



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

BACHELOROPPGAVE 2021

20 studiepoeng

## **Effekt av blansjering på antioksidantaktivitet og innhold av polyfenoler i *Saccharina latissima***

The effect of blanching on antioxidant activity and the polyphenol content of  
*Saccharina latissima*

utført av

Anette Gjertsen

Mari Sliper

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

## Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å undersøke hvilken effekt blansjering har på tare når det gjelder antioksidantaktivitet og innhold av polyfenoler, med utgangspunkt i brunalgen *Saccharina latissima*. Fire forskjellige metoder ble benyttet for å måle antioksidantaktiviteten i åtte ulike ekstrakter, bestående av enten blansjert eller ikke-blansjert tare, blansjeringsvann eller dryppvann. Det totale fenolinnholdet (TPC) i prøvene ble målt ved bruk av Folin-Ciocalteu analysen. Den radikale slukningsaktiviteten ble deretter målt med to ulike metoder, nemlig DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)-analyse og ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))-analyse. Avslutningsvis ble det utført en FRAP analyse (Ferric Reducing Antioxidant Power) for å måle reduksjonsevnen til antioksidantforbindelsene i de ulike ekstraktene.

For samtlige ekstrakter av *S. latissima* ble det påvist innhold av fenoler og antioksidantaktivitet. Resultatene viste at aktivitetsnivået i den blansjerte rå prøven var svært lavt sammenlignet med de tørkede prøvene. Ved sammenligning av frysetørket blansjert tare og frysetørket rå tare, framkom det at blansjering hadde en positiv effekt på det totale fenolinnholdet og antioksidantaktiviteten. Påvist antioksidantaktivitet i blansjeringsvannet viser at en blansjeringsprosess vil føre til tap av fenoler, og vil redusere antioksidantaktiviteten i taren ved at komponentene trekkes ut i blansjeringsvannet. Funnet av antioksidantaktivitet i dryppvannet viser at en tineprosess vil medføre tap av verdifulle fenoliske forbindelser. Korrelasjon ble funnet mellom Folin-Ciocalteu og metodene DPPH, ABTS og FRAP, og det ble observert signifikant samvariasjon mellom analysene. Resultatet indikerer at polyfenoler bidrar til antioksidantaktiviteten. Basert på funn i denne oppgaven og tidligere studier konkluderes det med at blansjering kan ha både positiv og negativ effekt på innholdet av polyfenoler og antioksidantaktiviteten i tare.

## Summary

The aim of this study was to investigate the effects of blanching on kelp in terms of its antioxidant activity and polyphenol content, based on the brown algae *Saccharina latissima*. Four different methods were used to measure antioxidant activity in eight different extracts, containing either blanched or unblanched kelps, blanching water, or drip water. The total phenolic content (TPC) of each sample was measured with the Folin-Ciocalteu assay. Two distinct assays were then used to measure the radical scavenging activity, namely DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Lastly, the reducing capacity of the antioxidant components in the various extracts was measured with the FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power).

All extracts of *S. latissima* were found to contain phenols and antioxidant activity. The results showed that the activity of the blanched raw sample was very low compared to that of the dried samples. Comparison of freeze-dried blanched kelp and freeze-dried raw kelp shows that blanching had a positive effect on the total phenolic content and antioxidant activity. The presence of antioxidant activity in the blanching water shows that the process of blanching results in a loss of phenols and a reduction of the antioxidant activity in the kelp by extracting the components into the blanching water. Similarly, the presence of antioxidant activity in the drip water shows that the process of thawing results in a loss of valuable phenolic compounds. Correlations were found between Folin-Ciocalteu and the DPPH, ABTS and FRAP assays, indicating that polyphenols contribute to antioxidant activity. The findings of this study as well as previous studies leads to the conclusion that blanching can have both positive and negative effects on the polyphenol content and antioxidant activity of kelp.

## Forord

Denne rapporten er det endelige resultatet av bacheloroppgaven skrevet av Anette Gjertsen og Mari Sliper, studenter ved utdanningen Matteknologi (Matvitenskap, teknologi og bærekraft) ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU Trondheim. Arbeidet startet 17. mars og ble avsluttet 25. mai 2021. Alle kostnader knyttet til oppgaven er dekket av instituttets driftsbudsjett, og det praktiske arbeidet er gjennomført ved næringsmiddellaboratoriet på Gløshaugen i Trondheim.

Tusen takk til veileder Turid Rustad som har bidratt med gode tilbakemeldinger og faglig diskusjon. Takk til Maria Stavnes Sletta og SINTEF ved Tom Ståle Nordtvedt for råstoffet som er benyttet i oppgaven. En spesielt stor takk til laboratorieingeniør Siri Stavrum for god hjelp i forbindelse med den praktiske gjennomføringen av oppgaven.

Dato: 25.05.2021

Sted: Trondheim

Anette Gjertsen

Mari Sliper

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>i</b>
<b>Summary</b> .....	<b>ii</b>
<b>Forord</b> .....	<b>iii</b>
<b>Figurliste</b> .....	<b>vii</b>
<b>Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Teoretisk bakgrunn</b> .....	<b>2</b>
1.1 Produksjon av makroalger i et bærekraftperspektiv .....	2
1.2 Dyrking og produksjon av makroalger globalt .....	3
1.3 Norsk tareindustri .....	3
1.4 Saccharina latissima .....	4
1.5 Bioaktivitet i makroalger .....	5
1.6 Fenoliske forbindelser .....	6
1.7 Antioksidantaktivitet .....	8
1.7.1 Antioksidantaktivitet og naturlige antioksidanter .....	8
1.7.2 Syntetiske antioksidanter .....	9
1.8 Effekter av blansjering .....	9
1.9 Tørkemetoder .....	10
1.10 Ekstraksjon .....	11
1.11 Metoder for måling av antioksidantaktivitet .....	12
1.11.1 Folin-Ciocalteu metoden .....	12
1.11.2 DPPH radikal slukningsaktivitet metoden .....	13
1.11.3 ABTS radikal slukningsaktivitet metoden .....	13
1.11.4 FRAP-metoden .....	13

<b>2. Materialer og metoder .....</b>	<b>14</b>
2.1 Råstoff .....	14
2.2 Flytskjema.....	15
2.3 Tillaging av ekstrakter .....	15
2.3.1 Tørket råstoff (blansjert og rå) .....	16
2.3.2 Blansjert råstoff .....	16
2.3.3 Blansjeringsvann og dryppvann.....	17
2.4 Metoder for måling av antioksidantaktivitet .....	17
2.4.1 Folin-Ciocalteu metoden .....	17
2.4.2 DPPH radikal slukningsaktivitet metoden .....	17
2.4.3 ABTS radikal slukningsaktivitet metoden .....	18
2.4.4 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoden .....	18
<b>3. Resultater.....</b>	<b>19</b>
3.1 Antioksidantaktivitet i <i>S. latissima</i> .....	19
3.1.1 Folin-Ciocalteu metoden, totalt fenolinnhold.....	20
3.1.2 DPPH radikal slukningsaktivitet .....	22
3.1.3 ABTS radikal slukningsaktivitet.....	23
3.1.4 FRAP metoden, reduksjons kapasitet.....	24
3.2 Korrelasjon mellom totalt fenolinnhold og antioksidantaktivitet .....	26
3.2.1 Sammenheng mellom DPPH og ABTS.....	26
3.2.2 Sammenheng mellom DPPH og Folin-Ciocalteu.....	27
3.2.3 Sammenheng mellom DPPH og FRAP .....	28
3.2.4 Sammenheng mellom ABTS og Folin-Ciocalteu .....	28
3.2.5 Sammenheng mellom ABTS og FRAP .....	29
<b>4. Vurdering .....</b>	<b>31</b>
4.1 Totalt fenolinnhold, Folin-Ciocalteu.....	31
4.2 DPPH og ABTS radikal slukningsaktivitet.....	32
4.3 Reduserende potensial - FRAP .....	34

4.4 Korrelasjon mellom totalt fenolinnhold og antioksidantaktivitet .....	36
4.5 Effekt av blansjering .....	37
4.6 Forlag til videre arbeid .....	39
<b>5. Konklusjon.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Referanseliste.....</b>	<b>41</b>

**Antall vedlegg: 4.**

## Figurliste

<b>Figur 1.1</b> <i>S. latissima</i> som er benyttet som råstoff i denne oppgaven. (Nores.no) .....	s. 4
<b>Figur 1.2:</b> Generell struktur på flavonoider funnet i alger: (A) Flavoner og (B) Flavonoler. (Cotas m. fl. 2020) .....	s. 7
<b>Figur 2.1:</b> Flytskjema som viser forbehandling av mottatt råstoff, tillaging av ekstrakt og metoder utført for måling av antioksidantaktivitet.....	s.15
<b>Figur 3.1:</b> Konsentrasjon av fenoler i <i>S. latissima</i> vist som $\mu\text{g}/\text{ml}$ for analysen Folin-Ciocalteu (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 20
<b>Figur 3.2:</b> Totalt fenolinnhold i tørket og blansjert <i>S. latissima</i> målt i $\mu\text{g PGE}/\text{g}$ alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) ved Folin-Ciocalteu analysen (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 21
<b>Figur 3.3:</b> Radikal slukningsaktivitet for DPPH (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 22
<b>Figur 3.4:</b> Radikal slukningsaktivitet for ABTS analysen (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 23
<b>Figur 3.5:</b> Reduksjonskapasitet målt i konsentrasjon av redusert jern i prøvene, vist ved $\mu\text{g}/\text{ml}$ for analysen FRAP (n=3) for omgang 1. Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 24
<b>Figur 3.6:</b> Ferric reducing antioxidant power (FRAP) målt i $\mu\text{g PGE}/\text{g}$ alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) for omgang 1 (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 25
<b>Figur 3.7:</b> Reduksjonskapasitet målt i konsentrasjon av redusert jern i prøvene, vist ved $\mu\text{g}/\text{ml}$ for analysen FRAP (n=3) for omgang 2. Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 25
<b>Figur 3.8:</b> Ferric reducing antioxidant power (FRAP) målt i $\mu\text{g PGE}/\text{g}$ alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) for omgang 2 (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.....	s. 26
<b>Figur 3.9:</b> Korrelasjonsgrafene mellom analysene DPPH og ABTS der verdiene for radikal slukningsaktivitet (%) er benyttet ( $r= 0,83$ ; $p<0,02$ ).....	s.27
<b>Figur 3.10:</b> Korrelasjonsgrafene som viser samvariasjon ( $r= 0,71$ ; $p<0,05$ ) mellom analysene DPPH radikal slukningsaktivitet (%) og Folin-Ciocalteu (konsentrasjon av fenoler [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] i ekstraktet).....	s.27
<b>Figur 3.11:</b> Korrelasjonsgrafene som viser samvariasjon ( $r= 0,92$ ; $p<0,002$ ) mellom analysene DPPH radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 1 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	s.28



**Figur 3.12:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r= 0,94$ ;  $p<0,001$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og Folin-Ciocalteu (konsentrasjon av fenoler vist ved  $\mu\text{g/ml}$  i ekstraktet).....s. 29

**Figur 3.13:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r= 0,94$ ;  $p<0,001$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 1 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved  $\mu\text{g/ml}$ ).....s. 30

**Figur 3.14:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r= 0,83$ ;  $p<0,02$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 2 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved  $\mu\text{g/ml}$ ).....s. 30

## Innledning

For å møte etterspørselen etter mat, fôr og drivstoff til en stadig voksende befolkning er det viktig å utnytte ressurser fra sjø og land i større grad. Interessen for utnyttelse av tang og tare som råstoff har de siste årene økt i Europa, og forutsetningene for å etablere en fremtidsrettet næring ligger godt til rette i Norge. Med få innsatsfaktorer kan det dyrkes og produseres store mengder biomasse med høy ernæringsmessig verdi. Makroalger har derfor potensialet til å bli en viktig bærekraftig ressurs. I tillegg inneholder makroalger verdifulle komponenter som blant annet fenoliske forbindelser og antioksidanter, som kan gi helsemessige fordeler.

Målet med denne oppgaven har vært å undersøke hvilken effekt blansjering har på antioksidantaktivitet og innhold av polyfenoler i tare, med utgangspunkt i brunalgen *Saccharina latissima*. Studier som er utført viser at blansjering har god effekt på reduksjon av jod i *S. latissima* (Nilsen m. fl. 2020). Ettersom nevnte tare inneholder store mengder av jod, vil blansjeringen være et viktig prosesstrinn. Det finnes foreløpig få studier som ser på effekten blansjering har på innholdet av fenoler og antioksidantaktivitet i tare, og industrien vil derfor ha nytte av studier som kan bidra til økt kunnskap på området. Med bakgrunn i teori om blansjering var det forventet at en blansjeringsprosess ville føre til tap av polyfenoler og redusere antioksidantaktiviteten i taren. Det var også forventet å finne antioksidantaktivitet i blansjeringsvannet, da blansjering bidrar til tap av vannløselige komponenter i vegetabiler (Fellows 2016 s. 525).

# 1. Teoretisk bakgrunn

## 1.1 Produksjon av makroalger i et bærekraftperspektiv

Havet er en stor ressurs med potensiale til å være en viktig bidragsyter for å sikre tilstrekkelig med mat til en stadig voksende befolkning. Det anslås at befolkningstallet i verden vil stige til 9,8 billioner frem mot år 2050. Matproduksjonen bør derfor økes med 70% for å kunne møte behovet for mat. Med dette som utgangspunkt, bør havets ressurser utnyttes bedre slik at også fremtidens behov for og etterspørsel av mat, dyrefôr, drivstoff og legemidler kan imøtekommes. Produksjon av makroalger eller «tang og tare» har potensiale til å bli en av de store fremtidige næringene innen marin sektor, og vil være en viktig næring i arbeidet med å dekke etterspørselen av nødvendige ressurser. Makroalger inneholder en rekke komponenter som kan benyttes i mat, både som funksjonell ingrediens og som kilde til nødvendige og viktige næringsstoffer. Produktive havområder som kan benyttes til å dyrke makroalger vil bidra til en ressursøkning og en grønn bioøkonomisk næring. Økt kunnskap og kompetanse innenfor feltet er essensielt for at bedrifter skal kunne lykkes i produksjonen av matvarer produsert med makroalger som råstoff (Skjeremo 2016; Skjeremo m. fl. 2014 s.6).

Vår tids største globale utfordring er klimaendringene. Selv om problematikken er sammensatt er svaret på hvordan utviklingen skal bremses enkel, utslippet av klimagasser må reduseres. Klimagassutslipp relatert til mat står for 25% av det globale utslippet og 8,5% av Norges nasjonale utslipp (Oort og Holmelin 2019). Av den grunn vil et grønt skifte innen matproduksjon være en viktig bidragsyter for å redusere det totale klimagassutslippet. Makroalger som primærprodusenter trenger kun sollys og næringsstoffer fra havet, samtidig som de vokser og tar opp CO<sub>2</sub>, og gir derfor et nøytralt karbonavtrykk (Skjeremo m. fl. 2014 s.35). «Kjente ressurser – uante muligheter» er navnet på regjeringens bioøkonomistrategi. Strategien har som hensikt å bidra til verdiskapning og sysselsetting, samtidig som den skal bidra til å redusere klimagassutslipp og sørge for mer effektiv og bærekraftig ressursutnyttelse. Havet rommer uutnyttede muligheter, og blant nye eller hittil lite utnyttede arter, vil makroalger som råstoff være et viktig bidrag (Regjeringens bioøkonomistrategi 2016 s. 5, 53).

## 1.2 Dyrking og produksjon av makroalger globalt

Historisk sett har biomasse fra makroalger blitt benyttet til mat, dyrefôr, gjødsel og som jordforbedringsmiddel rundt om i verden (Schiener m. fl. 2015). Dyrking av makroalger har tradisjonelt vært praktisert i Asia, som står for rundt 99% av den globale produksjonen (FAO 2012 s.41). Av de asiatiske landene er Kina den største produsenten av makroalger og står for omtrent 60% av det totale volumet på verdensbasis, som i 2015 utgjorde nesten 14 millioner tonn biomasse (FAO 2018 s. 8-9). Bruksområder for makroalgene har i hovedsak vært knyttet til mat, og produksjon av alginat, agar og karragenan (Schiener m. fl. 2015; FAO 2018 s. 62). I 2018 passerte den globale årlige produksjonen av makroalger 30 millioner tonn. Den totale produksjonen har mer enn tredoblet seg fra 10,6 millioner tonn i 2000 til 32,4 millioner tonn i 2018 (FAO 2020 s.29). De siste årene har også interessen for dyrking av makroalger økt i Europa, hvor brunalgene *Saccharina latissima* og *Alaria esculenta* har vært spesielt i fokus på grunn av evnen til å kunne oppnå et høyt utbytte av biomasse, samt på grunn av innholdet av verdifulle næringsstoffer (Stévant m. fl. 2017).

## 1.3 Norsk tareindustri

I mange tiår har Norge drevet med høsting av vill tare, og den kommersielle utnyttelsen er i dag begrenset til den ville bestanden. Norge er i dag en av verdens største alginatprodusenter og utvinner årlig rundt 150 000 tonn stortare (Fiskeridirektoratet 2020). I 2014 ble den første tillatelsen til dyrking av makroalger i Norge gitt, og allerede fem år senere har 475 dyrkningstillatelser blitt utlevert, de fleste i Vestland, Nordland og Trøndelag. Det ble i 2019 til sammen dyrket 111 tonn sukkertare (*S. latissima*) og butare (*A. esculenta*), til en verdi av 4,4 millioner kroner (Norderhaug m. fl. 2020 s. 7). En rapport fra 2012 anslo at omsetningsverdien i den norske tang- og tareindustrien vil øke til 40 milliarder frem mot 2050, basert på dyrking og høsting av 20 millioner tonn biomasse (Olafsen m. fl. 2012). Innsatsfaktorene for å kunne dyrke frem store biomasser med makroalger er svært enkle og allerede til stede i Norge. Med sin lange kyst bestående av havområder med god vannkvalitet, og høye kompetanse når det gjelder havbruk, ligger forutsetningene til rette for å etablere en fremtidsrettet næring som kan utnytte havets ressurser på en bærekraftig måte. Norge som ledende nasjon innen lakseoppdrett, benytter i dag store mengder

soyaprotein i fôret, importert fra Brasil. Havbruksnæringen ser etter alternative proteinkilder og utpeker tare som en mulig naturlig erstatning (Skjermo m. fl. 2014 s.24; Skjermo 2016). For å kunne bli en lønnsom industri med dyrking i storskala må det utvikles metoder for effektivisering av innhøsting, samt gode lagringsmetoder, som både er kostands- og energieffektive. Ved videre oppskalering er det viktig å finne gode prosesseringsmetoder som utnytter råstoffet på best mulig måte (Norderhaug m. fl. 2020 s. 5, 9).

#### **1.4 *Saccharina latissima***

Brunalgen *Saccharina latissima*, også kjent som sukkertare, er den mest vanlige tarearten å dyrke i Europa (Bruhn m. fl. 2019). *S. latissima* finnes langs hele norskekysten, og tilhører ordenen Laminariales. Sukkertaren kan nå en lengde på inntil 4 meter, og kan vokse ned til 30 meters dyp avhengig av lysforhold. Livsløpet til *S. latissima* er relativt kort og spenner over 2-4 år (Indergaard 2010; Artsdatabanken 2006). Arten har et ernæringsmessig verdifullt innhold som består av mineraler, essensielle aminosyrer, flerumettede fettsyrer, antioksidanter og fenoliske forbindelser (Stévant m. fl. 2017; Nielsen m. fl. 2020). I enkelte brunalger kan innholdet av jod være svært høyt, og *S. latissima* spesielt rik på sporstoffet (Ho og Redan 2020). I europeisk sukkertare har det blitt oppdaget et jodinnhold så høyt som 6500 mg/kg tørrvekt. Øvre anbefalt daglig inntaksnivå for voksne ligger til sammenlikning på 600 µg jod/dag. Muligheten for å innta for store mengder av sporstoffet som kan føre til negative helsekonsekvenser, gjør at tareindustrien trenger å utvikle og finne frem til prosesseringsbetingelser som kan redusere innholdet av jod i ferdige produkter (Nielsen m. fl. 2020).



**Figur 1.1:** *S. latissima* som er benyttet som råstoff i denne oppgaven. (Nores.no)

## 1.5 Bioaktivitet i makroalger

Makroalger inneholder verdifulle bioaktive forbindelser og har et ernæringsmessig innhold som kan gi helsemessige fordeler. Potensialet for makroalger som funksjonell ingrediens er derfor stort, og råstoffet kan utnyttes for å ekstrahere ut nyttige komponenter (Holdt og Kraan 2011). Den kjemiske sammensetningen i makroalger vil variere etter sesong og dyrkningsområde, og maksnivåene av verdifulle komponenter vil sjelden være til stede på samme tid (Schiener m. fl. 2015; Holdt og Kraan 2011). Samtidig vil sesongen for høsting av makroalger begrense seg til våren, på grunn av begroing om sommeren da havtemperaturene er høyere (Stévant m. fl. 2017).

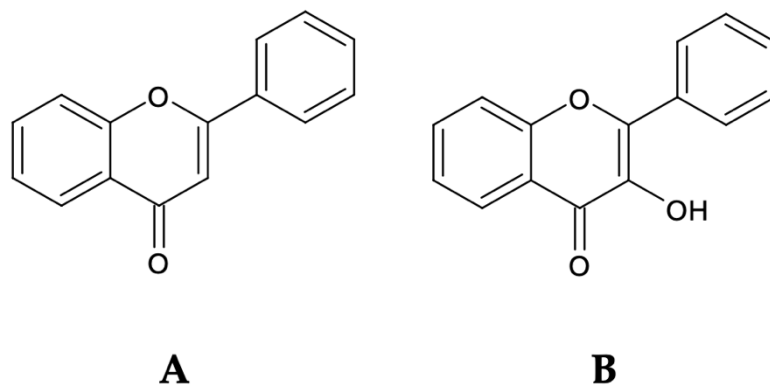
Vanninnholdet i makroalger er svært høyt og kan utgjøre opptil 94% av biomassen. I tillegg er makroalger kjent for å ha et høyt innhold av karbohydrater, ofte mer enn 70%, som inkluderer blant annet cellulose, alginat, karragenan og glukaner (Ho og Redan 2020). Polysakkaridene har mange bruksområder i ulike produkter som stabilisator, fortykningsmiddel og emulgator, og har høy kommersiell verdi, og er viktige i både farmasøytisk industri og næringsmiddelindustri (Holdt og Kraan 2011; Salehi m. fl. 2019). Karbohydratrike makroalger kan også være en mulig løsning på bærekraftig produksjon av biodrivstoff (Kraan 2013). En betydelig del av biomassen i marine alger består av aske, som inkluderer mineraler og sporstoffer, og brunalger kan ha et askeinnhold på over 50% av tørrvekten (Schiener m. fl. 2015; Holdt og Kraan 2011). Proteininnholdet i makroalger er generelt lavt, spesielt i brunalger som inneholder mindre proteiner enn det som er funnet i rød- og grønnalger. *S. latissima* som er høstet på samme område kan eksempelvis ha et proteininnhold mellom 1,3-10,8% tørrvekt (Salehi m. fl. 2019). Lipidinnholdet i makroalger er generelt sett lavt, og kan variere fra 0,12-6,73% tørrvekt (Pérez m. fl. 2015).

Flere studier har også påvist mengden av både vann- og fettløselige vitaminer i makroalger, som askorbinsyre (C-vitamin), tokoferoler (E-vitamin), karotenoider (pro-vitamin A), samt vitamin B12. Resultater fra flere studier viser imidlertid at biotilgjengeligheten for vitamin B12 ikke nødvendigvis er spesielt god (Ho og Redan 2020; Schiener m. fl. 2015). En viktig antioksidant som finnes i marine alger er karotenoidet fucoxanthin, et pigment som i brunalger har vist seg å ha flere helsefremmende virkninger, blant annet hemmende effekt på kreftceller, samt effekt på fedme og diabetes. Videre er makroalger en rik kilde til flere naturlige antioksidanter som polyfenoler, som i brunalger kan nå opp mot 25% av

tørrvekten. Florotanniner som er en viktig gruppe av fenolforbindelser i makroalger, har vist bioaktive effekter som blant annet antioksidantaktivitet, antibiotika og beskyttelse mot stråling. Sammenlignet med rød- og grønnalger, inneholder brunalger høyere konsentrasjoner av florotanniner, og fenolinnholdet kan variere fra <1% til 14% av tørrvekten (Stévant m. fl. 2017; Holdt og Kraan 2011). Samtidig inneholder ikke makroalger kun ønskede forbindelser, da de har en tendens til å absorbere og akkumulere tungmetaller fra havet over tid, som ved svært høye konsentrasjoner kan føre til negative helseeffekter (Salehi m. fl. 2020).

## 1.6 Fenoliske forbindelser

Fenoliske forbindelser blir ansett for å være blant de viktigste naturlige antioksidantene, og er en av hovedbidragsyterne til antioksidantaktiviteten. Fenolene inneholder én eller flere aromatiske ringer, som er knyttet til én eller flere hydroksylgrupper over et stort område (Machu m. fl. 2015). Strukturen til fenolforbindelsene varierer i stor grad fra helt enkle til mer komplekse molekyler. Polyfenolene deles inn i ulike klasser basert på antallet fenolringer molekylet inneholder, samt de strukturelle elementene som binder fenolringene sammen. Hovedklassene av polyfenoler er flavonoider, fenolsyrer, tanniner, stilbener og lignaner. Spesielt flavonoider regnes som viktige antioksidanter på grunn av sitt høye redokspotensial, som gir dem muligheten til å opptre som reduktanter og hydrogendonorere som lett gir fra seg elektroner. Flavonoidene kan videre deles inn i undergruppene antocyaniner, flavoner, isoflavoner, flavonoler, flavanoner og flavanoler. Strukturen til flavonoidene består av to aromatiske ringer, A og B, koblet sammen med en 3-karbonbro, vanligvis i form av en heterosyklisk ring C (Ignat m. fl. 2010).



**Figur 1.2:** Generell struktur på flavonoider funnet i alger: (A) Flavoner og (B) Flavonoler. (Cotas m. fl. 2020)

Opptil flere tusen polyfenoliske strukturer har blitt identifisert som sekundære metabolitter i planter (Machu m. fl. 2015). Polyfenoliske forbindelser er blant de mest effektive antioksidantene i brunalger, og det finnes generelt et høyere innhold i brunalger sammenlignet med grønn- og rødalger (Vasanthi m. fl. 2020; Pérez m. fl. 2015).

Antioksidantaktiviteten til polyfenolene er sterkt relatert til fenolringene, som fungerer som elektron-feller som fjerner radikaler. Flоротanniner som er den mest vanlige fenoliske forbindelsen i flere brunalger, har eksempelvis opptil åtte sammenkoblede ringer, og er derfor en kraftigere radikal-fjerner enn andre polyfenoler (Cotas m. fl. 2020; Wang m. fl. 2009). Polyfenoler blir stadig mer etterspurt av både forbrukere og næringsmiddelindustri, spesielt på grunn av sin gode antioksidanteffekt og de antibakterielle og betennelsesdempende egenskapene (Machu m. fl. 2015). Imidlertid er det usikkerhet knyttet til biotilgjengeligheten for ulike polyfenoliske forbindelser. Det kan blant annet oppstå interaksjon mellom polyfenoler og andre komponenter som eksempelvis proteiner eller karbohydrater, som kan påvirke absorpsjonen og dermed opptak av stoffene i kroppen. Mer forskning på området er derfor nødvendig (Manach m. fl. 2004).



## 1.7 Antioksidantaktivitet

### 1.7.1 Antioksidantaktivitet og naturlige antioksidanter

Antioksidanter er en betegnelse på ulike stoffer som forsinker eller hemmer oksidasjon av frie radikaler (Mahdi-Pour, m. fl. 2012). Naturlige antioksidanter i mat har fått økt oppmerksomhet de siste årene ut fra et mattrygghets-perspektiv, og blir ansett for å være et godt alternativ til syntetiske antioksidanter, som i noen tilfeller har vist seg å ha negative helseeffekter (Mitterer-Daltoé m. fl. 2020). Antioksidantenes funksjon er å nøytralisere frie radikaler i levende celler, som kan ha en negativ virkning på levende organismer. Reaktive oksygenarter (ROS) eller oksidativt stress oppstår som en uønsket, men naturlig konsekvens under cellemetabolismen og kan potensielt være skadelig (Akar m. fl. 2017). Oksidativt stress kan også oppstå fra eksogene kilder som luftforurensning, organiske løsemidler og plantevernmidler (Gulcin 2020). For lave nivåer av antioksidanter eller manglende balanse mellom prooksidanter og antioksidanter kan føre til oksidativt stress, en prosess som spiller en viktig rolle når det gjelder blant annet betennelsessykdommer, kreft eller tidlig aldring (Akar m. fl. 2017). En annen viktig funksjon antioksidanter har er å forhindre lipidoksidasjon i mat, som kan påvirke matens sensoriske egenskaper, samt redusere den ernæringsmessige kvaliteten i produktet (Jacobsen m. fl. 2019). Lipidoksidasjon induseres av oksygen i nærvær av blant annet varme, lys, metallioner eller frie radikaler (Laguerre m. fl. 2007).

Begrepet antioksidantaktivitet omhandler kinetikken eller hastigheten til en reaksjon mellom en antioksidant og en prooksidant eller radikalet som reduseres eller fjernes (Apak m. fl. 2013). Effektive antioksidanter kan sies å være «radical scavengers», som hemmer oksidasjon ved kjedereaksjon ved at de fungerer som hydrogen donor eller som akseptor av frie radikaler, og dermed skaper stabile radikaler. Denne gruppen av antioksidanter har hovedsakelig en fenolisk struktur (Huang m. fl. 2005). Antioksidanter kan kategoriseres som enten primære eller sekundære basert på deres mekanisme. Primære antioksidanter er frie-radikalslukkere («radical scavengers»), og vil som oftest donere et hydrogenatom. De kan enten forsinke initieringsfasen eller forstyrre propageringsfasen ved auto-oksidasjon. Videre kan de reagere med lipid- og peroksidradikaler og konvertere forbindelsene til mer stabile produkter. Sekundære eller forebyggende antioksidanter kan redusere hastigheten på lipidoksidasjoner ved en rekke mekanismer, eksempelvis ved binding av metall-ioner, ved å

slukke reaktive oksygen arter eller absorbere UV-stråling (Rojita og Satpal 2011; Gulcin 2020).

Et betydelig antall studier som har blitt utført viser at antioksidanter er essensielle for å forebygge og opprettholde en god helse, på grunn av evnen til å redusere oksidativt stress. Ved å måle antioksidantaktivitet i næringsmidler eller i biologiske prøver som eksempelvis tære, kan den ernæringsmessige kvaliteten sikres, og effekten antioksidantene har i næringsmidlet kan studeres for å forhindre og behandle sykdommer som er relatert til oksidativt stress (Munteanu og Apetrei 2021; Apak m. fl. 2013).

### **1.7.2 Syntetiske antioksidanter**

Syntetisk fremstilte antioksidanter benyttes som tilsetningsstoff i fettholdige matvarer for å motvirke oksidativ harskning. De syntetiske antioksidantene er mer aktive enn de naturlige antioksidantene og tilsettes derfor mat i lavere konsentrasjoner, ettersom de naturlige antioksidantene ikke er rene stoffer sammenlignet med de syntetiske (Pokorný 2007). De mest brukte syntetiske antioksidantene i næringsmiddelindustrien er BHA (butylated hydroxyanisole, E 320), BHT (butylated hydroxytoluene, E 321), TBHQ (tert-butylhydroquinone, E 319) og PG (propyl gallate, E 310) (Gulcin 2012; Silva og Lidon 2016). Propyl gallate (propyl 3,4,5-trihydroksybenzoat) som benyttes som referanse til forsøkene i denne oppgaven, er en ester fremstilt av gallesyre. Den fenoliske antioksidanten har mange biologiske funksjoner, og blant de viktigste er evnen til å forhindre oksidasjon av frie radikaler. Propyl gallate er en effektiv radikal-slukker både i hydrofile og lipofile miljøer (Becker 2007; Medina m. fl. 2013).

## **1.8 Effekter av blansjering**

Blansjering benyttes for å forlenge holdbarheten og kvaliteten på vegetabiler før de eksempelvis blir fryst, tørket eller hermetisert og prosessen blir tradisjonelt utført ved at råstoff blir kokt eller dampet i vann. Prosesskriterier for blansjering som tid, temperatur og trykk bestemmes av hvilken type råstoff som behandles, størrelsen på råstoffet, samt i hvor stor grad råstoffet er oppdelt. Blansjering vil øke holdbarheten til råstoffet av flere grunner,

men hovedhensikten er at enzymer som bidrar aktivt i en nedbrytningsprosess blir inaktivert. Andre viktige fordeler med blansjering er at prosessen vil bidra til å redusere antall mikroorganismer, fjerne forurensning på overflaten i tillegg til å bevare farge, smak og øke råstoffets næringsverdi. Blansjering ved bruk av vann har mange fordeler, men metodene kan gi tap av proteiner, vitaminer, fenoliske komponenter, samt andre vannløselige komponenter i råstoffet (Reis 2017 s. 7).

Fenoliske komponenter som finnes i planter er ofte bundet opp i celleveggen, men finnes også i løselig form. Ved blansjering vil plantens store overflateareal være omsluttet av vann, og i kombinasjon med høye temperaturer kan prosessen bidra til denaturering av celleveggen, samt fenoliske forbindelser. Vannløselige fenoliske forbindelser kan også la seg ekstrahere ut av råstoffet og lekke ut i blansjeringsvannet (Reis 2017 s. 51-52). Hvilken effekt blansjering har på fenoliske komponenter i *Saccharina latissima* og makroalger generelt er lite beskrevet i litteraturen. Studier viser at blansjering har god effekt på reduksjon av jod, og er derfor et viktig prosesstrinn for makroalger som er tiltenk konsum (Nielsen m. fl. 2020; Ho og Redan 2020). Blansjeringsprosessen vil også kunne påvirke antioksidantaktiviteten og den radikale slukningsaktiviteten. Faktorer av betydning vil blant annet være tid og temperatur, samt i hvilken grad råstoffet er kuttet opp. Antioksidantkapasiteten kan også variere etter varmetoleransen til de ulike forbindelsene (Reis 2017 s. 53-54).

## 1.9 Tørkemetoder

Fersk tare inneholder store mengder vann som bidrar til at fersk tare har høy vekt og volum. Det høye vanninnholdet bidrar til å komplisere lagringen ved at råstoffet forringes raskt etter innhøsting. Derfor er det hensiktsmessig å tørke makroalgene slik at råstoffet blir enklere å håndtere samtidig som holdbarheten forlenges. Ved å redusere vannaktiviteten vil vekst av mikroorganismer reduseres, noe som bidrar til å opprettholde kvaliteten under lagring. En tørkeprosess kan resultere i forringelse i makroalgens funksjonelle egenskaper samt antioksidant egenskaper ved at råstoffets kjemiske sammensetning endres (Amorim m. fl. 2020).

De vanligste metodene for tørking er frysetørking og lufttørking. Ved frysetørking benyttes vakuum og fryst råstoff, samt lave temperaturer for å fjerne vann fra produktet. Vannet fjernes ved hjelp av sublimasjon, som vil si at trykk og temperatur senkes slik at isen fordampes direkte (Fellows 2016 s. 930-931). Frysetørking er en skånsom metode da det ikke benyttes høye temperaturer for å fjerne vann. Studier har vist at metoden gir et bedre utbytte av næringsstoffer i makroalger sammenlignet med andre tørkemeter (Amorim m. fl. 2020). Lufttørking benytter varm luft i sirkulasjon for å dehydrere produktet. Varmluft vil varme opp råstoffet slik at porene åpner seg og vanndamp frigjøres. Vanndampen blir fraktet vekk ved hjelp av varmluften som sirkulerer rundt produktet. Siden råstoffet tørkes fra overflaten, kan råstoffet få varmeskader dersom temperaturen blir for høy. Et varmeskadet produkt vil få en hard overflate som ikke slipper gjennom væske, noe som resulterer i at vann vil bli fanget inne i produktet (Fellows 2016 s. 663, 667- 671).

## 1.10 Ekstraksjon

Ekstraksjon har som hensikt å trekke komponenter ut fra et råstoff som eksempelvis tare, for så å separere konsentrat fra råstoff (Fellows 2016 s. 235). Tradisjonelt benyttes organiske løsemidler for å ekstrahere fenoliske forbindelser ut av makroalger.

Ekstraksjonsvæsken vil da inneholde løsemidler som etanol, metanol eller aceton som fortynnes med vann. For å øke konsentrasjonen av fenoler i ekstraktet er det vanlig å varme opp løsningen, men temperaturen må ikke overstige 92°C, da fenoliske forbindelser vil degraderes ved så høye temperaturer (Besednova m. fl. 2020). Tradisjonelle metoder for ekstraksjon er i ferd med å bli utkonkurrert av moderne ekstraksjonsmetoder som eksempelvis superkritisk væske-ekstraksjon og trykkvæskeekstraksjon. Grunnen til at nye ekstraksjonsmetoder utvikles er at tradisjonelle metoder gir et lavere utbytte, samt at ekstraktet vil inneholde andre forbindelser som forstyrrer målingene. Tradisjonelle metoder har også lang ekstraksjonstid og krever store volum av en eller flere organiske løsemidler, som bidrar til en større miljøforurensning (Matos m. fl. 2021; Getachew m. fl. 2020). Et forsøk utført i 2014 (Matos m. fl.) som så på det totale fenolinnholdet i tare, fant at ekstraksjon ved bruk av destillert vann så ut til å være den mest effektive fremgangsmåten for omtrent alle de analyserte tareprøvene. En annen studie utført av Wang m. fl. (2009)

fant derimot et høyere innhold av fenoler i ulike makroalger ved bruk av 70% aceton som løsemiddel, sammenlignet med vann.

## **1.11 Metoder for måling av antioksidantaktivitet**

For måling av antioksidantaktivitet finnes det mange ulike metoder å velge mellom. Blant de viktigste metodene er Folin-Ciocalteu metoden som måler totalt fenolinnhold og FRAP- (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoden, som baserer seg på overføring av et enkelt elektron (SET-mekanisme), i tillegg til metodene DPPH og ABTS som innebærer overføring av både et elektron og et hydrogenatom (HAT-mekanisme). Analysene baserer seg på kjemiske reaksjoner og bestemmes spektrofotometrisk. Ingen av metodene vil alene være tilstrekkelig for å vurdere den totale antioksidantaktiviteten, da hver enkelt metodene har sine begrensninger. Det er derfor nødvendig å inkludere flere ulike metoder for å danne et mer riktig bilde av den helhetlige antioksidantaktiviteten i en prøve (Munteanu og Apetrei 2021).

### **1.11.1 Folin-Ciocalteu metoden**

Folin-Ciocalteu- metoden er en velkjent og utbredt metode for bestemmelse av totalt fenolinnhold i planteekstrakter (Munteanu og Apetrei 2021). Det grunnleggende prinsippet bak metoden er en oksidasjon-/reduksjonsreaksjon, hvor en fenolgruppe blir oksidert og et metallion blir redusert (Agbor m. fl. 2014). Polyfenoler som finnes tilgjengelig i planteekstraktet reagerer med det spesifikke redoks-komplekset Folin-Ciocalteu reagens (FCR), og det dannes et blått kromofor som består av et fosfotungsten-fosfomolybden-kompleks, som måles ved 765 nm. Innholdet av polyfenoler er proporsjonalt med den blå fargen, og en dypere farge indikerer derfor høyere absorbans. Metoden har flere fordeler som at den er enkel, sensitiv og presis. En viktig ulempe ved metoden er at en del ikke-fenoliske reduserende stoffer er til stede under reduksjonen av FCR. Forstyrrende stoffer kan eksempelvis være reduserende sukker eller enkelte aminosyrer, som kan medføre at det måles en for høy konsentrasjon av fenoler (Hudz m.fl. 2019; Munteanu og Apetrei 2021).

### 1.11.2 DPPH radikal slukningsaktivitet metoden

DPPH-metoden er en av de mest brukte og anerkjente spektrofotometriske metodene for måling av antioksidantaktivitet i planteekstrakter. DPPH-radikalet har et uparet elektron lokalisert ved nitrogenatomet, som reduseres ved at det mottar et hydrogenatom fra en antioksidant som fungerer som hydrogendonor (Chen m. fl. 2020). Metoden er basert på antioksidantenes evne til å fjerne eller binde frie radikaler, gjennom å redusere opprinnelig konsentrasjon av radikalet, og dermed endre farge på løsningen fra dyp lilla til gul. DPPH-radikalet har maksimum absorbans på 517 nm (Akar m. fl. 2017). Metoden viser høy stabilitet, er enkel å utføre og har lave kostnader (Chen m. fl. 2020).

### 1.11.3 ABTS radikal slukningsaktivitet metoden

Metoden går ut på å måle antioksidanters kapasitet til å nøytralisere det stabile radikale kationet 2,20-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS $\bullet$ +), som er et blå/grønt kromofor med maksimum absorbans ved 734 nm. Ved tilsetning av antioksidanter vil intensiteten på fargen reduseres, grunnet at det radikale kationet ABTS $\bullet$ + reduseres til ABTS. Lavere absorbans viser økt antioksidantpotensiale. ABTS $\bullet$ + reagerer raskt med både naturlige og syntetiske antioksidanter, og metoden tillater derfor bestemmelse av et bredt spekter av antioksidantforbindelser (Munteanu og Apetrei 2021). Andre fordeler ved metoden er at den er enkel i bruk, og at ABTS $\bullet$ + er løselig i både organiske løsemidler og vann, som gjør det mulig å bestemme antioksidantkapasiteten til både hydrofile og lipofile forbindelser. Det ser likevel ut til at vannløselige reaksjoner vil være foretrukket (Gulcin 2020). Metoden kan videre benyttes over et bredt pH-spekter, men reaksjonsmekanismene kan også endres etter pH-verdi, og eksempelvis kan elektronoverføring lettere skje ved sur pH (Munteanu og Apetrei 2021).

### 1.11.4 FRAP-metoden

FRAP-metoden måler antioksidantenes evne til å redusere treverdige jern-tripyridyltriazine (Fe $^{3+}$ -TPTZ) til toverdige jern (Fe $^{2+}$ -TPTZ). Reaksjonen skjer ved lav pH (3,6) hvor sistnevnte vil utvikle en dyp blå farge som måles ved maks absorbans på 593 nm (Gulcin 2020). FRAP-

metoden er enkel, rask og har lave kostnader. Forsøk har imidlertid vist at resultater fra målinger kan variere avhengig av analysetid. Det kan derfor være mulig at reaksjonen ikke er fullstendig ved et bestemt tidspunkt for måling av absorbans, da ulike antioksidanter krever forskjellige reaksjonstider for påvisning (Munteanu og Apretei 2021).

## 2. Materialer og metoder

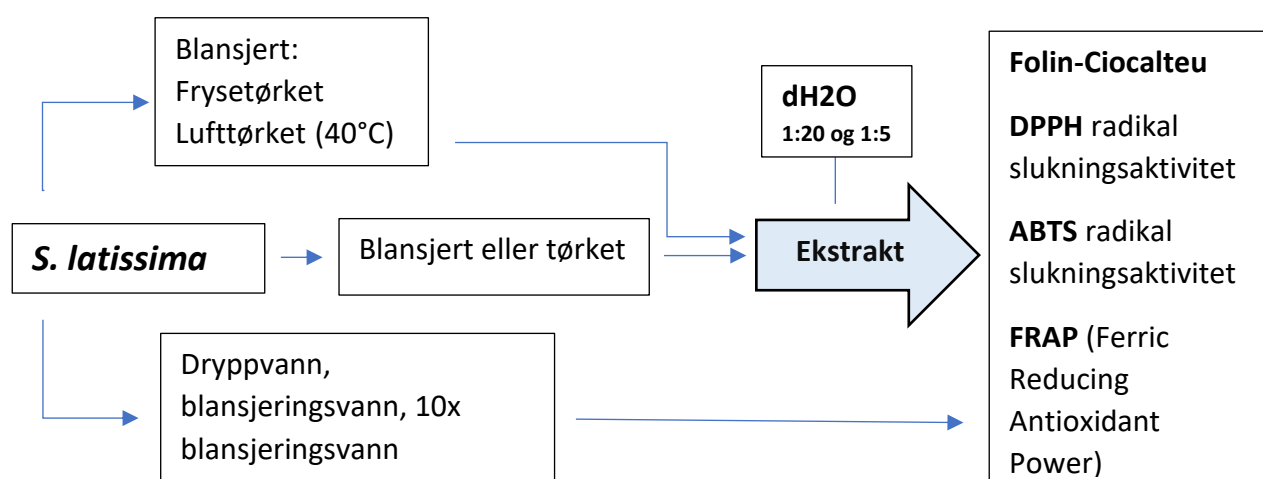
### 2.1 Råstoff

Råmateriale som ble benyttet til forsøkene var *Saccharina latissima*, mottatt fra både SINTEF Ocean og Seaweed Solutions AS (SES). Mottatt råstoff fra SINTEF var høstet ved SES sitt anlegg. Prøvematerialet var blansjert og frysetørket, samt blansjert og lufttørket ved 40°C i ca. 20-25 timer. Blansjeringsbetingelser for dette råstoffet er ikke oppgitt, men en standard på 85°C i 120 sekunder er sannsynligvis benyttet.

*S. latissima* mottatt fra SES, ble dyrket og høstet ved deres sjøanlegg utenfor Frøya i Norge. I uke 21 mai 2020 ble *S. latissima* høstet og videre oppbevart i tanker med filtrert sjøvann (~8°C) gjennom dagen og over natten, før tarebiomassen ble sendt til Hitramat for prosessering. Råmaterialet hadde ingen eller liten begroing. Mottatt råstoff var fersk og hel tare blansjert i vannbad ved 80°C i 120 sekunder (50 g. v.v./L ferskvann), samt blansjeringsvann med samme betingelser, som var benyttet ved én runde blansjering og ti runder blansjering. Blansjert *S. latissima* og blansjeringsvann ble fryst (-20°C) ved Hitramat og deretter transportert til NTNU Gløshaugen hvor råstoffet ble videre fryst (-40 eller -80°C). I tillegg ble det mottatt frysetørket rå tare som ikke var blansjert, ellers med samme betingelser.

## 2.2 Flytskjema

En oversikt over råstoff, ekstrakter og utførte metoder vises i figur 2.1. Flytskjema gir et forenklet bilde av mottatt og ferdigprosessert råstoff av *S. latissima*, samt det praktiske arbeidet som startet med tillaging av ekstrakter.



**Figur 2.1:** Flytskjema som viser forbehandling av mottatt råstoff, tillaging av ekstrakt og metoder utført for måling av antioksidantaktivitet.

## 2.3 Tillaging av ekstrakter

Ved tillaging av ekstrakter ble det kun benyttet destillert vann (dH<sub>2</sub>O) som ekstraksjonsvæske. Tabell 2.1 gir et oversiktlig bilde over de åtte ekstraktene, hvor råstoffet kommer fra, samt valg av fortynningsforhold.



**Tabell 2.1:** Oversikt over ekstrakter av *S. latissima*, hvor råstoffet kommer fra, samt fortynningsforhold.

Ekstrakter av <i>S. latissima</i>		Mottatt råstoff	Fortynning (dH <sub>2</sub> O)
FT. BL.	Frysetørket og blansjert	SINTEF	1:20
LT. BL.	Lufttørket (40°C) og blansjert	SINTEF	1:20
BL. RÅ	Blansjert rå	SES	1:5
FT. RÅ	Frysetørket rå	SES	1:20
D.V.	Dryppvann (tinevann)	SES	-
BL.V	Blansjeringsvann	SES	-
10x BL.V. (A)	Blansjeringsvann benyttet 10 ganger	SES	-
10x BL.V. (B)	Blansjeringsvann benyttet 10 ganger	SES	-

### 2.3.1 Tørket råstoff (blansjert og rå)

10,0 gram tørket *S. latissima* ble knust til pulver ved hjelp av en stavmikser. Av knust tarepulver ble 0,500 ( $\pm$  0,005) gram veid ut i et sentrifugerør og tilsatt 10 ml dH<sub>2</sub>O. Ekstraktene ble vortexet godt før de ble plassert i bevegelig vannbad ved 80°C i 10 minutter. Videre ble ekstraktene avkjølt i romtemperatur før de på nytt ble grundig vortexet og plassert på kjølerom (1-4°C) over natten. Neste dag ble ekstraktene igjen vortexet godt før de ble sentrifugert ved 5500 rpm i 20 minutter. Ekstraktene ble til slutt filtrert i foldefilter (520 B ½ ø320mm).

### 2.3.2 Blansjert råstoff

Blansjert og fryst *S. latissima* ble tint på kjølerom over natten (1-4°C) før 10,0 gram ble knust til puré ved hjelp av en stavmikser. Deretter ble 2,000  $\pm$  0,005 gram veid ut i et sentrifugerør og tilsatt 10 ml dH<sub>2</sub>O. Videre ble ekstraktet behandlet på samme måte som for det tørkede råstoffet.

### 2.3.3 Blansjeringsvann og dryppvann

Etter at blansjert og fryst *S. latissima* ble tint på kjølerom over natten (1-4°C), ble dryppvann eller tinevann fra den blansjerte taren tatt ut av posen og benyttet som ferdig ekstrakt.

Mengdeforholdet mellom den fryste taren og dryppvannet er ukjent. «Blansjeringsvann x 10» er blansjeringsvann som er gjenbrukt, det vil si at vannet er brukt på nytt for ti blansjeringer på rad. Ekstraktene med blansjeringsvann og dryppvann ble videre behandlet på samme måte som for tørket eller blansjert råstoff.

## 2.4 Metoder for måling av antioksidantaktivitet

Antioksidantaktivitet ble målt for samtlige åtte ekstrakter ved bruk av Folin-Ciocalteu metoden, DPPH radikal slukningsaktivitet metoden, ABTS radikal slukningsaktivitet metoden og FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoden. Propyl gallate (PG) ble benyttet som referanse for kalibrering til alle metoder.

### 2.4.1 Folin-Ciocalteu metoden

Det totale fenolinnholdet ble bestemt etter Folin-Ciocalteu metoden beskrevet av Singleton m. fl. (1999). En fortyningsserie (0.5-2 mM) med PG ble tillaget og benyttet som standardkurve for kalibrering. 5 ml dH<sub>2</sub>O, 0.5 ml Folin-Ciocalteu reagens og 0.5 ml ekstrakt, blankprøve (80% metanol) eller PG ble deretter blandet i rør og vortexet. Etter 3 minutter ble 1 ml 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tilsatt prøvene og blandet, før 3 ml dH<sub>2</sub>O ble tilsatt og utgjorde et totalvolum på 10 ml per rør. Prøvene ble vortexet, dekket med folie og satt til inkubering i 1 time i romtemperatur. Absorbans ble til slutt målt ved 725 nm med vann som referanse.

### 2.4.2 DPPH radikal slukningsaktivitet metoden

DPPH metoden for måling av antioksidantaktivitet ble utført som beskrevet av Thiansilakul m. fl. (2007). Dagen før måling ble DPPH-løsningen gjort klar ved å tilsette 0.15 mM DPPH i 96% etanol, før løsningen ble dekt til og satt på røring over natten ved 4°C. En serie med fortyninger (10-30 µM) av PG ble benyttet som standardkurve for kalibrering. Videre ble 1.5 ml ekstrakt og 1.5 ml DPPH-løsning blandet i prøverør og vortexet godt. Blankprøve ble

tillaget på samme måte med 80% metanol i stedet for ekstrakt. Prøvene ble deretter tildekt med folie og inkubert ved romtemperatur i 30 minutter, før absorbans ble lest av spektrofotometrisk ved 517 nm, med 96% etanol som referanse. DPPH radikal slukningsevne ble utregnet etter følgende formel:

$$\text{DPPH radikal slukningsaktivitet (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{prøve}}}{A_{\text{blank}}}\right) * 100\%$$

*Aprøve* er her absorbansen til prøven, og *Ablank* er absorbansen til blankprøven.

### 2.4.3 ABTS radikal slukningsaktivitet metoden

ABTS metoden for måling av antioksidantaktivitet ble utført etter fremgangsmåten beskrevet av Nenadis m. fl. (2004). ABTS•+ løsningen ble gjort klar dagen før måling, ved å først tilsette 25 ml 7 mM ABTS i dH<sub>2</sub>O, for deretter å tilsette 440 µl 140 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Blandingen ble dekket med folie og satt i romtemperatur over natten. ABTS•+ løsningen ble så fortynnet med 80% metanol til absorbansen var 0.75 ± 0.05 ved 734 nm, med vann som referanse. Videre ble en serie med fortynninger av PG (10-40 µM) benyttet til å lage standardkurve, som ble benyttet til kalibrering. Deretter ble 2 ml ABTS•+ blandet med 200 µl ekstrakt, blankprøve (80% metanol) eller PG og vortexet. Prøvene ble tildekket og inkubert i 6 minutter i romtemperatur, før absorbans ble målt ved 734 nm med vann som referanse. ABTS radikal slukningsevne ble utregnet etter følgende formel:

$$\text{ABTS radikal slukningsaktivitet (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{prøve}}}{A_{\text{blank}}}\right) * 100\%$$

*Aprøve* er her absorbansen til prøven, og *Ablank* er absorbansen til blankprøven.

### 2.4.4 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoden

Reduksjonsevnen til ekstraktene ble målt etter FRAP metoden som beskrevet av Benzie og Strain (1996), med enkelte modifikasjoner. FRAP-reagenset ble tillaget samme dag som målingen, og bestod av 5 ml 19 mM Jern-løsning (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), 5 ml 10 mM TPTZ-løsning (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazine) i 40 mM HCl og 50 ml acetatbuffer. Blandingen ble inkubert i varmeskap ved 37°C frem til bruk. En standardkurve med fortynninger (31.25-1000 µM) av

PG ble gjort klar for å benytte til kalibrering. Videre ble 10 µl ekstrakt, blankprøve eller PG blandet med 30 µl dH<sub>2</sub>O og 300 µl ferdig oppvarmet FRAP-reagens i en mikroplate, og inkubert i varmeskap ved 37°C i 30 minutter. Blankprøven bestod av 40 µl dH<sub>2</sub>O og 300 µl FRAP-reagens. Prøvene ble deretter satt inn i en plateleser og ristet i 3 sekunder, før absorbans ble målt ved 593 nm. FRAP metoden ble utført i to omganger, første omgang som beskrevet over, og i andre omgang ble 30 µl dH<sub>2</sub>O erstattet med ekstrakt før måling av absorbans, grunnet at ikke alle prøvene viste utslag ved første måling.

### 3. Resultater

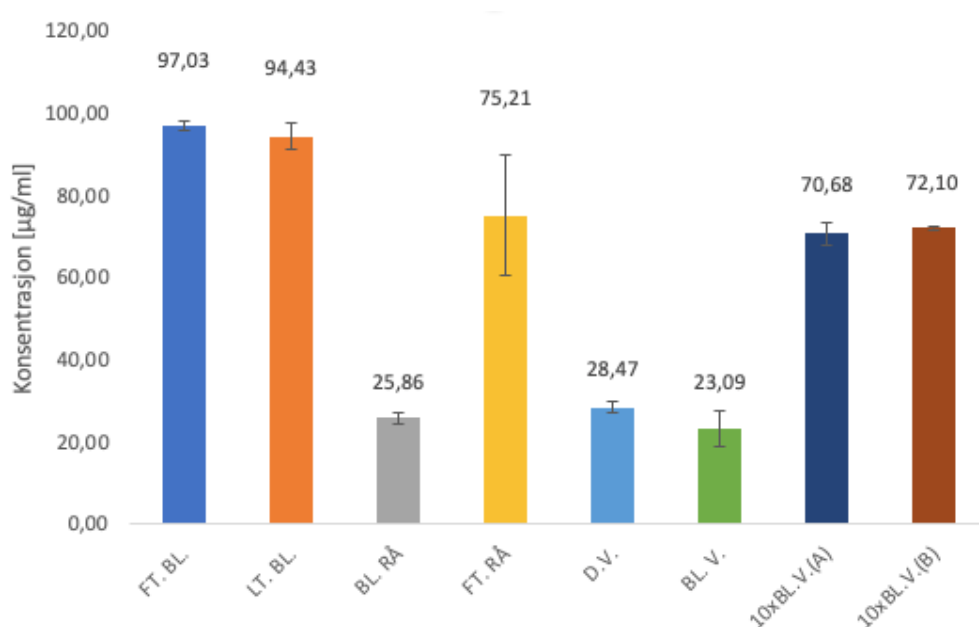
I første del av resultatene presenteres forskjellene i antioksidantaktivitet og totalt fenolinnhold for de ulike prøvene av *S. latissima*. Siste del av resultatene viser korrelasjon mellom det totale fenolinnholdet og antioksidantaktiviteten fra analysene.

#### 3.1 Antioksidantaktivitet i *S. latissima*

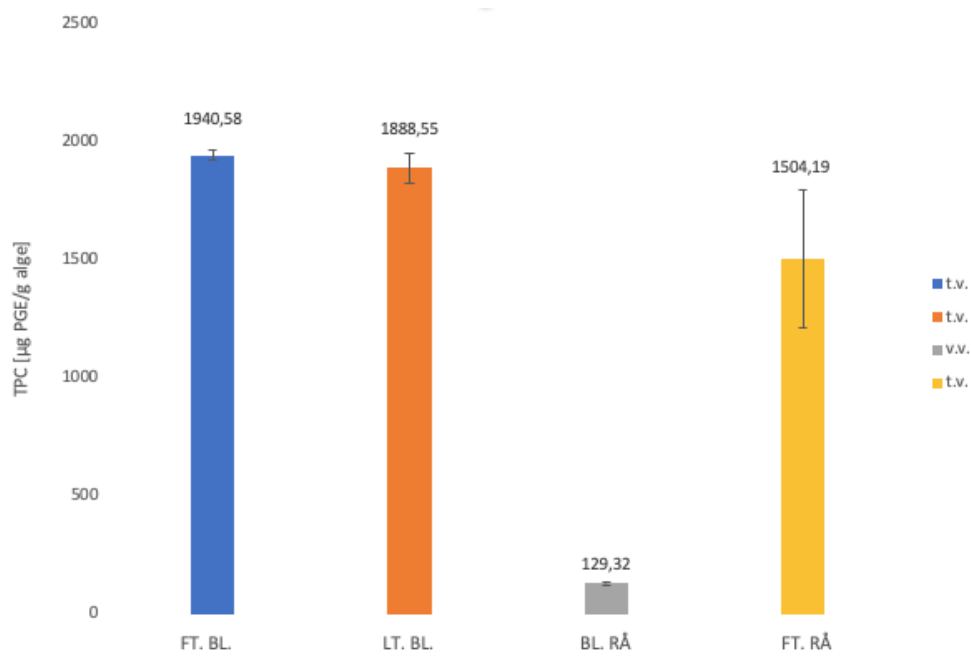
Resultatene for målt antioksidantaktivitet ved bruk av de fire forskjellige metodene Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS og FRAP er fremlagt under. Samtlige ekstrakter er benyttet for analyse for alle metodene. Alle målingene er utført med tre replikater (n=3) og standardavviket er vist ved hjelp av feilstolper. Noen absorbansmålinger er forkastet da de avviker i stor grad fra de to andre målingene, og derfor er beregninger på noen av prøvene utført med kun to replikater. For Folin-Ciocalteu metoden er resultatene fremstilt ved [konsentrasjon av fenoliske komponenter i ekstraktet (µg/ml)] for samtlige prøver, mens for prøver med kjent tørrvekt eller våtvekt er det totale fenolinnholdet vist ved [µg propyl gallate ekvivalenter (PGE)/g tørket/våt alge]. Resultatene fra DPPH og ABTS viser radikal slukningsaktivitet (RSA [%]). For FRAP-analysen er resultatene fremstilt ved konsentrasjon av redusert jern vist i [µg/ml] for samtlige prøver, og for prøver med kjent tørrvekt eller våtvekt er reduksjonsevnen vist ved [µg PGE/g tørket/våt alge]. FRAP-analysen ble utført i to omganger, med enkelte modifikasjoner i omgang to (som beskrevet i utførelsen).

### 3.1.1 Folin-Ciocalteu metoden, totalt fenolinnhold

For analysen Folin-Ciocalteu (vedlegg A) fremstilt i figur 3.1 viste de tørkede prøvene det høyeste innholdet av fenoler. Høyest konsentrasjon av ekstraherte fenoler ble funnet i frysetørket blansjert (FT. BL.) og lufttørket blansjert (LT. BL.) *S. latissima* med henholdsvis  $97,03 \pm 1,0$   $\mu\text{g/ml}$  og  $94,43 \pm 3,2$   $\mu\text{g/ml}$ . Prøven blansjert rå (BL. RÅ) viste den nest laveste konsentrasjonen av fenoler med  $25,86 \pm 1,43$   $\mu\text{g/ml}$ . Videre viser figur 3.2 resultatet av det totale fenolinnholdet i prøvene som har kjent tørrvekt eller våtvekt. Sammenlignet med prøven blansjert rå (BL. RÅ) viste alle de tørkede prøvene et svært høyt innhold av fenoler.



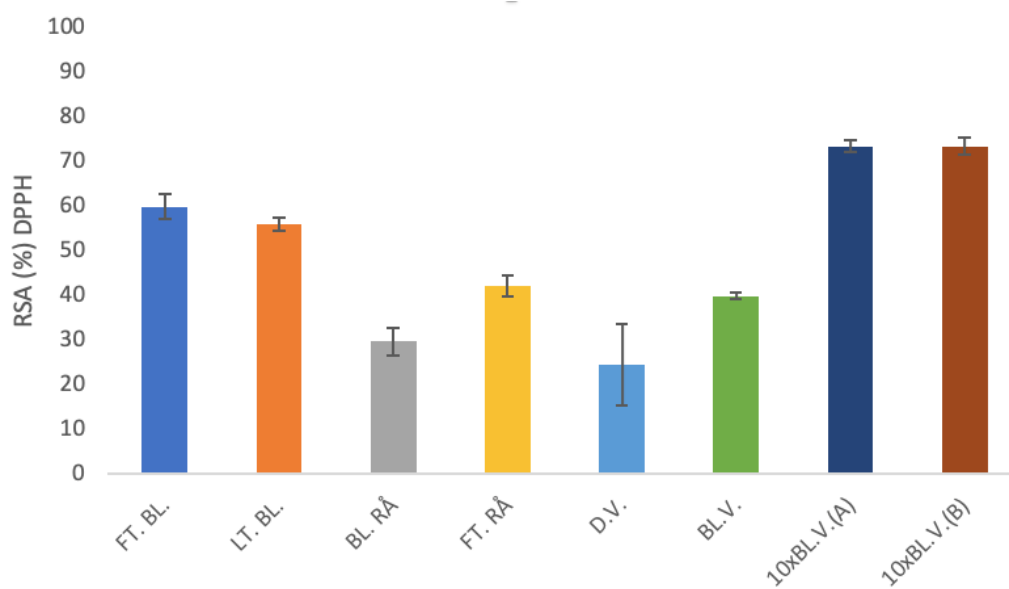
**Figur 3.1:** Konsentrasjon av fenoler i *S. latissima* vist som  $\mu\text{g/ml}$  for analysen Folin-Ciocalteu ( $n=3$ ). Standardavviket er vist ved feilstolper.



**Figur 3.2:** Totalt fenolinnhold i tørket og blansjert *S. latissima* målt i µg PGE/g alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) ved Folin-Ciocalteu analysen (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.

### 3.1.2 DPPH radikal slukningsaktivitet

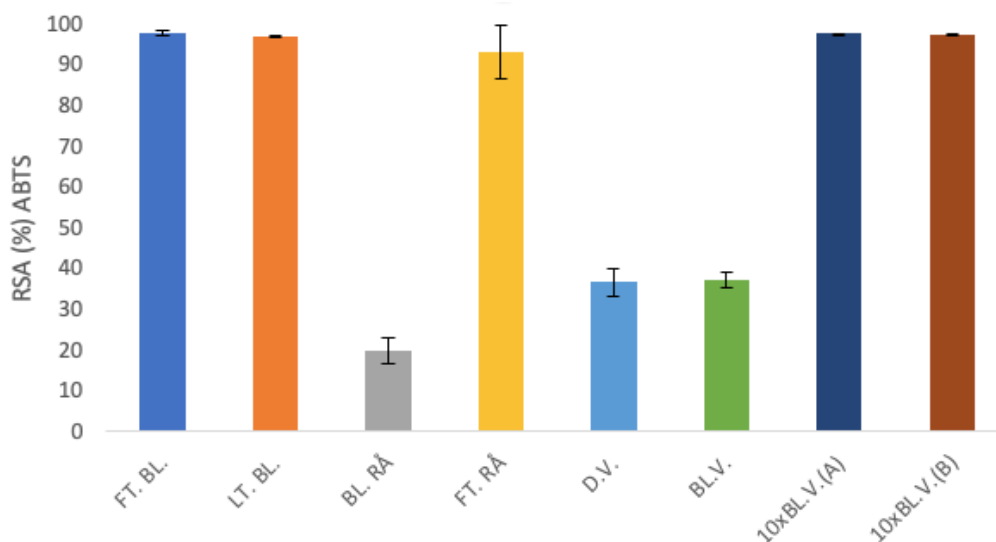
I DPPH radikal slukningsaktivitet analysen (vedlegg B) fremstilt i figur 3.3, fikk prøven blansjeringsvann benyttet ti ganger høyest aktivitet med  $73,5 \pm 2,0\%$  (10x BL.V. (B)) og  $73,45 \pm 1,3\%$  (10x BL.V. (A)). Samtlige av de tørkede prøvene av *S. latissima* viste også en høyere radikal slukningsaktivitet enn den blansjerte rå prøven, som viste den nest laveste aktiviteten med  $29,7 \pm 3\%$ . Lavest slukningsaktivitet ble funnet i dryppvannet (D.V.) med  $24,5 \pm 9\%$ .



**Figur 3.3:** Radikal slukningsaktivitet for DPPH (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.

### 3.1.3 ABTS radikal slukningsaktivitet

Analysen for ABTS radikal slukningsaktivitet (vedlegg C) fremstilt i figur 3.4 viste store utslag for mange av prøvene. Frysetørket blansjert (FT. BL.) og lufttørket blansjert (LT. BL.) *S. latissima* viste høy radikal slukningsevne med henholdsvis  $97,95 \pm 0,6\%$  og  $96,89 \pm 0,2\%$ . Omtrent like store utslag på slukningsaktivitet ga blansjeringsvann benyttet ti ganger med  $97,69 \pm 0,08\%$  (10x BL.V. (A)) og  $97,56 \pm 0,21\%$  (10x BL.V. (B)), tett fulgt av frysetørket rå (FT. RÅ) med  $93,3 \pm 6,6\%$ . Prøven som viste lavest slukningsaktivitet var blansjert rå (BL. RÅ) med  $19,9 \pm 3,2\%$ .



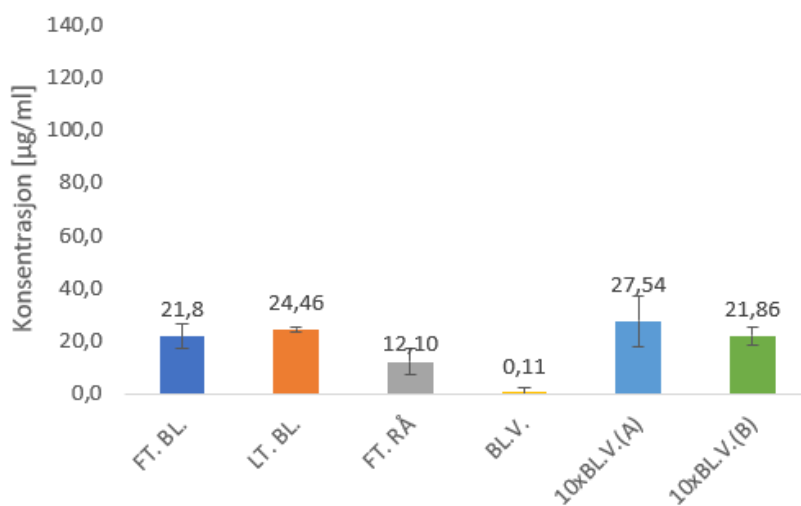
**Figur 3.4:** Radikal slukningsaktivitet for ABTS analysen (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.



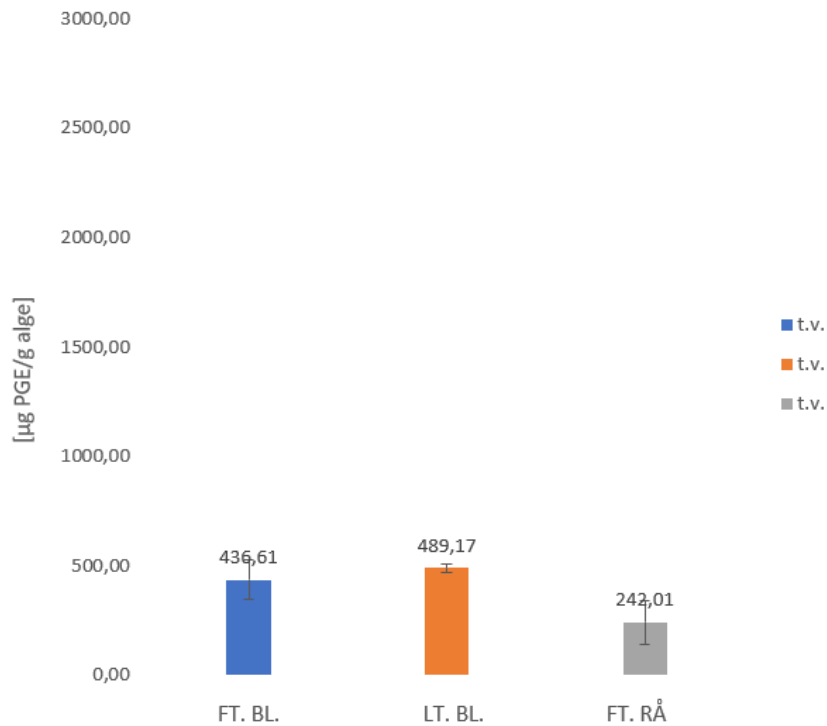
### 3.1.4 FRAP metoden, reduksjons kapasitet

FRAP analysen (vedlegg D) viser forskjellene i reduksjonskapasitet mellom de ulike prøvene. I figur 3.5 (omgang 1) viser blansjeringsvann som er benyttet ti ganger (10xBL.V. (A)) den høyeste reduksjonsevnen med  $27,5 \pm 9,6$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , etterfulgt av lufttørket blansjert (LT. BL.) *S. latissima* med  $24,46 \pm 1,1$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Prøven frysetørket rå (FT. RÅ) med  $12,1 \pm 5,1$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , viser omtrent halvparten så stor reduksjonskapasitet som prøven frysetørket blansjert (FT. BL.), målt til  $21,8 \pm 4,5$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Videre viser figur 3.6 (omgang 1) resultatet av reduksjonskapasiteten til prøvene som har kjent tørrvekt eller våtvekt. Resultatene viser de samme forholdene mellom prøvene som i figur 3.5. Det ble ikke påvist reduserende evne i ekstraktene blansjert rå (BL. RÅ) og dryppvann (D.V.) i omgang 1.

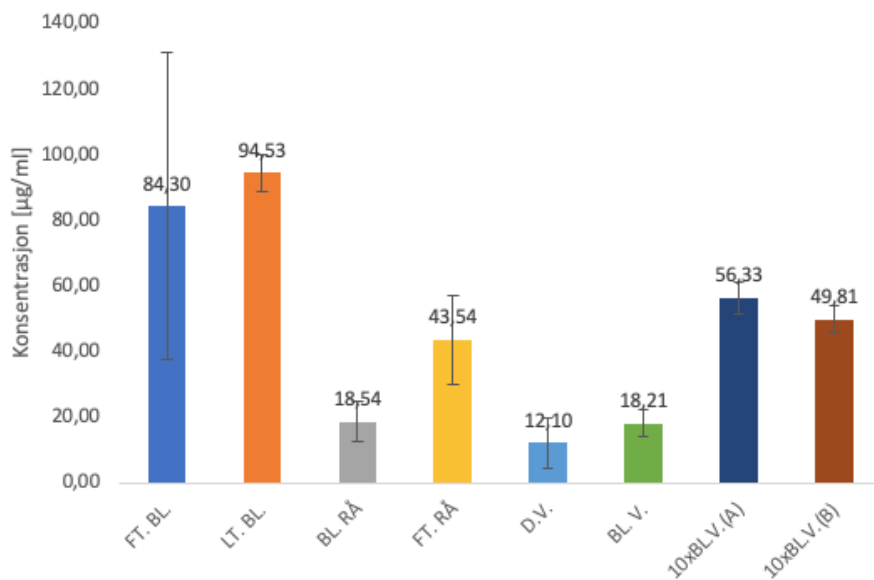
Fra modifisert FRAP analyse (omgang 2) fremstilt i figur 3.7 viser lufttørket blansjert (LT. BL.) *S. latissima* det høyeste reduksjonspotensialet med  $94,53 \pm 5,6$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , etterfulgt av prøven frysetørket blansjert (FT. BL.) med en reduksjonsevne på  $84,3 \pm 46,9$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . I figur 3.8 (omgang 2) som kun viser ekstrakter av *S. latissima* som har kjent tørrvekt eller våtvekt, viser prøven blansjert rå (BL. RÅ) igjen svært lav reduksjonskapasitet sammenlignet med de tørkede prøvene.



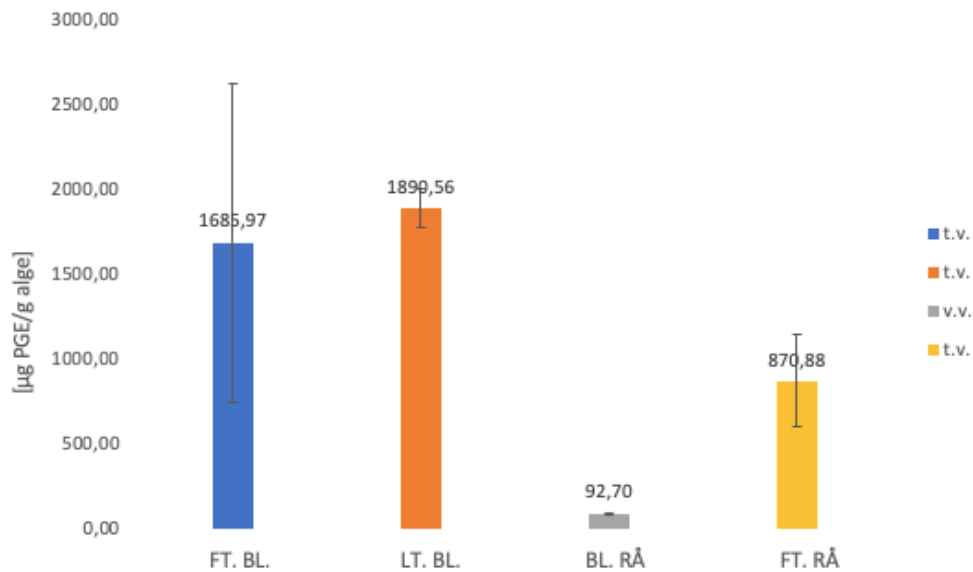
**Figur 3.5:** Reduksjonskapasitet målt i konsentrasjon av redusert jern i prøvene, vist ved  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for analysen FRAP (n=3) for omgang 1. Standardavviket er vist ved feilstolper.



**Figur 3.6:** Ferric reducing antioxidant power (FRAP) målt i µg PGE/g alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) for omgang 1 (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.



**Figur 3.7:** Reduksjonskapasitet målt i konsentrasjon av redusert jern i prøvene, vist ved µg/ml for analysen FRAP (n=3) for omgang 2. Standardavviket er vist ved feilstolper.



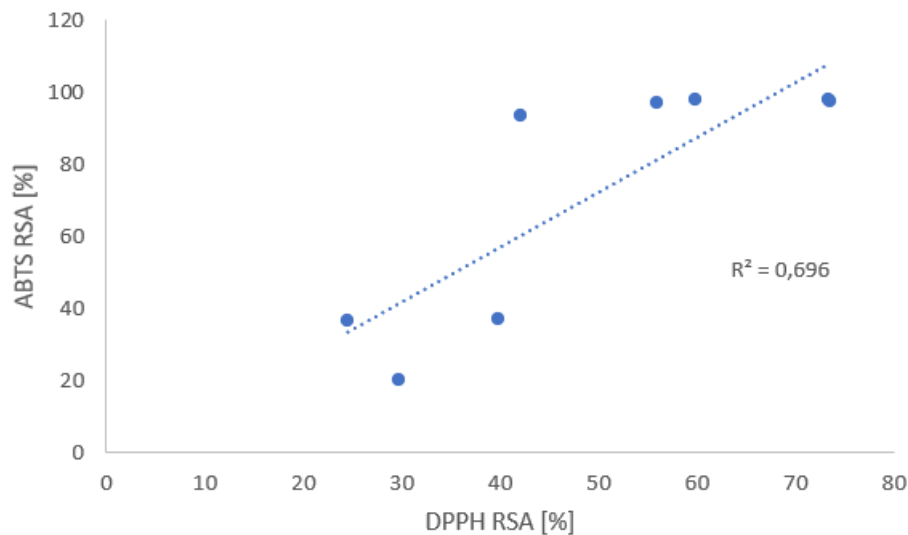
**Figur 3.8:** Ferric reducing antioxidant power (FRAP) målt i µg PGE/g alge tørrvekt (t.v.) eller våtvekt (v.v.) for omgang 2 (n=3). Standardavviket er vist ved feilstolper.

## 3.2 Korrelasjon mellom totalt fenolinnhold og antioksidantaktivitet

For å bestemme om det var samvariasjon eller korrelasjon mellom de ulike analysemetodene ble en korrelasjonsanalyse gjennomført. Korrelasjonskoeffisient og signifikansen ble beregnet i Excel Office 365 ved å benytte dataanalyseverktøyene *korrelasjon* og *variansanalyse*. For DPPH og ABTS ble gjennomsnitt av verdiene for radikal slukningsaktivitet benyttet, mens for Folin og FRAP ble gjennomsnitt av verdiene for konsentrasjon vist ved µg/ml i ekstraktene brukt.

### 3.2.1 Sammenheng mellom DPPH og ABTS

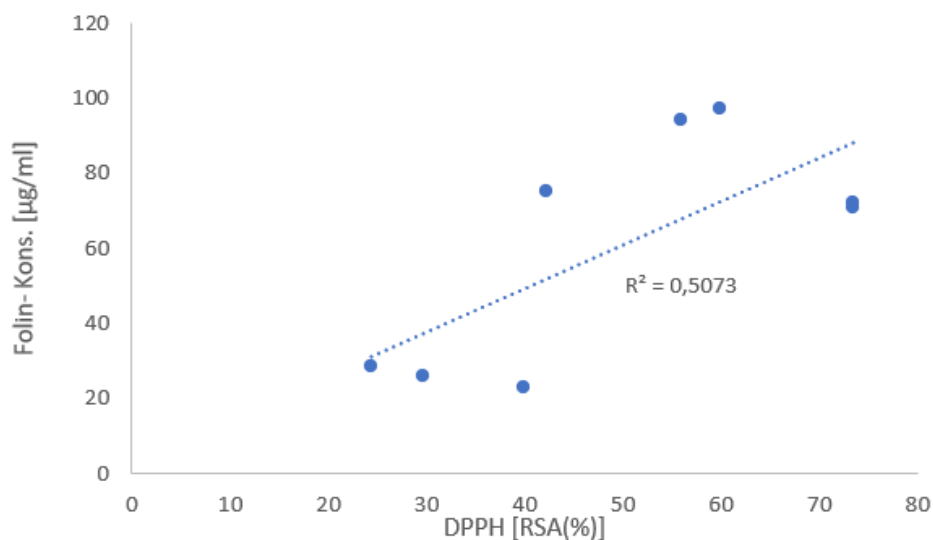
Under viser figur 3.9 en signifikant positiv korrelasjon mellom DPPH RSA (%) og ABTS RSA (%). Korrelasjonskoeffisienten ble bestemt til å være  $r = 0,83$  (n=8) som gir en signifikant positiv korrelasjon som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ).



**Figur 3.9:** Korrelasjonsgrafen mellom analysene DPPH og ABTS der verdiene for radikal slukningsaktivitet (%) er benyttet ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,02$ ).

### 3.2.2 Sammenheng mellom DPPH og Folin-Ciocalteu

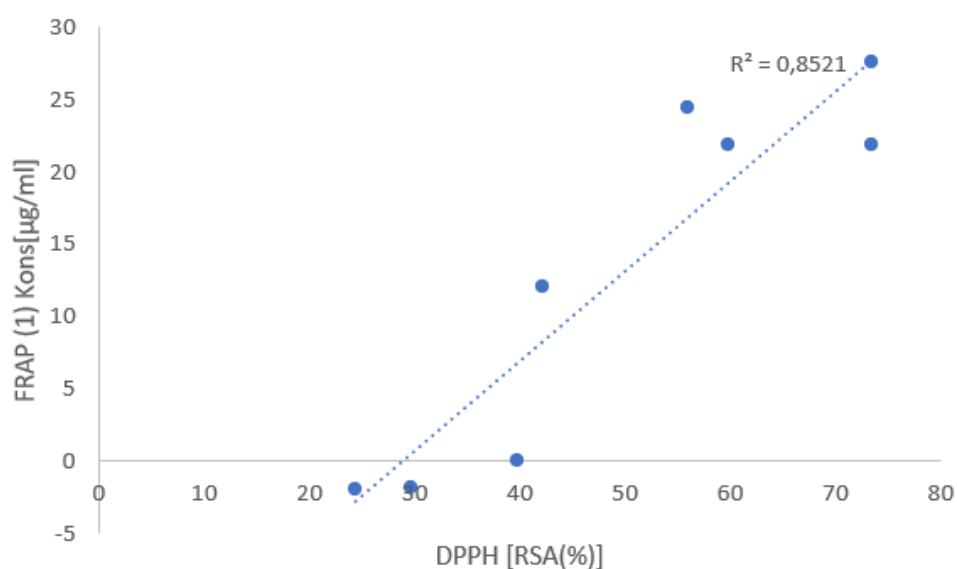
Under viser figur 3.10 en signifikant positiv korrelasjon mellom analysene DPPH RSA (%) og Folin-Ciocalteu der verdiene for konsentrasjon av antioksidanter vist ved  $\mu\text{g/ml}$  i ekstraktet er benyttet. Korrelasjonskoeffisienten ble bestemt til å være  $r = 0,71$  ( $n = 8$ ) som gir en svak positiv korrelasjon som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ).



**Figur 3.10:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,05$ ) mellom analysene DPPH radikal slukningsaktivitet (%) og Folin-Ciocalteu (konsentrasjon av fenoler [ $\mu\text{g/ml}$ ] i ekstraktet).

### 3.2.3 Sammenheng mellom DPPH og FRAP

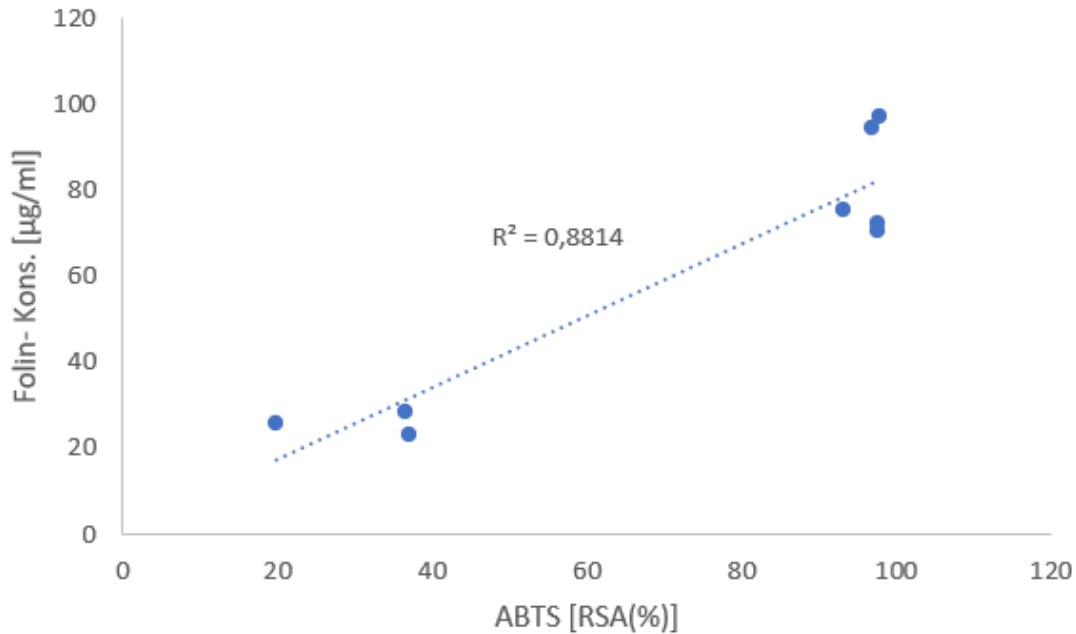
Figur 3.11 viser en signifikant positiv korrelasjon mellom analysene DPPH RSA (%) og FRAP, der verdiene for konsentrasjon av redusert jern [ $\mu\text{g/ml}$ ] i prøven i omgang 1 er benyttet. Korrelasjonskoeffisienten ble bestemt til å være  $r = 0,92$  ( $n=8$ ) som gir en sterk positiv korrelasjon som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ).



**Figur 3.11:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,002$ ) mellom analysene DPPH radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 1 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.2.4 Sammenheng mellom ABTS og Folin-Ciocalteu

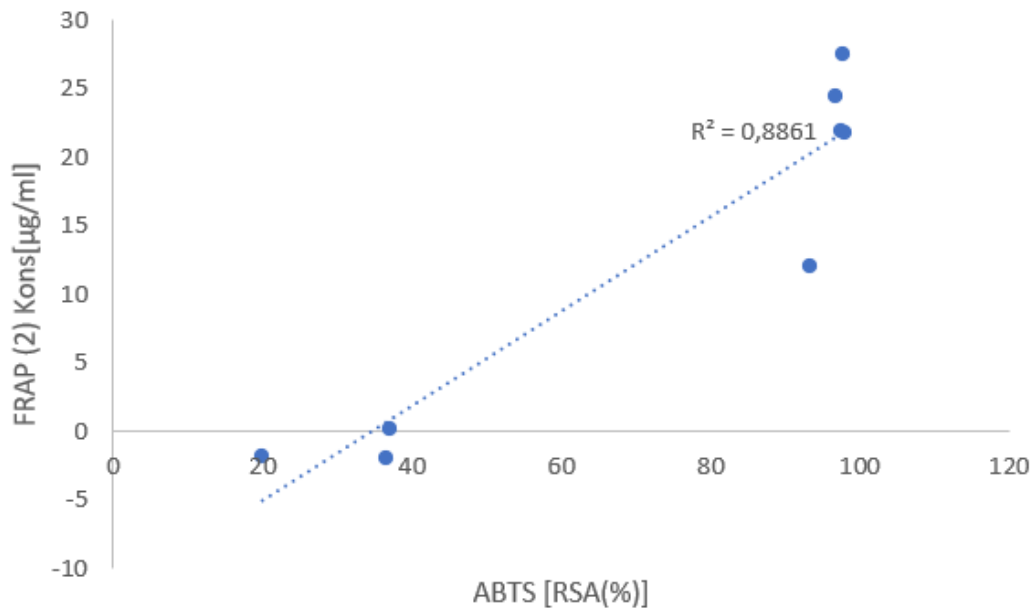
Under viser figur 3.12 en signifikant positiv korrelasjon mellom analysene ABTS RSA (%) og Folin-Ciocalteu der verdiene for konsentrasjon av fenoler [ $\mu\text{g/ml}$ ] i ekstraktet er benyttet. Korrelasjonskoeffisienten ble bestemt til å være  $r = 0,94$  ( $n=8$ ) som gir en sterk positiv korrelasjon, som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ).



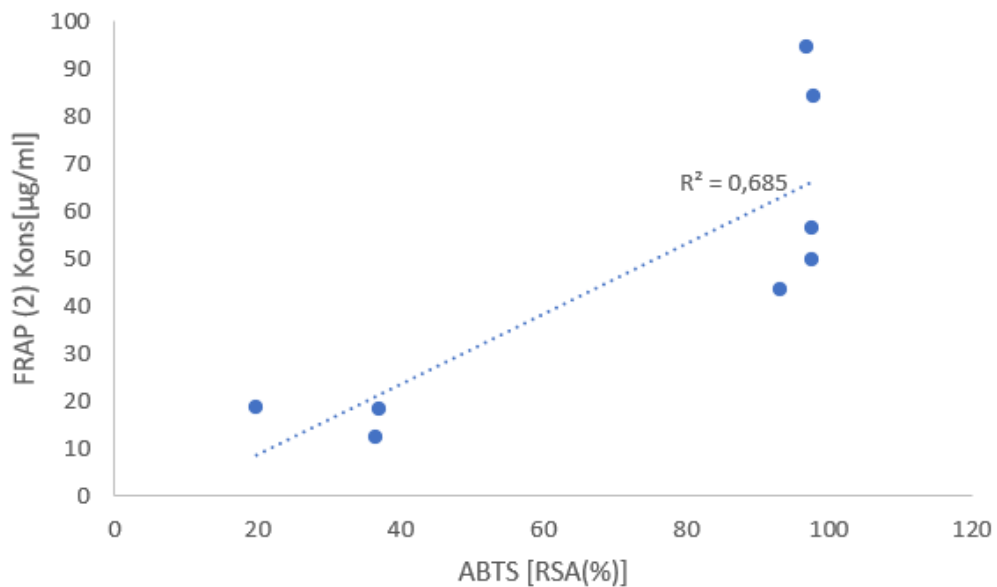
**Figur 3.12:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,001$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og Folin-Ciocalteu (konsentrasjon av fenoler vist ved  $\mu\text{g/ml}$  i ekstraktet).

### 3.2.5 Sammenheng mellom ABTS og FRAP

Under viser figur 3.13 og figur 3.14 en signifikant positiv korrelasjon mellom analysene ABTS RSA (%) og FRAP, der verdiene for konsentrasjon av redusert jern i prøven [ $\mu\text{g/ml}$ ] er benyttet. For ABTS og FRAP omgang 1 (figur 3.13) ble korrelasjonskoeffisienten bestemt til å være  $r = 0,94$  ( $n=8$ ) som gir en sterk positiv korrelasjon som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ). For ABTS og FRAP omgang 2 (figur 3.14) ble korrelasjonskoeffisienten bestemt til å være  $r = 0,83$  ( $n=8$ ) som gir en svak positiv korrelasjon som ligger innenfor 95% konfidensintervallet ( $p < 0,05$ ).



**Figur 3.13:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,001$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 1 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figur 3.14:** Korrelasjonsgrafen som viser samvariasjon ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,02$ ) mellom analysene ABTS radikal slukningsaktivitet (%) og FRAP omgang 2 (konsentrasjon av redusert jern i prøven vist ved  $\mu\text{g/ml}$ ).

Korrelasjonsberegningene for DPPH og FRAP omgang 2 gir en korrelasjonskoeffisienten på  $r = 0,67$  og en p- verdi på  $0,066$ . Korrelasjonene mellom analysene er ikke signifikant og korrelasjonsgrafen for DPPH og FRAP omgang 2 er derfor ikke presentert i resultatene.

## 4. Vurdering

Hovedmålet med denne oppgaven var å finne ut hvilken effekt blansjering har på tare når det gjelder antioksidantaktivitet og innhold av polyfenoler, med utgangspunkt i brunalgen *Saccharina latissima*. Et delmål har derfor vært å sammenligne fire forskjellige metoder som måler antioksidantaktivitet ved hjelp av ulike mekanismer, samt undersøke om metodene korrelerer.

### 4.1 Totalt fenolinnhold, Folin-Ciocalteu

I Folin-Ciocalteu analysen ble det funnet et høyt fenolinnhold i samtlige prøver som enten var frysetørket eller lufttørket, sammenlignet med den blansjerte rå prøven. Et interessant funn var at prøven som både var frysetørket og blansjert viste et høyere innhold av fenoler enn den frysetørkede rå prøven. Forskjellen mellom prøvene kan tyde på at blansjeringen har hatt en positiv effekt på innholdet av fenoler. Samme trend var å se for antioksidantaktiviteten spesielt i ABTS- og FRAP analysen. Ut fra disse resultatene kan det se ut som at det er vanskeligere å ekstrahere ut fenoliske forbindelser fra tare som ikke har vært gjennom en tørkeprosess.

Nielsen (2018) undersøkte i sin masteroppgave det totale fenolinnholdet for fersk, fryst og blansjert *S. latissima*. Betingelser for blansjeringen var 30, 45 og 80°C i 0, 30 og 120 sekunder, og ingen av prøvene ble tørket. Det høyeste innholdet av fenoler ble funnet i det ferske råstoffet ( $0,75 \pm 0,30$  mg PGE/g tørrvekt), noe som indikerer at prosesseringen reduserer det totale fenolinnholdet. Det ble ikke funnet noen klar sammenheng mellom prosesseringstid- og temperatur, men når det gjaldt tiden ble det funnet signifikante forskjeller mellom de tre ulike temperaturene. I nevnte studie ble det funnet et gjennomsnittlig totalt fenolinnhold på  $0,40 \pm 0,03$  mg PGE/g tørrvekt, i de blansjerte rå prøvene ved 120 sekunder (Nielsen 2018 s. 31, 32, 52). Til sammenligning ble det funnet et



totalt fenolinnhold på  $129,3 \pm 7,2$   $\mu\text{g PGE/g}$  våtvekt ( $0,13 \pm 0,007$  mg PGE/g våtvekt) i eget forsøk for prøven blansjert rå, som er omtrent en tredjedel lavere. I studien til Nielsen (2018) ble det benyttet en blanding av 60% etanol og destillert vann som ekstraksjonsmiddel, mens det i eget forsøk kun ble benyttet vann. Valg av ekstraksjonsmiddel er vist å ha en effekt på mengde fenoler som trekkes ut av ekstraktet, og resultatet kan dermed ha blitt påvirket av dette. Polyfenoler er generelt mer løselig i organiske løsemidler som etanol og aceton, som er mindre polare løsemidler enn vann (Wang m. fl. 2009). I tillegg vil den kjemiske sammensetningen i makroalger variere etter tidspunkt for høsting, og kan dermed påvirke innholdet av fenoler (Schiener m. fl. 2015).

En studie utført av Susanto m. fl. (2017) så på effekter av forskjellig varmebehandling på brunalgen *S. ilicifolium*. Det totale fenolinnholdet ble undersøkt for både fersk, blansjert, kokt, dampet og sterilisert *S. ilicifolium*. Høyest innhold av fenoler ble observert i de ferske prøvene, en observasjon som stemmer overens med funnet til Nielsen (2018).

Sammenlignet med de ferske prøvene som viste et totalt fenolinnhold på  $47,60 \pm 15,05$   $\mu\text{g GAE/mg}$  ekstrakt, viste de blansjerte prøvene et totalt fenolinnhold på  $42,90 \pm 2,63$   $\mu\text{g GAE/mg}$  ekstrakt. Blant de varmebehandlede prøvene var det likevel de blansjerte prøvene som viste det høyeste innholdet av fenoler, da det totale fenolinnholdet ble redusert ved økende temperaturer. De blansjerte prøvene ble imidlertid varmebehandlet ved  $40^\circ\text{C}$  i 15 minutter og tørket.

Det ble også påvist en del fenoler i blansjeringsvannet. Ut fra resultatene kan det se ut som det trekkes ut en større andel fenoler i vannet ved første blansjering, enn ved gjentatt blansjering. I dryppvannet ble det påvist et litt større innhold av fenoler enn i blansjeringsvannet, som forteller at verdifulle fenolforbindelser også forsvinner under tining. Det er ikke funnet noen studier som ser på innholdet av fenoler i blansjeringsvann eller dryppvann.

## 4.2 DPPH og ABTS radikal slukningsaktivitet

Den radikale slukningsaktiviteten ble målt ved hjelp av DPPH analyse (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) og ABTS analyse (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Både DPPH og ABTS analysene baserer seg på reduksjon av DPPH radikal eller ABTS radikal.

Resultatene fra analysene viste at *Saccharina latissima* som både var blansjert og tørket ga høyest radikal slukningsaktivitet av alle prøvene i DPPH analysen, og var blant prøvene med høyest slukningsaktivitet i ABTS analysen. Ved sammenligning av den radikale slukningsaktiviteten i prøvene frysetørket blansjert og lufttørket blansjert var forskjellene små. Resultatene fra de nevnte prøvene kan antyde at valg av tørkemetode er av mindre betydning for prøvene som ble analysert i dette forsøket. Samme observasjon var også å se i Folin-Ciocalteu og FRAP analysen. Det kan tenkes at kombinasjonen av blansjering og tørking er gunstig med tanke på mengde fenolforbindelser som ekstraheres ut av taren. Blansjeringen kan ha bidratt til denaturering av eksempelvis enzymer som polyfenol oksidase, som ellers ville kunne oksidert fenolkomponenter (Ho and Redan 2020). En tørkeprosess vil oppkonsentrere makroalgens tørrstoff og det kan da tenkes at andelen fenolkomponenter blir lettere tilgjengelig ved ekstraksjon. En studie utført av Amorim m. fl. (2020) som så på effekten av de ulike tørkemetodene frysetørking, lufttørking (40°C) og silica-tørking på antioksidantaktivitet i makroalger, fant lignende resultater. Resultater fra studien for analysene DPPH og ABTS viste ingen signifikant forskjell mellom de ulike tørkemetodene. Studien konkluderte likevel med at frysetørking er den mest skånsomme metoden, da metoden resulterte i en mindre endring i antioksidantpotensial og pigmentinnhold sammenlignet med de andre tørkemetodene. Dette kan forklares med at frysetørking ikke krever varme og vil bli gjennomført under vakuum der oksygentilgangen er redusert (Amorim m. fl. 2019).

Ved en generell sammenligning av analysene kan det indikeres en trend som tilsier at ekstraktene har høyere radikal slukningsaktivitet i ABTS analysen, enn i DPPH analysen. Funnet tyder på at ekstraktene har økt evne til å inhibere en større andel av ABTS radikalene sammenlignet med DPPH radikalene. Spesielt viste resultatene en svært tydelig økning i radikal slukningsaktivitet for prøven frysetørket rå, som ved ABTS analysen hadde nesten like høy aktivitet som prøvene frysetørket blansjert og lufttørket blansjert. I tillegg til en liten økning i blansjeringsvann benyttet kun én gang, har prøven blansjert rå en betraktelig høyere radikal slukningsaktivitet i DPPH analysen enn i ABTS analysen, og skiller seg derfor ut fra de andre ekstraktene. Prøven blansjert rå er også det ekstraktet som har gitt den laveste slukningsaktiviteten i DPPH analysen, og den nest laveste aktiviteten i ABTS analysen med unntak av prøven dryppvann. Den lave radikale slukningsaktiviteten i prøven blansjert

rå kan ha sammenheng med skader som kan ha vært påført råstoffet ved gjentatt mekanisk bearbeiding, i form av kutting og deling av taren ved prosessering eller tillaging av ekstrakt. Når råstoffet deles i mindre biter vil en større andel av taren være eksponert for oksidasjon, som kan resultere i et lavere innhold av antioksidanter i ekstraktet som kan inhibere radikaler (Zhang m. fl. 2009).

Samtlige prøver av blansjeringsvann har gitt utsalg i analysene og inneholder derfor komponenter som bidrar til radikal slukning. Funnet tyder på at en blansjeringsprosess vil gi tap av komponenter med antioksidantegenskaper. Samme observasjon var også se i studien Nielsen m. fl. (2020) som påviste lavere radikal slukningsaktivitet i blansjert rå, sammenlignet med fersk *S. latissima* i DPPH analysen. Dryppvann fra prøven blansjert rå inneholder også komponenter med antioksidantegenskaper som bidrar til radikal slukning. Resultatene for dryppvann tyder på at tineprosessen vil bidra til tap av komponenter med antioksidantegenskaper, som også var å se i Folin-Ciocalteu analysen.

### 4.3 Reduserende potensial - FRAP

Reduksjonskraften indikerer antioksidantaktiviteten til ekstraktet og uttrykker evnen antioksidanter har til å donere elektroner, og dermed redusere de oksiderte mellomproduktene i lipid-oksidasjonsprosessen, ved å opptre som primære eller sekundære antioksidanter (Rajauria m. fl. 2010; Ungureanu m. fl. 2020). FRAP-analysen ble som nevnt tidligere utført i to omganger, hvor omgang 2 var modifisert. I omgang 1 viste prøven blansjert rå og dryppvann ingen reduksjonsevne, men i omgang 2 viste begge prøvene utslag. Forholdet mellom prøvene er ellers relativt likt for begge omgangene, og resultatene er derfor vurdert samlet, med unntak av blansjeringsvannet. Ideelt sett ville det vært hensiktsmessig å lage ekstrakter med en lavere fortynningsgrad for prøvene som ikke ga utslag i omgang 1.

Resultatene for FRAP analysen viste i hovedsak de samme tendensene som resultatene i Folin, med noen variasjoner. Spesielt var forskjellene i antioksidantaktivitet mellom prøven frysetørket rå og frysetørket blansjert større i FRAP, som viste et omtrent dobbelt så stort reduksjonspotensial for frysetørket blansjert tare. Funnet kan tyde på at blansjeringen har

hatt en positiv effekt på reduksjonsevnen. Observasjonen stemmer overens med funn i studien til Rajauria m. fl. (2010), som fant at FRAP-verdien i brunalger utsatt for varmebehandling (autoklaving med destillert vann) fortsatte å øke signifikant ( $p < 0,05$ ) opp til  $110^{\circ}\text{C}$  før verdien sank, sammenlignet med rå, ikke varmebehandlede brunalger. Observasjonen indikerer at ved å varmebehandle brunalger i vann opp til en temperatur på  $110^{\circ}\text{C}$ , vil antioksidantaktiviteten kunne øke og reduksjonsevnen forbedres.

Nayyar (2016) så i sin masteroppgave blant annet på effekt av blansjering på *S. latissima*, og fant at frysetørket rå tare viste omtrent dobbelt så stor reduksjonsevne som frysetørket blansjert og blansjert rå tare. Signifikante ( $p < 0,05$ ) effekter av blansjering ble funnet i FRAP, med reduserte verdier i de blansjerte prøvene sammenlignet med de ferske, noe som indikerer tap av forbindelser med reduksjonskraft ved blansjering. Til sammenligning ble det i eget forsøk funnet et mye større reduksjonspotensiale i prøven frysetørket rå enn i prøven blansjert rå, og funnet samsvarer derfor med ovennevnte studie. Derimot viste prøven frysetørket blansjert omtrent dobbelt så stor reduksjonskraft som frysetørket rå tare, noe som står i kontrast til funn i studien til Nayyar (2016). Blansjeringsbetingelser for studien utført av Nayyar (2016) var  $80^{\circ}\text{C}$  i 1 minutt, samt at taren ble ekstrahert i 60% metanol. Til sammenligning var blansjeringsbetingelser i egen studie  $80^{\circ}\text{C}$  i 2 minutter, og det ble benyttet vann som ekstraksjonsmiddel. Det er også viktig å nevne at FRAP-verdien i studien til Nayyar (2016) var gitt ved  $\mu\text{mol FSE/g}$  tare, og studien er derfor ikke direkte sammenlignbar med eget forsøk (Nayyar 2016 s. 118, 121, 137-139, 143-144).

Fra omgang 1 viste blansjeringsvann benyttet kun én gang en neglisjerbar reduksjonskapasitet sammenlignet med blansjeringsvann benyttet ti ganger. Funnet fra denne omgangen kan tyde på at gjentatt blansjering kan føre til at antioksidanter i taren slipper lettere ut i blansjeringsvannet. I omgang 2 (modifisert) var det ikke like stor forskjell i reduksjonsevne mellom blansjeringsvann benyttet kun én gang, sammenlignet med blansjeringsvann benyttet ti ganger, noe som kan indikere at antioksidanter slipper lettere ut i vannet ved første gangs blansjering. Funn fra omgang 2 viser dermed det motsatte av funn fra omgang 1. Det ble ikke funnet studier som har gjort forsøk på blansjeringsvann for FRAP.

#### 4.4 Korrelasjon mellom totalt fenolinnhold og antioksidantaktivitet

Korrelasjon mellom analysene Folin-Ciocalteu og FRAP (omgang 1) ga en beregnet korrelasjonskoeffisient på 0,81 og en p-verdi på 0,003. Resultatene fra korrelasjonen gir derfor en signifikant korrelasjon mellom fenolinnhold og reduserende evne i ekstraktene. I studier utført av Dang m. fl. (2017) og Vasanthi m. fl. (2020) viste resultatene fra korrelasjon mellom TPC (totalt fenolinnhold) og FRAP (reduksjonskapasitet i ekstraktet) en sterk samvariasjon mellom analysene. Resultatene indikerer at fenoler i stor grad bidrar til den reduserende evnen i ekstraktet.

Korrelasjonskoeffisienten  $r$  mellom analysene DPPH og Folin-Ciocalteu ble beregnet til 0,71 og en p-verdi på 0,047. Korrelasjonen er derfor signifikant mellom DPPH radikal slukningsaktivitet og totalt fenolinnhold. For analysene DPPH og FRAP ble korrelasjonskoeffisienten  $r$  beregnet til å være 0,92 og p-verdien for korrelasjonen ble beregnet til 0,001. Korrelasjonen mellom DPPH og FRAP viser en signifikant samvariasjon mellom radikal slukningsaktivitet og reduserende evne i ekstraktene.

Undersøkelse av korrelasjon mellom ABTS og Folin-Ciocalteu ga en korrelasjonskoeffisient  $r=0,94$  som antyder en sterk samvariasjon mellom analysene. P-verdi for korrelasjon mellom ABTS og Folin-Ciocalteu ble beregnet til 0,0005 og viser en signifikant korrelasjon mellom radikal slukningsaktivitet og totalt fenolinnhold. For analysene ABTS og FRAP ble beregnet korrelasjonskoeffisient  $r=0,94$  (omgang 1) og  $r=0,83$  (omgang 2), p-verdi ble henholdsvis beregnet til 0,0005 og 0,01. Korrelasjonskoeffisientene og tilhørende p-verdier for analysene ABTS og FRAP viser en signifikant samvariasjon mellom radikal slukningsaktivitet og reduserende evne i ekstraktet. Analysene ABTS og DPPH viste også en sterk korrelasjon med en beregnet korrelasjonskoeffisient på 0,83 og p-verdi 0,02. Resultatet viser en signifikant samvariasjon for radikal slukning mellom analysene.

Korrelasjonene viser generelt høye korrelasjonskoeffisienter og lave p-verdier, som betyr at det er en signifikant sammenheng mellom ekstraktens innhold av fenoler (Folin-Ciocalteu) og påvist antioksidantaktivitet i analysene DPPH, ABTS og FRAP.

## 4.5 Effekt av blansjering

For samtlige analyser i denne oppgaven ble det påvist liten antioksidantaktivitet i prøven blansjert rå sammenlignet med de andre prøvene, som er et forventet funn. Det ble også påvist antioksidantaktivitet i blansjeringsvannet, som styrker forventningen om at en blansjeringsprosess vil føre til tap av fenoliske komponenter og antioksidanter. Ved å sammenligne prøvene som enten var tørket eller blansjert, med prøvene som både var blansjert og tørket, viste resultatene fra samtlige analyser et større utslag for sistnevnte prøver. Resultatet kan tyde på at en kombinasjon av blansjering og tørking vil føre til økt aktivitet, ved at antioksidantforbindelser lettere lar seg ekstrahere ut av råstoffet etter en blansjerings- og tørkeprosess. For å undersøke dette nærmere ville det vært svært interessant å gjennomføre samme analyser på rå tare som ikke er utsatt for hverken blansjering- eller tørkeprosessering, og i tillegg sammenligne ulike ekstraksjonsmetoder og ekstraksjonsvæsker. Ettersom det ved gjennomføring av denne studien ikke var tilgang på rå eller fersk uprosessert tare, som ville gitt et bedre sammenligningsgrunnlag for de ulike prøvene, har det blitt lagt mer vekt på å se på funn fra andre liknede studier. Blant studier som ser på hvordan makroalger og deres viktige bioaktive forbindelser blir påvirket av varmebehandling, konkluderer flere av studiene med at varmebehandling kan ha en gunstig effekt på makroalgers fenoliske komponenter, men det er samtidig en del studier som antyder at varmebehandling kan ha negativ effekt (Ho and Redan 2020).

En studie utført av Nielsen m. fl. (2020) så på effekt av blansjering knyttet til reduksjon av jodinnhold i *S. latissima*. Resultatene fra studien viste en positiv effekt på reduksjonen av jod i taren, spesielt ved blansjeringsbetingelsene 80°C i 120 sekunder. I studien ble det også undersøkt hvilken effekt blansjering har på antioksidantaktiviteten og innholdet av fenoler i taren. Resultatene viste at det totale fenolinnholdet ble signifikant høyere i prøvene som var blansjert, sammenlignet med fersk tare. Studien konkluderte med at blansjering av *S. latissima* ikke vil degradere verdifulle komponenter som antioksidantforbindelser, men tvert imot forbedre biomassens innhold av helsegunstige komponenter. Ved sammenligning av resultater for totalt fenolinnhold i nevnte studie og egen studie kan man se en lignende trend i Folin-Ciocalteu analysen for prøvene frysetørket rå og frysetørket blansjert. Samme trend ble også funnet hos Rajauria m. fl. (2010) som påviste et signifikant høyere innhold av fenoler i varmebehandlet (autoklavert) irsk brun makroalge sammenlignet med rå alge. Det

totale fenolinnholdet fortsatte å stige ved økende temperaturer opp til 95°C, men prøver som ble utsatt for temperaturer over 95°C fikk redusert utslag på fenoler i analysen. Forklaringen på hvorfor prosessering kan føre til økt innhold av fenoler er foreløpig ikke god nok, men en mulighet kan være at prosessering bidrar til økt effekt ved ekstraksjon av komponentene (Ho and Redan 2020). I artikkelen av Ho og Redan (2020) blir resultater fra flere studier sammenlignet for å se på hvilken betydning varmeprosessering har for viktige næringsstoffer, fytokjemikalier og metallforurensinger makroalger. Resultatene fra ulike studier viste at det totale fenolinnholdet i ferske alger varierte stort (fra <1 mg- 230mg/100g GAE), og det kan derfor tenkes at råstoffets utgangspunkt vil ha betydning når det gjelder det totale fenolinnholdet.

En studie utført av Amorim m. fl. (2012) sammenlignet fenolinnhold og antioksidantaktivitet i ferske og kokte, tørkede makroalger av typene Wakame (*Undaria pinnatifida*) og Kombu (*Laminaria sp.*). Resultatene fra studien viste at koking ga et signifikant tap av polyfenoler i Wakame, mens en liten økning av fenoler ble observert i Kombu. Forskjellene i det totale fenolinnholdet kan forklares med at makroalgene hadde ulik kjemisk struktur, samt at det var forskjeller i polyfenolenes varmetoleranse. En annen forklaring kan være at cellestrukturen kan ha blitt svekket under koking, som kan ha gitt større ekstraksjonseffekt av fenoliske komponenter. Spektrofotometriske metoder kan gi et estimat på innholdet av fenoler og makroalgers antioksidantkapasitet, men resultater fra slike analyser bør tolkes med forsiktighet, da metodene ikke tar hensyn til andre komponenter i ekstraktet som kan bidra til å forstyrre målingene (Ho and Redan 2020).

Nayyar (2016) så i sin masteroppgave på hvilken effekt blansjering og fryselagring har på flere ulike taretyper, deriblant *S. latissima*. Resultatene fra studien viste at det totale fenolinnholdet og tarens reduksjonskapasitet ble negativt påvirket av blansjering, mens den radikale slukningsaktiviteten (DPPH) ble forbedret ved blansjering (Nayyar 2016 s. 129-139). Konklusjonen fra studien var at blansjering ved 80°C i 1 minutt vil ha en negativ effekt på det totale fenolinnholdet og antioksidantaktivitet i *S. latissima* (Nayyar 2016 s. 143). Lignende resultater fikk også Cox m. fl. (2012) som sammenlignet rå og kokt *Himanthalia elongata*. Taren ble kokt ved 80°C og 100°C i 35 og 40 minutter som ble funnet å være den ideelle tiden for å oppnå sensorisk akseptabel tekstur. Ved sammenligning av totalt fenolinnhold mellom prøvene rå og kokt *H. elongata*, hadde kokingen resultert i et tap av fenoler på

henholdsvis 82,31% og 85,5%. Studien utført av Susanto m. fl. (2017) viste at ved sammenligning av flere metoder for varmebehandling, var blansjert brunalge (40°C i 15 minutter) den prøven med minst redusert fenolinnhold sammenlignet med fersk alge. For DPPH analysen var det prøvene som ble utsatt for koking og sterilisering som viste den høyeste radikale slukningsaktiviteten, mens prøver som var blansjert og dampet hadde redusert aktivitet sammenlignet med fersk makroalge.

Det er behov for flere studier på hvilken effekt blansjering har på fenoler og antioksidantaktivitet i makroalger, da det foreløpig finnes få studier som ser på akkurat denne formen for varmebehandling. Samtidig er det behov for å utvikle og finne frem til gode metoder for å påvise polyfenoler og antioksidanter i råstoffer av tare. Dette vil være et viktig arbeid for å finne optimale prosessbetingelser for blansjering, slik at unødvendig tap av verdifulle forbindelser reduseres til et minimum (Ho og Redan 2020). Det må påpekes at det har vært utfordrende å sammenligne egne resultater med andres arbeid, da det er mange faktorer som vil være av betydning, eksempelvis behandling av råstoff ved tillaging av ekstrakt samt råstoffets utgangspunkt.

#### **4.6 Forlag til videre arbeid**

Ettersom samtlige ekstrakter av blansjeringsvann fikk påvist antioksidantaktivitet og innhold av polyfenoler, ville det vært interessant å undersøke om blansjeringsvannet kan ha en potensiell nytteverdi for næringsmiddelindustrien og forbrukere. I den forbindelse kunne videre arbeid eksempelvis ha vært å se på muligheten for oppkonsentrering av verdifulle antioksidantforbindelser fra blansjeringsvannet. Dersom blansjeringsvannet kan benyttes flere ganger vil det være både ressurs- og energibesparende i forbindelse med prosesseringen av taren.



## 5. Konklusjon

For samtlige ekstrakter av *Saccharina latissima* benyttet i denne oppgaven ble det påvist innhold av polyfenoler og antioksidantaktivitet. Viktige funn fra analysene var at prøven blansjert rå viste svært lav antioksidantaktivitet sammenlignet med de tørkede prøvene. Ettersom den blansjerte rå prøven viste et lavere innhold av fenoler og antioksidantaktivitet enn prøven frysetørket rå, kan funnet tyde på blansjeringen i dette tilfellet ikke har bidratt til økt antioksidantaktivitet sammenlignet med tørkeprosessen. Ved sammenligning av prøvene frysetørket blansjert og frysetørket rå har blansjeringen vist en positiv effekt på totalt fenolinnhold og antioksidantaktivitet i samtlige analyser. Som forventet ble det også påvist aktivitet i blansjeringsvannet. Funnet viser at en blansjeringsprosess vil føre til tap av fenoler og redusere antioksidantaktiviteten i taren ved at komponentene trekkes ut i blansjeringsvannet. I dryppvannet ble det også påvist antioksidantaktivitet, et funn som viser at en tineprosess vil gi tap av verdifulle fenoliske forbindelser, og vil føre til redusert antioksidantaktivitet i taren. Resultatene fra de fire ulike analysene samsvarte i stor grad og trenden var derfor lik på tvers av metodene. Ved undersøkelse av korrelasjon mellom analysemetodene ble det observert signifikant samvariasjon mellom analysen Folin-Ciocalteu og DPPH, ABTS og FRAP. Resultatet indikerer at polyfenoler bidrar til antioksidantaktiviteten. Generelt så viser funn fra både eget forsøk og litteratur at blansjering kan ha både positiv og negativ effekt på innholdet av polyfenoler og antioksidantaktiviteten i tare. På bakgrunn av denne observasjonen er det behov for videre studier for å se nærmere på hvilken effekt blansjering har på de verdifulle antioksidantforbindelsene.

## 6. Referanseliste

Agbor GA, Vinson JA og Donnelly PE (2014) *Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay* International Journal of Food Science Nutrition and Dietetics (IJFS) ISSN 2326-3350 3(8) 147-156.

Akar Z, Küçük M og Doğan H (2017) *A new colorimetric DPPH•scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs* Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry 2017-01-01, Vol.32 (1), s.640-647

Amorim K., Lage- Yusty M. A. and Lopez- Hernandez J. (2012) *Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing.* Journal of Food, 2012-11-01, Vol. 10 (4), s. 321-324. doi: 10.1080/19476337.2012.658871

Amorim AM, Nardelli AE og Chow FO (2020) *Effects of drying processes on antioxidant properties and chemical constituents of four tropical macroalgae suitable as functional bioproducts* Journal of Applied Phycology 2020-04, Vol.32 (2), s.1495-1509

Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M og Güçlü K (2013) *Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)\** Pure and applied chemistry, 2013-02-26, Vol.85 (5), s.957-998

Artsdatabanken (2006) *Sukkertare Saccharina latissima* Artsdatabankens faktaark ISSN1504-9140 nr. 5 utgitt 2006

Becker L (2007) *Final Report on the Amended Safety Assessment of Propyl Gallate* International journal of toxicology, 2007, Vol.26 (Supplement 3), s.89-118

Benzie, I. F. F. og Strain, J. J. (1996) *Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay.* Analytical Biochemistry, 239, 70-76.

Besednova NN, Andryukov BG, Zaporozhets TS, Kryzhanovsky SP, Kuznetsova TA, Fedyanina LN, Makarenkova ID og Zvyagintseva TN (2020) *Algae Polyphenolic Compounds and Modern Antibacterial Strategies: Current Achievements and Immediate Prospects* Biomedicines, 2020-09-11, Vol.8 (9), s.342

Bruhn A, Brynning G, Johansen A, Lindegaard MS, Sveigaard HH, Aarup B, Fonager L, Andersen LL, Rasmussen MB, Larsen MM, Elsser-Gravesen D og Børsting ME (2019) *Fermentation of sugar kelp (Saccharina latissima)—effects on sensory properties, and content of minerals and metals* *Journal of applied phycology* 2019-10, Vol.31 (5), s.3175-3187

Chen X, Lianga L og Han C (2020) *Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay* *Food science & technology*, 2020-09, Vol.131, s.109769

Cotas J, Leandro A, Monteiro P, Pacheco D, Figueirinha A, Gonçalves AMM, Jorge da Silva G og Pereira L (2020) *Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications* *Marine drugs* 2020-07-24, Vol.18 (8), s.384

Cox S., Abu- Ghannam N. and Gupta S. (2012) *Effect of processing conditions on phytochemical constituents of edible Irish seaweed Himanthalia elongata*. *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 36 (4), s. 348- 363. doi: 10.1111/j.1745-4549.2011.00563.x.

Dang TT, Vuong QV, Schreider MJ, Bowyer MC, Van IA og Scarlett CJ (2017) *The Effects of Drying on Physico- Chemical Properties and Antioxidant Capacity of the Brown Alga (Hormosira banksii (Turner) Decaisne)*. *Journal of food processing and preservation*, 2017-08, Vol. 41 (4), p. n/a ISSN: 0145-8892

FAO Fisheries and Aquaculture Department (2012) *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. ISBN: 978-92-5-107225-7

FAO Food and Aquaculture Organization of the United Nations (2018) *The global status of seaweed production, trade and utilization*. Globefish Research programme volume 124, Rome. ISBN: 978-92-5-130870-7

FAO Food and Aquaculture Organization of the United Nations (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Sustainability in action. Rome. ISSN: 2410-5902

Fellows PJ (2016) *Food Processing Technology: Principles and Practice* Cambridge: Elsevier Science & Technology ISBN: 978-008-101-907-8

- Fiskeridirektoratet (2020) *Tarehøsting* [Fiskeridir.no] [Lastet ned 17.05.21]
- Getachew AT, Jacobsen C og Holdt SL (2020) *Emerging Technologies for the Extraction of Marine Phenolics: Opportunities and Challenges* *Marine drugs*, 2020-07-27 Vol.18 (8) s.389
- Gulcin I (2012) *Antioxidant activity of food constituents: an overview* *Archives of toxicology*, 2012-03, Vol.86 (3), s.345-391
- Gulcin I (2020) *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview* *Archives of toxicology*, 2020-03, Vol.94 (3), s.651-715
- Ho KHY og Redan BW (2020) *Impact of thermal processing on the nutrients, phytochemicals, and metal contaminants in edible algae* *Critical reviews in food science and nutrition* 2020-09-23, s. 1-19
- Holdt SL og Kraan S (2011) *Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation*. *Journal of applied phycology* 23, 543–597.
- Huang D, Ou B og Prior RL (2005) *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays* *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005-03-23, Vol.53 (6), s.1841-1856
- Hudz N, Yezerska O, Shanaida M, Sedláčková VH og Wieczorek PP (2019) *Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of Salvia sclarea extracts* *Pharmacia*, 2019-12-31, Vol.66 (4), s.209-215
- Ignat I, Volf I og Popa VI (2010) *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables* *Food chemistry*, 2011-06-15, Vol.126 (4), s.1821-1835
- Indergaard M (2010) *Tang og tare-i hovedsak norske brunalger: Forekomster, forskning og anvendelse* [[https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/228180/397862\\_FULLTEXT02.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/228180/397862_FULLTEXT02.pdf?sequence=1&isAllowed=y)] [Lastet ned 11.04.21]
- Kraan S (2013) *Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production* *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 2013-01, Vol.18 (1), s.27-46

Laguerre M, Lecomte J, og Villeneuve P (2007) *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges* Progress in lipid research, 2007, Vol.46 (5), s.244-282

Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, 1, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J og Jurikova T (2015) *Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products* Molecules 2015, 20, s.1118-1133

Mahdi-Pour B, Jothy SL, Yoga Latha L, Chen Y og Sasidharan S (2012) *Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of Lantana camara* Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2012, Vol.2 (12), s.960-965

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C og Jiménez L (2004) *Polyphenols: Food sources and bioavailability* The American journal of clinical nutrition, 2004-05, Vol.79 (5), s.727-747

Medina ME, Iuga C, Alvarez-Idaboy og Juan R (2013) *Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: A theoretical study* Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2013-08-21, Vol.15 (31), s.13137-13146

Mitterer-Daltoé M, Bordim J, Lise C, Breda L, Casagrande M og Lima V (2020) *Consumer awareness of food antioxidants. Synthetic vs. Natural* Ciência e tecnologia de alimentos, 2020-07-17

Munteanu, IG og Apetrei C (2021) *Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review* International journal of molecular sciences, 2021-03-25, Vol.22 (7), s.3380

Nayyar D (2016) *Refrigerated ShelfLife Evaluation and Effects of Minimal Processing on Antioxidant Capacity of Fresh Sea Vegetables from New England*. Masteroppgave Food Science and Human Nutrition. University of Maine.

Nenadis N, Wang L-F, Tsimidou M og Zhang H-Y (2004) *Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS Assay* J. Agric. Food Chem. 2004, vol. 52, no. 15, s. 4669-4674. ISSN 0021-8561

Norderhaug KM, Skjermo J, Kolstad K, Broch OJ, Ergon Å, Handå A, Horn SJ, Lock EJ og Øverland M (2020) *Mot en ny havnæring for tare? Muligheter og utfordringer for dyrking av alger i Norge* Rapportserie: Fisken og havet År - Nr.:2020-5 ISSN:1894-5031

Nielsen CW (2018) *Effect of hydrothermal processing on chemical composition and quality of Saccharina latissimi cultivated in Norway for human consumption*. Masteroppgave Institutt for bioteknologi og matvitenskap. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, NTNU

Nielsen CW, Holdt SL, Sloth JJ, Marinho GS, Sæther M, Funderud J og Rustad T (2020) *Reducing the High Iodine Content of Saccharina latissima and Improving the Profile of Other Valuable Compounds by Water Blanching Foods*, 2020-05-04, Vol.9 (5), s.569

Olafsen T, Winther U, Olsen Y og Skjermo J (2012) *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050*. Rapport fra arbeidsgruppe oppnevnt av Det Kongelige Videnskabers Selskap (DKNVS) og Norges Tekniske Vitenskapsakademi (NTVA) 2012. ISBN 978-82-7719-074-3.

Oort BV og Holmelin NB (2019) *Klimagassutslipp fra norsk mat*. CICERO, Center for International Climate Research. REPORT 2019:05

Pérez MJ, Falqué E og Domínguez H (2015) *Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed* Marine drugs 2016-03-09, Vol.14 (3), s.52

Pokorný J (2007) *Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?* European journal of lipid science and technology, 2007-06-06, Vol.109 (6), s.629-642

Rajauria G., Jaiswal A. K., Abu- Ghannam N. and Gupta S. (2010) *Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds*. International Journal of Food Science & Technology 2010, Vol. 45, s. 2485- 2493.

Regjeringen (2016) *Kjente ressurser- uante mulighet Regjeringens bioøkonomistrategi* [regjeringen.no]

[[https://www.regjeringen.no/contentassets/32160cf211df4d3c8f3ab794f885d5be/nfd\\_bioekonomi\\_strategi\\_uu.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/32160cf211df4d3c8f3ab794f885d5be/nfd_bioekonomi_strategi_uu.pdf)] [Lastet ned: 19.03.21]

Reis FR (2017) *New perspectives on food blanching* Springer International Publishing ISBN 978-3-319-48665-9

Rojita M og Satpal SB (2011) *Antioxidants and their characterization* Journal of Pharmacy Research Vol.4.Issue 8. August 2011 s. 2744-2746

Rueness J (1998) *Alger i fager: en felthåndbok om kystens makroalger* Almater forlag as.  
ISBN 82-7858-006-5

Salehi B, Sharifi-Rad J, Seca AML, Pinto DCGA, Michalak I, Trincone A, Mishra AP, Nigam M, Zam W og Martins N (2019) *Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications* Molecules (Basel, Switzerland), 2019-11-18, Vol.24 (22), s.4182

Schiener P, Black KD, Stanley MS og Green DH (2015) *The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species Laminaria digitata, Laminaria hyperborea, Saccharina latissima and Alaria esculenta* Journal of applied phycology, 2014, Vol.27 (1), s.363-373

Silva MM og Lidon FC (2016) *An overview on applications and side effects of antioxidant food additives* Emirates journal of food and agriculture, 2016-01-01, Vol.28 (12), s.823-832

Singleton VL, Orthofer R og Lamuela-Raventos RM (1999) *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Methods Enzymol., 1999, vol. 299, pp. 152-178. ISBN 978-0-12-182200-2.

Skjermo J, Aasen IM, Arff J, Broch OJ, Carvajal AK, Christie HC, Forbord S, Olsen Y, Reitan KI, Rustad T, Sandquist J, Solbakken R, Steinhovden K, Wittgens B, Wolff R og Handå A (2014) *A new Norwegian bioeconomy based on cultivation and processing of seaweeds: Opportunities and R&D needs*. SINTEF Fisheries and Aquaculture ISBN: 978-82-14-05712-6

Skjermo J (2016) *Havet som ressurs- fremtidig potensialet i dyrkning av tang og tare*. Universitetsforlaget ISSN: 1501-0074

Stévant P, Marfaing H, Rustad T, Sandbakken I, Fleurence J og Chapman A (2017) *Nutritional value of the kelps Alaria esculenta and Saccharina latissima and effects of short-term storage on biomass quality* Journal of applied phycology, 2017-10, Vol.29 (5), s.2417-2426

Susanto E, Fahmi AS, Agustini TW, Rosyadi S og Wardani D (2017) *Effects of Different Heat Processing on Fucoxanthin, Antioxidant Activity and Colour of Indonesian Brown Seaweeds*.

Thiansilakul Y, Benjakul S og Shahidi F (2007) *Antioxidative activity of protein hydrolysate from round muscle using alcalase and flavourzyme*. Journal of food Biochemistry 31:266-287

Ungureanu CRM, Poiana MA, Cocan I, Lupitu AI, Alexa E og Moigradean D (2020) *Strategies to Improve the Thermo-Oxidative Stability of Sunflower Oil by Exploiting the Antioxidant Potential of Blueberries Processing Byproducts Molecules* (Basel, Switzerland), 2020-12-03, Vol.25 (23), s.5688

Vasanthi C, Rao VA, Babu RN, Sriram P og Karunakaran R (2020) *In- vitro antioxidant activities of aqueous and alcoholic extracts of Sargassum species- Indian brown seaweed*. Journal of Food Processing and Preservation 2020-11, Vol.44 (11)

Wang T, Jónsdóttir R og Ólafsdóttir G (2009) *Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds* Food chemistry, 2009, Vol.116 (1), s.240-248

Zhang Z, Lv G, Pan H, Wu Y og Fan L (2009) *Effects of different drying methods and extraction conditio on antioxidant properties of shiitake (lentinus edodes)*. Food science and technology research, Vol. 15, s.547-552.

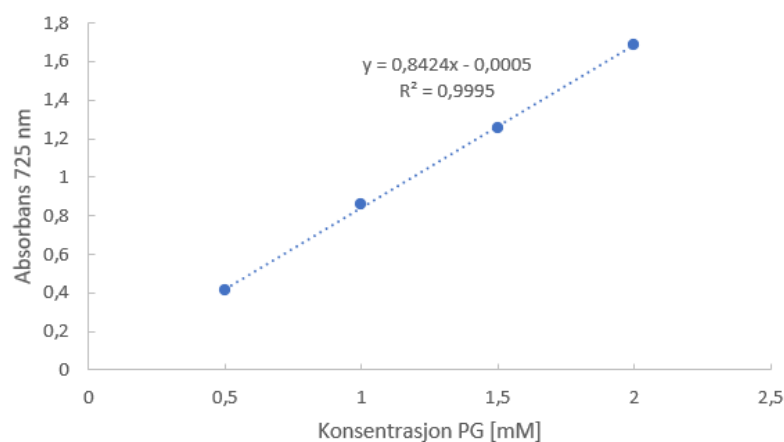


## Vedlegg

Beregninger for alle analysene og korrelasjoner er utført ved hjelp av Excel Office 365.

### Vedlegg A: Folin-Ciocalteu, totalt fenolinnhold

Standardkurve for propyl gallate ved Folin-Ciocalteu analyse er vist i figur 6.1 under.



**Figur 6.1** Standardkurve for propyl gallate i [mM] for Folin-Ciocalteu analysen.

### Beregning av totalt fenolinnhold

For å finne konsentrasjon i [mM] ble Excel funksjonen T.TEST benyttet. T.TEST beregner konsentrasjonen ved å benytte den lineære funksjonen til standardkurven for propyl gallate:

$$y = 0,8424x - 0,0005$$

**Figur 6.2** Lineære funksjon av standardkurven for propyl gallate for Folin- Ciocalteu analysen.

I den lineære funksjonen er y den målte absorbansen, mens x er konsentrasjonen (mM) av propyl gallate.

For å beregne totalt fenolinnhold i ekstraktene ble følgende formel benyttet:

$$\text{Totalt fenolinnhold} = \frac{cV}{m}$$

**Figur 6.3** Formel for beregning av totalt fenolinnhold.

Totalt fenolinnhold ble målt i  $\mu\text{gPGE/g}$  alge. I formelen er  $c$  konsentrasjonen i  $[\text{mM}]$  som ble kalkulert fra standardkurven med propyl gallate som vist over i figur 6.2. Videre ble  $[\text{mM}]$  omgjort til  $\mu\text{gPGE/ml}$  ved å benytte molarmassen til propyl gallate ( $212,2\text{g/mol}$ ).  $V[\text{ml}]$  er volumet av løsning benyttet i ekstraktet og  $m$   $[\text{g}]$  er massen av alge i ekstraktet.

Absorbans, konsentrasjon og TPC bestemmelse FOLIN assays, 725 nm					
Ekstrakt	Ekstrakt	Blank:	Abs A u/blank	Abs B u/blank	Abs C u/blank
FT. BL.	FT. BL.	0,001	0,38	0,388	0,385
LT. BL.	LT. BL.	0,001	0,75	0,365	0,383
BL. RÅ	BL. RÅ	0,001	0,097	0,108	0,1
FT. RÅ	FT. RÅ	0,001	0,24	0,355	0,298
D.V.	D.V.	0,001	0,107	0,117	0,112
BL. V.	BL. V.	0,001	0,073	0,091	0,108
10xBL.V.(A)	10xBL.V.(A)	0,001	0,282	0,29	0,267
10xBL.V.(B)	10xBL.V.(B)	0,001	0,284	0,288	0,284

**Figur 6.4** Absorbansmålinger for Folin-Ciocalteu analysen der blankprøven er trukket fra målt absorbans. Røde tall er ikke benyttet i videre beregninger.

Ekstrakt	Gj. Snitt Abs u/ blank	Kons $[\text{mM}]$	Kons $[\mu\text{gPGE/ml}]$	St. avvik $[\mu\text{gPGE/ml}]$	TPC $[\mu\text{gPGE/g alge}]$	St.avvik TPC
FT. BL.	0,38	0,46	97,03	1	1940,58	20,4
LT. BL.	0,37	0,44	94,43	3,2	1888,55	64,1
BL. RÅ	0,1	0,12	25,86	1,4	129,32	7,2
FT. RÅ	0,3	0,35	75,21	14,5	1504,19	289,5
D.V.	0,11	0,13	28,47	1,3		
BL. V.	0,09	0,11	23,09	4,4		
10xBL.V.(A)	0,28	0,33	70,68	2,9		
10xBL.V.(B)	0,29	0,34	72,1	0,6		

**Figur 6.5** Beregnet konsentrasjon av  $\mu\text{gPGE/ml}$  og TPC  $[\mu\text{g PGE/g alge}]$  for Folin-Ciocalteu analysen.

## Vedlegg B: DPPH analyse, radikal slukningsaktivitet

### Beregninger og formel

Standardavvik er beregnet ved hjelp av Excel funksjonen: STDAV.S.

Gjennomsnitt er beregnet ved hjelp av Excel funksjonen: =GJENNOMSNIITT.

RSA (%) er beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{DPPH radikal slukningsaktivitet (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{prøve}}}{A_{\text{blank}}}\right) * 100\%$$

**Figur 6.6** Formel for beregning av radikal slukningsaktivitet for DPPH analysen.

*A<sub>prøve</sub>* er den målte absorbansen for ekstraktet og *A<sub>blank</sub>* er absorbansen til blankprøven som besto av ferdig DPPH reagens og 80% metanol.

### Absorbans og beregnet RSA(%)

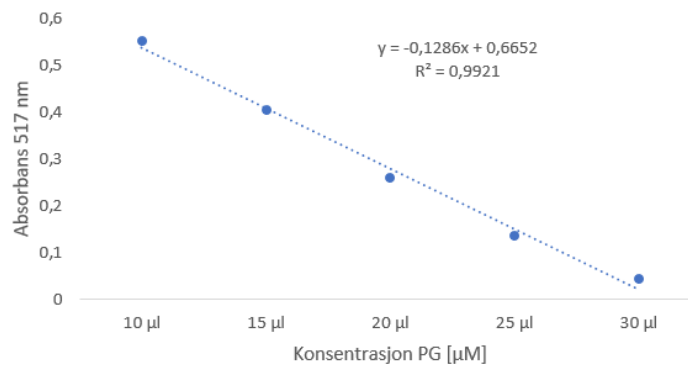
Absorbansmålinger for DPPH analyse (n=3) med beregnet gjennomsnitt og standardavvik er vist i figur 6.7. Målinger markert med rødt er ikke medregnet, da de avviker. Beregnet gjennomsnittlig RSA(%) og standardavvik for hvert ekstrakt er vist i 6.8 under. Vedlagt ligger også standardkurve for propyl gallate ved DPPH analysen i figur 6.9.

Absorbans og RSA (%) for DPPH assay, 517nm						
Ekstrakt	Blank	abs A	abs B	abs C	St. avvik	Gj.snitt
FT. BL.	0,85	0,33	0,33	0,37	0,02	0,34
LT. BL.	0,85	0,36	0,38	0,38	0,01	0,37
BL. RÅ	0,85	0,56	0,59	0,61	0,03	0,59
FT. RÅ	0,85	0,48	0,18	0,51	0,02	0,49
D.V.	0,85	0,65	0,56	0,72	0,06	0,64
BL. V.	0,85	0,57	0,58	0,38	0,01	0,58
10xBL.V.(A)	0,85	0,23	0,21	0,23	0,01	0,23
10xBL.V.(B)	0,85	0,24	0,21	0,23	0,02	0,23

**Figur 6.7** Målt absorbans for ekstraktene og blankprøve ved DPPH analysen.

**RSA (%) for DPPH assay, 517nm**

Ekstrakt	RSA%	Std. avvik
FT. BL.	59,94	2,7
LT. BL.	56,03	1,5
BL. RÅ	29,69	3,1
FT. RÅ	42,19	2,4
D.V.	24,47	9,1
BL. V.	39,84	0,7
10xBL.V.(A)	73,45	1,3
10xBL.V.(B)	73,53	2,0

**Figur 6.8** Beregnet gjennomsnittlig og standardavvik av RSA(%) for ekstraktene.**Figur 6.9** Standardkurve for propyl gallate [ $\mu\text{M}$ ] ved DPPH analysen.

## Vedlegg C: ABTS analyse, radikal slukningsaktivitet

### Beregninger og formel

Standardavvik er beregnet ved hjelp av Excel funksjonen: STDAV.S.

Gjennomsnitt er beregnet ved hjelp av Excel funksjonen: =GJENNOMSNITT.

For å beregne den radikale slukningsaktiviteten (%) ble formelen under i figur 6.10 benyttet i Excel:

$$\text{ABTS radikal slukningsaktivitet (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Aprøve}}{\text{Ablank}}\right) * 100\%$$

**Figur 6.10** Formel for radikal slukningsaktivitet for ABTS analysen.

*Aprøve* er den måle absorbansen for ekstraktet og *Ablank* er absorbansen til blankprøven som besto av ferdig ABTS reagens og destillert vann.

### Absorbans og beregnet RSA(%)

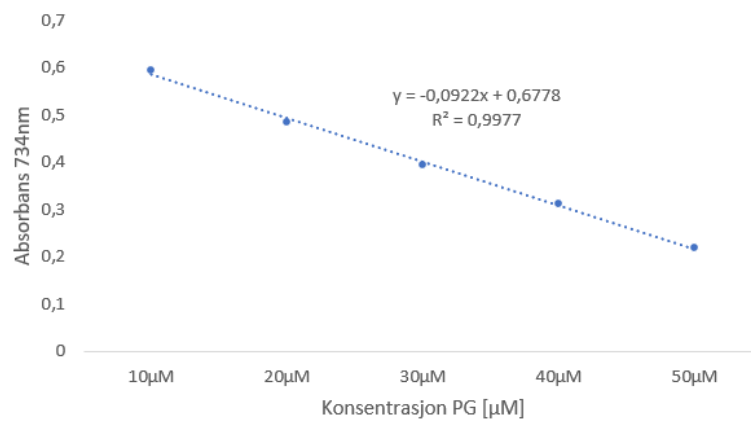
Absorbansmålinger for ABTS analyse (n=3) med beregnet gjennomsnitt og standardavvik er vist i figur 6.11. Målinger markert med rødt er ikke medregnet, da de avviker. I figur 6.12 er beregnet gjennomsnittlig RSA(%) vedlagt og standardkurven for propyl gallate er vedlagt i figur 6.13.

Absorbans og RSA (%) for ABTS assay, 734nm						
Ekstrakt	Blank	Abs A	Abs B	Abs C	St. avvik	Gj.snitt
FT. BL.	0,73	0,017	0,018	0,01	0,00	0,02
LT. BL.	0,73	0,024	0,023	0,021	0,00	0,02
BL. RÅ	0,73	0,598	0,558	0,598	0,02	0,58
FT. RÅ	0,73	0,15	0,015	0,083	0,05	0,05
D.V.	0,724	0,578	0,477	0,441	0,03	0,46
BL. V.	0,724	0,445	0,465	0,388	0,01	0,46
10xBL.V.(A)	0,724	0,017	0,016	0,017	0,00	0,02
10xBL.V.(B)	0,724	0,016	0,019	0,018	0,00	0,02

**Figur 6.11** Viser absorbansmålingene for ekstraktene i ABTS analysen. Røde tall er ikke benyttet i beregningene da de avviker.

RSA (%) for ABTS assay, 734nm		
Ekstrakt	RSA%	St. avvik
FT. BL.	97,95	0,6
LT. BL.	96,89	0,2
BL. RÅ	19,91	3,2
FT. RÅ	93,29	6,6
D.V.	36,60	3,5
BL.V.	37,15	2,0
10xBL.V.(A)	97,70	0,1
10xBL.V.(B)	97,56	0,2

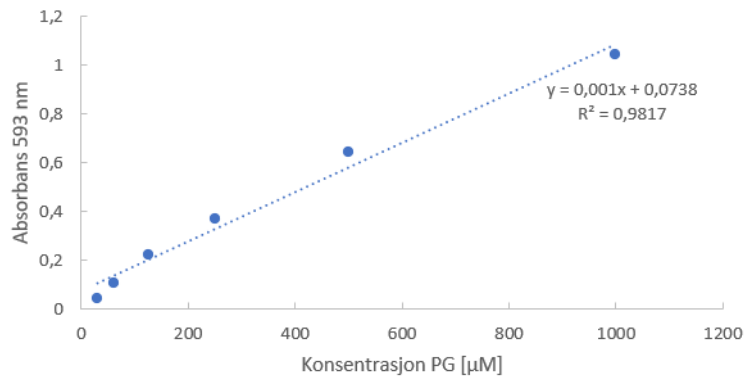
**Figur 6.12** beregnet gjennomsnittlig radikal slukningsaktivitet i analysen ABTS, samt tilhørende standardavvik.



**Figur 6.13** Standardkurve for propyl gallate [μM] i ABTS analysen.

## Vedlegg D: FRAP analyse, reduksjonskapasitet

Standardkurve for propyl gallate for FRAP analyse



**Figur 6.14** Standardkurve for propyl gallate [µM] ved FRAP analysen.

### Absorbansmålinger for FRAP analyse, 593nm og beregning av reduserende effekt i ekstraktene

Reduserende kapasitet ble målt i µgPGE/g alge. Konsentrasjonen i µM ble kalkulert fra standardkurven (vist i figur 6.14) med propyl gallate og videre omgjort til µgPGE/ml ved å benytte molarmassen til propyl gallate (212,2g/mol) og delt på  $10^3$  for å få riktig benevning. Til slutt ble ekstraktene med kjent fortytning omgjort til µgPGE/g alge ved at µgPGE/ml ble delt på ekstraktets fortytning som er 0,05 g/ml for tørket alge og 0,2 g/ml for våt alge.

For å finne konsentrasjon i µM ble Excel funksjonen T.TEST benyttet. T.TEST beregner konsentrasjonen ved å plote den lineære funksjonen (figur 6.15) for standardkurven for propyl gallate mot målt absorbans av ekstraktene som er vist i figur 6.16 og 6.18.

$$y = 0,001x + 0,0738$$

**Figur 6.15** viser den lineære funksjonen til standardkurven med propyl gallate for FRAP analysen.

I den lineære funksjonen er y den målte absorbansen, mens x er konsentrasjonen (µM) av propyl gallate. Beregnede konsentrasjoner for ekstraktene er vist i figur 6.17 og 6.19 under.

Ekstrakt	abs. A1	abs. B1	abs. C1	Abs. Gj. Snitt
FT. BL.	0,17633	0,19406	0,15045	0,174
LT. BL.	0,18564	0,18168	0,19181	0,186
BL. RÅ	0,0442	0,06164	0,07008	0,059
FT. RÅ	0,11135	0,15483	0,11289	0,126
D.V.	0,03716	0,07354	0,06346	0,058
BL. V.	0,06013	0,06408	0,08019	0,068
10xBL.V.(A)	0,17005	0,25506	0,17893	0,201
10xBL.V.(B)	0,17267	0,19144	0,15723	0,174

**Figur 6.16** Absorbansmålingene og beregnet gjennomsnitt for FRAP analysen omgang 1.

Ekstrakt	Kons (µM)	[µgPGE/ml]	St.av.[µgPGE/ml]	Fortynning:	µg PGE/T.V	St. avvik [µg PGE/T.V]
FT. BL.	102,88	21,83	4,5	0,05	436,61	90,3
LT. BL.	115,26	24,46	1,1	0,05	489,17	21,0
BL. RÅ	0,00	0,00	2,7	0,2	0,00	0,0
FT. RÅ	57,02	12,10	5,1	0,05	242,01	101,6
D.V.	0,00	0,00	3,9			
BL. V.	0,53	0,11	2,2			
10xBL.V.(A)	129,79	27,54	9,6			
10xBL.V.(B)	103,04	21,87	3,5			

**Figur 6.17** Beregninger av gjennomsnittlig konsentrasjon og reduserende kapasitet for FRAP omgang 1.

Ekstrakt	abs. A1	abs. B1	abs. C1	Gj. Snitt
FT. BL.	0,64193	0,572	0,2171	0,47701
LT. BL.	0,5467	0,53758	0,4958	0,52669333
BL. RÅ	0,12597	0,18489	0,16205	0,15763667
FT. RÅ	0,21329	0,27953	0,3444	0,27907333
D.V.	0,0962	0,11632	0,16657	0,12636333
BL. V.	0,16371	0,1335	0,17085	0,15602
10xBL.V.(A)	0,36117	0,31526	0,3471	0,34117667
10xBL.V.(B)	0,31862	0,32307	0,28677	0,30948667

**Figur 6.18** Absorbansmålingene og beregnet gjennomsnitt for FRAP analysen omgang 2.

Kons (µM)	[µgPGE/ml]	St.av.[µgPGE/ml]	Fortynning:	µg PGE/T.V	St. avvik [µg PGE/T.V]
397,26	84,3	46,9	0,05	1685,97	938,01
445,47	94,53	5,59	0,05	1890,56	111,76
87,37	18,54	6,12	0,2	92,7	0,33
205,2	43,54	13,5	0,05	870,88	269,95
57,03	12,1	7,46			
85,81	18,21	4,08			
265,46	56,33	4,48			
234,71	49,81	4,08			

**Figur 6.19** Beregninger av gjennomsnittlig konsentrasjon og reduserende kapasitet for FRAP omgang 2.



