



NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2019

20 studiepoeng

**Effekt av dyrkningsstrategi på kjemisk sammensetning av makroalger, med fokus på fucoxanthin.**

utført av

Synnøve Strand Jacobsen

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matteknologi ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av rapportens innhold skjer på eget ansvar.

## Sammendrag

I denne oppgaven har det vært arbeidet med å etablere og tilpasse en metode for ekstraksjon og analyse av karotenoidet fucoxanthin fra brunalgen *Saccharina latissima*, ved laboratoriene til SINTEF Ocean SeaLab i Trondheim. *S. latissima* dyrket våren 2018, som en del av prosjektet MACROSEA, ble brukt som prøvemateriale og aceton (62.2 % i MilliQ-vann) ble valgt som løsningsmiddel for å ekstrahere fucoxanthin fra algeprøvene.

Under metodeoptimaliseringsforsøkene ble det testet for tap av ekstraksjonsutbytte ved tre ulike steg i metoden; ekstraksjon, inndamping av løsemiddel med rotavapor og filtrering. To ulike metoder ble brukt for ekstraksjon med aceton, frysetørking av materiale og filtrering før analyse. Den optimaliserte metoden ble så benyttet for å kvantifisere innhold av fucoxanthin i ulike prøver av *S. latissima*. Mengden ble bestemt med væskechromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS/MS). Fucoxanthin-innholdet ble deretter satt i sammenheng med 11 ulike behandlingsmetoder brukt i MACROSEA, for å se på hvordan ulike dyrkningsstrategi kan ha påvirket den kjemiske sammensetningen til algene.

Tap av ekstraksjonsutbytte ved ekstraksjon, inndamping av løsemiddel og filtrering var henholdsvis 7 %, 96 % og 36 %. Ved videre arbeid anbefales det å forbedre samtlige steg. De ulike prøvene hadde generelt små forskjeller i konsentrasjon av fucoxanthin, men det høyeste ekstraksjonsutbyttet ble funnet i prøver med sporer inkubert på laboratorium i 21 dager og vektorpoding i sjø, med fucoxanthin-innhold på hele 1.5 og 1.4 mg per gram tørrvekt tare. Det er uansett vanskelig å si noe om hvilken behandling som anbefales for å oppnå et høyest mulig innhold av fucoxanthin i *S. latissima*, men ut fra resultatene i denne oppgaven, kan man anta at inkubering i 21 dager av kulturer med sporer er den best egnede dyrkningsstrategien.

Ekstraksjon med aceton (62.2 % i MilliQ-vann) er et godt løsemiddel for å oppnå et høyt ekstraksjonsutbytte av fucoxanthin fra brunalgen *S. latissima*, men mulighetene for ekstraksjon med enzymer bør undersøkes nærmere for å redusere miljøbelastninger og eksponering for giftstoffer. På grunn av risiko for stort tap i enkelte steg av metoden, bør ytterligere optimalisering være i fokus i videre arbeid. Som forslag til videre arbeid anbefales det å prøve en annen løsemiddelblanding, hvor vann med fordel kan byttes ut med et annet løsemiddel som karotenoider løses godt i, for eksempel metanol.

## Abstract

In this work, a method for extraction and analysis of the carotenoid fucoxanthin from the macro algae *Saccharina latissima* has been customized and established at the laboratories at SINTEF Ocean SeaLab in Trondheim. Samples of *S. latissima* cultivated during spring 2018, as a part of the project MACROSEA, were used as test material and acetone (62.2 % in MilliQ-water) was chosen as solvent for extraction.

The possible loss of extraction yield was tested for three different steps during the optimization process; extraction, evaporation of solvent, and filtration. Two different methods were used for extraction, freeze-drying of samples, and filtration before analysis. The optimized method was then used for quantification of fucoxanthin-content in different samples of *S. latissima*. The amount was decided by Liquid chromatography connected to a mass spectrometry (LC-MS/MS). The content of fucoxanthin was then put in context with 11 different treatments used in MACROSEA, to see how different strategies of cultivation may affect the chemical composition of the algae.

The loss of extraction yield through extraction, evaporation of solvent, and filtration was 7 %, 96 %, and 36 % respectively. In any further work on this method it is recommended to improve all three steps. The differences in the amount of fucoxanthin between the samples were in general low, but the highest extraction yield was achieved in samples with spores incubated for 21 days in the laboratory, and cultivated in sea with vector seeding, with concentrations as high as 1.5 and 1.4 mg per gram dry weight of algae. From the findings in this work it is not possible to decide which cultivation strategy that should be used to achieve the highest possible extraction yield of fucoxanthin from *S. latissima*, but it might look like the incubation of spores for 21 days is preferable.

Extraction with acetone (62.2 % in MilliQ-water) as solvent is an efficient method to achieve a high extraction yield of fucoxanthin from the macroalgae *S. latissima*. The possibilities of extraction with enzymes should be further investigated to reduce the environmental impact and exposure of toxic substances. Due to the high risk of possible loss of fucoxanthin during specific stages in the method, further work should probably focus on additional optimization of the method. A suggestion for any future work on this matter is to try the same method with a different solvent mixture, where water could be replaced with another solvent in which carotenoids dissolve well, for example methanol.

## **Førord**

Den følgende rapporten er en bacheloroppgave av Synnøve Strand Jacobsen, student ved MATteknologisk utdanning på institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU Trondheim. Arbeidet er et samarbeid mellom NTNU og SINTEF Ocean og oppgaven inngår i prosjektet NordAqua, hvor SINTEF Ocean er en av partnerne. Alle kostnader i forbindelse med dette arbeidet er dekt av NordAqua-prosjektet og alle analyser har blitt gjennomført på SINTEF Oceans laboratorier på Brattørkaia i Trondheim. Arbeid i forbindelse med denne oppgaven har pågått fra 7. mars 2019 til 31. mai 2019. Åse Strand (NTNU), Lisbet Sørensen (SINTEF) og Jorunn Skjermo (SINTEF) har vært veiledere for oppgaven.

Takk til veilederne for tid, støtte, tilbakemeldinger og gode råd i forbindelse med alt arbeid som er gjort. Takk til Marianne Rønsberg for hjelp med laboratoriearbeid på analyse miljø-laboratoriet og kromatografi-laboratoriet, all hjelp i forbindelse LC-MS/MS, rettleiding og oppmuntring underveis. Takk til Marthe Schei og Merete Selnes for hjelp, tilrettelegging og selskap på kjemilaboratoriet. Og sist, men ikke minst en ekstra stor takk til Peter Alexandersen for god hjelp ved utførelse av analyser, gode diskusjoner og mye latter.

Dato/Sted

31.05.19 TRONDHEIM

Synnøve Strand Jacobsen

Synnøve S. Jacobsen

## Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>INNLEDNING</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>FORPROSJEKT TIL OPPGAVEN: MACROSEA</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>MAKROALGER</b>	<b>3</b>
3.1	TAREDYR KING	4
3.2	SACCHARINA LATISSIMA	5
3.2.1	Livssyklus	5
3.2.2	Kjemisk sammensetning	7
3.3	KAROTENOIDER	8
3.3.1	Fucoxanthin	9
3.3.2	Biokjemisk effekt	10
3.3.3	Ekstraksjonsmetoder	12
3.3.4	Analysemetoder	13
<b>4</b>	<b>MATERIALER OG METODER</b>	<b>17</b>
4.1	KJEMIKALIER	17
4.2	INSTRUMENTER	17
4.3	UTSTYR	17
4.4	PRØVER	18
4.5	METODER	21
4.5.1	Bestemmelse av tørrvekt	21
4.5.2	Innledende forsøk med fucoxanthin-standard	21
4.5.3	Forberedelse av prøver til ekstraksjon	21
4.5.4	Ekstraksjon med aceton og inndamping av løsemiddel	21
4.5.5	Frysetørrking og filtrering før analyse	22
4.5.6	Validering av metode	23
4.5.7	Forsøk på ekstraksjon med Viscozyme	24
4.5.8	Karakterisering av fucoxanthin med LC-MS/MS	24
4.5.9	Kvantifisering av fucoxanthin	26
<b>5</b>	<b>RESULTATER</b>	<b>27</b>
5.1	VALIDERING AV METODEN	27
5.2	FUCOXANTHIN-INNHOLD	27
<b>6</b>	<b>VURDERING</b>	<b>29</b>
6.1	OPTIMALISERING OG VALIDERING AV METODE	29
6.1.1	Innledende forsøk med fucoxanthin-standard	29
6.1.2	Gjennomførte tiltak	29
6.1.3	Metode	31
6.1.4	Validering av metode	32
6.2	INNHOLD AV FUCOXANTHIN	33
6.3	VURDERING AV LÆRING	35
6.4	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	36
<b>7</b>	<b>KONKLUSJON</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>REFERANSER</b>	<b>40</b>

Antall vedlegg: 3

# 1 INNLEDNING

Bioøkonomi kan defineres som ”bærekraftig produksjon av fornybare ressurser, og videreforedling av disse til verdifulle produkter” (Bekessy og Selinske 2017 s. 158) Dette har alltid vært en viktig del av menneskenes aktivitet, men det er først i senere tid at begrepet har fått en spesifikk definisjon og aktivt blitt tatt i bruk. Bærekraftig utnyttelse av biologiske organismer i vann kalles ”blå” bioøkonomi, og forskning innenfor feltet har sterk vekst globalt. Det forskes på bruk av fotosyntetiske organismer, som blå-grønn-, mikro- og makroalger, til blant annet rensing av avløpsvann og produksjon av biomasse. (NordAqua u.å.) Biomassen fra disse organismene kan være kilde til verdifulle bioaktive forbindelser, med funksjoner som kan utnyttes innen medisin, gjødsel, biodrivstoff og til ernæring av mennesker og dyr. (Forbord m. fl. 2018; Holdt og Kraan 2011)

Det følgende arbeidet i denne oppgaven utgjør en del av prosjektet NordAqua, med det fullstendige navnet ”Towards Versatility of Aquatic Production Platforms: Unlocking the Value of Nordic Bioresources”. NordAqua er et samarbeid mellom nordiske forskningsinstitusjoner og universitet, samt partnere fra industrien og en rekke samfunnsaktører. Prosjektet er en del av programmet ”Nordisk program om bioøkonomi”, og har som mål å skape ny kunnskap om hvordan overgangen til et mer biobasert og bærekraftig samfunn i de nordiske landene kan stimuleres og utvikles. (NordForsk u.å.a.) Programmet utgjør et Nordic Center of Excellence (NCoE), som er NordForsks viktigste finansieringsform med mål om å tilrettelegge for et godt samarbeid mellom de fremste forskerne, forskergruppene og institusjonene i Norden. (Nordforsk u.å.b) I følge NordAquas egne sider skal ”det virtuelle senteret omfatte verdensledende eksperter innen fotosyntese, syntetisk biologi, industriteknikk, mikrobiologi, medisinsk forskning, vannforvaltning og entreprenørskap”. (NordAqua u.å.)

NordAqua ønsker å utvikle teknologi som tilrettelegger for at organismene produserer mest mulig biomasse og mest mulig av de etterspurte forbindelsene,

og dermed en mer bærekraftig utnyttelse av disse ressursene. SINTEF Ocean bidrar til dette med kompetanse på alger, og analyser og prosessering av prøvemateriale. (SINTEF 2017) Som en del av dette skal det følgende arbeidet bidra til å utvikle en metode for, og analyse av, fucoxanthin i brunalgen *Saccharina latissima*.

*Saccharina latissima* er en fornybar kilde til flere bioaktive komponenter (Holdt og Kraan 2011; Rey m. fl. 2019), deriblant karotenoidet fucoxanthin. De siste årene har fokuset på fucoxanthins mange helseeffekter økt kraftig. Disse har tidligere vært dårlig utnyttet, mulig som følge av stoffets oksidative ustabilitet og kostbare ekstraksjonsmetoder, men med en enklere og mer effektiv ekstraksjonsmetode er det ønskelig å øke utbyttet. (Shannon og Abu-Ghannam 2016) Det er ønskelig å kunne inkorporere *S. latissima* i nye høy-verdi-produkter (Rey m. fl. 2019; Skjermo m. fl. 2014), noe som krever dokumentasjon på innhold av de ulike bioaktive komponentene og hvordan utbyttet kan bli størst mulig.

## **2 FORPROSJEKT TIL OPPGAVEN: MACROSEA**

MACROSEA, hvor prøvematerialet til denne oppgaven er hentet fra, ledes av SINTEF Ocean i Trondheim som samarbeider med flere nasjonale og internasjonale partnere. Prosjektet har en varighet på fire år og skal fra 2016 til og med 2019 bidra med: "økt kunnskap om ulike algearters produktivitet og sammensetning, samt hvilken betydning miljøforhold og geografi har på sluttresultatet for den produserte biomassen" (SINTEF 2017b). Med dette ønsker de å skape: "en tverrfaglig kunnskapsplattform som kan danne grunnlag for kostnadseffektiv taredyrking og utvikling av en ny biomarin industri i Norge". Prosjektet er finansiert av det norske Forskningsrådets program "Havbruk 2", et stort program for havbruksforskning og har et budsjett på 2,6 millioner euro. (MACROSEA u.å. a). MACROSEA består av sju arbeidspakker (WP); 1) Frøplantebiologi (WP1), 2) Dyrking i sjø, 3) Genetikk og sykdom, 4) Marin modellering, 5) Påsåing-, utplassering- og høsteteknologi, 6) Tareanlegg i sjø og 7) Ledelse, koordinering og formidling.

### **Arbeidspakke 1, Frøplantebiologi (WP1)**

Første arbeidspakke tar for seg dyrkningsbiologien til brunalgene *Saccharina latissima* og *Alaria esculenta* og rødalgen *Palmaria palmata*. Hensikten med denne arbeidspakken er å etablere kvalitetsparametere for dyrkning og karakterisere de biologiske behovene og terskelverdiene artene har under ulike miljøforhold. Det er viktig for utviklingen av industriell tare dyrking å vite hva som påvirker kvaliteten på plantene og hvilken betydning dette har for produktiviteten, kvaliteten og den kjemiske sammensetningen ved dyrking ute i sjø. (MACROSEA u.å.b)

### **Arbeidspakke 2, Dyrking i sjø (WP2)**

Andre arbeidspakke skal gjennom både forsøk i laboratorier og ved feltarbeid, utvikle ny kunnskap om hvordan tilgjengelig næring, samt ulike lys-, temperatur- og saltforhold påvirker artenes vekst, biokjemiske sammensetning og begroing. Et måleprogram langs norskekysten, fra Agder til Tromsø, gjennomføres for å se på disse faktorene hos *S. latissima*. Nitrogenopptak i form av nitrat og ammoniakk i arten registreres i et forsøk på unge planter (8 -12 cm lange). I denne arbeidspakken vil også frø med ulik kvalitet fra WP1 dyrkes for å teste og følge opp påvirkningen av de kvalitetsparameterne utviklet på utbytte av biomasse og kvalitet ved vekst i sjø. (MACROSEA u.å. c)

Arbeidspakke 1 og 2 er direkte relatert til denne oppgaven.

## **3 MAKROALGER**

Makroalger er lavtrofiske organismer som kun bruker sollys som energi, utnytter næringssalter fra sjøen og tar opp CO<sub>2</sub> ved vekst. I Norge finnes det omkring 175 brune, 200 røde og 100 grønne arter av marine makroalger, og disse er blant de raskest voksende plantene i verden. De kan produsere store mengder biomasse og kultiveres uten bruk av ferskvann, landjord, gjødsel eller plantevernmidler. Ved utvikling av metoder og teknologi, er mulighetene store for en industrialisering av makroalgedyrking og en kostnadseffektiv, helhetlig



utnyttelse av råstoffet nødvendig for produksjonen av en rekke viktige produkter. (Skjeremo m.fl. 2014 s. 5)

I oppbygning, størrelse og form er det stor forskjell mellom de ulike algene, noen kan være veldig små og enkle, mens andre er mer kompliserte og av de største plantene som finnes. Hos flere makroalger kan vi skille mellom blad, stengel og rot. Tarebladet kalles thallus og består av lamina (bladet), stipe (stengel) og hapter (festeorgan/rot). Algene tar opp vann, næring og oppløste gasser gjennom hele dens overflate i motsetning til landplanter som kun tar opp vann og næring gjennom roten. (Rueness & Knispel, 1998 s. 8)

Brunalgene innen ordenen Laminariales, bedre kjent som tare, er de største og mest produktive primærprodusentene i de kystnære havområdene (Rothman m. fl. 2017). Disse kan vokse tett sammen over et større areal og danne det som kalles for en "seng av tare" eller tareskog (Bolton 2010). Slike områder har stor potensiale i å lagre karbon fra atmosfæren og på denne måten bidra positivt til dagens klimautfordringer (Rothman m. fl. 2017). Celleveggen til brunalgene er hovedsakelig bygd opp av cellulose, kjeder av D-glukose-enheter bundet sammen av  $\beta$ -1,4-glukosidbinder, og alginat, kjeder av mannuronsyre og guluronsyre (Shannon og Abu-Ghannam 2018).

### **3.1 Tare dyrking**

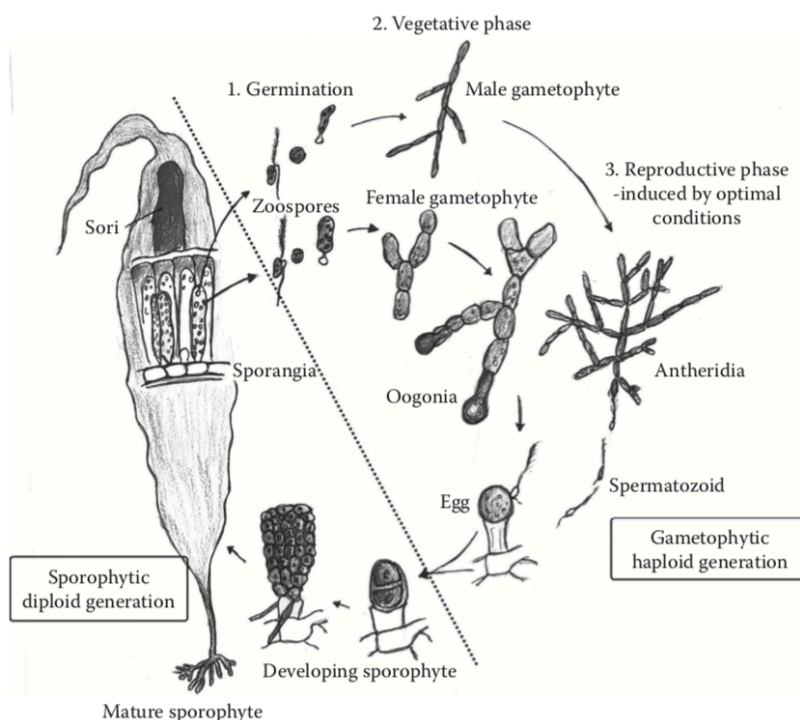
Tare har en høy økonomisk verdi i mange land, hvor de høstes for ekstraksjon av alginat som brukes innen blant annet farmasøytisk-, papir-, tekstil- og matindustri, og i både mat, dyrefôr og gjødsel (Rothman m. fl. 2017). Interessen for å dyrke akvatiske planter har de siste årene økt kraftig og tare dyrking foregår nå i omtrent 50 land. I 2014 ble det dyrket 27.3 millioner tonn akvatiske planter, hovedsakelig tare, tilsvarende en verdi på 5.6 milliarder amerikanske dollar. (FAO 2016 s. 5) Økningen har vært 8% per år det siste tiåret (2005-2014), noe som er 6.2 % mer i økning fra tiåret før (FAO 2016 s. 22). Årsaken til økt interesse skyldes et stadig økende behov for nye, alternative kilder til både mat og energi, noe som krever flere millioner tonn ny biomasse.

### 3.2 *Saccharina latissima*

Sukkertare, *Saccharina latissima*, som tilhører ordenen Laminariales, er en kaldtvannsart som vokser naturlig ned mot 30 meters dyp (Skjermo m. fl. 2014) til nederste del av den eufotiske sone (Forbord m. fl. 2018). Arten er distribuert sirkumpolart i den nordlige hemisfære, og finnes på begge sider av Atlanteren fra Nova Scotia til Europa, i arktiske deler av Russland og i Stillehavet langs den Nord-amerikanske kysten, samt noen områder utenfor Japan. Av de europeiske tareartene er den en av de raskest voksende og er estimert til å ha kapasitet til å produsere 75-170 tonn biomasse (våt vekt) per hektar per år i sjø. (Forbord m. fl. 2018) Dyrkningsforsøk med *S. latissima* viser et produksjonspotensial opp mot 340 tonn (våt vekt) biomasse per hektar (Skjermo m. fl. 2014), men dyrking av arten er karakterisert av lav forutsigbarhet på volum og kvalitet på biomassen, som følge av variasjon i sesong, region og sted, samt ulike dyrkningsstrategier (Forbord m fl. 2018).

#### 3.2.1 Livssyklus

*S. latissima* har en diplohaplontisk, heteromorf livssyklus, som er tilnærmet lik for alle artene innen Laminariales-ordenen. Livssyklusen alternerer mellom et mikroskopisk haploid gametofyttgenerasjon og en makroskopisk diploid sporofyttgenerasjon, som vist i figur 1 nedenfor.



Figur 1: Skjematisk oversikt av livssyklusen til *S. latissima* (Figur hentet fra Forbord m. fl. 2018)

Sporofyitten består av blad, stipe og hapter og kan bli opp til 3 meter lang. På bladet dannes det sorus med sporehus, hvor det gjennom meiose utvikles 32 bevegelige zoosporer per sporehus. (Forbord m. fl. 2018) I Midt-Norge er *S. latissima* er fruktbar fra oktober til januar (Forbord m. fl. 2018), og i dette tidsintervallet utvikles de forplantningsdyktige områdene og taren sprer et stort antall modne zoosporer i vannet. De mikroskopiske sporene følger vannstrømmen (Handå m. fl. 2009) til de faller ned på sjøbunnen og fester seg til et passende underlag, ved hjelp av et forgrenet hapter. Deretter starter germineringsfasen, hvor sporene spirer til mikroskopiske, små hann- og hunnplanter, gametofytter. Gametofyttene har kjønnnet formering der hannplanten er tynne, svært forgrenede og slipper ut en mengde små spermatozoider (spermieliknende celler), mens hunnplanten har tykkere celler, er mindre forgrenet og utvikler egg. (Forbord m. fl. 2018; Handå m. fl. 2009) Spermatozoidene finner veien til en hunnplante og befrukter egget, som spirer straks. Ut fra egget på hunnplanten vokser en ny kimplante, en mikroskopisk sporofytt, som videre vokser til en ferdig utvokst tareplante, sporofytt. (Handå m. fl. 2009).

Ved å behandle gametofyttene med svakt, rødt lys vil de ha en vegetativ vekst, hvor de vokser i størrelse, men ikke utvikle spermatozoider og nye planter. Ved eksponering av blått lys ved 400 – 512 nm (Lüning 1980) vil befruktning induseres. Flere arter har vist god evne til å produsere kjønnsceller etter opp til 30 år (Druehl m. fl. 2005) under behandling med rødt lys, noe som gjør kultivering av gametofytter på laboratorium mulig å styre ved hjelp av kontrollerte lysregimer. (Forbord m. fl. 2018) Utviklingen av reproduktivt stadium starter så fort lys- og temperaturforholdene ligger til rette for det. Optimumstemperatur varierer med geografisk beliggenhet, men temperaturer mellom 10 – 15 °C har vist seg å gi optimal vekst (Bolton og Lüning 1982; Forbord m. fl. 2018).

### 3.2.2 Kjemisk sammensetning

Den kjemiske sammensetningen av *S. latissima* varierer etter sesong og habitat, men arten er kjent for et høyt innhold av polysakkarider, analysert til opp til 61 % av tørrvekt (Holdt og Kraan 2010; Morrissey m. fl. 2001). Karbohydrater i alger er hovedsakelig kostfibre som ikke tas opp av mennesker, men som bidrar til et sunt miljø i fordøyelsessystemet, og dermed positivt på helsen. Av proteiner inneholder alger alle de essensielle aminosyrene, men konsentrasjonen varierer mye fra art til art (Dawczynski m. fl. 2007). Innholdet i brunalger påvirkes spesielt av plantenes habitat og sesongvariasjoner, og er generelt sett lavt sammenliknet med rød- og grønnalger. Analyser av *Saccharina* viser til et proteininnhold på 3 – 14 %, hvor unge deler av bladene inneholder klart mest. (Holdt og Kraan 2010). Lipider utgjør opp til 4.5 % tørrvekt tare (Holdt og Kraan 2011), og i *S. latissima* er det registrert lipidmengder på opp til 1.9 % tørrvekt. Arten kjennetegnes av en fettsyreprofil av høy ernæringsmessig verdi, med høyt innhold av PUFA (polyunsaturated fatty acids/ flerumettede fettsyrer) og et lav *n-6/n-3*-forhold. (Rey m. fl. 2019)

I tillegg til karbohydrater, proteiner og lipider, inneholder *S. latissima* en rekke vitaminer, mineraler og sporstoffer, samt mye vann (Holdt og Kraan 2010; MacArtain m. fl. 2007). Makroalger generelt inneholder alle de essensielle mineralene og sporstoffene for mennesker, ofte i større konsentrasjon enn landbruksråvarer. *S. latissima* har spesielt et høyt innhold av fosfor, kalium og jod, og er en god kilde til vitamin C og E. Dette gjør makroalger svært attraktive til anvendelse som såkalt funksjonell mat eller "supermat". (Kraan 2013)

Pigment i alger kan hovedsakelig deles inn i tre grupper; 1) klorofyll, grønne, fettløselige fargestoffer som finnes i alle alger og er ansvarlig for fotosyntesen, 2) karotenoider, naturlige fargestoff som er en del av det fotosyntetiske apparat og hjelpe-pigment i lys-høstende prosesser, og 3) fykobiliproteiner, vannløselige fargestoffer bestående av pigmenterte fykobiliner som er spesielt viktige i fotosyntesen til rødalger, blågrønnalger og svelgflagellater. (Kraan 2013) Schmid og Stengel (2015) fant i sin studie på innholdet av pigment, både type og mengde, i flere arter innen Laminariales-ordenen, at *S. latissima*

inneholdt de laveste konsentrasjonene av pigmenter. Arten har derimot vist seg å være en svært god kilde til ekstraksjon av karotenoidet fucoxanthin (Kraan 2013), og Shannon og Abu-Ghannam (2016) ekstraherte opp mot  $0.5 \text{ mg g}^{-1}$  (tørrvekt) fra bladene av *S. latissima* ved hjelp av ekstraksjon med aceton. Fra stipe og hapter lå ekstraksjonsutbyttet i overkant av  $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  (tørrvekt) (Shannon og Abu-Ghannam 2016). Henley og Dunton (1995) fant et større innhold av både klorofyll og karotenoider i *S. latissima* høstet i juli enn i april, og det er vist at brunalger høstet mellom september og mars, i sporofyttenes modne fase, vanligvis inneholder en høyere konsentrasjon av fucoxanthin (Shannon og Abu-Ghannam, 2016).

Avfallsprodukter fra kultiverte brunalger har også vist seg å være gode biologiske kilder til ekstraksjon av fucoxanthin, da utkast fra prosesseringen, både stipe, hapter og blad-materie, kan brukes (Holdt og Kraan 2010; Kraan 2013). Det har vist seg at slikt utkast inneholder de samme mengdene fucoxanthin som resten av algen, 178 – 196 mg/kg våtvekt (Kraan 2010).

### **3.3 Karotenoider**

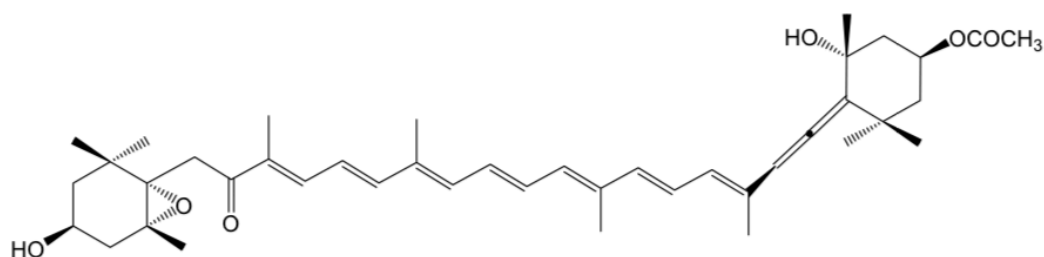
Karotenoider er de mest utbredte pigmentene i naturen og representerer fotosyntetiske pigmenter i rød, oransje og gul bølgelengde. De finnes i alle fotosyntetiske organismer, både alger, høyere planter og flere fotosyntetiserende bakterier. (Holdt og Kraan 2010 s. 568) De deles inn i to hovedgrupper; 1) Karotener, hydrokarboner som inkluderer forbindelser som  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten og lykopen og 2) Xanthophyller, karotenoider som inneholder oksygen (Zou m.fl 2012) I grønt plantevev finnes karotenoider i kloroplastene, og i annet plantevev, som kronbladene, i kromoplastene (Coulate 2016 s. 235-236).

Karotenoider generelt har god løselighet i aceton- og metanol-løsninger, og disse stoffene brukes vanligvis ved ekstraksjon av karotenoider fra vannholdig biologisk materiale. Ved arbeid med karotenoider er det nødvendig å ta hensyn til lyseksponering og temperatur for å redusere risikoen for dekomponering og uønskede reaksjoner. Alt arbeid bør gjennomføres i svakt dagslys og ved laveste

temperatur som er praktisk mulig. Ved ekstraksjon bør ikke temperaturen overstige romtemperatur. Løsemidler med lavt kokepunkt foretrekkes og ved inndamping av løsemiddel med roterende fordamping, bør ikke temperaturen i vannbadet overstige 40 °C. Reaksjoner bør skje under mørke forhold, og det anbefales at utstyr tildekkes av svarte duker eller aluminiumsfolie. (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83)

### 3.3.1 Fucoxanthin

Fucoxanthin er et xanthophyll med to epoksygrupper (Chandini m. fl. 2008), som vist i figur 2 nedenfor. Det er et av de mest utbredte karotenoidene i naturen, estimert til å utgjøre 10 % av alt naturlig produsert karotenoid. Pigmentet er ansvarlig for den gul-brune fargen i brunalger og utgjør fra 172 – 720 mg kg<sup>-1</sup> tørrvekt alge, og omtrent 70 % av det totale innholdet av karotenoider. (Holdt og Kraan 2010 s. 568) Forbindelsen kan eksistere i både trans- og cis-konfigurasjon, hvor trans-isomeren utgjør om lag 90% av fucoxanthin i naturen. Trans-isomeren er den rent kjemisk mest stabile av de to, og har størst potensiale som antioksidant. (Shannon og Abu-Ghannam 2016)



Figur II: Struktur av fucoxanthin (Figur hentet fra Oryza 2011)

I makroalger produseres fucoxanthin hovedsakelig i bladene, hvor den største fotosyntetiske aktiviteten forekommer, som følge av størst overflate til absorpsjon av sollys fra havoverflaten (Shannon og Abu-Ghannam 2016). Ved analyser av mengden fucoxanthin i brunalger, kommer det frem at innholdet er klart størst i bladet sammenliknet med resten av planten. Stipe har et lavere innhold, mens hapter inneholder minst fucoxanthin. (Schmid og Stengel 2015;

Shannon og Abu-Ghannam 2016) Fucoxanthin lagres i kloroplastene, inne i membranbundet thylakoider, men innholdet kan variere mye både innen samme plante, samme art og mellom ulike arter. Disse variasjonene er avhengig av plantenes livsstadium, sesongvariasjoner, geografisk lokasjon, næringstilgang, tilgang på sollys, organismens utviklingsløp og ekstraksjonsmetoder. (Shannon og Abu-Ghannam 2016)

Fucoxanthin har høy kommersiell verdi og er allerede inkorporert som ingrediens i en rekke matvarer, som pasta, kjeks og ulike dipper. EFSA (European Food Safety Authority), Japan's Food for Specified Health Uses (FOHSU) og FTA (US Food and Drug Authority) har godkjent fucoxanthin som supplement i mat, og ser på karotenoidet som trygt å innta for mennesker da det ikke er funnet noen toksiske virkninger av ekstraherte prøver. (Shannon og Abu-Ghannam 2016) I 2015 ble det på verdensbasis produsert omtrent 500 tonn fucoxanthin, og Joel m. fl. (2016) beskrev en forventet vekst på 5.3 % årlig mellom 2016 og 2021 (Shannon og Abu-Ghannam 2016).

### **3.3.2 Biokjemisk effekt**

Flere kliniske forsøk har vist at fucoxanthin fra brunalger har en rekke helsefremmende virkninger, og virker blant annet antioksidierende, hemmende på kreftceller og styrkende på metabolismen (Holdt og Kraan 2011).

Data fra epidemiologiske studier har vist at et regelmessig inntak av tang og tare kan bidra til å redusere risikoen for å utvikle sykdommer forbundet med oksidativt stress. Den antioksidierende effekten til fucoxanthin kan bidra til å forbedre den antioksidierende kapasiteten i blodserumet og avvæpne reaktive oksygen-forbindelser. Slike forbindelser er kjent for å skade cellene, og føre til både hjerte-og karsykdommer, kreft, metabolsk syndrom og type 2 diabetes. (Shannon og Abu-Ghannam 2016) I mus med induert type 2 diabetes har tilførsel av fucoxanthin vist en forbedret insulinresistens og reduksjon i blodsukkerverdier ved å regulere utskillelsen av cytokiner fra hvitt fettvev og ved å forbedre musklens gjenopptak av glukose i blodet (Maeda m. fl. 2005).

I overvektige mus og rotter har fucoxanthin vist seg effektiv mot vektøkning, og det anslås at stoffet kan være effektivt mot forebygging av fedme generelt (Oh m. fl. 2016; Miyashita & Hosokawa 2007; Park m. fl. 2011). Maeda m. fl. (2005) viste til en reduserende effekt på hvitt fettvev (lagringsvev fot fett) i mus og rotter som ble foret med fucoxanthin ekstrahert fra brunalger. I en klinisk studie på mennesker i Russland, ble et utvalg av 115 ikke-diabetiske, overvektige, pre menopausale kvinner med og uten ikke-alkoholisk fettleversykdom, gitt et daglig tilskudd av 300 mg tare-ekstrakt fra brunalger med 2.4 mg fucoxanthin. Det ble vist en signifikant økning i hvilende energiforbruk og et gjennomsnittlig vekttap på 4.9 kg etter 16 uker. (Abidov m. fl. 2009)

Fucoxanthin fra brunalgen *Undaria* har vist signifikant reduksjon i kreftceller i både mennesker og mus. Ved å tilføre fucoxanthin i drikkevannet til mus fant Okuzumi m. fl. (1993) at fucoxanthin hemmet karsinogener og reduserte både prosentandelen av tumor-bærende mus og gjennomsnittlig antall tumorer per mus (Okuzumi m. fl. 1993 s. 166 – 167). Fucoxanthin har også vist seg å være et av karotenoidene med best effekt for å redusere levedyktigheten til kreftceller, og Kotake-Nara m. fl. (2001) fant signifikant reduksjon i overlevelsesevnen til kreftceller i prostata. Spredning av umodne hvite blodceller, leukocytt, reduseres ved tilførsel av fucoxanthin, som inhiberer spredning og induserer apoptose av kreftceller i blodet. Evnen til å hemme spredning avhenger av de ulike isomere strukturene av fucoxanthin, og cis-formen har vist seg å ha bedre effekt sammenliknet med trans-formen (Nakazawa m. fl. 2009).

Fucoxanthin har også vist seg å ha flere andre biokjemiske funksjoner, både positiv effekt på kolesterolet (Beppu m. fl. 2012) og effekt mot høyt blodtrykk (Sivagnanam m. fl. 2015), inflammatoriske sykdommer (Heo m. fl. 2012; Kim m. fl. 2010), angiogenese (nydanning av blodårer) ved utvikling av kreft (Ganesan m. fl. 2013; Martin 2015) og malaria (Briglia m. fl. 2015).



### 3.3.3 Ekstraksjonsmetoder

For å få optimal ekstraksjon av karotenoider fra råstoff med høyt vanninnhold, er det anbefalt å bruke vannløselige, organiske løsemidler. Disse bidrar til å frigjøre karotenoidene fra matriksen de er bundet opp i og forhindrer dannelsen av emulsjon mellom råstoff og løsemiddel. (Khachik 2009; Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83) Industrielt er aceton blant de vanligste løsningsmidlene for ekstraksjon av fucoxanthin, i tillegg til heksan, metanol, DMSO (dimetylsulfoksid), etanol, petroleumseter, dietyleter, dimetyleter og etylacetat (Kanda m. fl. 2014; Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83; Shannon og Abu-Ghannam 2016). Aceton er godt dokumentert (Abu-Ghannam 2017; Oullette og Rawn 2014; Shannon og Abu-Ghannam 2016) som et effektivt løsningsmiddel for ekstraksjon av karotenoidet, og i sin studie på optimalisering av ekstraksjon av fucoxanthin fra makroalgen *Fucus vesiculosus*, fant Shannon og Abu-Ghannam (2016) at aceton var den mest signifikante variabelen ved den statistiske metoden RSM, respons overflate metodikk, på ekstraksjonsutbytte av fucoxanthin.

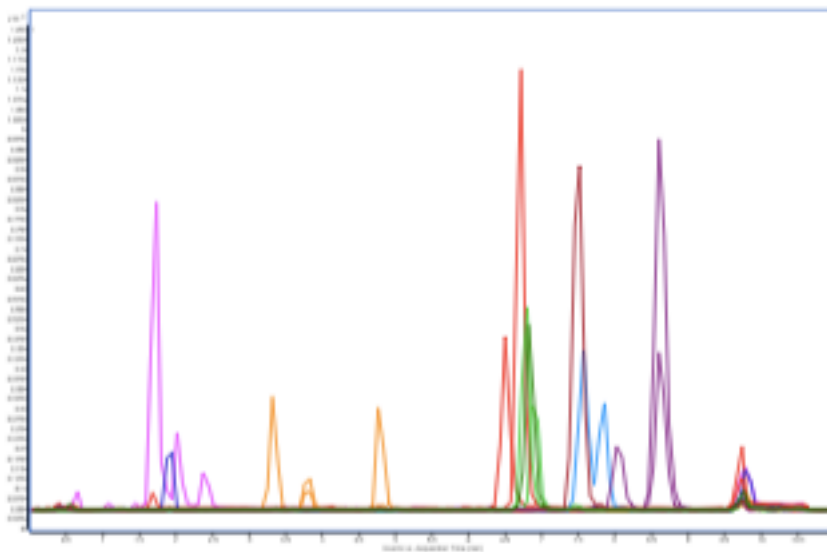
Aceton,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , tilhører stoffklassen ketoner (Oullette og Rawn 2014), og har kokepunkt ved 56.5 °C ved normalt atmosfæretrykk (1 atm), til sammenligning med 100 °C for vann (Heidolph u.å.). Stoffet er mildt giftig for dyr og mennesker ved eksponering i konsentrert form (ACS 2012; NCBI u.å.) Nyere forskning (Shannon og Abu-Ghannam 2018) viser til metoder for ekstraksjon med bruk av enzymer, som er mindre giftige og har en lavere miljøbelastning. Viscozyme, bestående av følgende karbohydraser; cellulase, arabanase,  $\beta$ -glukanase, hemicellulase og Xylanase, er et multi-enzym kompleks som kan være egnet til ekstraksjon av fucoxanthin fra brunalger. Sammensetningen av de ulike karbohydrasene muliggjør nedbrytningen av celleveggen, ved at de spalter  $\beta$ -(1-4)- bindingene mellom enhetene av D-glukose i cellulose. Enzymatisk hydrolyse av polysakkarider i celleveggen, tørking ved lav temperatur og mekanisk oppdeling kan potensielt gi samme ekstraksjonsutbytte av fucoxanthin sammenlignet med ekstraksjon med organiske løsemidler. (Shannon og Abu-Ghannam 2018)

### 3.3.4 Analysemetoder

Ved karakterisering og kvantifisering av komponenter i komplekse blandinger, er det ofte nødvendig å foreta en separering av forbindelsene i forkant (Ho og Stuart 2003). Kromatografi er en kjemisk separasjonsmetode for å skille ulike komponenter i en blanding fra hverandre, slik at de kan analyseres. Løsningen som skal analyseres består av analytter og matriks, hvor analyttene er de spesifikke forbindelsene av interesse, mens matriksen er de resterende komponentene.

Kromatografi er basert på at forbindelsene som skal separeres har forskjellige fysikalsk-kjemiske egenskaper, som gjør at de fordeles ulikt mellom en mobil og en stasjonær fase med ulike egenskaper. I moderne applikasjoner er stasjonærfasen vanligvis en kolonne. Mobilfasen er enten en gass (gasskromatografi) eller en væske (væskrokromatografi). (Moldoveanu og David 2013 a) Det er i kolonnen løsningens innhold separeres basert på de fysikalsk-kjemiske egenskaper (Ho og Stuart 2003).

Tiden det tar for et stoff å bevege seg gjennom kolonnen kalles retensjonstid (RT), og denne påvirkes både av molekylens struktur, mobil- og stasjonærfasens natur, mobilfasens strømningshastighet og kolonnens dimensjon (Moldoveanu og David 2013 b). De eluerte molekylene skilles fra mobilfasens komponenter ut fra forhåndsbestemte fysikalsk-kjemiske egenskaper (eksempelvis molekylær masse) og detekteres ved hjelp av en ionedetektor. Ulike komponenter i den separerte løsningen vil ha ulik retensjonstid, som fremstilles grafisk som ulike topper i en kurve, kalt kromatogram, med detektorrespons som funksjon av tid. (Moldoveanu og David 2013 a) Generelt sett vil analytter med lav interaksjon med stasjonærfasen få lav retensjonstid og eluere tidlig, mens analytter med høyere interaksjon får høyere retensjonstid og eluere senere (Bakke u.å.). Et eksempel på hvordan et kromatogram kan se ut er vist nedenfor i figur 3. I eksempelet symboliserer hver topp forskjellige analytter med ulik retensjonstid, og arealet under hver topp er grunnlaget for å bestemme konsentrasjonen av stoffet i prøven.



Figur III: Eksempel på hvordan et kromatogram kan se ut, med ulike topper som signaliserer analytter med ulik retensjonstid. Jo lengre retensjonstid, jo lengre til høyre i kromatogrammet vil (Bakke u.å.)

Det er utviklet en rekke ulike kromatografimetoder, og de ulike metodene skiller seg hovedsakelig fra hverandre avhengig av den stasjonære og mobile fasens aggregattilstand (væske, gass eller fast stoff), samt hvilke fysiokjemiske egenskaper som ligger til grunn ved deteksjon (Moldoveanu og David 2013 a; Poole og Poole 1991).

### 3.3.4.1 Væskekromatografi

Instrumentell væskekromatografi, vanligvis HPLC (high-performance liquid chromatography), er en vanlig kromatografisk metode, som benyttes rutinemessig for et bredt spekter av analyser, for eksempel innen analyser på mat, medisiner og plantevernmidler (Ho og Stuart 2003).

Ved HPLC brukes et løsemiddel eller en løsemiddelblanding i væskeform som mobilfase til å separere de ulike komponentene i en løsning. Komponentene må på forhånd løses opp i et løsningsmiddel, før de kan tvinges, ved hjelp av høyt trykk, til å strømme, via mobilfasen, gjennom en kolonne (stasjonær fase). HPLC kan deles inn i to kategorier; 1) normal fase, hvor det brukes en polar stasjonær fase, vanligvis silika, til å holde på de polare analyttene, og 2)

reversert/omvendt fase, hvor krefter mellom upolare forbindelser og upolare funksjonelle grupper i stoffet utnyttes til å binde de til den stasjonære fasen. (Ho og Stuart 2003)

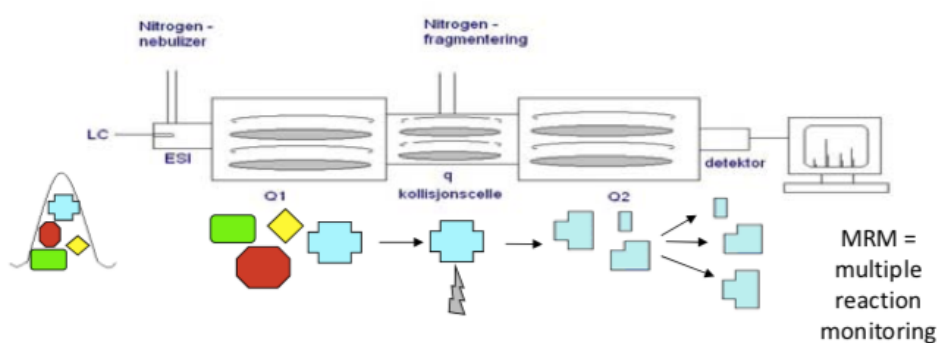
#### **3.3.4.2 Væske kromatografi koblet til masse spektrometri**

Væske kromatografi koblet til massespektrometri, LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) kombinerer separasjonsevnen til HPLC med sensitiv og selektiv deteksjon basert på molekylenes masse. Ved LC-MS konverteres de oppløste analyttene fra mobilfasen i en væskekromatograf til ioner i gass-fase, som videre analyseres etter masse ved hjelp av en masseanalysator (MS). LC-MS anses som en eksepsjonelt sensitiv og selektiv metode sammenlignet med andre deteksjonsteknikker, ved at den enkelt kan måle svært lave nivåer av ulike forbindelser i en prøve og differensiere mellom ulike molekyler med forskjellig masse og fragmenteringsmønstre. (Moldoveanu og David 2013 a)

For LC-MS finnes flere teknikker for å danne ioner, ladede molekyler, av analyttene. De to mest vanlige 1) elektropray-ionisering (electrospray ionization, ESI), hvor ioner dannes ved at en elektropray tilfører høy spenning til løsningen og det dannes en aerosol som løsningsmiddelet kan fordampes fra, og 2) atmosfære-trykk kjemisk ionisering (atmospheric pressure chemical ionization, APCI), hvor ioner dannes ved at høy spenning tilføres en utladningselektrode. (Øiestad 2018) Graden av ionisering påvirker sensitiviteten av masseanalysen. Når fragmenteringen av de ulike komponentene er gjennomført, vil masseanalysatoren måle forholdet mellom masse og ladning til ionene produsert under ioniseringsprosessen (Ludovici m. fl. 2017).

Det finnes forskjellige typer masseanalysatorer, hvor de vanligste er magnetsektor-, kvadrupol-, flygetid- og ionefelleanalysator.

Kvadrupolanalytatorer er masseanalytatorer med lav oppløsning, og har som regel en detekteringsgrense i et massespekter mellom 2 og 1100 Da (Dalton, masseenheter) (Moldoveanu og David 2013a). Ved å kombinere to kvadrupolanalytatorer med en kollisjonscelle oppnår man en trippel kvadrupolanalytator (QqQ MS) (Ludovici m. fl. 2017) eller tandem-MS med to massespektrometre etter hverandre (LC-MS/MS) (Bakke u.å.). Dette gir økt sensitivitet på grunn av mulighet til å fjerne bakgrunnsstøy fra analysen, og økt selektivitet på grunn av muligheten til å overvåke flere reaksjoner for samme analytt (Bakke u.å.). En oversiktsfigur av en MS/MS-prosess er vist nedenfor i figur 4.



Figur 4: Oversiktsfigur av et oppsett av en MS/MS-analyse med væskrokromatograf (LC) koblet til to massespektrometre etter hverandre, Q1 og Q2, ESI, kollisjonscelle og detektor. (Hentet fra Bakke u.å.)

## **4 MATERIALER OG METODER**

### **4.1 Kjemikalier**

- Aceton (62.2 % i MilliQ-vann)
- Etanol (Ethanol absolute 95-97%, AnalaR NORMAPUR)
- Flytende nitrogen
- Natriumacetat (0.1 M, løst i MilliQ-vann)
- Viscozyme® L (Sigma® Life Science)
- MilliQ-vann
- Hydrogenklorid
- Natriumhydroksid

### **4.2 Instrumenter**

- Sentrifuge (Jouan KR 22 i)
- Rotavapor (Heidolph Laborota 4000 – efficient)
- Gammel frysetørke (ukjent leverandør)
- Frysetørke (CHRIST)
- HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity II Prime LC)
- MS (Agilent Technologies 6470 Triple Quad LC/MS)

### **4.3 Utstyr**

- Veieskip
- Vekt (XPE205, METTLER TOLEDO)
- Porselensmorter
- – 80 °C-fryser
- Erlenmeyerkolbe
- Sentrifugerør (15 mL, 50 mL, Falcon®)
- Vortexer (MS2 Minishaker, IKA®)
- Risteinkubator (KS 4000 ic, IKA®)
- Ristebord
- Varmeskap (Termaks)
- Tube Rotator (SB3, Stuart)
- Aluminiumsbeger
- Vannbad (BANDELIN SONOREX, ultralydbad)

- Termometer (Memory Dual Thermo)
- Rundkolber (1 L)
- Sprøyter (2 ml – 10 ml, BD Plastipak)
- Membranfilter (13 mm, w/0.45 µm PFTE, VWR)
- HPLC-glass (Agilent Technologies, gjerne mørke/brune glass)
- Pipetter
- Spatler
- Parafilm
- Aluminiumsfolie
- Dramglass
- Pinsett
- Eksikator

#### **4.4 Prøver**

Brunalgen *Saccharina latissima* ble valgt som prøvemateriale for oppgaven. Prøvematerialet ble dyrket på laboratorier hos SINTEF Ocean og i sjø ved Skarvøya/Hitra våren 2018. På laboratoriet ved SINTEF Ocean ble kulturer av *Saccharina latissima* dyrket med ulike behandlinger, som beskrevet av Forbord et al. (2018). Kulturer med sporer (S) ble dyrket i 21, 28 og 42 dager, henholdsvis 3, 4 og 6 uker. Kulturer med gametofytter (G) ble dyrket i 14, 21 og 28 dager, henholdsvis 2, 3 og 4 uker. Induserte gametofytter (Gi) ble dyrket i 0 og 14 dager (2 uker). Kulturer med sporofytter (D) ble dyrket i 28, 35 og 42 dager, henholdsvis 4, 5 og 6 uker. Tabell 1 og 2 nedenfor viser en total oversikt over dyrkningsstrategiene på prøvene fra MACROSEA-prosjektet.

Spoler med tynt tau ble brukt som substrat for behandlingene som ble dyrket med vektorpoding (merket «vektor» under metode, se tabell 2). Alle disse behandlingene fikk samme nærings-, lys- og temperaturforhold, og ble oppbevart i 300L store sylindere. Kulturene med sporofytter ble blandet ut i en egen limblanding (AlgeaBinder, AtSeaNova) og sprayet direkte på egne tau (AlgeaRope, AtSeaNova) (merket «direkte» under metode, se tabell 2).

Tabell I: Oversikt over livsstadier undersøkt i innledende forsøk. Tabellen viser tarens livsstadium under inkubering, lengden på inkubering i dager og hvilken metode som ble brukt ved påsåing på tau i sjø. (Hentet fra MACROSEA årlige møte 22.01.2019)

Livsstadium	Lengde på inkubering (d)							Metode ved påsåing
<b>Sporer</b>	42		28	21				På spoler, fra sporeslipp
<b>Gametofytter</b>			28	21	14			På spoler, uten induisert fertilitet
<b>Gametofytter Indusert fertilitet</b>					14			På spoler, med induisert fertilitet
<b>Gametofytter Indusert fertilitet</b>							0	Direkte påsåing (lim), med induisert fertilitet
<b>Sporofytter</b>	42	35	28					Direkte påsåing (lim)
<b>Antall uker før utplassering i sjø</b>	6	5	4	3	2	1	0	

Tabell II: Oversikt over når de ulike behandlingene ble startet på laboratoriet (påsåing, induisering, sporeslipp) og tid for utplassering i sjø. (Hentet fra MACROSEA årlige møte 22.01.2019)

Uke	0	1	2	3	4	5	6	
Dato (2018)	03.01	10.01	17.01	24.01	31.01	07.02	14.02	
<b>Sporer 42</b>	Påsåing							Utplassering i sjø
<b>Sporer 28</b>			Påsåing					
<b>Sporer 21</b>				Påsåing				
<b>Gametofytter 28</b>			Påsåing					
<b>Gametofytter 21</b>				Påsåing				
<b>Gametofytter 14</b>					Påsåing			
<b>Gametofytter induisert 14</b>			Indusert		Påsåing			
<b>Gametofytter induisert 0</b>					Indusert			Direkte påsåing/ Utplassering i sjø
<b>Sporofytter 42</b>	Sporeslipp							
<b>Sporofytter 35</b>		Sporeslipp						
<b>Sporofytter 28</b>			Sporeslipp					



På Hitra ble tauene spunnet over til tykkere tau, ved hjelp av en spinnemaskin designet av SINTEF og bygd av Mtech (Trondheim, Norge). Tauene ble så festet til bæreliner ut i anlegget på sjøen. Dette var en del av WP1 (Work Package 1) "Seedling biology" i prosjektet MACROSEA, som skulle forbedre klekkeriforholdene og redusere kultiveringskostnadene ved dyrking av tare.

Prøvematerialet ble plantet i sjø i midten av februar og høstet i midten av juni. Etter høsting ble prøvematerialet fraktet til SINTEF Sealab i Trondheim, hvor prøver til kjemi ble sortert og fryst (-20 °C). Av det totale prøvematerialet ble det plukket ut 12 populasjoner, 6 fra hver line, B og C. Disse 12 ble valgt for å representere hele utvalget av ulike behandlinger som var brukt ved dyrkingen. Tabell 3 nedenfor gir en total oversikt over de utvalgte prøvene, med navn på prøvene under prosessering og type behandling gitt på laboratoriet før dyrking i sjø.

**Tabell 3: Oversikt over utvalgte prøver, hvilken bæreline i sjøen de er dyrket på (B eller C), inkludert behandling, forklaring på behandling og metode for utplassering i sjø (vektor/direkte).**

Line	Prøve	Behandling	Forklaring	Metode
<b>B</b>	B1	G21	Gametofytter, 21 dager inkubering	Vektor
	B4	Gi14	Gametofytter, induisert fertilitet, 14 dager inkubering	Vektor
	B5	D43	Sporofytter, 42 dager inkubering	Direkte
	B8	S21	Sporer, 21 dager inkubering	Vektor
	B10	D35	Sporofytter, 35 dager inkubering	Direkte
	B11	S42	Sporer, 42 dager inkubering	Vektor
<b>C</b>	C3	Gi14	Gametofytter, induisert fertilitet, 14 dager inkubering	Vektor
	C4	S21	Sporer, 21 dager inkubering	Vektor
	C5	S42	Sporer, 42 dager inkubering	Vektor
	C7	D42	Sporofytter, 42 dager inkubering	Direkte
	C8	G21	Gametofytter, 21 dager inkubering	Vektor
	C9	D35	Sporofytter, 35 dager inkubering	Direkte

## 4.5 Metoder

### 4.5.1 Bestemmelse av tørrvekt

Fryste (-20 °C) prøver av *S. latissima* knust med nitrogen (1-2 g) ble plassert i dramglass med kjent vekt og veid. Prøvene ble tørket i varmeskap (105 °C, 24 timer) og nedkjølt i en eksikator, før de deretter ble veid på nytt. Tørrvekt ble bestemt som differansen mellom vekt før og etter tørking. For utregning av forholdet mellom tørrvekt (TV) og våt vekt (VV) se formel 1 vedlegg 1.

### 4.5.2 Innledende forsøk med fucoxanthin-standard

Fucoxanthin-standard (100 µl) [10.0 µg/mL] og acetone (20 mL, 62.2%, pH 5.7) ble blandet i en Erlenmeyerkolbe dekt med parafilm og ekstrahert på to ulike måter, både på risteinkubator og ved plassering av flasker på et ristebrett i et varmeskap (30 °C, 100 r.p.m., 36.5 minutter) ved mørke forhold. Videre ble løsning med standard kjørt gjennom hele metoden- for å teste utstyr, finne mulige løsninger ved eventuelle utfordringer, og for å tilpasse metoden til endelig gjennomkjøring med tareprøver.

### 4.5.3 Forberedelse av prøver til ekstraksjon

Tareprøver (~10 g) fryst ved -80 °C ble knust i en morter og stampet med flytende nitrogen. Knuste tareprøver ble lagret ved -80 °C til ekstraksjonen ble utført.

### 4.5.4 Ekstraksjon med acetone og inndamping av løsemiddel

Metoden for ekstraksjon ble endret underveis, og to ulike metoder (metode 1 og metode 2) er beskrevet nedenfor. Det ble tatt ett tilfeldig uttak av hver prøvene med unntak av tre uttak av prøve B8 i metode 1 og B4 i metode 2. Det ble ikke skilt mellom de ulike delene (blad, stipe, hapter) av algen.

Knuste tareprøver (~ 2 g, nøyaktig veid) ble tilsatt acetone (62.2% i MilliQ-vann, pH 5.7) i forholdet 1:10 (w/v) i en kolbe dekt med parafilm og ekstrahert ved

mørke forhold. pH i aceton-løsningen ble justert med hydrogenklorid og natriumhydroksid og kontrollert med pH-papir.

Metode 1: Prøvene ble ekstrahert i Erlenmeyerkolber som ble plassert på et ristebord satt i et varmeskap (30 °C, 100 r.p.m., 36.5 minutter). Flaskens innhold ble deretter overført til Falcon®-rør (50 mL sentrifugerør).

Metode 2: Prøvene ble ekstrahert direkte i sentrifugerør (Falcon®, 50 mL). Disse ble festet i en rør-rotator (Tube Rotator Stuart, SB3) som ble plassert i et varmeskap (30 °C, 3.5 minutter).

Etter ekstraksjon ble prøvene sentrifugert (10 minutter, 4°C, 12000 x *g*) (Jouan KR22I Centrifuge 000579). Supernatanten ble beholdt, og pelleten vasket og sentrifugert 3 ganger med aceton (20 mL, 62.2 %, pH 5.7). Samlet supernatant ble filtrert (Sigma Aldrich Millex Durapore 0.45 µm pore, 13 mm diameter) og redusert til 5 mL med roterende fordamping ved 30 °C. Trykket ble senket gradvis under fordampingen, fra ca. 250 mbar til 30 mbar. (Heidolph). Ekstraktene ble fryst i Falcon®-rør (50 mL sentrifugerør) ved -80 °C til LC-MS-analyser.

#### **4.5.5 Frysetørking og filtrering før analyse**

Metoden for frysetørking og filtrering ble endret underveis, og to ulike metoder er beskrevet nedenfor. Metode 1 og 2 gjelder for de samme prøvene som metode 1 og 2 for ekstraksjon, se kapittel 4.5.3 ovenfor.

Lagrede tare-ekstrakter, fryst ved -80 °C, ble lyofilisert til pulver ved frysetørking.

Metode 1: Prøvene ble lyofilisert ved hjelp av en gammel frysetørke av ukjent leverandør på kjemilaboratoriet ved SINTEF Ocean (48 timer, -50 °C, 0.4 mbar). En del av lyofilisert tare-ekstrakt (~ 100 mg, nøyaktig veid) ble deretter preparert til LC-MS/MS-analyser ved å overføre ekstraktene til Falcon®-rør (50

mL sentrifugerør). Ekstraktene ble tilsatt etanol (10 mL) og løst opp ved hjelp av Vortexer (MS2 Minishaker, IKA®).

Metode 2: Prøvene ble lyofilisert ved hjelp av frysetørke (CHRIST) (24 timer, -50 °C, 1 mbar + endelig tørking: -50 °C, 18 timer, 0.02 mbar). En del av lyofilisert tare-ekstrakt (~ 100 mg, nøyaktig veid) ble deretter preparert til LC-MS/MS-analyser ved å overføre ekstraktene til aluminiumsbeger. Ekstraktene ble tilsatt etanol (10 mL) og løst opp ved hjelp av omrøring med spatel.

Oppløste prøver ble deretter filtrert (Sigma Aldrich Millex Durapore 0.45 µm pore, 13 mm diameter) med sprøyte i over i målekolber (25 mL) og fortynnet med etanol til merket. Fra målekolbene ble prøvemateriale (100 µl) og etanol (900 µl) pipettert over i mørke HPLC-glass (Agilent Technologies 2 ml Amber screw top glass vial).

Lyofilisert tare-ekstrakt som ikke ble brukt til LC-MS-analyser ble bevart slik de var etter frysetørking og senere brukt ved beregning av fucoxanthin-konsentrasjon i prøvene. For å finne nøyaktig vekt på den totale mengden lyofilisert ekstrakt, ble Falcon®-rørene veid, vasket og tørket, før de ble veid på nytt. Differansen (x, mg) mellom rør før og etter vasking representerer lyofilisert tare-ekstrakt som ikke ble brukt i LC-MS-analysen.

#### **4.5.6 Validering av metode**

Metoden for ekstraksjon av fucoxanthin med aceton ble validert ved bruk av spikede prøver fucoxanthin-standard. Tre steg i metoden ble validert for å se på eventuelle tap. Dette ble gjort ved å behandle standarden kun med det steget i metoden som skulle testes for tap eller påvirkning. Dette ble gjort for følgende steg: 1) ekstraksjon (metode 2, ekskludert sentrifugering), 2) inndampning av løsemiddel med rotavapor og 3) filtrering gjennom filter.

For å teste tapet i disse tre parameterne ble fucoxanthin-standard (100 µl) [10 µg/mL] tilsatt aceton (20 ml) og deretter ekstrahert, inndampet med rotavapor

*eller* filtrert. Standard (100 µl) ble pipettert over i mørke HPLC-glass (Agilent Technologies 2 ml Amber screw top glass vial) med etanol (900 µl). Standardene ble deretter direkte analysert med LC-MS/MS uten videre behandling. Mengde tap (%) i stegene ble beregnet opp mot en ubehandlet standard (100 µl) [10 µg/mL] kun tilsatt aceton (20 ml) og analysert med LC-MS.

#### **4.5.7 Forsøk på ekstraksjon med Viscozyme**

Fucoxanthin-standard (100 µl) [10.0 µg/mL] og natriumacetatbuffer (4 mL, 0.1 M, pH 4.5) ble blandet i en Erlenmeyerkolbe dekt med parafilm og ekstrahert i ovn (Termax, 50 °C, 100 r.p.m., 10 min). pH i bufferen ble justert med hydrogenklorid og natriumhydroksid og kontrollert med pH-papir. Da flaskens innhold nådde 50 °C ble den tilsatt flytende Viscozyme (100 fungal β-glukanase enheter g<sup>-1</sup>) i forholdet 0.5 % av det totale innholdet av løsemiddelet, og ekstrahert videre i ovn (Termax, 50 °C, 100 r.p.m., 3 timer).

Prøver av *S. latissima* ble plassert i ett lag på brett og tørket i ovn under mørke forhold (Termax, 40 °C, 12 timer, 2.0 ± 0.1 ms<sup>-1</sup>).

Ekstraksjon med Viscozyme ble ikke fullført, da det viste seg å være for tidkrevende.

#### **4.5.8 Karakterisering av fucoxanthin med LC-MS/MS**

Separasjon ble oppnådd ved bruk av væskechromatografi-massespektrometri (HPLC-MS/MS, Agilent Technologies: 1260 Infinity II Prime LC + 6470 Triple Quad LC/MS, ved 800 bar), med en C-30 reversert-fase kolonne (YMC Carotenoid 4.6 mm x 250 mm I.D., S-5 µm, silika basert) og ESI som ioniseringskilde. To mobilfaser A og B ble brukt, hvorav A bestod av 80 % metyl-tert-butyleter (MTBE) og 20 % metanol og B av 100 % metanol. Begge tilsatt ammoniumacetat [0.7 g L<sup>-1</sup>] og acetylaceton [0.1 %].

Et 50-minutters program ble brukt med en strømningshastighet på 0.600 mL min<sup>-1</sup> og et injeksjonsvolum på 5.0 µL, ved romtemperatur i hele systemet

(temperatur ikke monitorert). Følgende betingelser var gitt for masse-spektrometeret: positiv ioniseringsmodus, 160 V fragmenteringsspenning, 2500 V kapillærspenning og 53 V kollisjonsenergi. Forstøveren hadde trykk på 40 psi og strømningshastighet på 4 L min<sup>-1</sup>. MRM-overgangen ble satt fra 659.4 til 109. Konsentrasjonen av fucoxanthin i tare-ekstraktene ble ekstrapolert fra ulike konsentrasjoner av kommersiell fucoxanthin-standard.

En oversikt over når, og i hvor stor mengde, de ulike mobilfasene A og B er brukt i LC-MS/MS-analysen er gitt i tabell 4 nedenfor. Strømningshastighet og trykk brukt ved de ulike trinnene er også gitt.

**Tabell 4: Hvor lenge og mengde av mobilfasene A og B gjennom metoden, inkludert strømningshastighet og trykk brukt.**

<b>Trinn</b>	<b>Tid i prosess [min]</b>	<b>Mobilfase A [%]</b>	<b>Mobilfase B [%]</b>	<b>Strømningshastighet [mL min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Trykk [bar]</b>
<b>1</b>	0-10	25	75	0.600	800
<b>2</b>	10-20	50	50	0.600	800
<b>3</b>	20-25	70	30	0.600	800
<b>4</b>	25-35	90	10	0.600	800
<b>5</b>	35-37	94	6	0.600	800
<b>6</b>	37-39	10	90	0.600	800
<b>7</b>	39-50	10	90	0.600	---

#### 4.5.9 Kvantifisering av fucoxanthin

Kalibreringskurve for LC-MS-analyser ble produsert ved å forberede HPLC-glass med følgende åtte konsentrasjoner av fucoxanthin-standard; 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 og 10.0 µg/mL. Arealet under toppene i grafen som korresponderte med retensjonstiden til fucoxanthin-standard ble plottet mot konsentrasjon. Lineær regresjon mellom konsentrasjon av standard og respons (areal) på LC-MS ble utført, og brukt for å finne konsentrasjonen i tareprøvene (ikke prøve B10, som hadde Lineær regresjon ga:  $y = 3021.9x + 845.76$  og  $R^2 = 0.98294$ , se tabell 1 og figur 1, vedlegg 2, s. 1. Resultatet ble omregnet til konsentrasjon av fucoxanthin [mg/g] tare (tørrvekt) veid opp.

De tre laveste konsentrasjonene: 0.001, 0.01, 0.05 µg/mL, ble brukt til å utarbeide en kalibreringskurve for utregning av konsentrasjon av fucoxanthin i standarder, brukt ved validering av metoden. Denne kalibreringskurven ble også brukt til å regne ut konsentrasjon i prøve B10 (metode 2).

## 5 RESULTATER

### 5.1 Validering av metoden

Validering av metoden ble gjort ved å teste følgende tre steg for tap; ekstraksjon (metode 2), inndamping av løsningsmiddel med rotavapor og filtrering.

Resultatene for disse testene er gitt i tabell 5 nedenfor.

Tap i prosessen er gitt som prosent av en ubehandlet standard med samme konsentrasjon som prøven i steget som ble testet. Resultatene for de ulike stegene (ekstraksjon (metode 2), inndamping av løsemiddel og filtrering) er basert på LC-MS/MS-analyser av fire standarder, se tabell III, vedlegg 2.

Beregningene for disse verdiene er gitt i formel 10 og tabell V, vedlegg 3.

Fra tabell 5 kan man se at inndamping av løsemiddel (kun kalt inndamping i tabell) er det steget med størst risiko for tap av fucoxanthin gjennom metoden, med 96 %. Ekstraksjon med aceton er det steget med minst risiko for tap, 7 %.

**Tabell 5: Prosentvis tap gjennom de ulike stegene testet i metoden: ekstraksjon (metode 2), inndamping av løsemiddel og filtrering gitt som % av arealet til en ubehandlet standard**

Steg	Konsentrasjon [ $\mu\text{g}$ ]	Tap (%)
Standard ubehandlet	2.1	---
Ekstraksjon	1.9	7
Inndamping	0.1	96
Filtrering	1.3	36

### 5.2 Fucoxanthin-innhold

Mengde [ $\text{mg g}^{-1}$ ] fucoxanthin i de ulike tareprøvene av *Saccharina latissima* ble bestemt ved hjelp av ekstraksjon og LC-MS/MS-analyser og resultatene er gitt i tabell 5 nedenfor. Tabellen viser en oversikt over prøve, behandling og korresponderende mengde fucoxanthin [ $\text{mg}$ ] per gram tørrvekt av prøvene.

Rådata for beregningene som ligger til grunn for verdiene i tabell 5, er gitt i tabell 3, vedlegg 2.



Fra tabell 5 kan man se at prøve C4 har det høyeste innholdet av fucoxanthin per gram tare (tørrvekt), med henholdsvis 1.5 mg g<sup>-1</sup> og 1.4 mg g<sup>-1</sup> for metode 1 og metode 2. Fucoxanthin-innholdet er gjennomgående høyere ved metode 2 enn ved metode 1.

**Tabell 5: Resultat fra LC-MS-analyse på ekstraksjon og kvantifisering av fucoxanthin, metode 1.** Tabellen viser mengden fucoxanthin i hver tareprøve, gitt som mg g<sup>-1</sup> tørrvekt, samt hvilken line i sjøen prøven er dyrket på, behandling prøven har fått og forkortelse for behandling (kode). Se kommentarer i fotnoter for prøve B4, B11, C3, C7 og C9 (metode 1).

Line	Prøve	Behandling		Fucoxanthin-innhold [mg/g] (tørrvekt)		
				Metode 1	Metode 2	
<b>B</b>	1 (B1)	Gametofytter, 21 dager inkubering	G21	<b>0.55</b>	<b>0.61</b>	
	4 (B4)	Gametofytter, 14 dager inkubering indusert fertilitet	Gi14	0.14 <sup>1</sup>	Uttak 1	<b>0.83</b>
					Uttak 2	<b>0.64</b>
					Uttak 3	<b>1.3</b>
	5 (B5)	Sporofytter, 42 dager inkubering	D42	<b>0.91</b>	<b>1.3</b>	
	8 (B8)	Sporer, 21 dager inkubering	S21		Uttak 1	<b>0.98</b>
					Uttak 2	<b>0.73</b>
Uttak 3					<b>0.32</b>	
10 (B10)	Sporofytter, 35 dager inkubering	D35	<b>1.1</b>	0,19 <sup>2</sup>		
11 (B11)	Sporer, 42 dager inkubering	S42	0.26 <sup>1</sup>	<b>1.4</b>		
<b>C</b>	3 (C3)	Gametofytter, 14 dager inkubering indusert fertilitet	Gi14	0.94 <sup>1</sup>	<b>0.82</b>	
	4 (C4)	Sporer, 21 dager inkubering	S21	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	
	5 (C5)	Sporer, 42 dager inkubering	S42	<b>0.99</b>	<b>1.2</b>	
	7 (C7)	Sporofytter, 42 dager inkubering	D42	0.73 <sup>1</sup>	<b>0.84</b>	
	8 (C8)	Gametofytter, 21 dager inkubering	G21	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>	
	9 (C9)	Sporofytter, 35 dager inkubering	D35	0.90 <sup>1</sup>	<b>1.1</b>	

<sup>1</sup> Mekanisk tap som følge av lekkasje ved ekstraksjon.

<sup>2</sup> Sannsynlig dekomponert som følge av høy temperatur ved inndamping av

<sup>2</sup> Sannsynlig dekomponert som følge av høy temperatur ved inndamping av løsemiddel.

## 6 VURDERING

Hovedmålet med oppgaven var i utgangspunktet å finne ut hvilken effekt ulik dyrkningsstrategi, brukt i MACROSEA våren 2018, har på den kjemiske sammensetningen av makroalgen *Saccharina latissima*, med fokus på karotenoidet fucoxanthin. Ekstraksjon og analyse av fucoxanthin fra makroalger er ikke en standardisert metode ved SINTEF OCEAN, og for å nå målet måtte en metodikk for dette utarbeides. Den største delen av denne oppgaven har dermed gått til utvikling og tilpassing av en metode for ekstraksjon og analyse av fucoxanthin, mens en mindre del har gått til å se på den kjemiske sammensetningen til *S. latissima*. Dette har medført at målet med oppgaven har delvis endret seg fra å se på effekt av dyrkningsstrategi, til å rette seg mer mot metodeutvikling.

### 6.1 Optimalisering og validering av metode

#### 6.1.1 Innledende forsøk med fucoxanthin-standard

Under de innledende forsøkene med fucoxanthin-standard ble det oppdaget at risteinkubatoren, som først var planlagt å bruke til ekstraksjon, var ustabil i temperatur. Temperatur i risteinkubator oversteg innstilt temperatur på 30 °C. Da karotenoider ikke bør utsettes for temperaturer over romtemperatur (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995, s. 83) ble risteinkubatoren byttet ut med et ristebord plassert i et varmeskap for ekstraksjon.

#### 6.1.2 Gjennomførte tiltak

Etter første gjennomføring av ekstraksjon, frysetørking og filtrering, metode 1, ble det bestemt å gjennomføre en runde til. Ved andre gjennomføring, metode 2, ble prøvemateriale fra de samme plantene som ved første runde brukt. Tiltakene som ble innført ble gjort etter erfaringer fra første runde, og utarbeidet på grunnlag av hypoteser om hvordan metoden kunne bli mer optimal.

Ekstraksjon i Erlenmeyerkolbe førte til et par utfordringer. De fryste tare-prøvene tinte i løpet av et par minutter, noe som gjorde oppveining og overføring av prøvemateriale fra veieskip til Erlenmeyerkolbe vanskelig, uten tap av materiale. Etter overføring var det mye materiale som satte seg fast i flaskehalsen og ble vanskelig å skylle ned i flasken, og følgelig ble det vanskelig å eksponere alt av prøvematerialet for aceton. Ristebordet var gammelt og ga ujevn omrøring, noe som førte til at noen av flaskene falt overende inne i varmeskapet og noe løsning lakk ut. Dette gjaldt prøve B4, C3, C7 og C9 i metode 1, og kan forklare hvorfor alle disse, foruten C3, har lavere konsentrasjon enn tilsvarende prøver i metode 2. Dette kan enkelt løses ved å ta i bruk et nyere og bedre ristebord med mulighet for stødig ekstraksjon i Erlenmeyerkolbe eller ved bruk av flasker eller annen type beholder med mulighet for å lukkes med tett kork eller topp.

Ekstraksjon direkte i Falcon®-rør løser alle disse utfordringene, da sentrifugerørene ikke har en flaskehals som påvirker overføringen. I tillegg kan sentrifugerør veies direkte på vekta, og oppveining via veieskip ble overflødig. Ved direkte overføring til sentrifugerør kan sentrifugerørene plasseres rett i sentrifugen etter ekstraksjon, noe som sparer metoden for et ytterligere trinn med overføring av materiale, og reduserer dermed tidsforbruket og faren for et eventuelt tap ved overføring.

I metode 1, hvor det ble brukt Falcon®-rør (50 mL sentrifugerør) til å løse opp lyofilisert tare-ekstrakt i etanol, ble det erfart at rørene var for store til å at sprøyten, som skulle brukes ved filtrering, klarte å suge opp hele løsningen. Sentrifugerørene var derimot godt egnet til å løse opp blandingen i, da vortexer kunne benyttes til dette. Sentrifugerør kan også lett gjøres lystette, ved å kle de i aluminiumsfolie, noe som er viktig ved arbeid med pigmenter (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 83) I metode 2 ble det valgt å benytte aluminiumsbeger for å gjøre det lettere å suge opp løsningen med sprøyte. Det var derimot vanskeligere å få løst prøven godt opp i aceton ved bruk av slike beger, da vortexer ikke kunne benyttes. Ved overføring til slike beger fikk løsningen en større overflate, og prøven ble dermed lettere utsatt for lyseksponering.

Optimale rør med plass til sprøyte uten videre overføring til annen beholder, og mulighet for god miksing og lite lyseksponering, vil være en aktuell løsning på denne utfordringen.

Det er generelt noe høyere verdier for fucoxanthin-innhold i prøver fra metode 2, men forskjellen i mengde er såpass liten på flere av prøvene at det er vanskelig å trekke noe konklusjon fra dette. Flere prøver fra metode 1 hadde i tillegg et mekanisk tap i ekstraksjonen, noe som trolig har gitt en lavere beregnet konsentrasjon i disse.

### **6.1.3 Metode**

Beholderne som ekstraktene ble frysetørket i, burde vært veid på forhånd for å unngå steget med vasking og tørking av beholdere. Dette ville redusert tidsforbruket ved at man kunne ha veid beholderne direkte, etter uttak av frysetørket materiale til LC-MS, for å finne den totale samlede vekten av frysetørket materiale. Steget med frysetørking burde også vært testet for eventuelt tap, for å se hvordan frysetørkingen spiller inn på det totale tapet gjennom hele metoden. Dette ble ikke gjennomført i denne oppgaven på grunn av begrenset tidsbruk, men anbefales å være en del ved videre arbeid.

Aceton er godt dokumentert som et effektivt løsningsmiddel for ekstraksjon av fucoxanthin (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82; Shannon og Abu-Ghannam 2016), noe som gjenspeiles i høyt ekstraksjonsutbytte i denne oppgaven. Da det anbefales å bruke løsemidler med lavt kokepunkt ved ekstraksjon av karotenoider (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 83), antas det at vann, som har et mye høyere kokepunkt enn aceton (Heidolph u.å.), kan være årsaken til problematikken ved inndamping av løsemidler. Ved å bytte ut vann med et løsningsmiddel med lavere kokepunkt, for eksempel metanol, (Heidolph u.å.) som også er et godt løsemiddel for pigmenter (Kanda m. fl. 2014; Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83; Shannon og Abu-Ghannam 2016) kunne dette problemet muligens vært unngått.

Selv om ekstraksjonsutbyttet er høyt ved bruk av aceton (62.2 % i MilliQ-vann) bør videre optimalisering av metoden likevel gjennomføres for å unngå store tap og dermed øke ekstraksjonsutbytte ytterligere. *Saccharina latissima* er en fornybar kilde til flere bioaktive komponenter (Holdt og Kraan 2011; Rey m. fl. 2019), deriblant karotenoidet fucoxanthin, som kan ha stor positiv helseeffekt (Abidov m. fl. 2009; Beppu m. fl. 2012; Kotake-Nara m. fl. 2001; Maeda m. fl. 2005; Miyashita & Hosokawa 2007; Nakazawa m. fl. 2009; Oh m. fl. 2016; Okuzumi m. fl. 1993; Park m. fl. 2011). Slike bioaktive komponenter er ønskelig å bruke som verdifulle tilsetninger i blant annet medisin og mat (Forbord m. fl. 2018; Holdt og Kraan 2011), men aceton vil ikke være aktuelt som løsningsmiddel ved ekstraksjon av fucoxanthin til slike formål da det er mildt giftig for dyr og mennesker (CAS 2012; NCBI u.å.).

#### **6.1.4 Validering av metode**

Fra valideringsforsøkene med kun standard og løsemiddel, observeres det store tap i enkelte steg i metoden, opp til 96 % ved inndamping av løsemiddel med rotavapor. Dette er et veldig høyt tap, men det er mulig at dette dreier seg om et problem kun med den spesifikke prøven. Det er uansett vanskelig å si om det reelle tapet i prøver med alger er noe annerledes enn prøver som kun inneholder standard, da prøver med alger har en matriks bestående av andre komponenter enn fucoxanthin. Hvordan disse matrikseffektene påvirker tapet er ikke testet i dette arbeidet, og det er dermed umulig å si hvordan dette påvirker tapet.

Store tap ved inndamping av løsemiddel kan skyldes dekomponering av fucoxanthin, eller at fucoxanthin fester seg irreversibelt på veggene i rundkolben og ikke lar seg vaske ut. Selv om temperaturen på vannbadet i rotavapor var satt til 30 °C, 10 grader lavere enn maksimal anbefalt temperatur i vannbadet, som er 40 °C (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83), kan dekomponering være forårsaket av støtkoking i målekolben. Trykket ble, som tidligere nevnt i kapittel 4.5.4, senket gradvis under fordampingen, fra ca. 250 mbar til 30 mbar, for å få dampet av både vann og aceton fra løsningen, noe som kan ha forårsaket støtkoking. Dekomponering av fucoxanthin kan også komme av lyseksponering

under inndampingsprosessen. Pigmenter tåler ikke eksponering av sollys, og det anbefales at instrument og utstyr dekkes til ved arbeid med pigmenter (Schiedt og Liaaen-Jensen s. 83), noe som var vanskelig å gjennomføre under inndamping, da både trykk, temperatur og volum på prøven ble kontrollert jevnlig.

Store tap i gjennom metoden vil påvirke det målte innholdet av fucoxanthin i algeprøver slik som de brukt i dette arbeidet, men dette er ikke tatt høyde for slik tap i beregningene i denne oppgaven. Det er vanskelig å trekke en konklusjon ut av ett forsøk med kun én enkelt prøve. Det er derfor nødvendig å verifisere disse resultatene videre i flere forsøk, helst med flere paralleller, for å kunne si noe om hvor store tap man kan forvente i de ulike stegene.

## **6.2 Innhold av fucoxanthin**

Både det laveste og høyeste resultatet av mengde fucoxanthin ble oppnådd med metode 1, i henholdsvis prøve B4 med behandling Gi14 og C4 med behandling S21 (se tabell 5). B4 består av gametofytter med induisert fertilitet inkubert i 14 dager på laboratorium, mens C4 består av sporer inkubert på laboratorium i 21 dager. Begge er plassert i sjø med vektorpoding.

Denne vurderingen gjelder kun om man ikke tar hensyn til at B4 hadde et mekanisk tap av prøvemateriale som følge av lekkasje ved ekstraksjon, ved gjennomføring av metoden. Det samme gjelder prøve B11, metode 1. Prøve B10, metode 2, har også lavt innhold av fucoxanthin sammenlignet med de andre prøvene. Ved utregning av konsentrasjon med regresjonslinje fra samme kalibreringskurve som de andre prøvene, fikk B10 (metode 2) negativ konsentrasjonsverdi. Dette kommer av at arealet for B10 fra LC-MS/MS var for lavt til å bli dekt av kalibreringskurven. Det ble derfor avgjort å regne konsentrasjonen av fucoxanthin i B10 (metode 2) fra kalibreringskurven brukt til utregning av fucoxanthin i standarder brukt i validering av metoden. En kalibreringskurve som dekker alle verdiene fra LC-MS-analysene burde vært utarbeidet.

Den lave verdien for B10 kan forklares av problemer med rotavapor i form av vanskeligheter med temperatur- og trykkregulering. Prøven kokte selv om instrumentet viste 30 °C og atmosfæretrykk, noe som kan ha ført til at fucoxanthin-innholdet ble dekomponert da karotenoider tåler lite varme (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 83).

Ser man alle resultater under ett, er det generelt ikke store forskjeller på konsentrasjon av fucoxanthin i prøver undergått ulik dyrkningsstrategi. Da alt prøvematerialet var av samme art, inkubert ved samme laboratorium, dyrket på samme lokalitet i sjø og høstet på samme tid, kan man til en viss grad forvente små variasjoner som her. Da det ikke er gjennomført test av flere replika av samme, homogene prøve, er det ikke mulig å si noe sikkert om hvilken behandling som er best for å gi høyest fucoxanthin-innhold i algeprøvene, basert på disse resultatene.

Ut fra enkeltresultater fra denne analysen er det behandling S21, dyrkningsstrategien med sporer inkubert på laboratorium i 21 dager og vektorpoding i sjø, som gir størst innhold av fucoxanthin (mg/g) per tørrvekt tare. Ved å se på de ulike livsstadiene til planten, ved behandling på laboratoriene, kan man anta at inkubering av kulturer med sporer (S) er best egnet for å oppnå et høyt fucoxanthin-innhold. I forhold til lengden på inkubasjonsperioden, kan man anta ut i fra disse resultatene at 21 dager er optimal lengde.

Flere av resultatene i dette arbeidet er høye sammenlignet med tidligere publiserte verdier av fucoxanthin i *S. latissima* og andre brunalger, hvor resultatene ligger rundt 0.5 mg g<sup>-1</sup> (Holdt og Kraan 2010; Shannon og Abu-Ghannam 2016). En forklaring på dette kan være knusingen med flytende nitrogen, som har bidratt til å bryte ned den sterke thallusen, rik på polysakkarider. Det flytende nitrogenet skaper brudd i kloroplastenes cellevegg og det frigjøres dermed komplekser med pigment fra thylakoidene, som eksponeres for aceton. (Shannon og Abu-Ghannam 2016)

Det er kjent at de ulike delene av planten har ulikt innhold av fucoxanthin (Shannon og Abu-Ghannam 2016) hvorav bladene inneholder mest. I denne oppgaven er det ikke skilt mellom de ulike delene av planten, da tilfeldige prøver av planten ble brukt. Dette kan være en mulig forklaring på de forskjellene man ser i de ulike uttakene av samme plante, som ved B8 uttak 1, B8 uttak 2 og B8 uttak 3, men om de store variasjonene i prøvene kommer av prøvematerialets natur eller metoden er vanskelig å si. Dersom det hadde vært mer tid til å jobbe med analysene, ville det vært hensiktsmessig å analysere mengden av fucoxanthin i flere uttak fra samme plante, for å få verifisert resultatet oppnådd i denne oppgaven.

### **6.3 Vurdering av læring**

Alt arbeid relatert til denne oppgaven har vært svært lærerikt, da det har gitt et innblikk i, og erfaring med, hvordan forskning utføres i praksis. På forskningslaboratorium, som ved SINTEF Ocean, er det ofte høy aktivitet, med mange ulike former for metoder og analyser som gjennomføres samtidig. Dette krever høy grad av planlegging og samarbeidsevne mellom forskerne, slik at alle får mulighet til å gjennomføre sine forsøk innen den enkeltes tidsramme.

Ved etablering av nye metoder kreves det at man hele tiden evner å tenke flere steg fremover, slik at det kan planlegges innkjøp, og bruk av, utstyr og instrument nødvendig for gjennomføring av metoden, og slik at eventuelle utfordringer som kan møtes på kan unngås i størst mulig grad. Et laboratorium er ikke nødvendigvis tilrettelagt for metoden(e) man ønsker å innføre, noe som kan resultere i en del prøving og feiling, og i flere tilfeller må man være løsningsorientert og tilpasse metoden underveis. Her spiller erfaring stor rolle, og samarbeid mellom ulike forskere, med ulik kunnskap og erfaring, kan være helt nødvendig for at en ny metode kan bli etablert.

Arbeidet i denne oppgaven har også gitt undertegnede god innblikk i, og verdifull erfaring og kunnskap om, ekstraksjon og analyser av komponenter, spesielt karotenoider, i algeprøver. Kunnskap om hvordan ulike løsemidler spiller inn på



både prøvemateriale og ulike komponenter i løsning, hvordan naturlige forhold på et laboratorium, som lys og temperatur, kan påvirke prøvematerialet, hvordan instrument, som i utgangspunktet er like, kan oppføre seg ulikt, samt hvordan ulike tiltak kan være nødvendig å gjennomføre for å få en ny metode etablert, har gitt viktig erfaring ved videre arbeid.

#### **6.4 Forslag til videre arbeid**

Som forslag til videre arbeid anbefales det å gjennomføre hele metoden flere ganger, for å se på om den gir et reproduserbart resultat. Metoden må også optimaliseres ytterligere slik at tapet i prosessen minskes. For å lettere kunne sammenligne resultatene fra analysen, kan det være aktuelt å homogenisere prøvene og gjennomføre ekstraksjon på flere paralleller fra samme plante. Dette vil gjøre det mulig å regne ut gjennomsnittlig verdi av fucoxanthin-innhold i planten og finne et standardavvik, noe som øker sikkerheten i metoden. Det anbefales også å utarbeide en kalibreringskurve som dekker alle areal fra LC-MS-analyser, slik at det ikke blir noe usikkerhet ved beregning av konsentrasjon i prøvene.

Det bør vurderes om det finnes annet og bedre utstyr til bruk ved ekstraksjonen generelt. Om det finnes mer optimale beholdere med tette korker eller lokk, som hindrer tap ved eventuelle velt av beholdere, bør undersøkes og om mulig innføres som et tiltak mot tap. Det kan også være aktuelt å innføre bruk av risteinkubator i metoden, dersom man har tilgang til en risteinkubator med god kontroll av temperaturer.

Det kan også være aktuelt å benytte et annet løsemiddel enn vann, da vann har høyt kokepunkt. Som tidligere diskutert, kan metanol som fordel brukes da dette er et godt løsemiddel for karotenoider, og har et lavere kokepunkt enn vann (Kanda m. fl. 2014; Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82-83; Shannon og Abu-Ghannam 2016). Selv om det er dokumentert at aceton er et godt løsemiddel for pigmenter (Schiedt og Liaaen-Jensen 1995 s. 82; Shannon og Abu-Ghannam

2016) kan det være aktuelt å undersøke andre blandinger av løsemidler enn aceton og vann.

Selv om ekstraksjonsutbyttet, ved bruk av aceton (62.2 % i MilliQ-vann) som løsemiddel, er høyt, må det utarbeides metoder for ekstraksjon som ikke innebærer organiske løsemidler. For utnyttelse av fucoxanthin fra *S. latissima* som en verdifull biokjemisk komponent i medisiner og mat, bør det blant annet arbeides videre med ekstraksjon med enzymer, som ikke gir økt fare for miljøbelastning eller eksponering av giftstoffer (Shannon og Abu-Ghannam 2018). Andre miljø- og helsevennlige muligheter bør også utforskes. Her bør metoden gjennomføres i sin helhet slik at den kan optimaliseres og tilpasses de aktuelle laboratoriene.

## 7 KONKLUSJON

I denne oppgaven har det vært arbeidet med å etablere og tilpasse en metode for ekstraksjon og analyse av karotenoidet fucoxanthin fra brunalgen *Saccharina latissima*, ved laboratoriene til SINTEF Ocean SeaLab i Trondheim.

Flere av resultatene i dette arbeidet er høye sammenlignet med tidligere publiserte verdier av fucoxanthin i *S. latissima* og andre brunalger, og metoden anses som en god metode for ekstraksjon av fucoxanthin. De høye verdiene kan forklares ved bruk av flytende nitrogen, som kan ha bidratt til å bryte ned den sterke thallusen, rik på polysakkarider. Prøver fra metode 2 har generelt et høyere innhold av fucoxanthin enn prøver fra metode 1, men forskjellen i mengde er såpass liten på flere av prøvene at det er vanskelig å trekke noe konklusjon fra dette. Det kan likevel se ut som tiltakene som ble gjort fra metode 1 til metode 2 har vært med på å gjøre metoden mer optimal.

Ut fra enkeltresultater fra denne analysen er det behandling S21 og S42, dyrkningsstrategien med sporer inkubert på laboratorium i henholdsvis 21 og 42 dager og vektorpoding i sjø, som gir størst innhold av fucoxanthin [ $\text{mg g}^{-1}$ ] i tørrvekt tare. Behandling S21 ga konsentrasjoner av fucoxanthin på hele 1.5 mg (metode 1) og 1.4 mg (metode 2) per gram tørrvekt tare, og S42 ga konsentrasjon på 1.4 mg (metode 2) per gram tørrvekt tare. Ved å se på de ulike livsstadiene til planten, ved behandling på laboratoriene, kan man anta at inkubering av kulturer med sporer (S) er best egnet for å oppnå et høyt fucoxanthin-innhold. I forhold til lengden på inkubasjonsperioden, kan man anta ut i fra disse resultatene at 21 dager er optimal lengde.

Gjennom metoden er det flere kilder til tap, både mekaniske tap som følge av dårlig tilpasset utstyr, og kjemiske tap i som følge av dekomponering av fucoxanthin ulike steg av prosessen. Følgende steg ble testet for tap; ekstraksjon med acetone, inndamping av løsemiddel ved hjelp av rotavapor og filtrering. Tapet i disse stegene ble analysert til henholdsvis 7 %, 96 % og 36 %.

Dersom det hadde vært mer tid til å jobbe med analysene, ville det vært hensiktsmessig å analysere mengden av fucoxanthin i flere uttak fra samme plante, for å få verifisert resultatet oppnådd i denne oppgaven. Ved videre arbeid bør mulighetene for ekstraksjon med enzymer undersøkes nærmere for å redusere miljøbelastninger og eksponering for giftstoffer. På grunn av risiko for stort tap i enkelte steg av metoden, bør ytterligere optimalisering være i fokus i videre arbeid. Som forslag til videre arbeid anbefales det å prøve en annen løsemiddelblanding, hvor vann med fordel kan byttes ut med et annet løsemiddel som karotenoider løses godt i, for eksempel metanol.

## 8 REFERANSER

Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R. og Grachev, S. (2009) *The effects of Xanthigen™ in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat* Diabetes, Obesity and Metabolism Volume 12 nr. 1 s. 72 – 81.

ACS American Chemical Society (2012) *Acetone* Molecule of the Week Archive [acs.org] [<https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/a/acetone.html>] [130519]

Bakke, L. H. (u.å.) *Analyse av steroidhormoner med LC-MS/MS ved Hormonlaboratoriet* Oslo Universitetssykehus for NITO [nito.no] [<https://www.nito.no/contentassets/70480f7af6584f97b0824d18b1864bb6/biokingeniorkongressen/f24-analyse-av-steroidhormoner-med-lc-ms-ms-ved-hormonlaboratoriet.-liv-hanne-bakke.pdf>] [Lastet ned 270519]

Beppu, F., Hosokawa, M., Niwano, Y. og Miyashita, K. (2012) *Effects of dietary fucoxanthin on cholesterol metabolism in diabetic/obese KK-A y mice*. Lipids Health Dis 11:1-8

Bolton, J. J. og Lüning, K. (1982) *Optimal growth and maximal survival temperatures of Atlantic Laminaria species (Phaeophyta) in culture* Marine Biology Volume 66 nr. 1 s. 89 – 94.

Bolton, J. J. (2010) *The biogeography of kelps (Laminariales, Phaeophyceae): a global analysis with new insights from recent advances in molecular phylogenetics* Helgoland Marine Research Volume 64 nr. 4 s. 263 – 279

Chandini, S. K., Ganesan, P., Suresh, P. V. og Bhaskar, N. (2008) *Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds – A review* Journal of Food Science and Technology Volume 45 nr. 1 s. 1 – 13

Coulter, T. (2016) *Food, The Chemistry of its components* 6. utgave Royal Society of Chemistry ISBN 978-1-84973-880-4

Druehl, L. D., Collins, J. D., Lane, C. E. og Saunders, G. W. (2005) *An Evaluation of Methods Used to Assess Intergeneric Hybridization in Kelp Using Pacific Laminariales (Phaeophyceae)* Journal of Phycology Volume 41 nr. 2 s. 250 – 262.

Forbord, S., Steinhovden, K. B., Rød, K. K., Handå, A. & Skjermo, J. (2018) *Cultivation protocol for Saccharina latissima*. In: Charrier, B., Wichard, T. & Reddy, C. R. K. (eds.) *Protocols for Macroalgae Research*. U.S.A.: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 37-59.

Ganesan, P., Matsubara, K., Sugawara, T. og Hirata, T. (2013) *Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells* *Molecular and Cellular Biochemistry* Volume 380 nr. 1 – 2 s. 1 – 9.

Handå, A., Forbord, S., Broch, O. J., Richardsen, R., Skjermo, J. og Reitan, K. J. (2009) *RAPPORT: Dyrking og anvendelse av tare, med spesiell fokus på bioenergi i nordområdene* SINTEF Fiskeri og havbruk AS [sintef.no] [[https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri\\_og\\_havbruk/marin-ressursteknologi/nsttt/sintef-rapport-bioenergi-fra-tare-i-nord\\_fkd\\_6juli\\_2009.pdf](https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri_og_havbruk/marin-ressursteknologi/nsttt/sintef-rapport-bioenergi-fra-tare-i-nord_fkd_6juli_2009.pdf)] [Lastet ned 190519]

Heidolph (u.å.) *Laborota 4000/4001 efficient* Bruksanvisning [heidolph-instruments.com] [<https://heidolph-instruments.com/documents/operation%20manuals/rotary%20evaporator/Operation-Manual-Rotary-Evaporator-Laborota-4000-4003.pdf>] [Lastet ned 290519]

Heo, S-J., Yoon, W-J., Kim, K-N., Oh, C., Choi, Y-U., Yoon, K. T., Kang, D-H., Qian, Z-J., Choi, I-W. og Jung W-K. (2012) *Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from Sargassum siliquastrum in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage* *Food and Chemical Toxicology* Volume 50 nr. 9 s. 3336-3342.

Ho, W., F. og Stuart, B. (2003) *High Performance Liquid Chromatography I: P Bedson og E Prichard (red.) Practical laboratory skills training guides: High Performance Liquid Chromatography*. Royal Society of Chemistry. ISBN 9780854044832

Kanda, H., Kamo, Y., Machmudah, S., Goto, W. og Goto, M. (2014) *Extraction of Fucoxanthin from Raw Macroalgae including Drying and Cell Wall Disruption by Liquefied Dimethyl ether* *Marine Drugs* Volume 12 nr. 5 s. 2383 – 2396.

Khachik, F. (2009) *Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies I*: G Britton, H Pfander og S Liaan-Jensen (red) Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health. Birkhäuser Basel ISBN: 978-3-7643-7500-3.

Kim, K-N., Heo, S-J., Yoon, W-J., Kang, S-M., Ahn, G., Yi, T-H. og Jeon, Y-J. (2010) *Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced raw 264.7 macrophages* European Journal of Pharmacology Volume 649 nr. 1-3 s. 369 – 375.

Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K. og Nagao, A. (2001) *Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells* American Society for Nutritional Sciences p. 3303 – 3306.

Kraan, S. (2013) *Pigments and minor compounds in algae I*: H Dominguez (red) Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Elsevier Science and Technology ISBN: 978-0-85709-512-1.

Ludovici, M., Ialongo, C. og Camera, E. (2017) *Principles, current applications, and future perspectives of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical chemistry I*: S Fanali, CF Poole, PR Haddad og M-L Riekkola (eds.) Liquid Chromatography 2. utg. Elsevier ISBN: 978-0-12-805392-8.

Maeda H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. og Miyashita, K. (2005) *Fucoxanthin from edible seaweed, Undaria pinnatifida, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues* Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 332 nr. 2 s. 392 – 397.

Martin, L. J. (2015) *Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment* Marine Drugs Volume 13 nr. 8 s. 4784 – 4798.

Miyashita, K. og Hosokawa, M. (2007) *Beneficial Health Effects of Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin*. In: Barrow, C. & Shahidi, F. (eds.) Marine Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 297-313.

Moldoveanu, S. C. og David, V. (2013 a) *Basic Information of HPLC I*: SC Moldoveanu og V David (red) Essentials in Modern HPLC separations Elsevier ISBN 978-0-12-385013-3.

Moldoveanu, S. C. og David, V. (2013 b) *Parameters that Characterizes HPLC Analysis I*: SC Moldoveanu og V David (red) Essentials in Modern HPLC separations Elsevier ISBN 978-0-12-385013-3.

Morrissey, J., Kraan, S. og Guiry M. D. (2001) *A guide to Commercially important Seaweeds on the Irish coast* Bord Iascaigh Mhara/Irish Sea Fisheries Bord [s3.amazonaws.com]  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37300798/A\_guide\_to\_commercially\_important\_seaweedsby\_us.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1557063457&Signature=1TBfZM7BMiAHadmcyHc%2Ft%2F8sqfE%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DA\_guide\_to\_commercially\_important\_seawee.pdf] [Lastet ned 050619]

NCBI National Center of Biotechnology (u.å.) *2-propanone* Pubchem [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetone#section=GHS-Classification&fullscreen=true] [Lastet ned 130519]

NordAqua (u.å.) *NordAqua* [nordacqua.fi] [http://nordacqua.fi/pa-norsk] [Lastet ned 070519]

NordForsk (u.å.a.) *Nordic Centre of Excellence* [nordforsk.org]  
[https://www.nordforsk.org/no/funding/finansieringsformer/nordic-centre-of-excellence] [Lastet ned 200319]

NordForsk (u.å.b.) *Nordisk program om bioøkonomi* [nordforsk.org]  
[https://www.nordforsk.org/no/programmer-og-prosjekter/programmer/nordisk-program-om-bioekonomi] [Lastet ned 200319]

Oh, J-H., Kim, J. og Lee Y. (2016) *Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice* Nutrition Research and Practice Volume 10 nr. 1 s. 42 – 48.

Oryza (2011) *Fucoxanthin: dietary ingredient for prevention of metabolic syndrome, antioxidation and cosmetics*. Oryza Oil & Fat Chemical CO., LTD, Tokyo, Japan [oryza.co.jp]  
[http://www.oryza.co.jp/html/english/pdf/Fucoxanthin2.0M.pdf] [Lastet ned 020519]

Park, H. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Shin, Y. C. og Choi, M. S. (2011) *Beneficial effects of Undaria pinnatifida ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice* Food and Chemical Toxicology Volum 49 nr. 4 s. 727 – 733.



Poole, C. F. og Poole, S. K. (1991) *Chromatography today* Elsevier Science Publishers B.V. ISBN 0-444-88492-0.

Rey, F., Lopes, D., Maciel, E., Monteiro, J., Skjermo, J., Funderud, J., Raposo, D., Domingues, P., Calado, R. og Domingues, M. R. (2019) *Polar lipid profile of Saccharina latissima, a functional food from the sea* Algal Research Volume 39 (101473) s. 1 – 8.

Rothman, M. D., Mattio, L., Anderson, R. J. og Bolton, J. J. (2017) *A phylogeographic investigation of the kelp genus Laminaria (Laminariales, Phaeophyceae), with emphasis on the South Atlantic Ocean* Journal of Phycology Volume 53 nr. 4 s. 778-789.

Schiedt, K. og Liaan-Jensen, S. (1995) *Isolation and Analysis I*: G Britton, S Liaan-Jensen og H Pfander (eds.) Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis 1. utgave Birkhäuser Verlag ISBN:3-7643-2908-4

Schmid, M. og Stengel D. B. (2015) *Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales* Journal of Phycology Volume 51 s. 25 – 36.

Shannon og Abu-Ghannam (2016) *Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology* Journal of Applied Phycology Volume 29 nr. 2 s. 1027 – 1036.

Shannon og Abu-Ghannam (2018) *Enzymatic extraction of fucoxanthin from brown seaweed* International Journal of Food Science + Technology Volume 53 nr. 19 s. 2195 – 2204.

SINTEF (2017) *NordAqua* [sintef.no]  
[<https://www.sintef.no/prosjekter/nordaqu/>] [Lastet ned 200319]

Skjermo, J., Asen, I. M., Arff, J., Broch, O. J., Carvajal, A., Christie, H., Forbord, S., Olsen, Y., Reitan, K. I., Rustad, T., Sandquist, J., Solbakken, R., Steinhoved, K. B., Wittgens, B., Wolff, R. og Handå, A. (2014) *A new Norwegian bioeconomy base don cultivation and processing of seaweeds: Opportunities and R&D needs* 1. utgave SINTEF Fiskeri og havbruk AS ISBN 978-82-14-05712-6.

Øiestad, Å. M. L. (2018) *LC-MS/MS – gjennomgang av hele instrumentet* NITO-kurs i kromatografi og massespektrometri Oslo Universitetssykehus [nito.no]  
[<https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/kr>]

omatografi/05-lc-ms---gjennomgang-av-hele-instrumentet-ase-marit-leere-  
oiestad.pdf] [Lastet ned 240519]

## BEREGNING AV TØRRVEKT

Tørrvekt av tareprøvene ble beregnet som en prosent av våt vekt tare, ved å tørke en kjent mengde våt tare og deretter finne vekt av tørr tare. Prosent tørrvekt ble beregnet etter formel I nedenfor og verdiene som ligger til grunn for disse beregningene er vist i tabell I. Tabell I viser den totale gangen i beregning av tørrvektsprøvene.

$$\% \text{ tørrvekt av våt vekt} = \frac{\text{tørrvekt (g)}}{\text{våtvekt (g)}} * 100\% \quad (I)$$

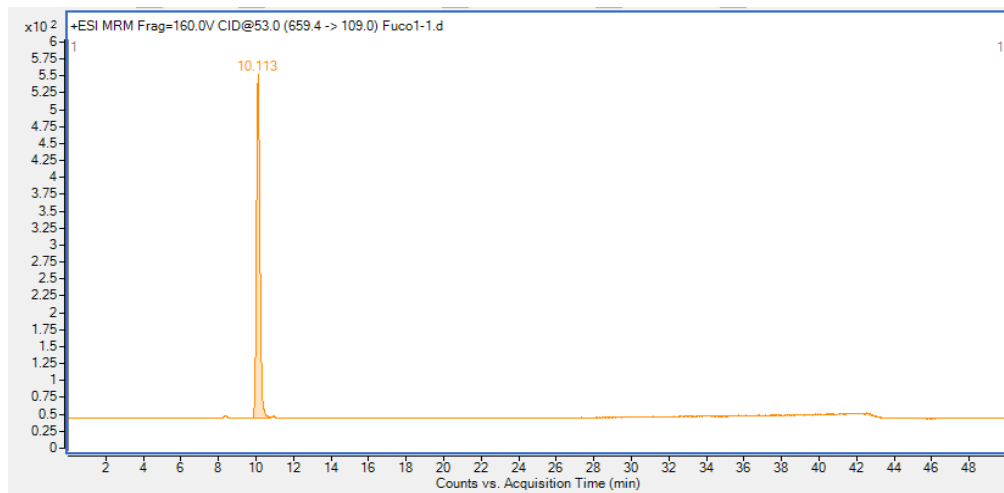
**Tabell I: Beregning av %tørrvekt prøve av våt vekt tare [g]. Tabellen gir oversikt over prøver, vekt på dramglass [g], vekt av dramglass med våt tare [g], vekt av dramglass med tørr tare [g], vekt av våt tare [g], vekt av tørr tare [g], samt prosent tørrvekt av våt vekt tare [%].**

Prøve	Dramglass [g]	+ våt prøve [g]	+ tørr prøve [g]	Våt vekt prøve [g]	Tørrvekt prøve [g]	% tørrvekt av våt vekt [%]
B1	5,5928	6,7374	5,7491	1,1446	0,1563	13,7
B4	5,4775	6,4868	5,6221	1,0093	0,1446	14,3
B5	5,4245	6,4892	5,5581	1,0647	0,1336	12,5
B8	5,4112	6,5566	5,5445	1,1454	0,1333	11,6
B10	5,6058	6,7597	5,7480	1,1539	0,1422	12,3
B11	5,4279	6,8125	5,6132	1,3846	0,1853	13,4
C3	5,6263	7,0589	5,8188	1,4326	0,1925	13,4
C4	5,4230	6,4544	5,5546	1,0314	0,1316	12,8
C5	5,5898	6,8222	5,7754	1,2324	0,1856	15,1
C7	5,4155	6,4286	5,5659	1,0131	0,1504	14,8
C8	5,4220	6,7708	5,5964	1,3488	0,1744	12,9
C9	5,4637	6,4788	5,5870	1,0151	0,1233	12,1

## RÅDATA FRA LC-MS-ANALYSER

De åtte ulike konsentrasjonene av fucoxanthin-standard: 0.001, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500, 1.0, 5.0 og 10.0 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] som ble analysert med LC-MS ga opphav til åtte ulike kromatogram, og et eksempel på disse (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) er gitt i figur I nedenfor. Arealet til de åtte ulike konsentrasjonene, som ble brukt til utarbeidelse av kalibreringskurve, fra LC-MS-analysen vises i tabell II på neste side.

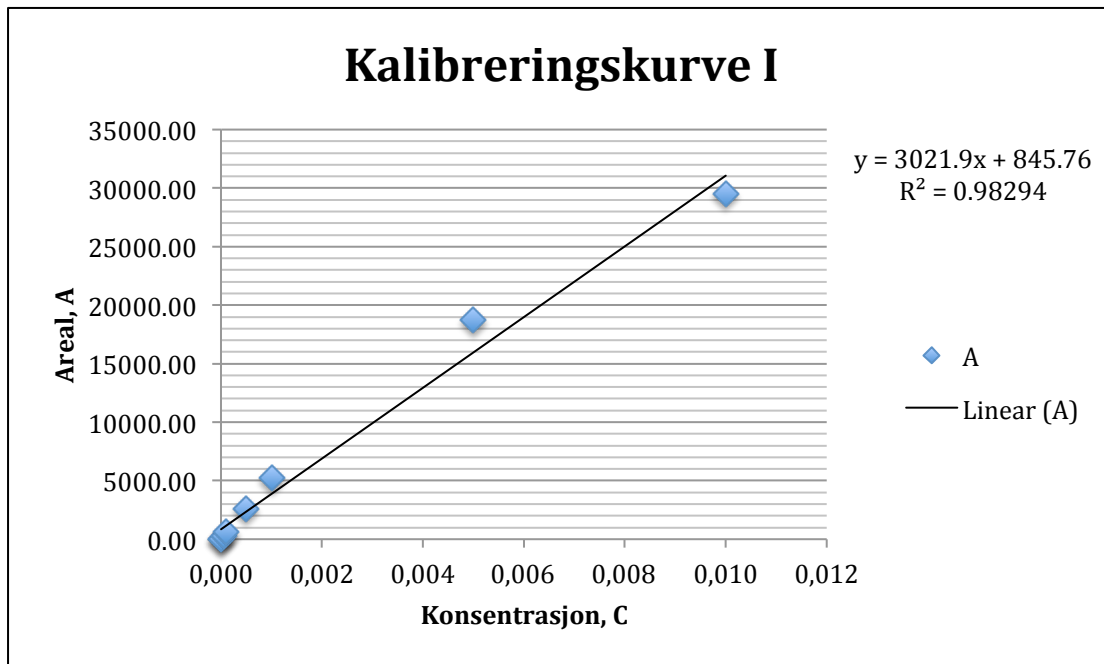
Den utarbeidede kalibreringskurven, kalibreringskurve I, brukt til å regne ut konsentrasjonen av fucoxanthin i prøvene er vist i figur II på neste side. Arealet til de tre laveste konsentrasjonene: 0.001, 0.010, 0.050 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] ble brukt til å utarbeide en kalibreringskurve, kalibreringskurve II, brukt til å regne ut konsentrasjon av fucoxanthin i standardene ved validering av metoden. Kalibreringskurve II er vist i figur III nedenfor på side 3. Lineær regresjon er utarbeidet etter formel 2, side 3.



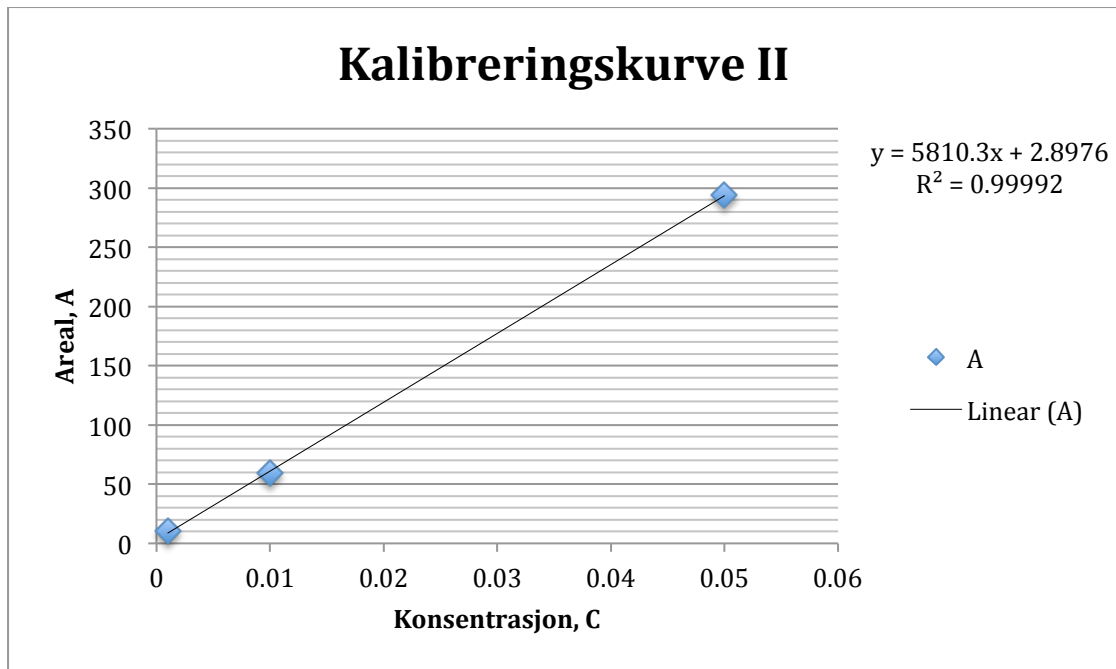
**Figur I: Eksempel på kromatogram av én av åtte konsentrasjoner av fucoxanthin-standard brukt til utarbeidelse av kalibreringskurve. Kromatogrammet viser LC-MS/MS-analyse av fucoxanthin-standard med konsentrasjon 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , med retensjonstid (RT) = 10.113. Y-akse: Areal, X-akse: tid (min).**

Tabell II: Tabellen viser en oversikt over åtte ulike konsentrasjoner av fucoxanthin-standard, brukt til å utarbeide kalibreringskurve, med tilhørende areal fra LC-MS-analyser.

Konsentrasjon [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	Areal
0,001	9,90
0,010	59,54
0,050	293,68
0,100	571,79
0,500	2643,48
1,000	5251,39
5,000	18768,76
10,000	29515,63



Figur II: Kalibreringskurve utarbeidet fra åtte ulike konsentrasjoner av fucoxanthin-standard. Lineær regresjon uttrykker areal som funksjon av konsentrasjon med:  $y = 3021.9x + 845.76$ .  $R^2 = 0.98294$ .



**Figur III: Kalibreringskurve II utarbeidet fra arealet til de tre laveste konsentrasjonene av fucoxanthin-standard 0.001, 0.010, 0.050 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]. Lineær regresjon uttrykker areal som funksjon av konsentrasjon med  $y = 5810.3x + 2.8976$ .  $R^2 = 0.99992$**

$$y = (a \times x) + b \quad (2)$$

Omgjøring fra regresjonslinje til formel for areal som funksjon av konsentrasjon er gitt ved formel 3 nedenfor. Formel for areal gir grunnlag for utarbeidelse av formel for konsentrasjon i prøven, formel 4.

$$A = (a \times C) + b \quad (3)$$

$$C = \frac{A-b}{a} \quad (4)$$

Retensjonstid og areal fra LC-MS/MS-analyser er presentert i tabell III og IV nedenfor. Tabell III viser en oversikt over LC-MS/MS-analyser på standarder brukt til validering av metoden, med stegene ekstraksjon (metode 2), inndamping av løsemiddel og filtrering. Se tabell VI, vedlegg 3 for fullstendig beregning av tap i de aktuelle prosessene. Tabell IV viser tilsvarende oversikt over tare-prøvene fra MACROSEA-prosjektet.

**Tabell III: Rådata fra LC-MS-analyser av standarder brukt til validering av metoden, i følgende steg; ekstraksjon (metode 2), inndamping av løsemiddel og filtrering. Retensjonstid (RT) og areal for hver prøve er oppgitt.**

Prøve	RT	Areal
<b>Standard ubehandlet</b>	10.103	62.46
<b>Standard ekstrahert</b>	10.113	58.29
<b>Standard inndampet</b>	10.072	12.94
<b>Standard filtrert</b>	9.717	41.17

**Tabell IV: Rådata fra LC-MS-analyser av prøver fra MACROSEA-prosjektet. Retensjonstid (RT) og areal for hver prøve analysert er oppgitt.**

Prøve	Metode 1		Metode 2	
	RT	Areal	RT	Areal
<b>B1</b>	10.072	2193.72	10.082	2162.05
<b>B4</b>	10.042	1196.80	1 10.103	2737.78
			2 10.072	2287.15
			3 10.093	4123.11
<b>B5</b>	10.052	3327.56	10.052	3481.49
<b>B8</b>	1 10.072	7046.01	10.103	3797.63
	2 10.072	2665.10		
	3 10.052	1700.44		
<b>B10</b>	10.062	3478.72	10.072	815.93
<b>B11</b>	10.072	2377.84	10.072	4496.56
<b>C3</b>	10.062	7265.15	10.042	2621.15
<b>C4</b>	10.062	4524.97	10.062	3835.86
<b>C5</b>	10.072	7568.90	10.082	3655.32
<b>C7</b>	10.062	2454.84	10.082	2660.55
<b>C8</b>	10.062	3535.32	10.062	3443.97
<b>C9</b>	10.072	3062.65	10.093	3156.43

Konsentrasjon av fucoxanthin [ $\text{mg g}^{-1}$ ] i våt vekt tare ble beregnet fra kalibreringskurven utarbeidet fra LC-MS/MS-analyser. Tabell V nedenfor viser den totale gangen i beregning av konsentrasjon fucoxanthin [ $\text{mg g}^{-1}$ ] fra konsentrasjon i lyofilisert tare-ekstrakt ( $C(E)$  [ $\mu\text{g/mL}$ ]) til konsentrasjon per gram våt tare ( $C(T)$  [ $\text{mg/g}$ ]). Formel 5 – 8 ligger til grunn for utregning av disse verdiene.

$$C(E) = \frac{A-b}{a} \quad (5)$$

$$C(D) = \text{fortynning} \times C(E) \quad (6)$$

$$C(F) = \frac{C(D)}{m(D)} \times (m(D) + (m(x))) \quad (7)$$

$$C(T_v) = \frac{C(F)}{m(T_v)} \quad (8)$$

For utregning av konsentrasjon av fucoxanthin i tørrvekt tare ( $T_t$ ) er det formel 9, nedenfor, som ligger til grunn.

$$C(T_t) = \frac{C(F)}{m(T_t)} \quad (9)$$



Tabell V: Oversikt over den totale gangen i beregning av konsentrasjon av fucoxanthin i tare (våt vekt) fra konsentrasjon i lyofilisert tare-ekstrakt. C = Konsentrasjon, D = oppløst lyofilisert tare-ekstrakt, m = mengde, x = mengde av ikke-analysert lyofilisert tare-ekstrakt, F = lyofilisert tare-ekstrakt, Tv = tare (våt vekt). Prøver fra metode 1 for både ekstraksjon og frysetørking og filtrering er markert med (1) bak prøvenummer, mens (2) bak prøvenummer markerer tilsvarende prøver brukt i metode 2.

Metode	Prøve nr.	C (D) [µg/mL]	Fortynning [mL]	C (D) [µg]	m (D) [mg]	m (x) [mg]	C (F) [µg]	m (Tv) [g]	C (Tv) [µg/g]	C (Tv) [mg/g]	
1	B1	0.45	250	111.52	100.17	35.93	151.52	2.00	75.76	0.076	
	B4	0.12	250	29.04	100.94	44.10	41.73	2.07	20.13	0.020	
	B5	0.82	250	205.32	96.90	10.80	228.20	2.00	114.10	0.114	
	B8	1	2.05	100	205.18	91.70	11.50	230.91	2.04	113.41	0.113
		2	0.60	250	150.51	91.05	12.99	171.99	2.02	85.02	0.085
		3	0.28	250	70.71	97.43	6.50	75.42	2.01	37.52	0.038
	B10	0.87	250	217.82	100.61	25.70	273.46	2.00	136.73	0.137	
	B11	0.51	100	50.70	100.20	37.61	69.73	2.01	34.69	0.035	
	C3	2.12	100	212.43	100.47	18.18	250.87	2.00	125.43	0.125	
	C4	1.22	250	304.38	100.10	29.07	392.77	2.01	195.41	0.195	
	C5	2.22	100	222.48	100.36	34.23	298.36	2.00	149.18	0.149	
	C7	0.53	250	133.12	100.14	63.40	217.40	2.00	108.70	0.109	
	C8	0.89	250	222.51	100.64	44.10	320.01	2.00	160.00	0.160	
C9	0.73	250	183.40	100.09	17.79	216.00	1.99	108.54	0.109		
2	B1	0.44	250	108.90	100.26	53.20	166.68	2.00	83.22	0.083	
	B4	1	0.63	250	156.53	100.27	52.50	238.48	2.02	118,35	0.118
		2	0.48	250	119.25	100.68	55.50	184.98	2.03	91.12	0.091
		3	1.08	250	271.13	100.63	48.00	400.46	2.10	190.79	0.191
	B5	0.87	250	218.05	100.07	43.70	313.27	2.00	156.48	0.156	
	B8	0.98	250	244.21	100.76	23.70	301.65	2.01	150.37	0.150	
	B10 <sup>3</sup>	0.14	250	35.23	100.75	31.00	46.07	2.02	22.81	0.023	
	B11	1.21	250	302.03	100.32	26.40	381.51	2.01	190.09	0.190	
	C3	0.59	250	146.88	100.64	54.10	225.83	2.06	109.63	0.110	
	C4	0.99	250	247.37	100.10	45.90	360.80	2.01	179.86	0.180	
	C5	0.93	250	232.43	100.14	52.00	353.13	2.01	175.77	0.176	
	C7	0.60	250	150.14	100.62	68.80	252.79	2.03	124.77	0.125	
	C8	0.86	250	214.95	100.76	38.30	296.65	2.02	146.86	0.147	
C9	0.76	250	191.16	100.66	38.60	264.46	2.02	130.66	0.131		

<sup>3</sup> Utarbeidet fra regresjonslinjen ( $y=5810.3x2.8976$ ) fra kalibreringskurven II (figur III, vedlegg 2, s. 3).

## VALIDERING AV METODE

Validering av metoden ble gjennomført ved å sammenligne konsentrasjon av fucoxanthin i standard kun ekstrahert, inndampet *eller* filtrert, med konsentrasjon av fucoxanthin i ubehandlet standard. En oversikt over tap i de ulike stegene er presentert i tabell VI nedenfor. Prosentvis tap ble beregnet etter formel 10.

Tabell VI: Beregning av tap [%] gjennom metoden, i steg: ekstraksjon, inndamping av løsemiddel og filtrering i forhold til ubehandlet prøve (standard 3). RT = retensjonstid, Areal = arealet fra LC-MS/MS, C = konsentrasjon.

Prøve	RT	Areal	C [µg]	% av ubehandlet standard	Tap [%]
Standard ubehandlet	10.103	62.46	2.05	100	0
Standard ekstrahert	10.113	58.29	1.91	93	7
Standard inndampet	10.072	12.94	0.09	20,1	83
Standard filtrert	9.717	41.17	1.32	66	36

$$\% \text{ tap} = 100 \% - \frac{C (\text{steg}) [\mu\text{g}]}{C (\text{ubehandlet standard}) [\mu\text{g}]} * 100\% \quad (10)$$