

Digel		Vekt tom digel (g)	Vekt tørrstoff etter tørking (g)	Vekt digel m/aske (g)	Vekt aske (g)	% aske
Nullprøve (-m)	C22	19,4103	0,1143	19,4352	0,0249	21,78
	C14	19,5101	0,1145	19,5342	0,0241	21,05
Nullprøve (+m)	I30	18,0065	0,1759	18,046	0,0395	22,46
	D9	17,9710	0,1302	18,0002	0,0292	22,43
Kontroll	D26	18,5342	0,19	18,5751	0,0409	21,53
	D25	19,1918	0,183	19,2308	0,039	21,31
Enzym	D16	17,0506	0,4522	17,0846	0,034	7,52
	A6	21,7829	0,4458	21,8161	0,0332	7,45
Ultralyd	D19	17,2914	0,4511	17,3254	0,034	7,54
	D11	16,6207	0,4567	16,6207	0,0346	7,58

Tabell 20h: Rådata fra bestemmelse av askeinnhold i sedimenter fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon. Hydrolysen er utført på biomasse fra *Chlorella*.

Digel		Vekt tom digel (g)	Vekt tørrstoff etter tørking (g)	Vekt digel m/aske (g)	Vekt aske (g)	% aske
Null (-m)	122	28,0736	0,1495	28,0804	0,0068	4,55
	109	28,4226	0,143	28,4248	0,0022	1,54
	16B	23,8968	0,1405	23,9035	0,0067	4,77
	126	28,0063	0,1369	28,0123	0,006	4,38
Null (+m)	D11	16,6209	0,143	16,6256	0,0047	3,29
	D13	17,0265	0,1358	17,0296	0,0031	2,28
	D25	19,1949	0,1341	19,1963	0,0014	1,04
	D26	18,5359	0,139	18,5396	0,0037	2,66
Kontroll	D17	17,4529	0,1363	17,4554	0,0025	1,83
	D9	17,9724	0,135	17,9756	0,0032	2,37
	D10	17,5611	0,1432	17,5635	0,0024	1,68
	Blank	13,6701	0,1411	13,6742	0,0041	2,91
Enzym	128	20,738	0,1204	20,7399	0,0019	1,58
	134	21,3679	0,1125	21,3694	0,0015	1,33
	140	19,2869	0,1194	19,289	0,0021	1,76
	A13	27,6205	0,1192	27,624	0,0035	2,94
Ultralyd	141	22,6165	0,1045	22,6128	-0,0037	-
	A32	25,6017	0,1112	25,6047	0,003	2,70
	C9	19,8536	0,1043	19,8549	0,0013	1,25
	139	19,5367	0,1017	19,5383	0,0016	1,57

Tabell 21h: Rådata fra bestemmelse av askeinnhold i hydrolysater fra proteinhydrolyse etter etanolekstraksjon. Hydrolysen er utført på biomasse fra *Chlorella*.

Digel		Vekt tom digel (g)	Vekt tørrstoff etter tørking (g)	Vekt digel m/aske (g)	Vekt aske (g)	% aske
Enzym	A53	23,7822	0,4592	23,8138	0,0316	6,88
	A15	27,1349	0,4508	27,1663	0,0314	6,97

Tabell 22h: Rådata fra bestemmelse av askeinnhold i sedimenter fra proteinhydrolyse etter etanolekstraksjon. Hydrolysen er utført på biomasse fra *Chlorella*.

Digel		Vekt tom digel (g)	Vekt tørrstoff etter tørking (g)	Vekt digel m/aske (g)	Vekt aske (g)	% aske
Enzym	D6	17,6723	0,1087	17,678	0,0057	5,24
	D29	17,8083	0,1162	17,8141	0,0058	4,99
	D2	16,3357	0,1067	16,3409	0,0052	4,87
	D1	17,6208	0,1134	17,626	0,0052	4,59

Massebalanse for protein og lipid ble beregnet i prøver der hydrolyse ble kjørt før etanolekstraksjon. Rådata brukt i massebalansen er presentert nedenfor i tabell 23h og 24h.

Tabell 23h: Oversikt over verdier brukt til å beregne massebalanse av protein i prøver fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon. Tørrstoff er korrigert for vanninnhold (6,4%). Enzym- og ultralydprøve er korrigert for tilsatt mengde enzym.

Prøve	Null (+m)		Kontroll		Enzym		Ultralyd	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Parallell								
Tørrstoff (g)	2,83	2,83	2,95	2,92	3,05	3,06	2,98	3,12
Protein i tørrstoff (g)	1,63	1,63	1,70	1,68	1,76	1,76	1,72	1,80
Tørrstoff i hydrolysat (%)	6,31	5,95	12,43	11,96	39,93	39,81	40,09	39,36
Protein i hydrolysat (%)	52,92	52,92	52,85	52,85	62,07	62,07	61,79	61,79
Tørrstoff i hydrolysat (g)	0,22	0,27	0,37	0,35	1,22	1,22	1,19	1,23
Protein i hydrolysat (g)	0,12	0,14	0,20	0,18	0,76	0,76	0,74	0,76
% hydrolysert protein	7,14	8,77	11,51	11,00	39,83	39,70	39,69	39,29

% hydrolysert protein er beregnet slik:

$$(\text{Tørrstoff i hydrolysat (g)} * \text{protein i hydrolysat (\%)}) / \text{Protein i tørrstoff (g)} \quad (\text{H-5})$$

I enzym- og ultralydprøve er proteinmengden (9%) i tilsatt Alcalase trukket fra protein i hydrolysat (g). De tilsatte verdiene av Alcalase kan sees i tabell 1h. Prosentandelen protein i tørrstoff som er brukt til å beregne proteinandelen i tørrstoffet (g) finnes i tabell 5h. Denne verdien ble funnet ved CN-analyse.

Tabell 24h: Oversikt over verdier brukt til å beregne massebalanse av lipid i prøver fra proteinhydrolyse før etanolekstraksjon. Tørrstoff er korrigert for vanninnhold (6,4%).

Prøve	Null (-m)		Null (+m)		Kontroll		Enzym		Ultralyd	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Tørrstoff (g)	3,12	3,17	2,83	2,83	2,95	2,92	3,05	3,06	2,98	3,12
Lipid i tørrstoff (mg)	380,6	367,7	345,3	345,3	359,9	356,2	372,1	373,3	363,6	380,6
Tørrstoff i sediment (g)	2,69	2,54	1,90	2,16	2,35	2,32	1,84	1,93	1,78	1,74
Lipid i 1g sediment (mg)	144,6	144,6	153,3	153,3	158,1	158,1	295,3	295,3	315,8	315,8
Lipid i totalt sediment (mg)	389,1	367,4	291,3	331,1	371,6	366,8	543,3	569,9	562,1	549,4

Prosentandelen lipid i tørrstoff som er brukt til å beregne lipidandelen i tørrstoffet (g) er fra etanolekstraksjon (12,2%).

