

Tobias Skammelsrud Madsen
Ida Asbøll Magnussen
Ragnhild Kvist Simonsen

Ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *Alaria esculenta* ved bruk av pulserende elektrisk felt teknologi

Bacheloroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft
Veileder: Jørgen Lerfall
Medveileder: Synne Hylene Røsten
Mai 2024



Modifisert etter (Kraan, 2020)

Tobias Skammelsrud Madsen
Ida Asbøll Magnussen
Ragnhild Kvist Simonsen

Ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *Alaria esculenta* ved bruk av pulserende elektrisk felt teknologi

Bacheloroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft
Veileder: Jørgen Lerfall
Medveileder: Synne Hysten Røsten
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Forord

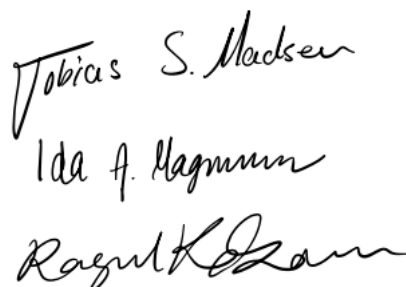
Arbeidet med denne oppgaven ble utført våren 2024 og markerer avslutningen på bachelorprogrammet Matvitenskap, teknologi og bærekraft ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap (IBT), Fakultet for naturvitenskap (NV) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

Bacheloroppgaven har kommet i stand med iherdig innsats fra alle på gruppa, både med praktisk arbeid på laboratoriet og under selve skriveprosessen. Vi har hatt en bratt læringskurve dette semesteret og vi har fått uvurderlig hjelp underveis i prosessen. Spesielt vil vi takke vår hovedveileder Jørgen Lerfall for gode diskusjoner, verdifulle innspill og tilbakemeldinger. Videre vil vi takke vår medveileder Synne Hysten Røsten for hennes hjelp under det praktiske arbeidet, hennes tålmodighet når vi stiller de dumme spørsmålene og ellers gode innspill underveis i prosessen – vi er utrolig takknemlig.

Råstoff, kjemikalier og utstyr benyttet under arbeidet er finansiert av NTNU. Takk til Seaweed Solution AS for å stille med rikelig mengde råstoff til arbeidet vårt. Takk til alle labansvarlige ved NTNU, som har gitt oss grundig innføring til selvstendig labarbeid og som har vært hjelpsomme underveis som spørsmål har dukket opp.

Avslutningsvis vil vi takke alle medstudenter på trinnet for å styrke hverandres moral og arbeidsinnsats. Labtorget har vært et livlig sted dette semesteret og det har vært givende å se og slå av en prat med medelever innimellom jobbingen.

Trondheim, 21.05.2024



Tobias Skammelsrud Madsen

Ida Asbøll Magnussen

Ragnhild Kvist Simonsen

Sammendrag

Marine makroalger er rike på bioaktive forbindelser, som er naturlige stoffer med spesialiserte biologiske funksjoner, inkludert antioksidative og antimikrobielle egenskaper. Det er en økende etterspørsel etter naturlige antioksidanter i næringsmiddelindustrien, og egenskapene til de bioaktive forbindelsene gjør dem også interessante for industrier som farmasi, kosmetikk og bioteknologi. Tradisjonelle ekstraksjonsmetoder innebærer bruk av organiske løsemidler, som er knyttet til negative påvirkninger på helse og miljø. Derfor er det av interesse å utvikle mer miljøvennlige ekstraksjonsmetoder for disse stoffene.

Flere studier har vist at pulserende elektrisk felt (PEF)-teknologi kan øke ekstraksjonsutbyttet fra ulike råstoff, blant annet en økning av polyfenoler fra brunalgen *Alaria esculenta* (*A. esculenta*) med opptil 38,7%. Denne studien undersøkte anvendelsen av PEF som forbehandling for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, med vann som løsemiddel. Målet med oppgaven var å undersøke om PEF-behandlingen kunne gi økt utbytte av bioaktive forbindelser sammenlignet med tradisjonell solid-liquid ekstraksjon (SLE) med to løsemidler: vann og etanol:vann (30:70). Utbyttet av bioaktive forbindelser ble kvantifisert ved å analysere ekstraktens kjemiske karakteristikk, samt deres *in vitro* antioksidative og antimikrobielle egenskaper.

PEF-parameterne ble optimalisert med mål om å oppnå høyest mulig utbytte av bioaktive forbindelser. Optimaliseringen resulterte i et forsøksdesign hvor elektrisk feltstyrke (2, 4 og 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100 og 200) var varierende parametere, og de ferdige ekstraktene hadde en prøvekonsentrasjon på 10 g tørket *A. esculenta* per liter løsemiddel. Ekstraktens kjemiske karakteristikk ble undersøkt ved å måle totalt polyfenolinnhold (TPC) ved hjelp av Folin-Ciocalteu metoden, innhold av fukoxantin ved hjelp av væskeskromatografi (HPLC), samt pH-verdien til ekstraktene. Videre ble ekstraktens antioksidative kapasitet kvantifisert *in vitro* med følgende tre metoder: 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP). Den antimikrobielle effekten mot bakteriene *Listeria innocua* (*L. innocua*) og *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) ble avslutningsvis analysert for utvalgte ekstrakter ved bruk av 96-brønnsplate inhiberingsanalyse.

Resultatene viste at elektrisk feltstyrke og prøvens konduktivitet hadde stor betydning for hvorvidt forsøkene på PEF-maskinen var gjennomførbare uten feilmeldinger. Det antas at det eksisterer mer optimale parametere for PEF på *A. esculenta* enn dem som ble benyttet i denne

oppgaven, og at både metoden og parameterinnstillingene har forbedringspotensial. TPC-analysene viste at etanol:vann-ekstraktene hadde signifikant høyere innhold av polyfenoler enn de andre ekstraktene, og at PEF ved 4 kV/cm ga høyere utbytte enn 6 kV/cm uavhengig av antall pulser. Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom PEF- og vannekstraktene uten PEF-behandling. Analysen av fukoxantin-innhold ga ingen detekterbare resultater, noe som indikerte at den lave prøvekonsentrasjonen var begrensende for metoden. Resultatene fra pH-målingene viste at etanol:vann hadde signifikant lavere pH enn de andre gruppene, noe som kan relateres til denne prøvens høyere polyfenolinnhold, og muligens høyere innhold av organiske syrer.

Resultatene fra ABTS viste ingen signifikante forskjeller i Radical Scavenging Activity (RSA%) mellom hverken PEF- eller SLE-gruppene, men det ble observert en ikke-signifikant tendens som antydte at PEF-ekstraktene lå mellom vannekstraktet og etanol:vann. DPPH viste heller ingen signifikante forskjeller i RSA% mellom noen av gruppene. FRAP viste at PEF ved 4 kV/cm og 10 pulser hadde ekstrahert en større andel forbindelser med evne til å redusere Fe^{2+} , enn PEF ved 6 kV/cm og 100 pulser. Korrelasjonsanalysen viste signifikant korrelasjon mellom FRAP og TPC for PEF-ekstraktene. De antimikrobielle analysene ble kun utført på vannekstraktene uten PEF-behandling, og PEF-ekstraktene som ble behandlet med 4 kV/cm. Analysene viste at vannekstraktet hadde en svak, men signifikant bedre inhibering av *L. innocua* enn PEF-ekstraktet ved 4 kV/cm og 10 pulser, mens det motsatte var tilfellet for inhibering av *P. fluorescens*. De mikrobiologiske resultatene var imidlertid usikre, og konsentrasjonen av inhiberende stoffer var sannsynligvis for lav til å gi utslag på inhiberingsanalysen.

Basert på resultatene presentert i denne studien ble det vurdert at PEF *ikke* ga signifikant høyere utbytte av bioaktive forbindelser enn SLE med vann som løsemiddel. Til tross for dette ble det påpekt at de signifikante forskjellene i TPC-analysen, mellom SLE og PEF-gruppene, ble utjevnet av de antioksidative analysene. I tillegg var korrelasjonskoeffisienten mellom FRAP og TPC lavere for PEF enn SLE. Dette indikerte at PEF-behandlingen hadde ekstrahert andre forbindelser enn polyfenoler, med antioksidative egenskaper, i større grad enn SLE. På grunn av dette ble det konkludert med at PEF kan være en egnet forbehandling for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, med forutsetning om videre optimalisering av prosessparametere og metode for PEF, samt kvantifisering av forbindelser utover polyfenoler.

Abstract

Marine macroalgae are rich in bioactive compounds, which are natural compounds with specialized biological functions, including antioxidative and antimicrobial properties. There is an increasing demand for natural antioxidants in the food industry, and the properties of these bioactive compounds also make them interesting for industries such as pharmaceuticals, cosmetics, and biotechnology. Traditional extraction methods involve the use of organic solvents, which are associated with negative impacts on health and the environment. Therefore, it is of interest to develop more environmentally friendly extraction methods for these compounds.

Several studies have shown that pulsed electric field (PEF) technology can increase extraction yields from various raw materials, including an increase of polyphenols from the brown algae *Alaria esculenta* (*A. esculenta*) by up to 38.7%. This study investigated the application of PEF as a pretreatment for the extraction of bioactive compounds from *A. esculenta*, using water as the solvent. The aim of this study was to determine if PEF treatment could yield higher amounts of bioactive compounds compared to traditional solid-liquid extraction (SLE) with two solvents: water and ethanol:water (30:70). The yield of bioactive compounds was quantified by analyzing the chemical characteristics of the extracts, as well as their *in vitro* antioxidant and antimicrobial properties.

PEF parameters were optimized with the goal of achieving the highest possible yield of bioactive compounds. The optimization resulted in an experimental design where the electric field strength (2, 4, and 6 kV/cm) and the number of pulses (10, 100, and 200) were variable parameters, and the final extracts had a sample concentration of 10 g dried *A. esculenta* per liter of solvent. The chemical characteristics of the extracts were examined by measuring; the total polyphenol content (TPC) using the Folin-Ciocalteu method, the content of fucoxanthin using high performance liquid chromatography (HPLC), and the pH value of the extracts. Furthermore, the antioxidant capacity of the extracts was quantified *in vitro* using the following three methods: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The antimicrobial effect against the bacteria *Listeria innocua* (*L. innocua*) and *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) was finally analyzed for selected extracts using a 96-well plate inhibition assay.

The results showed that electric field strength and the conductivity of the sample were crucial for whether the experiments on the PEF-machine could be done successfully without errors. It

was assumed that there exist more optimal parameters for PEF on *A. esculenta* than those used in this study, and that both the method and parameter settings have potential for improvement. TPC analyses showed that the ethanol:water extracts had significantly higher polyphenol content than the other extracts, and that PEF at 4 kV/cm yielded higher outputs than at 6 kV/cm, regardless of the number of pulses. No significant differences were found between PEF and water extracts without PEF treatment. The fucoxanthin content analysis gave no detectable results, indicating that the low sample concentration was limiting for the method. The pH measurements showed that ethanol:water had significantly lower pH than the other groups, which may be related to the higher polyphenol content, and its possibly higher content of organic acids.

The ABTS results showed no significant differences in Radical Scavenging Activity (RSA%) between the PEF and SLE groups, but a non-significant tendency was observed indicating that the PEF extracts were between the water extract and ethanol:water. DPPH also showed no significant differences between any of the groups. FRAP showed that PEF with 4 kV/cm and 10 pulses had extracted a larger share of compounds with the ability to reduce Fe^{2+} than PEF at 6 kV/cm and 100 pulses. Correlation analysis showed a significant correlation between FRAP and TPC for the PEF extracts. The antimicrobial analyses were only performed on the water extracts without PEF treatment and the PEF extracts treated with 4 kV/cm. The analyses showed that the water extract had a weak but significantly better inhibition of *L. innocua* than the PEF extract at 4 kV/cm and 10 pulses, while the opposite was true for the inhibition of *P. fluorescens*. However, the microbiological results were uncertain, and the concentration of inhibitory compounds was likely too low to show an effect in the inhibition assay.

Based on the results presented in this study, it was assessed that PEF did *not* yield significantly higher bioactive compound extraction than SLE with water as the solvent. Despite this, it should be noted that the significant differences in the TPC analysis between the SLE and PEF groups were evened out in the antioxidant analyses. Additionally, the correlation coefficient between FRAP and TPC was lower for PEF than for SLE. This indicated that the PEF treatment had extracted other compounds with antioxidant properties, besides polyphenols, to a greater extent than SLE. Because of this, it was concluded that PEF may be a suitable pretreatment for the extraction of bioactive compounds from *A. esculenta* provided that further optimization of process parameters and the method for PEF, as well as the quantification of compounds beyond polyphenols, is conducted.

Oversikt over forkortelser og faguttrykk

A. *esculenta* – *Alaria esculenta*

ABTS – 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre)

ANOVA – Analysis of Variance (variansanalyse)

BHI – Brian Heart Infusion

BHIA – Brian Heart Infusion Agar

CFU – Colony Forming Units

DPPH – 2,2,-duphenyl-1-picrylhydrazyl

E – Elektrisk feltstyrke

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

GAE – Gallic Acid Equivalents

GLM – General Linear Model (Generell Lineær Modell)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (væskekromatografi)

L. *innocua* – *Listeria innocua*

nP – Antall pulser

P. *fluorescens* – *Pseudomonas fluorescens*

PEF – Pulsed Electric Field (Pulserende elektrisk felt)

RSA – Radical Scavenging Activity

SLE – Solid Liquid Extraction

TE – Trolox ekvivalenter

TPC – Total Polyphenol Content (totalt polyfenolinnhold)

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iv
Oversikt over forkortelser og faguttrykk	vi
Figurer	ix
Tabeller	xii
1 Innledning	1
1.1 Målformulering	2
1.2 Bærekraftsperspektiv	3
2 Teori	4
2.1 Makroalger	4
2.2 <i>Alaria esculenta</i>	5
2.2.1 Bioaktive forbindelser hos <i>Alaria esculenta</i>	6
2.2.2 Antioksidantegenskaper hos ekstrakter fra <i>Alaria esculenta</i>	9
2.2.3 Antimikrobiell effekt hos ekstrakter fra <i>Alaria esculenta</i>	10
2.3 Potensielle bruksområder for ekstrakter fra makroalger	12
2.4 Ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra makroalger	13
2.4.1 Pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon	14
2.4.2 Anvendelse av pulserende elektrisk felt (PEF) som forbehandling til ekstraksjon	15
2.5 Prosessoptimalisering	17
3 Materialer og metoder	19
3.1 Råstoff	20
3.2 Ekstraksjon	20
3.2.1 Solid-liquid ekstraksjon (SLE)	20
3.2.2 Pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon	21
3.3 Kjemisk karakteristikk	22
3.3.1 Totalt polyfenolinnhold (TPC)	22
3.3.2 Kvantifisering av fukoxantin-innhold	23
3.4 Antioksidative analyser	23
3.4.1 Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)	23
3.4.2 Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	24
3.4.3 Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)	25
3.5 Antimikrobielle analyser	25
3.5.1 Forberedelse av målorganismer	27
3.5.2 96-brønnsplate inhiberingsanalyse	27
3.6 Dataanalyse og statistikk	29

4	Resultater	30
4.1	Kjemisk karakteristikk	30
4.1.1	Totalt polyfenolinnhold (TPC)	30
4.1.2	Fukoxantin	32
4.1.3	Temperaturrendring under PEF behandling og pH	32
4.2	Antioksidative analyser	34
4.2.1	Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)	34
4.2.2	Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	36
4.2.3	Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)	37
4.3	Pearsons parvise korrelasjonsanalyser	38
4.4	Antimikrobielle analyser	40
5	Vurdering	42
5.1	Prosessoptimalisering	42
5.2	Kjemisk karakteristikk	43
5.2.1	Totalt polyfenolinnhold (TPC)	43
5.2.2	Fukoxantin	45
5.2.3	Temperaturøkning under PEF behandling	45
5.2.4	pH	46
5.3	Antioksidative analyser	47
5.3.1	Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)	47
5.3.2	Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	48
5.3.3	Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)	48
5.4	Antimikrobielle analyser	50
6	Konklusjon	52
7	Videre arbeid og generelle bemerkninger	53
8	Referanseliste	55
	Vedlegg 1	I
	Vedlegg 2	I
	Spesifikk energitilførsel	I
	Konduktivitet før og etter PEF-behandling	II
	pH-målinger	III
	Vedlegg 3	I
	Standardkurve for totalt polyfenolinnhold	I
	Standardkurve for FRAP	II
	Vedlegg 4	III

Figurer

Figur 1: Utvalg av FNs bærekraftsmål som er relevante for oppgaven. Hentet fra: (FNs bærekraftsmål, 2024).	3
Figur 2: Skisse av <i>Alaria esculenta</i> , med markerte seksjoner for lamina, stripe og holdfast, samt sporofyll og midtribbe Modifisert etter (Kraan, 2020).	5
Figur 3: Polyfenolet floroglucinol (A) som finnes i brunalger, og eksempler på florotanniner, med deres kjemiske strukturer. Ringstrukturene gir mulighet for delokalisering av elektroner. Hentet fra (Erpel et al., 2020)	7
Figur 4: Strukturen til fukoxantin, et karotenoid som finnes i brunalger. Molekylet har en kjemisk aktiv propylen-struktur med ni konjugerte dobbeltbindinger og seks oksygenatomer, med funksjonelle grupper som hydroksyl-, epoksy-, karbonyl- og karboksylgrupper. Hentet fra (Gong et al., 2024).	8
Figur 5: Tre eksempler på sulfaterte polysakkarider fra marine alger. (A) fucoidan fra brunalger, (B) karragenan fra rødalger og (C) ulvan fra grønnalger. Hentet fra (Li & Kim, 2011).	9
Figur 6: Mulige antimikrobielle mekanismer hos karotenoider, deriblant evnen til å forstyrre aktiviteten til effluks-pumpen, inhibering av nukleinsyrer, skade på celleveggen, inhibering av virulensfaktorer, inhibering av oksygenopptak og inhibering av biofilmdannelse. Hentet fra (Karpinski et al., 2021).	11
Figur 7: Eksempler på antimikrobielle effekter hos polysakkarider, deriblant inhibering av biofilmdannelse, effekt på cellemembranen og celleveggen, inhibering av nukleinsyrer og inhibering av metabolske prosesser. Hentet fra (Wang et al., 2021).	11
Figur 8: Prosessoptimalisering i 6 steg. Tilnærmingen er som regel kontinuerlig, og etter steg 6 settes et nytt mål (1), og stegene kan gjennomgås igjen. Metoden er hentet fra Numminen (2023).	17
Figur 9: Flytskjema som illustrerer forsøksdesignet for ekstraksjon fra <i>Alaria esculenta</i> med pulserende elektrisk felt (PEF) og solid-liquid ekstraksjon (SLE). Det ble først utført en optimalisering av ulike PEF-parametere (elektrisk feltstyrke (E) og antall pulser (nP)) på ekstraksjon av <i>Alaria esculenta</i> , vurdert av ekstraktens kjemiske karakteristikk (totalt polyfenol-innhold (TPC) og fukoxantin-innhold). Det ble videre utført SLE som utgjorde sammenligningsgrunnlaget til de optimaliserte PEF-ekstraktene. Ekstraktens bioaktivitet ble vurdert basert på kjemisk karakteristikk, antioksidativ kapasitet og antimikrobielle egenskaper. Kjemisk karakteristikk ble målt ved TPC, fukoxantin-innhold og pH. Antioksidativ kapasitet ble målt med tre analyser; 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP). Ekstraktens antimikrobielle egenskaper ble målt ved å se på deres inhiberende effekt mot bakteriene <i>Listeria innocua</i> og <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
Figur 10: Hovedtrinnene i inhiberingsanalysen med 96-brønnsplate. Steg A: Forberedelse av målorganismen. (1) Fryste stammer av referanseorganismer ble strøket ut på plater med brain-heart	

infusion agar (BHIA) og inkubert ved optimale vekstvilkår. (2) Etter inkubering ble én koloni overført til prøverør med BHI-buljong og inkubert ved 15°C i 72 timer for temperaturlpasning. **Steg B:** Forberedelse av 96-brønnsplate analysen. (3) Inokulumet ble standardisert til en optisk tetthet på 0,10 før videre fortykning til ønsket cellekonsentrasjon, før (4) BHI-buljong, peptonvann, målorganisme og ekstrakter ble tilsatt i 96-brønnsplaten. (5) Platen ble inkubert ved 15°C i 72 timer. **Steg C:** Fortykningsserie og kvantifisering. (6) Hver rad fra den opprinnelige 96-brønnsplaten ble overført til nye 96-brønnsplater for seriefortynning med peptonvann til konsentrasjoner fra 10^{-1} til 10^{-9} . (7) Videre ble 5µL fra hver brønn mikrosippet på plater med BHIA og inkubert i 24 timer ved optimale temperaturer for de respektive målorganismene, før (8) kvantifiseringen av hver spotting ved å telle kolonier. Tilfeller hvor det ble registrert >50 kolonier ble kvantifisert som overgrodd. Figuren er lånt fra (Røsten, 2023). 26

Figur 11: 96-brønnsplate med fire paralleller for hvert *Alaria esculenta*-ekstrakt, samt positive og negative kontroller. I brønnene nummerert 3-6 ble solid-liquid ekstraktene (SLE) og ekstraktene behandlet med pulserende elektrisk felt (PEF) med ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) tilsatt, mens kontrollprøvene ble fylt med peptonvann istedenfor ekstrakt. De positive (blå på figuren) brønnene ble tilsatt bakteriekultur av *Listeria innocua* eller *Pseudomonas fluorescens*, mens de negative (lyserøde på figuren) ikke ble tilsatt bakterier. De umarkerte brønnene var ubrukte og ble kun fylt med 200 µL Brain Heart Infusion (BHI)-buljong. 28

Figur 12: Resultatene fra analysen av totalt polyfenolinnhold (TPC) i ekstraktene med *Alaria esculenta*, hvor pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid-liquid ekstraktene (SLE) totale polyfenolinnhold ble målt og gjengitt i g gallisk syre ekvivalenser per 100 g tørrvekt (g GAE/100 g dw), for PEF-ekstrakter og SLE-ekstrakter (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (abc) representerer signifikante forskjeller beregnet med Tukeys HSD pairwise comparison test. 31

Figur 13: Gjennomsnittlige temperaturrendringer [$\Delta^{\circ}\text{C}$] i de ulike ekstraktene med *Alaria esculenta* etter pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (abcde) indikerer signifikante forskjeller mellom grupper. 33

Figur 14: Gjennomsnittlige pH-verdier for alle ekstraktene av *Alaria esculenta* som ble ekstrahert med solid-liquid ekstraksjon (SLE) eller forbehandlet med pulserende elektrisk felt (PEF) (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) for PEF-behandling ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (a,b) indikerer signifikante forskjeller mellom grupper. 34

Figur 15: Resultatene fra 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre)(ABTS)-analysen, hvor *Alaria esculenta*-ekstraktene radikal scavenging activity (RSA) [%] ble målt, for solid-liquid (SLE)-

og pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstrakter (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt for PEF-behandlingen. Enveis ANOVA: p = 0,065, indikerer ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.	35
Figur 16: Resultatene fra 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)-analysen av ekstraktene med <i>Alaria esculenta</i> , hvor solid-liquid (SLE)- og de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktenes radical scavenging activity (RSA) [%] ble målt (n=3). Enveis ANOVA: p = 0,051, som indikerer ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.	36
Figur 17: Resultatene fra ferric reducing antioxidant power (FRAP)-analysen, hvor pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid liquid ekstraktene (SLE) av <i>Alaria esculenta</i> sin evne til å redusere Fe ³⁺ ble målt (n=3) i µmol trolox-ekvivalenter per g tørrvekt (µmol TE/g tørrvekt). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt for PEF-behandlingen. Enveis ANOVA: p < 0,05. Ulike bokstaver (abc) representerer signifikante forskjeller beregnet med Tukeys HSD pairwise comparison test.	38
Figur 18: Korrelasjonsmatrise som viser parvis sammenligning av korrelasjonen mellom antioksidativ kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)) og kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC), pH og temperaturøkning) for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene av <i>Alaria esculenta</i> . * indikerer signifikant korrelasjon (p < 0,05).....	39
Figur 19: Korrelasjonsmatrise som viser parvis sammenligning av korrelasjonen mellom antioksidant kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)) og kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC) og pH) for solid liquid ekstraktene (SLE) av <i>Alaria esculenta</i> . * indikerer signifikant korrelasjon (p < 0,05).....	39
Figur 20: Spesifikk energitilførsel som ekstraktene av <i>Alaria esculenta</i> ble utsatt for under pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling. Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble benyttet.	I
Figur 21: pH-målinger av pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstrakter og solid liquid ekstrakter (SLE) av <i>Alaria esculenta</i> . Ulike parameterinnstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ved PEF-behandling ble benyttet.	III
Figur 22: Standardkurven for løsninger med kjent konsentrasjon gallisk syre (mg/L) som ble benyttet til utregning av totalt polyfenol innhold (TPC) i ekstrakter av <i>Alaria esculenta</i>	I
Figur 23: Standardkurven for løsninger med kjent konsentrasjon trolox (µM) som ble benyttet til utregning av ferric reducing antioxidant power (FRAP)-verdi for ekstrakter av <i>Alaria esculenta</i>	II

Tabeller

- Tabell 1:** Oppsummeringstabell fra ulike studier som har sett på ekstraksjon av ulike forbindelser med pulserende elektrisk felt (PEF). Tabellen viser prosentandel økt utbytte av ulike ekstraksjonsprodukt eller analysemetoder (karotenoider, polyfenoler, 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP)) fra ulike råstoff, hvilke parametere (elektrisk feltstyrke (E), frekvens, behandlingstid) som ble benyttet, og hvilken spesifikk energi (W) prøvene ble utsatt for..... 16
- Tabell 2:** Oversikt over parameterinnstillingene som ble variert under forsøket med pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon fra *Alaria esculenta*. Parameterne som ble variert var elektrisk feltstyrke (E) (2, 4, 6 kV/cm) og antall pulser (nP) (10, 100, 200). Alle grupper ble testet i n = 3 paralleller..... 21
- Tabell 3:** Det totale innholdet av polyfenoler (TPC) i prøvene med *Alaria esculenta*, gitt som gram gallisk syre-ekvivalenter per 100 g tørrvekt (g GAE/100 g dw), ble analysert for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene (n = 3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultatene er gitt som et gjennomsnitt ± standardavvik..... 31
- Tabell 4:** Gjennomsnittlige temperaturendringer [$\Delta^{\circ}\text{C}$] ble utregnet for ekstraktene av *Alaria esculenta* som ble forbehandlet med pulserende elektrisk felt (PEF). Temperaturendringene tilsvarer forskjellen i prøvens temperatur før og etter PEF-behandling (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultater er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik..... 32
- Tabell 5:** Antioksidativ kapasitet målt ved hjelp av ferric reducing antioxidant power (FRAP) i prøvene med *Alaria esculenta*, gitt som μmol trolox-ekvivalenter per g tørrvekt ($\mu\text{mol TE/g dw}$), ble analysert for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene (n = 3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultatene er gitt som et gjennomsnitt for hver gruppe ± standardavvik..... 37
- Tabell 6:** Inhiberende effekt av pulserende elektrisk felt (PEF) ekstrakter og solid liquid ekstrakter (SLE) fra *Alaria esculenta* på bakteriene *Listeria innocua* og *Pseudomonas fluorescens*. Kun PEF-ekstraktene behandlet med elektrisk feltstyrke (E) = 4 kV/cm ble benyttet. Inhiberingseffekten er gitt som log-reduksjon CFU/mL, som representerer forskjellen mellom den gjennomsnittlige cellekonsentrasjonen (CFU/mL) til målorganismen (positiv kontroll), og cellekonsentrasjonen til målorganismen som ble tilsatt ekstrakt..... 40
- Tabell 7:** Oversikt over de ulike parameterinnstillingene benyttet under optimaliseringen av innstillingene for pulserende elektrisk felt (PEF)-maskinen for ekstraksjon av bioaktive forbindelser,

konsentrasjonen av frysetørket *Alaria esculenta* i PEF-kammeret og erfaring/lærdom fra hver testrunde..... II

Tabell 8: Gjennomsnittlig konduktivitet for prøvene med *Alaria esculenta* før og etter pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling med totalvolum 9 mL. Konduktivitet ble også målt etter PEF-behandling og 2 timer passiv ekstraksjon, men her var totalvolum 10 mL og disse dataene er derfor ikke umiddelbart sammenlignbare med de andre. Datasettet for målinger før PEF bestod av seks prøver. Datasettet for målinger etter PEF (9 mL) bestod av ni prøver, der alle ble behandlet med elektrisk feltstyrke (E) = 6 kV/cm..... II

Tabell 9: Korrelasjonen (r) mellom kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC), pH), antioksidant kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)), og temperaturøkning, ble målt for pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid liquid ekstraktene (SLE) av *Alaria esculenta* med Pearsons parvise korrelasjonsanalyse. Resultater for korrelasjonen mellom de ulike kjemiske karakteristikkene er også presentert. * indikerer signifikant korrelasjon $p < 0,05$ III

1 Innledning

Marine makroalger er en spennende ressurs med et stort, framtidig brukspotensial på grunn av sin kjemiske sammensetning, tilgjengelighet og mangfold (Lourenço-Lopes et al., 2020). Deres kjemiske sammensetning karakteriseres av et høyt innhold av proteiner, karbohydrater og vitaminer. I tillegg inneholder de bioaktive forbindelser som polyfenoler, karotenoider og polysakkarider, med både antioksidative og antimikrobielle egenskaper (Ciko et al., 2018). Dette er egenskaper som gjør dem interessante for industrier som næringsmiddelproduksjon, farmasi, kosmetikk og bioteknologi (Patra et al., 2018). For eksempel kan de benyttes som konserveringsmidler, funksjonelle ingredienser i matprodukter eller til produksjon av aktiv emballasje.

Tradisjonelle metoder for å ekstrahere bioaktive forbindelser fra råstoff, benytter organiske løsemidler som etanol, aceton, heksan, m.m. På grunn av bekymringer knyttet til disse løsemidlenes negative påvirkning på helse og miljø, er det av interesse å utvikle mer miljøvennlige metoder for ekstraksjon (Socas-Rodríguez et al., 2021). Utover dette er det en økende etterspørsel etter naturlige antioksidanter i næringsmiddelindustrien, da enkelte syntetiske antioksidanter (f.eks. BHT og BHA) er omdiskutert på grunn av sin mulige kobling til uønskede helseeffekter hos forbruker (Galal et al., 2024).

Alaria esculenta (*A. esculenta*) er en brun makroalge som har vist seg som et lovende råstoff for ekstraksjon av bioaktive forbindelser. Castejón et al. (2021) fant at pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstrakter av islandsk *A. esculenta* hadde høyere innhold av polyfenoler (> 400% økt utbytte) og flavonoid-forbindelser (> 260% økt utbytte), samt at de viste større antioksidativ kapasitet enn grønnalgen *Ulva lactuca* og rødalgen *Palmaria palmata*. I tillegg har PEF-assistert ekstraksjon vist seg som en lovende metode for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, med potensial for høyere utbytte og effektivitet (Einarsdóttir et al., 2022).

1.1 Målformulering

Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke om PEF-teknologi som forbehandling for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra makroalgen *A. esculenta*, gir et økt utbytte sammenlignet med den tradisjonelle ekstraksjonsmetoden, solid-liquid ekstraksjon (SLE). Ekstraktene skal også analyseres og sammenlignes med hensyn til kjemisk karakteristikk, samt deres antioksidative og antimikrobielle egenskaper.

For å oppnå hovedmålet ble følgende delmål utarbeidet:

1. Optimalisere PEF-parameterne elektrisk feltstyrke (E) og antall pulser (nP) for å bestemme de optimale betingelsene for økt utbytte av bioaktive forbindelser. Ekstraktenes bioaktivitet vil vurderes underveis ved å analysere totalt polyfenolinnhold (TPC) og fukoxantin.
2. Kvantifisering av ekstraktenes antioksidantegenskaper, ved å benytte analysene ABTS, DPPH og FRAP.
3. Kvantifisering av ekstraktenes antimikrobielle egenskaper, ved å undersøke deres inhiberende effekt på vekst av bakteriene *Listeria innocua* og *Pseudomonas fluorescens*.

Problemstillingen for denne oppgaven lyder som følger:

Er pulserende elektrisk felt (PEF)-teknologi en egnet forbehandling for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra Alaria esculenta?

Denne oppgaven vil bidra til eksisterende litteratur på to måter. For det første ved å utvide forskningen på PEF-teknologi, som fremdeles er en relativt ny metode med behov for ytterligere studier og data. For det andre ved å gi innsikt i om *A. esculenta* er et egnet råstoff for ekstraksjon med PEF-teknologi, og om denne metoden kan redusere bruken av organiske løsemidler i ekstraksjonsprosessen.

1.2 Bærekraftsperspektiv

Mer miljøvennlig ekstraksjon av bioaktive forbindelser med PEF-teknologi fra *A. esculenta* kan knyttes til flere av FNs bærekraftsmål (Figur 1) (FN-sambandet, 2024). Bærekraftsmål nr. 3 belyser behovet for god helse, og relateres til oppgavens mål om å redusere bruken av kjemikalier som etanol, aceton og heksan. Videre kan antioksidanter fra ekstraktene potensielt brukes som naturlige konserveringsmidler i mat og aktiv emballasje, og dermed bidra til mål nr. 12 om ansvarlig forbruk og produksjon, ved å forlenge matens holdbarhet og redusere matsvinn.

Oppgaven relateres også til bærekraftsmål nr. 8 og 9, som blant annet omhandler økonomisk vekst og industri, ved at den forsøker å bidra til å oppheve koblingen mellom økonomisk vekst og en negativ miljøbelastning. Ved å benytte PEF-teknologi til å omdanne lite utnyttede ressurser fra sjøen til høyverdiprodukter, kan man bidra til økonomisk vekst fra en mer bærekraftig industri. Dette kan videre føre til at det blir mer attraktivt å satse på makroalgenæringen og initiativer til å utnytte den resterende biomassen til andre formål.

Ifølge Hasselström et al. (2018) har svensk makroalgeproduksjon vist seg å ha positive effekter på mange økosystemtjenester langs kysten. Dersom denne oppgaven kan bidra til økt utvikling av makroalgenæringen, vil den derfor kunne bidra positivt til bærekraftsmål nr. 14 om livet i havet. I tillegg kan en eventuell økt produksjon av biomasse fra makroalger bidra til å redusere presset på landbaserte økosystemer, hvor det produseres biomasse som kan erstattes av makroalger. Redusert press på matjord og andre landbaserte økosystemer vil kunne bidra positivt til bærekraftsmål nr. 15 om livet på land.



Figur 1: Utvalg av FNs bærekraftsmål som er relevante for oppgaven. Hentet fra: (FNs bærekraftsmål, 2024).

2 Teori

2.1 Makroalger

Makroalger, eller «tang og tare» på folkemunne, er en mangfoldig gruppe planteliknende, marine organismer som vokser langs kysten med rundt 12.000 kjente arter i verden. Det antas at omtrent 500 arter vokser langs norskekysten (Johansen, u.å.). Makroalger er den dominerende primærprodusenten i kystsonen og de former grunnlaget for mange marine næringskjeder (Krause-Jensen & Duarte, 2016). De er ytterligere en stor komponent i biosfæren og er antatt å danne de mest omfattende og produktive habitatene blant alle kystnære (marine), vegetative økosystemer (Duarte et al., 2022). I likhet med landplanter har også makroalger fotosyntese (Johansen, u.å.).

Makroalger er multicellulære, makroskopiske, autotrofe og eukaryote organismer som varierer betraktelig med hensyn til størrelse, form og levevis (Johansen, u.å.; Leandro et al., 2019). Størrelsesvariasjonen strekker seg fra de minste som er mindre enn 1 mm i størrelse, og helt til de største som kan bli opptil 65 m lange. Ulike arter kan ha ulik form, hvor de kan være trådformete, bladlignende, buskelignende, m.m. (Johansen, u.å.). Makroalger inndeles taksonomisk i tre store hovedgrupper (*phyla*) basert på fargen de har på *tallus* og kjemisk struktur: *Chlorophyta* (grønnalger), *Phaeophyceae* (brunalger) og *Rhodophyta* (rødalger) (Leandro et al., 2019).

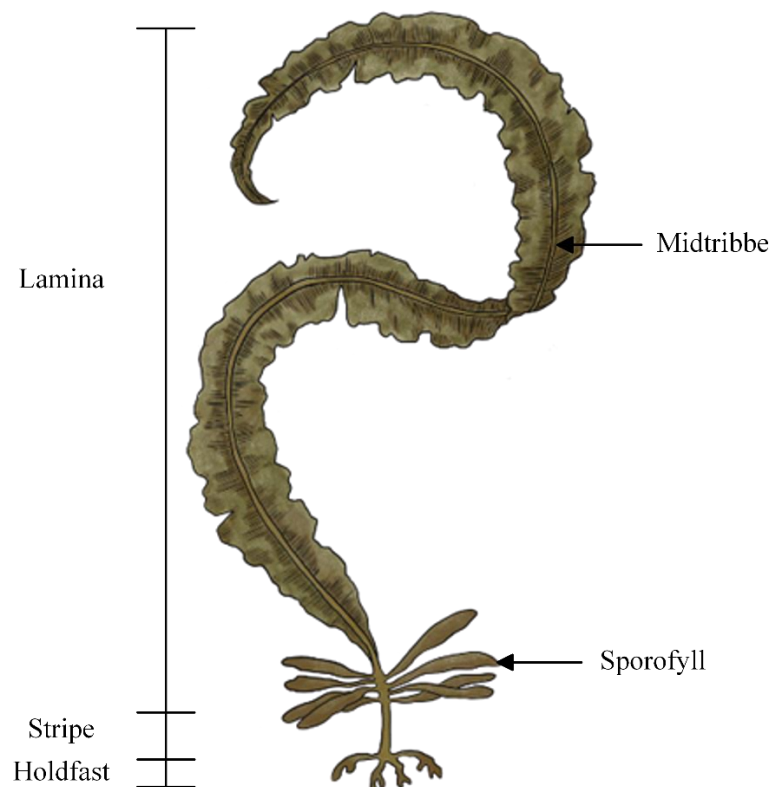
Det har vært en økende interesse for dyrking av tare langs kysten i Norge siden 2014 (Blikra et al., 2020). I 2022 var det 221 konsesjonstillatelser i drift fordelt på 25 selskaper over 105 lokaliteter langs norskekysten (Fiskeridirektoratet, 2023, 2024a, 2024b). Sukkertare er dominerende på popularitet, tett fulgt av butare og fingertare. Da makroalger lett kan dyrkes eller høstes fra kystområder, kan det produseres en stor andel biomasse uten behov for store landområder og uten at produksjonen går på bekostning av dyrkbar jord (Wan et al., 2019). Det var i en periode visjoner om produksjon av biodiesel fra tare, men høye kostnader har gjort at fokuset heller er blitt rettet mot produksjon av produkter med høyere markedsverdi. Slike produkter omfatter ingredienser i fôrindustri, mat og kosmetikk (Blikra et al., 2020).

Næringsinnholdet i makroalger kan i likhet med landplanter variere betraktelig mellom arter, slekter, divisjoner, årstider og steder. Sett bort ifra den generelle næringsverdien inneholder tang også en rekke pigmenter, forsvars- og lagringsforbindelser og sekundære metabolitter som kan ha gunstige effekter på dyr når de blir inkludert i fôret (Wan et al., 2019).

2.2 *Alaria esculenta*

Brunalger er den største og mest komplekse gruppen av makroalger og de omfatter omtrent 2000 arter i rundt 300 slekter (Cheng et al., 2022; Kawai & Henry, 2016). Fokuset i denne bacheloroppgaven er brunalgen *Alaria esculenta* (*A. esculenta*).

A. esculenta, også kjent som butare på norsk, er en bredt distribuert og spiselig type brunalge tilhørende familien *Alariaceae* og orden Laminariales (BIOTIC, u.å.). Fargen på tallusen er grønn-gul-brun og kan deles inn i tre deler: holdfast, stripe og lamina (Figur 2). Butaren er karakterisert av dens klart definerte midtribbe og de hakkede endene på lamina (Seaweed Solutions, u.å.). Laminaen vokser typisk til et maksimum på 2-3 meter i lengde og midtribben forgrener seg til bølgete blader opp til 7 cm brede på hver side (BIOTIC, u.å.; Seaweed Solutions, u.å.). Langs de øvre delene av stripen vokser det sporofyller som produserer haploide sporer (zoosporer) som brukes til formering (BIOTIC, u.å.; Kraan, 2020).



Figur 2: Skisse av *Alaria esculenta*, med markerte seksjoner for lamina, stripe og holdfast, samt sporofyll og midtribbe. Modifisert etter (Kraan, 2020).

A. esculenta vokser i kalde klima med god vannutveksling (Seaweed Solutions, u.å.) og den vokser naturlig i Europa, spesielt langs kysten hvor den er utsatt for kraftige bølger. Dette inkluderer områder slik som Norge, Svalbard, Atlanterhavskysten til Frankrike, Storbritannia, Nederland og Island (Seaweed Solutions, u.å.). Veksthastigheten er relativt høy sammenlignet med andre alger da den vokser med 5,5% per dag, og oppnår en kapasitet på omtrentlig 2 kg våtvekt per kvadratmeter.

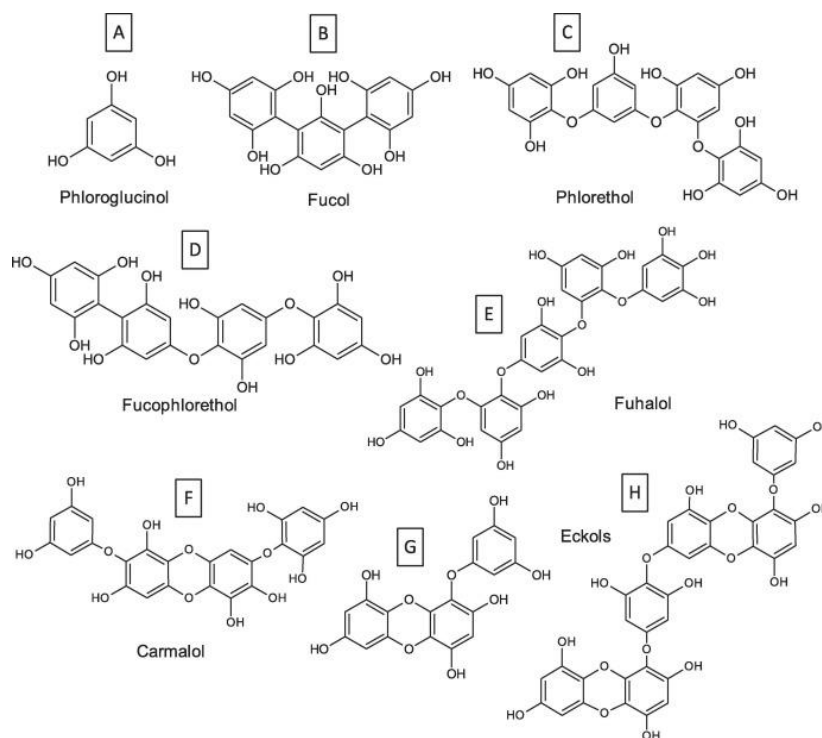
A. esculenta er rik på næringsstoffer som kalsium, og mange vitaminer. Spesielt er den rik på vitamin A, K, C og flere B-vitaminer. *A. esculenta* har også et meget høyt innhold av kostfiber. Videre finner vi flere gunstige mineraler som magnesium, jern, kalium og jod. Det er likevel verdt å merke seg at innholdet av mineraler og tungmetaller i taren kan utgjøre opptil 15% av tørrvekten (Blikra et al., 2020). Taren har riktignok ikke like høyt innhold av jod som sukkertare, med 220-1798 µg/g tørrvekt mot sukkertare sine 1700-5300 µg/g tørrvekt (Blikra et al., 2020). Likevel er jodnivået noe høyt og det bør tas høyde for ved konsum av taren, spesielt hvis den konsumeres i tørket tilstand. Til sammenlikning rapporterer Blomhoff et al. (2023) at en foreløpig gjennomsnittlig anbefaling av inntak av jod ligger på 120 µg/dag for kvinner og menn. Flere studier har imidlertid vist at det er mulig å redusere innholdet av jod i tare ved enkle prosesseringsmetoder slik som koking (Blikra et al., 2020). Videre poengterer Blikra et al. (2020) at det ofte finnes høye konsentrasjoner av tungmetaller i tare, og for *A. esculenta* er spesielt innholdet av kadmium noe høyt på 1,2-3,4 µg/g tørrvekt. Innholdet av kadmium er problematisk da det akkumuleres i kroppen og kan forårsake en rekke skadelige helseeffekter.

I tillegg til tarens næringsinnhold er den også rik på en rekke forbindelser med høy bioaktivitet. Blant disse forbindelsene finner vi blant annet ulike pigmenter, polysakkarider og fenoliske forbindelser, inkludert polyfenoler (Lomartire & Gonçalves, 2022).

2.2.1 Bioaktive forbindelser hos *Alaria esculenta*

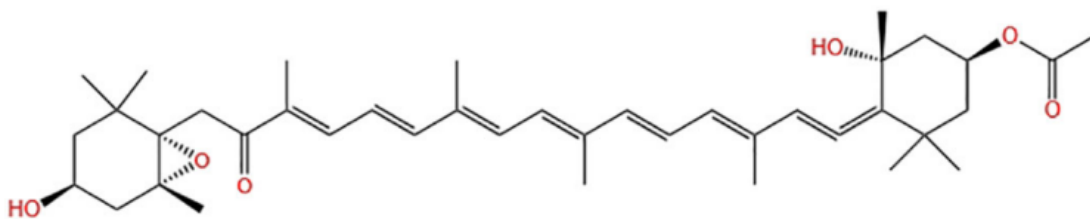
A. esculenta har fra tidligere studier vist seg å være en lovende kilde til bioaktive forbindelser som polyfenoler, fukoxantin og polysakkarider (Einarsdóttir et al., 2022). Bioaktive forbindelser er stoffer som forekommer naturlig, og som har spesialiserte biologiske funksjoner som for eksempel antioksidative og antimikrobielle egenskaper (Zepka et al., 2021). Bioaktive forbindelser utgjør et svært variert sett molekyler med ulike kjemiske strukturer og opphavssteder i naturen (Zepka et al., 2021).

Mange brunalger, inkludert *A. esculenta*, har et høyt innhold av polyfenoler. Disse molekylene er utbredt i naturen, og finnes i mange typer frukt, grønnsaker og andre plantebaserte næringsmidler. Polyfenoler er blant de største gruppene sekundærmetabolitter i planter, og spiller en viktig rolle i plantens forsvarsmekanisme mot angrep og andre stressfaktorer som ikke-optimale temperaturer, lysforhold og pH-forhold (Dias et al., 2016). Polyfenolene er en mangfoldig gruppe med stor variasjon innad, som generelt karakteriseres av aromatiske ringer med en eller flere hydroksylgrupper (Tijjani et al., 2020). De er relativt hydrofile på grunn av sin fenoliske struktur, er mest stabile ved lav pH, og kan være sensitive til både varme, lys og oksygen (Tsao, 2010). I *A. esculenta* forekommer polyfenolene stort sett som florotanniner (Einarsdóttir et al., 2022), som er halogenerte oligomerer og polymerer av floroglukinol (Mannino et al., 2017) (Figur 3). Innholdet av florotanniner varierer med algens karakteristikk som størrelse og alder, miljøfaktorer som temperatur og salinitet, samt geografiske faktorer og høstetidspunkt (Mannino et al., 2017; Røsten, 2023).



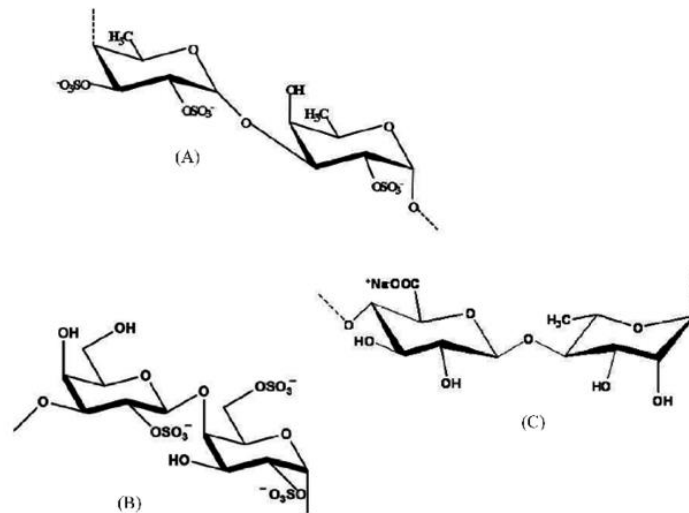
Figur 3: Polyfenolet floroglucinol (A) som finnes i brunalger, og eksempler på florotanniner, med deres kjemiske strukturer. Ringstrukturene gir mulighet for delokalisering av elektroner. Hentet fra (Erpel et al., 2020)

Fukoxantin er et karotenoid, som sammen med klorofyll er stoffet som i hovedsak står for fargen hos brunalger (Blikra et al., 2019; Einarsdóttir et al., 2022). Marine mikro- og makroalger regnes som hovedkildene til fukoxantin (Jafari et al., 2023). Pigmentet er kjent for å ha effekt mot en rekke sykdommer og helseplager, deriblant kreft, diabetes type II, overvekt, høyt kolesterol, betennelsesykdommer og malaria (Shannon & Abu-Ghannam, 2017). Omfanget av helseeffekter tilegnes de mange ulike funksjonelle gruppene til molekylet, illustrert i Figur 4 (Gong et al., 2024). I tillegg til 9 konjugerte dobbeltbindinger, har fukoxantin funksjonelle grupper som hydroksyl-, epoksy-, karbonyl- og karboksylgrupper (Jafari et al., 2023). Den kjemisk aktive strukturen gjør også molekylet ustabil, og det degraderer raskt ved eksponering for lys, varme, enzymer, oksygen og andre prooksidanter (Jafari et al., 2023). Disse egenskapene, samt lav løselighet i vann og lav tilgjengelighet, begrenser anvendelsen av fukoxantin som bioaktiv ingrediens i mat- eller farmasøytindustrien i dag, men forbedring av stabiliteten er et forskningsrelevant tema (Jafari et al., 2023). *A. esculenta* har vist seg å kunne gi høyt utbytte ved ekstraksjon av fukoxantin i forhold til flere andre brunalger (Shannon & Abu-Ghannam, 2017).



Figur 4: Strukturen til fukoxantin, et karotenoid som finnes i brunalger. Molekylet har en kjemisk aktiv propylen-struktur med ni konjugerte dobbeltbindinger og seks oksygenatomer, med funksjonelle grupper som hydroksyl-, epoksy-, karbonyl- og karboksylgrupper. Hentet fra (Gong et al., 2024).

Polysakkarider i brunalger finnes i celleveggen, og gir fleksibilitet. Noen polysakkarider som agar og alginat benyttes mest for sine geleringssegenskaper, mens sulfaterte polysakkarider som fucoidan (Figur 5) har vist høy bioaktivitet, mye på grunn av sine sulfatgrupper (Kadam et al., 2015; Oftebro, 2022). Graden av bioaktivitet i disse polysakkaridene avhenger av faktorer som molekylær vekt, innhold av sulfatert ester, posisjonen til sulfatgruppen og grad av glykosidisk forgrening (Qi et al., 2005).



Figur 5: Tre eksempler på sulfaterte polysakkarider fra marine alger. (A) fucoidan fra brunalger, (B) karragenan fra rødalger og (C) ulvan fra grønnalger. Hentet fra (Li & Kim, 2011).

2.2.2 Antioksidantegenskaper hos ekstrakter fra *Alaria esculenta*

Antioksidanteffekten hos polyfenoler skyldes sammensetningen av fenolringer, hvor delokalisering av π -elektronet på hver ring gjør at disse molekylerne er effektive som radikalfangere (Buøen & Rustad, 2020; Zepka et al., 2021). Florotanniner som vi finner i brunalger har unike molekyllære strukturer med opptil åtte sammenhengende ringer (Figur 3, kap. 2.2.1), som gjør dem til sterke antioksidanter sammenlignet med mange andre polyfenoler fra planteriket, som har færre ringer (Wang et al., 2009).

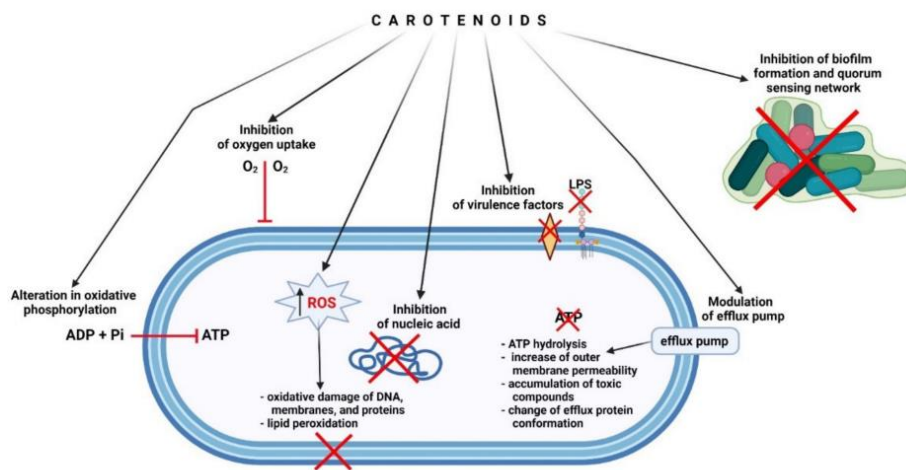
Fukoxantin med sine seks oksygenatomer og mange konjugerte dobbeltbindinger gir mulighet for delokalisering av elektroner langs molekylet, og den er en effektiv antioksidant (Gong et al., 2024). Molekylet er svært reaktivt med frie radikaler ved hjelp av mekanismer som elektronoverføring, dehydrogenering og addisjon (Gong et al., 2024). Fukoxantin kan dessuten modifisere betennelser og skader i huden som følge av UV-stråling og fotooksidativt stress, og kan dermed inkorporeres i solkrem for å beskytte huden mot skader fra stråling (Gong et al., 2024).

Sulfaterte polysakkarider fra marine alger har også vist seg å ha antioksidative egenskaper som radikalfangere. Strukturelle karakteristikk som grad av sulfatering, molekyllær vekt, type sukker og glykosidisk forgrening påvirker graden av antioksidativ effekt hos disse molekylerne. Sulfaterte polysakkarider med lav molekyllær vekt har for eksempel vist seg å kunne donere protoner mer effektivt enn større molekyler, og dermed ha bedre antioksidativ effekt (Li & Kim, 2011).

2.2.3 Antimikrobiell effekt hos ekstrakter fra *Alaria esculenta*

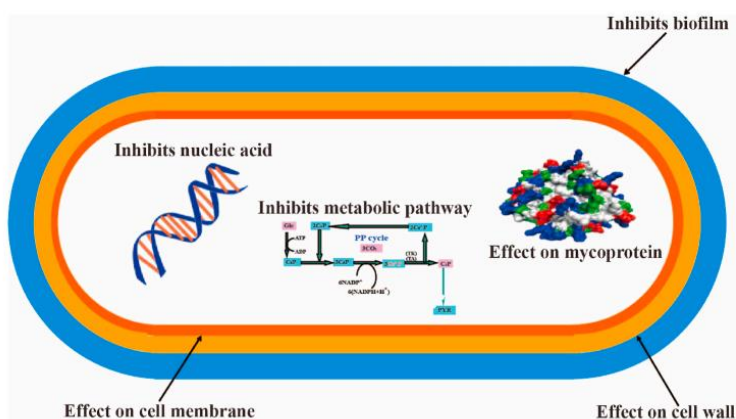
Polyfenoler har vist antimikrobiell effekt mot både gram-negative og gram-positive bakterier i *in vitro* studier, men på grunn av stor strukturell variasjon innad i gruppen har det vært vanskelig å tilegne de antimikrobielle effektene til spesifikke strukturer eller grupper av polyfenoler (Papuc et al., 2017). Papuc et al. (2017) har oppsummert funn fra flere ulike studier med forslag til mekanismer som kan ligge bak de antimikrobielle egenskapene. Effekten kan stamme fra de mange OH-gruppene bundet til både de aromatiske ringene og til den oksygensubstituerte ringen. Ryggradsstruktur, glykosidiske bindinger, antall OH-grupper samt deres posisjon og grad av alkylering har også innvirkning på graden av antimikrobiell effekt. Polyfenoler kan påvirke celleveggen hos bakterier. Gram-negative bakterier er mer resistente mot denne virkningen enn gram-positive, på grunn av innholdet av lipopolysakkarider i celleveggen hos gram-negative bakterier, som hindrer polyfenoler i å binde seg til peptidoglykan (Papuc et al., 2017).

Fukoxantin har også vist antimikrobiell effekt mot både gram-negative og gram-positive bakterier (Gong et al., 2024). Molekylets inhiberende effekt på flere humanpatogener har blitt påvist, deriblant *Listeria monocytogenes* (Rajauria & Abu-Ghannam, 2013), *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* og *Staphylococcus aureus* (Gong et al., 2024). Mekanismene bak den antimikrobielle aktiviteten til fukoxantin er lite kjent, men Karpiński et al. (2021) beskriver noen sannsynlige mekanismer basert på slektskapet til andre karotenoider og terpenoider: direkte skade på celleveggen og -membranen hos bakterier, evnen til å øke permeabiliteten til cytoplasma og lekkning av stoffer herfra, depolarisering av cytoplasmamembranen, og evnen til å forstyrre aktiviteten til effluks-pumpen, som normalt fjerner uønskede stoffer i bakterien. Videre er oksidativ skade som følge av akkumulering av reaktive oksygentyper (ROS) også en virkning av terpenoider, samt inhibering av biofilmdannelse både hos bakterier og sopp. Noen studier anslår at fukoxantin kan inhibere nukleinsyredannelse, og inhibering av oksygenopptak og påvirkning på bakteriecellens oksidative fosforylering er foreslått som en mulig antimikrobiell mekanisme hos fukoxantin, som i all hovedsak virker mot aerobe bakterier (Gong et al., 2024; Karpiński et al., 2021). En illustrasjon av mulige antimikrobielle mekanismer hos karotenoider, deriblant fukoxantin, er vist i Figur 6.



Figur 6: Mulige antimikrobielle mekanismer hos karotenoider, deriblant evnen til å forstyrre aktiviteten til effluks-pumpen, inhibering av nukleinsyrer, skade på celleveggen, inhibering av virulensfaktorer, inhibering av oksygenopptak og inhibering av biofilmdannelse. Hentet fra (Karpiński et al., 2021).

Polysakkarider kan også ha flere ulike effekter mot bakterier, hvor noen eksempler er vist i Figur 7. Polysakkarider kan for eksempel inhibere biofilmdannelse hos bakterier på flere ulike måter, både ved å inhibere *quorum sensing*, muligheten for bakterien til å feste seg til overflater, og dannelsen av biofilm i seg selv (Wang et al., 2021). Videre har polysakkarider vist inhiberende effekt på effluks-pumpen hos bakterier, samt effekter på celleveggen permeabilitet, proteiner i cellemembranen og andre viktige celledfunksjoner hos bakterier (Wang et al., 2021).



Figur 7: Eksempler på antimikrobielle effekter hos polysakkarider, deriblant inhibering av biofilmdannelse, effekt på cellemembranen og celleveggen, inhibering av nukleinsyrer og inhibering av metabolske prosesser. Hentet fra (Wang et al., 2021).

2.3 Potensielle bruksområder for ekstrakter fra makroalger

Marine makroalger er en rik kilde til bioaktive forbindelser som kan ha en rekke ulike bruksområder. Med næringsmiddelindustrien i fokus kan disse forbindelsene benyttes som blant annet funksjonelle ingredienser i mat, som konserveringsmidler og som virkestoff i aktiv emballasje (Røsten, 2023).

Det har i nyere tid blitt en økende etterspørsel etter naturlige matvareingredienser, samt en økende misnøye og skepsis rundt syntetiske tilsetningsstoffer. Dette skyldes de skadelige helseeffektene forbundet med dem, slik som visse nevrologiske eller immunologiske tilstander som hyperaktivitet og allergier (Silva et al., 2020). Dette har satt i gang forskningen på nye, naturlige kilder til bioaktive forbindelser som kan benyttes til å blant annet bedre holdbarheten til mat, samt øke mattryggheten med hensyn til mikrobiell kontaminasjon. Marine makroalger er som nevnt rike på bioaktive forbindelser, hvor mange av disse forbindelsene har utvist en antimikrobiell effekt mot noen av de vanligste patogene mikroorganismene funnet i mat. Silva et al. (2020) påpeker at å benytte disse forbindelsene vil kunne være fordelaktig på flere måter; både ved å redusere mikrobiell kontaminasjon i mat og samtidig erstatte enkelte syntetiske tilsetningsstoffer, og ved dette øke produktenes attraktivitet for forbrukere, samt øke produktenes helsemessige verdi.

I motsetning til arter av grønn- og rødalger, har brunalger høye konsentrasjoner av fenolgruppen florotannin. Holdt og Kraan (2011) peker på brunalgers høye innhold av polyfenoler og florotannin og deres sterke antioksidative effekt, noe som gjør dem til sterke kandidater for utviklingen av antioksidanter for industrielle applikasjoner (Holdt & Kraan, 2011; Røsten, 2023). Thomas og Kim (2011) peker også på at florotanniner potensielt kan ha ulike farmakologiske anvendelser som anti-diabetisk og kreftbekjempende legemidler. Videre påpeker Røsten (2023) at bioaktiviteten til pigmenter funnet i makroalger har vist seg å være effektive mot kreft, fedme og for blodsukkerreduksjon.

Den siste tiden har algeekstrakter også blitt vurdert til å være gode kandidater for tilsetningsstoffer for konservering av mat, som ingrediens i tillaging av biologisk nedbrytbare filmer/emballasje eller kjerneingredienser i aktiv emballasje med flere funksjoner, som for eksempel anti-biofilm eller veksthemming (Silva et al., 2020).

Marine makroalger, som *A. esculenta*, inneholder store mengder polysakkarider, både i form av strukturelle elementer i cellevegger, men også i form av mykopolsakkarider og lagringspolysakkarider (Holdt & Kraan, 2011). Disse polysakkaridene har flere kommersielle

brukspotensialer i næringsmiddelindustrien som blant annet stabilisatorer, tykningsmidler, emulgatorer, mat og fôr (Holdt & Kraan, 2011).

Videre ble det, i forsøk gjort av Surendhiran et al. (2019), vist at inkorporering av makroalgeekstrakter i matemballasje ga lovende resultater. Studien testet bruk av biologisk nedbrytbare nanofibre laget av en blanding av natriumalginat og polyetylenoksid, innkapslet med florotannin, for å undersøke om disse aktive nanofibrene kunne forlenge holdbarheten til kylling ved å redusere veksten av *Salmonella enteritidis*. Florotannin viste seg å ha en sterk antimikrobiell effekt mot *S. enteritidis* og virket på flere nivåer i bakteriecellen, inkludert membranen, ATP-produksjonen, proteiner og DNA-et. Videre ble det vist en god antioksidativ effekt og sensorisk evaluering viste ingen endring i kyllingens kvalitet (Surendhiran et al., 2019).

2.4 Ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra makroalger

Bioaktive forbindelser fra makroalger kan ekstraheres på ulike måter. Effektiv ekstraksjon handler om å bruke minst mulig energi og løsemiddel til å oppnå høyt utbytte av ønskede forbindelser, noe som både kan være mer miljøvennlig og økonomisk. I tillegg handler det om å få ut ekstrakter av høy kvalitet som ikke er kontaminert av celler eller andre forbindelser (Wang et al., 2019). En utbredt, tradisjonell ekstraksjonsmetode er solid-liquid ekstraksjon (SLE). SLE innebærer å ekstrahere ut ett eller flere oppløste forbindelser fra et fast stoff ved å benytte et flytende løsemiddel (Baskar et al., 2019). SLE benytter ofte organiske løsemidler som n-heksan, metanol, DMSO, etanol, petroleum eter, dietyl eter, dimetyl eter, aceton eller etyl acetat (Baskar et al., 2019; Leandro et al., 2020). Disse konvensjonelle løsemidlene kan være skadelige for helse og miljø på grunn av sine egenskaper som brannfarlige, eksplosive, lite biologisk nedbrytbare og potensielt toksiske for sluttforbruker (Socas-Rodríguez et al., 2021). Både SLE og andre tradisjonelle ekstraksjonsmetoder, som Soxhlet apparatus og liquid-liquid ekstraksjon, bruker store volum løsemidler og krever lang ekstraksjonstid. I tillegg har de ofte lavt ekstraksjonsutbytte og lav selektivitet av bioaktive forbindelser (Michalak & Chojnacka, 2014). Med bakgrunn i dette er det et økende behov for mer miljøvennlige ekstraksjonsmetoder. En fremvoksende og lovende teknologi som kan benyttes er pulserende elektrisk felt assistert ekstraksjon.

2.4.1 Pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon

Pulserende elektrisk felt (PEF) er en ikke-termisk teknologi som sender elektriske pulser med høy spenning mot et produkt som ligger mellom to elektroder (Castejón et al., 2021; Lyng et al., 2016). Hensikten med metoden er å strukturelt endre cellemembranen for å øke dens permeabilitet i en prosess kalt elektroporering. Den høye spenningen gjør at det transmembrane potensialet overskrides slik at cellemembranen punkteres (Lyng et al., 2016). Den ledende teorien er at det dannes porer i cellemembranen som blant annet gjør at intracellulære forbindelser lettere kan diffundere ut i løsemiddelet (Einarsdóttir et al., 2022). Disse endringene i cellemembranen kan være enten reversible eller irreversible, avhengig av intensiteten på pulsene, cellekarakteristikk og innstilte parametere (Kanduser & Miklavcic, 2009; Raso et al., 2016). Dersom den elektroporete cellen gjenoppretter integriteten til cellemembranen, er endringen reversibel. Hvis elektroporeringen fører til permanent celledød, er endringen irreversibel (Raso et al., 2016).

PEF-teknologi har blitt anvendt som forbehandling for ekstraksjon av ulike bioaktive forbindelser fra plante- og dyrevæv (Shavandi et al., 2020). Elektroporeringen av cellene vil kunne gi økt utbytte av ønskede forbindelser, som antioksidanter og pigmenter, ved ekstraksjon (Donsì et al., 2010). Dette vil kunne redusere bruken av organiske løsemidler vanligvis brukes i tradisjonelle ekstraksjonsmetoder. Utover dette kan PEF gi ekstrakter av høyere kvalitet (*higher purity*) og redusere ekstraksjonstid og energibruk (Castejón et al., 2021; Shavandi et al., 2020).

Sentrale prosessparametere som er avgjørende for effektiviteten av PEF-behandlingen er elektrisk feltstyrke (eng: *electric field strength*), pulsfrekvens (eng: *pulse frequency*), behandlingstid (eng: *treatment time*) og spesifikk energitilførsel (eng: *specific energy input*) (Knoerzer et al., 2012; Shavandi et al., 2020).

Valg av riktig **elektrisk feltstyrke (E)** er sentralt for å oppnå tilstrekkelig elektroporering av cellene. Den må overgå cellens kritiske verdi for elektrisk feltstyrke – altså den maksimale verdien av elektrisk feltstyrke hvor cellemembranen ikke poreres. Celler har ulik kritisk verdi for elektrisk feltstyrke (Naliyadhara et al., 2022).

Pulsfrekvensen (f) defineres som antall pulser (nP) per sekund som leveres til prøvematerialet i kammeret, målt i Hertz (Hz). **Behandlingstid (t)** defineres som den totale tiden prøvematerialet utsettes for elektriske pulser. Den bestemmes av pulsbredden [μ s] og antallet pulser som uttrykt i Formel 1.

$$t = \text{pulsbredde } [\mu\text{s}] * \text{antall pulser} \quad (1)$$

Elektroporering skjer som følge av tilstrekkelig tilført energi under PEF-behandlingen. Mengden energi tilført prøven under PEF-behandling kan analyseres ved å regne ut **spesifikk energitilførsel (W)** som uttrykkes av mengden energi levert til systemet [kJ] delt på massen av prøven i kammeret [kg] som vist i Formel 2 (Rahmah et al., 2020).

$$W = \frac{\text{energi levert [kJ]}}{\text{masse av prøve [kg]}} \quad (2)$$

Disse parameterne påvirker graden av elektroporering av cellene og dermed potensialet for økt ekstraksjonsutbytte. Utover dette har prøvematerialets konduktivitet og temperatur betydning. Generelt er det mer utfordrende å behandle prøvemateriale med høy konduktivitet, da de fører til generering av høy strøm, som igjen begrenser intensiteten av det elektriske feltet som kan benyttes (Amiali et al., 2006). Høyere konduktivitet vil gi en større økning i temperatur på prøvematerialet under PEF-behandlingen (Amiali et al., 2006).

Det er nødvendig å optimalisere PEF-parameterne for det enkelte råstoff som benyttes og for forbindelsene man er interessert i å ekstrahere. For eksempel vil en høy elektrisk feltstyrke kunne føre til økt ødeleggelse av cellemembranen, som kan gi et høyere ekstraksjonsutbytte av intracellulære forbindelser. På den andre siden vil for høy elektrisk feltstyrke føre til større risiko for ohmsk oppvarming, som kan være uheldig for lite varmestabile ekstraksjonsprodukter. I tillegg vil det føre til et høyere energiforbruk. Energiforbruket bør ikke være betydelig høyere enn nødvendig ettersom et av målene med PEF-teknologi er å være energibesparende og et mer miljøvennlig alternativ. For å optimalisere parameterne til vårt råstoff og forbindelser er det hensiktsmessig å se på hva tidligere studier har funnet ut.

2.4.2 Anvendelse av pulserende elektrisk felt (PEF) som forbehandling til ekstraksjon

Som vist i Tabell 1, studerte Andreou et al. (2020) effekten PEF hadde på ekstraksjon av karotenoider, lykopen og polyfenoler fra rester fra tomatjuiceproduksjon (frø, skall og tomatkjøtt). De fikk et økt ekstraksjonsutbytte på opptil 56,4% av karotenoider ved bruk av PEF. Den antioksidative kapasiteten økte i korrelasjon med konsentrasjonen av karotenoider. Mengden ekstrahert lykopen økte fra 9,84 mg lykopen/100g tomatrester til 14,31 mg/100g for en PEF-behandling på 1,0 kV/cm og en behandlingstid på 7,5 ms. Polyfenolinnholdet doblet seg til 56,16 mg GAE/kg tomatrester med en PEF-behandling på 2 kV/cm og nP = 700, spesifikk energitilførsel på 22,8 kJ/kg (Andreou et al., 2020).

Tabell 1: Oppsummeringstabell fra ulike studier som har sett på ekstraksjon av ulike forbindelser med pulserende elektrisk felt (PEF). Tabellen viser prosentandel økt utbytte av ulike ekstraksjonsprodukt eller analysemetoder (karotenoider, polyfenoler, 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP)) fra ulike råstoff, hvilke parametere (elektrisk feltstyrke (E), frekvens, behandlingstid) som ble benyttet, og hvilken spesifikk energi (W) prøvene ble utsatt for.

Råstoff	Ekstraksjonsprodukt	Økt utbytte	E (kV/cm)	Frekvens (Hz)	Behandlingstid	W (kJ/kg)	Studie
Tomatrester	Karotenoider	56,4%	1	20	7,5 ms	28,5	(Andreou et al., 2020)
Tomatrester	Polyfenoler	100,9%	2	20	3,0 ms	22,8	(Andreou et al., 2020)
Appelsinskall	Polyfenoler	159%	7	1	15-150 µs	0,06-3,77	(Luengo et al., 2013)
Appelsinskall	Antioksidativ kapasitet (DPPH)	192%	7	1	15-150 µs	0,06-3,77	(Luengo et al., 2013)
<i>Alaria esculenta</i>	Polyfenoler	4,8%	8	1,2	10 min	-	(Castejón et al., 2021)
<i>Alaria esculenta</i>	Polyfenoler	38,7%	7,5	1,2	0,7 ms	9,3 ± 2,5	(Einarsdóttir et al., 2022)
<i>Alaria esculenta</i>	Antioksidativ kapasitet (FRAP)	15,4%	7,5	1,2	0,7 ms	9,3 ± 2,5	(Einarsdóttir et al., 2022)
<i>Alaria esculenta</i>	Antioksidativ kapasitet (DPPH)	11,1%	7,5	1,2	0,7 ms	9,3 ± 2,5	(Einarsdóttir et al., 2022)

Luengo et al. (2013) undersøkte ekstrakter fra appelsinskall etter PEF-behandling og fant at behandling med elektrisk feltstyrke på 1, 3, 5 og 7 kV/cm økte den antioksidative kapasiteten med henholdsvis 51%, 94%, 148% og 192% og økte polyfenolinnholdet med henholdsvis 20%, 129%, 153% og 159%, sammenlignet med de ikke-behandlede prøvene (Luengo et al., 2013).

Castejón et al. (2021) sammenlignet den grønne makroalgen *Ulva lactuca*, den brune makroalgen *Alaria esculenta* og den røde makroalgen *Palmaria palmata* ved ulike ekstraksjonsmetoder og kom fram til at ekstraktene fra *A. esculenta* ga høyest TPC-innhold, høyest utbytte av flavonoid-forbindelser, høyest antioksidative kapasitet og god anti-enzymatisk kapasitet. For PEF-behandlet *A. esculenta* økte utbyttet av TPC noe (4,8%) sammenlignet med ekstraksjon med varmt vann (fra 8,94 mg GAE/g dw til 9,37 mg GAE/g

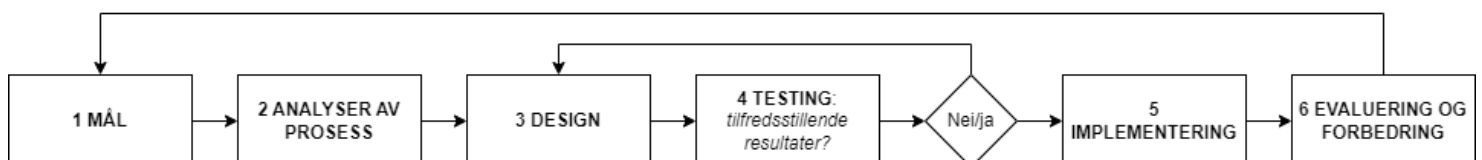
dw). Resultatene fra denne studien kunne imidlertid ikke vise til signifikante forskjeller i nevnte bioaktive forbindelser, antioksidativ kapasitet og anti-enzymatisk kapasitet hos ekstraksjon av *A. esculenta* med varmt vann og PEF (Castejón et al., 2021).

Einarsdóttir et al. (2022) utforsket ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta* ved bruk av PEF og ulike etanolkonsentrasjoner (0%, 15%). Studien viste at PEF-behandling kan forbedre ekstraksjonen av polyfenoler og karbohydrater, samt øke antioksidantaktiviteten i vannbaserte ekstrakter. Ekstraktene uten etanol (0%) (både med og uten PEF-behandling) hadde høyere innhold av polyfenoler sammenlignet med ekstraktene med konsentrasjon på 15% etanol. PEF-behandling av vannekstrakt medførte marginalt høyere innhold av polyfenoler enn uten PEF-behandling (38,7%). Den samme observasjonen ble gjort for FRAP-verdi og DPPH scavenging activity (hhv. 15,4% og 11,1%). For DPPH ble aktiviteten dobbelt så høy hos vannekstraktene kontra etanolekstraktene (Einarsdóttir et al., 2022).

2.5 Prosessoptimalisering

Prosessoptimalisering er en systematisk tilnærming til forbedring av en gitt prosess, for å oppnå maksimal effekt, utbytte og kvalitet (Numminen, 2023). Optimaliseringsprosessen kan deles inn i seks steg, ifølge Numminen (2023), som også er oppsummert i Figur 8:

1. Identifisere mål
2. Analysere nåværende prosesser
3. Designe prosessoptimalisering
4. Teste den optimaliserte prosessen
5. Implementere optimaliserte prosesser
6. Kontinuerlig evaluere og forbedre

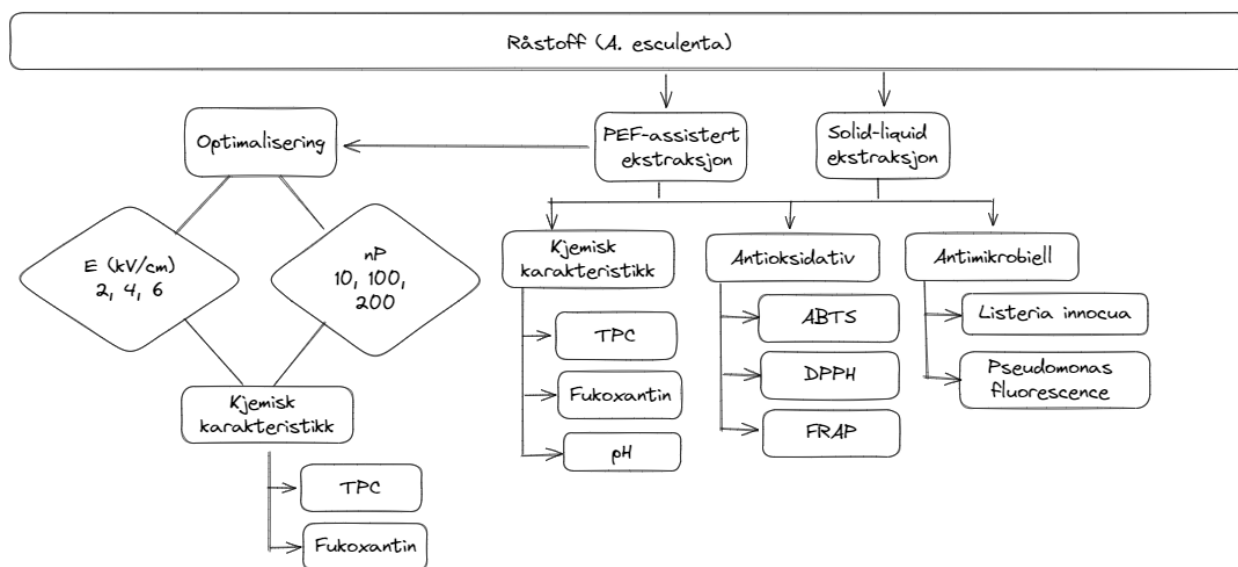


Figur 8: Prosessoptimalisering i 6 steg. Tilnærmingen er som regel kontinuerlig, og etter steg 6 settes et nytt mål (1), og stegene kan gjennomgås igjen. Metoden er hentet fra Numminen (2023).

Først må målet for optimaliseringsprosessen defineres **(1)**, for å kunne bestemme den beste fremgangsmåten videre. Målet kan for eksempel være å redusere svinn i produksjonen, effektivisere en tidkrevende prosess, eller oppnå maksimalt utbytte ved ekstraksjon av ønskede forbindelser fra et råstoff. Videre bør den nåværende prosessen analyseres **(2)**, for å identifisere hvilke områder i prosessen som kan forbedres for å nå målet. Det finnes mange måter å utføre en slik analyse på, blant annet gjennom prosessbeskrivelser eller rotårsaksanalyser. Prosessoptimaliseringen kan designes **(3)** etter at forbedringsområdene har blitt identifisert. Metodene og teknologien som trengs vil være avhengig av prosessen det gjelder. I tilfeller hvor for eksempel industrielt utstyr skal optimaliseres med hensyn til parameterinnstillinger, vil det være hensiktsmessig å designe et forsøk hvor effekten av ulike parameterinnstillinger kan testes opp mot hverandre under like betingelser. Deretter kan den designede, optimaliserte prosessen testes **(4)**, for å undersøke om målet har blitt nådd, og eventuelt på hvilke områder det er behov for forbedring. Dersom målet er å oppnå maksimalt utbytte av ønskede forbindelser fra et råstoff, kan produktet nå testes for aktuelle forbindelser og resultatene analyseres opp mot gamle verdier, og verdiene som eventuelt har blitt satt i målsetningen. Dersom resultatene er tilfredsstillende med hensyn til målet, kan den optimaliserte prosessen implementeres **(5)**, ellers kan et nytt design forsøkes i steg 3. Ytterligere overvåking og måling av prosessen kan være nødvendig for å sikre at optimaliseringen fremdeles gir tilfredsstillende resultater. Til slutt bør en prosess som oftest evalueres og forbedres kontinuerlig **(6)** for å oppnå inkrementell forbedring, hvor de seks stegene da gjentar seg selv og man kan identifisere nye mål man ønsker å jobbe mot.

3 Materialer og metoder

En oversikt over forsøksdesignet er oppsummert i figur 9. Ekstrakter av *A. esculenta* ble fremstilt både ved PEF-assistert ekstraksjon og SLE med to ulike løsemidler for SLE; vann og etanol:vann (30:70). PEF-ekstraktene ble optimalisert ved å teste for ulike verdier av elektrisk feltstyrke (E) og antall pulser (nP). Disse ble videre vurdert basert på sin kjemiske karakteristikk ved måling av TPC og innhold av fukoxantin. De optimaliserte ekstraktene og SLE-ekstraktene sine bioaktive egenskaper ble vurdert ved å sammenligne kjemisk karakteristikk, antioksidativ kapasitet og antimikrobielle egenskaper. Den kjemiske karakteristikken ble vurdert med utgangspunkt i TPC, innhold av fukoxantin og pH. Den antioksidative kapasiteten til ekstraktene ble undersøkt ved å utføre tre analyser; 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP). Den antimikrobielle effekten til utvalgte ekstrakter ble undersøkt ved å studere grad av inhibering på vekst av mikroorganismene *Listeria innocua* og *Pseudomonas fluorescens*.



Figur 9: Flytskjema som illustrerer forsøksdesignet for ekstraksjon fra *Alaria esculenta* med pulserende elektrisk felt (PEF) og solid-liquid ekstraksjon (SLE). Det ble først utført en optimalisering av ulike PEF-parametere (elektrisk feltstyrke (E) og antall pulser (nP)) på ekstraksjon av *Alaria esculenta*, vurdert av ekstraktenes kjemiske karakteristikk (totalt polyfenol-innhold (TPC) og fukoxantin-innhold). Det ble videre utført SLE som utgjorde sammenligningsgrunnlaget til de optimaliserte PEF-ekstraktene. Ekstraktenes bioaktivitet ble vurdert basert på kjemisk karakteristikk, antioksidativ kapasitet og antimikrobielle egenskaper. Kjemisk karakteristikk ble målt ved TPC, fukoxantin-innhold og pH. Antioksidativ kapasitet ble målt med tre analyser; 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP). Ekstraktenes antimikrobielle egenskaper ble målt ved å se på deres inhiberende effekt mot bakteriene *Listeria innocua* og *Pseudomonas fluorescens*.

3.1 Råstoff

Råstoffet som ble benyttet i denne oppgaven var *A. esculenta* dyrket ved toreanlegget Måsskjæra på Frøya av Seaweed Solution AS, høstet 09. mai 2023. Etter innhøsting ble taren lagret ved 4°C over natten i gjennomstrømmende sjøvann, før den ble pakket og fryst i porsjoner på 500 g. Råstoffet ble levert til NTNU Trondheim den 15. januar 2024, hvor det ble lagret ved -18°C inntil videre prosessering. Som forberedelse til frysetørrking ble 1 kg *A. esculenta* delvis opptint, hakket i mindre biter og lagret ved -80°C. Det ble deretter frysetørket (Christ Alpha 1-4 LD plus, Osterode am Harz, Tyskland) før det ble malt til et homogent pulver ved bruk av kaffekvern (Rommelsbacher EGK200, Dinkelsbühl, Tyskland). Pulveret ble vakuumpakket i poser på 10 g, og lagret ved -80°C.

3.2 Ekstraksjon

Ekstraktene i oppgaven ble fremstilt ved bruk av to ulike metoder: SLE med to forskjellige løsemidler; avionisert vann og etanol:vann (30:70), og PEF som forbehandling til ekstrakter med kun avionisert vann som løsemiddel. Etanol:vann-ekstraktene representerte tradisjonelle ekstraksjonsmetoder, mens SLE med avionisert vann fungerte som sammenligningsgrunnlag for å undersøke effekten av PEF som forbehandling på vannbaserte ekstrakter. For å utgjøre et godt sammenligningsgrunnlag ble SLE- og PEF-ekstraktene behandlet så likt som mulig med tanke på forbehandling, ekstraksjonstid og lagring.

3.2.1 Solid-liquid ekstraksjon (SLE)

SLE ble utført med to ulike løsemidler, avionisert vann og etanol:vann (30:70) ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CAS: 64-17-5, VWR International, Radnor, USA). En prøvemengde på 0,1 g frysetørket *A. esculenta* ble tilsatt 4,5 mL løsemiddel og rehydrert over natten (20 ± 2 timer, ved 4°C). Prøvene ble så homogenisert ved 12 000 rpm i 1 minutt (Polytron PT-MR-3000, Kinematica AG, Littau, Sveits), tilsatt 4,5 mL løsemiddel til et totalvolum på 9 mL, og konduktiviteten (Hach, CDC40101, Loveland, USA) ble målt. Videre sto prøvene i ro i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble 1 mL løsemiddel tilsatt prøvene, til et totalvolum på 10 mL. Ekstraktene ble sentrifugert ved 4000 rpm i 10 minutter (Kubota, Model 2010, Tokyo, Japan) og deretter filtrert gjennom et rundfilter (S&S Rundfilter, Ø 110 mm, 589 Schwarzband/white ribbon) i trakt. Ekstraktens konduktivitet (Hach, CDC40101, Loveland, USA) og pH (Radiometer Analytical, PHM210, Villeurbanne, Frankrike) ble målt. Detaljer om konduktivetsmålingene finnes i Vedlegg 2, Tabell 10 og ekstraktens pH-verdi finnes i Vedlegg 2, Figur 21. Prøvene ble videre analysert for TPC før de ble lagret ved -80°C.

3.2.2 Pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon

Før PEF kunne benyttes som forbehandling til ekstraksjon fra *A. esculenta*, måtte prosessparameterne optimaliseres. Optimaliseringsprosessen er nærmere beskrevet i Vedlegg 1, og legger grunnlaget for de parameterinnstillingene som ble valgt.

PEF-behandlingen ble gjennomført i et PEF-system produsert av Elea (Elea Pulsed Electric Field, Quakenbrück, Tyskland). Systemet lager pulser med rektangulær unipolar bølgeform. PEF-behandlingen ble utført i batch-system med et behandlingskammer som rommer 10 mL, med en avstand på 2 cm mellom elektrodene.

Prøvene ble rehydrert på lik måte som vannekstraktene laget ved å benytte SLE (kap. 3.2.1). Prøvene ble deretter homogenisert (Polytron PT-MR-3000, Kinematica AG, Littau, Sveits) ved 12 000 rpm i 1 minutt, før de individuelt ble overført til behandlingskammeret, og restene skylt ut av prøverøret med 4,5 mL avionisert vann til et totalvolum i kammeret på 9 mL. Prøvene ble så satt inn i PEF-maskinen. Tre ulike verdier for E (2, 4, 6 kV/cm) og nP (10, 100, 200) ble testet, som vist i Tabell 2.

*Tabell 2: Oversikt over parameterinnstillingene som ble variert under forsøket med pulserende elektrisk felt (PEF)-assistert ekstraksjon fra *Alaria esculenta*. Parameterne som ble variert var elektrisk feltstyrke (E) (2, 4, 6 kV/cm) og antall pulser (nP) (10, 100, 200). Alle grupper ble testet i n = 3 paralleller.*

Gruppe	E (kV/cm)	nP
PEF 2-10	2	10
PEF 2-100		100
PEF 2-200		200
PEF 4-10	4	10
PEF 4-100		100
PEF 4-200		200
PEF 6-10	6	10
PEF 6-100		100
PEF 6-200		200

Resterende innstillinger var like for alle prøvene; frekvens på 5 Hz og pulsbredde på 5 μ s. Etter gjennomført PEF-behandling ble innholdet i kammeret pipettert ut og over i prøverør, i tillegg til 1 mL vann som ble brukt til å skylle ut rester fra kammeret, til et totalvolum i prøverøret på 10 mL. Konduktiviteten (Hach, CDC40101, Loveland, USA) og temperaturen (Comarck C42, Høvik, Norge) ble målt før og etter behandling, og data for disse målingene, samt registrert spesifikk energitilførsel, finnes i Vedlegg 2. Videre sto prøvene i ro i romtemperatur til en total ekstraksjonstid på 2 timer (inkludert tid brukt på PEF-behandling). Ekstraktene ble deretter

sentrifugert og filtrert som forklart for SLE (kap. 3.2.1). TPC-analyser ble utført før ekstraktene ble fryst ned ved -80°C fram til videre analyser.

3.3 Kjemisk karakteristikk

Ekstraktenes kjemiske karakteristikk ble vurdert ved å analysere for TPC, innhold av fukoxantin og pH. De kjemiske analysene ble brukt for å få en indikasjon på ekstraktenes bioaktivitet underveis i optimaliseringen av prosessparameterne for PEF (Vedlegg 1), samt i vurderingen av deres bioaktivitet.

3.3.1 Totalt polyfenolinnhold (TPC)

Totalt polyfenolinnhold ble målt ved hjelp av Folin-Ciocalteu metoden som beskrevet av Singleton et al. (1999), og modifisert etter Røsten (2023). Før analysen ble det laget standardløsninger med ulike konsentrasjoner av gallisk syre (0-20 mg/L, CAS: 5995-86-8, Merck, Darmstadt, Tyskland). Disse ble brukt til å beregne standardkurven, som finnes i Vedlegg 3, Figur 22. Ekstraktene ble fortynnet 1:2 (250 µL ekstrakt + 250 µL vann), og blankprøver med 96% etanol ble også forberedt.

Reagensrør ble tilsatt 500 µL fortynnet ekstrakt/standardløsning/blank, 500 µL Folin-Ciocalteu reagens (CAS: 00-00-0, VWR International, Radnor, USA) og 5 mL vann. Innholdet ble blandet med vortex-mikser, og inkubert i avtrekkskap i 3 minutter. Prøvene ble deretter tilsatt 1 mL 20 % Na₂CO₃ (Na₂CO₃ anhydret, CAS: 497-19-8, Merck, Darmstad, Tyskland) og 3 mL vann, blandet og inkubert mørkt i 1 time. Etter inkubasjon ble absorbansen målt ved 725 nm (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Duisburg, Tyskland), med vann som referanse. Det ble målt tre paralleller av alle ekstraktene (n = 3).

Totalt innhold av polyfenoler i *A. esculenta* uttrykkes som gram ekvivalenter av gallisk syre (eng: *Gallic Acid Equivalents* (GAE)) per 100 g tørrvekt (g GAE/100g tørrvekt).

3.3.2 Kvantifisering av fukoxantin-innhold

Mengden fukoxantin i ekstraktene ble detektert og kvantifisert ved hjelp av væskechromatografi (eng: *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)) etter en metode beskrevet av Røsten (2023). Det ble benyttet en normal fase HPLC (Agilent 1100 series, Waldbronn, Tyskland) med en YMC-Pack 30 kolonne (250 × 4,6 mm id, S-5 µm). Den mobile fasen besto av metanol:aceton (60:40, (CH₃OH, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA), (CAS: 67-64-1, VWR International, Radnor, USA)) og aceton:vann (60:40). Den mobile fasen hadde en strømningshastighet på 1 mL/min og kolonnen hadde en temperatur på 20 °C. Injeksjonsvolumet for hver prøve var på 20 µL, og hver prøve hadde en analysetid på 20 minutter. En standardkurve ble lagd ved å benytte en kommersiell standard for fukoxantin (CAS: 3351-86-8, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) med konsentrasjoner fra 0,093-1,490 mg/L. 100 µL av hver av ekstraktene ble filtrert (PES 0,22µm VWR International, Radnor, USA) over i HPLC-glass med innlegg (n = 3). Fukoxantin-innholdet ble detektert for ekstraktene ved 447 nm.

3.4 Antioksidative analyser

Ekstraktenes antioksidative kapasitet ble vurdert ved å utføre tre ulike analyser: 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) og ferric reducing antioxidant power (FRAP). ABTS og DPPH gir et mål på hvor godt forbindelser i ekstraktene fungerer som radikalfangere (eng: *radical scavengers*), mens FRAP måler evnen til å redusere jernioner. Alle målte ekstrakter ble utført i paralleller på 3 (n = 3), med unntak av etanol:vann-ekstraktene da den siste parallellen gikk tapt (n = 2).

3.4.1 Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)

ABTS-analysen ble utført som beskrevet av Re et al. (1999), Nenadis et al. (2004) og Nenadis et al. (2007), med mindre modifikasjoner etter Røsten (2023). En ABTS^{•+}-løsning ble lagd ved å blande 25 mL ABTS (7 mM, CAS: 30931-67-0, Merck, Darmstadt, Tyskland) med 440 µL kaliumpersulfat (K₂S₂O₈, 140 mM, CAS: 7727-21-1, Merck, Darmstadt, Tyskland). Løsningen ble dekket til med aluminiumfolie og sto over natten i romtemperatur. Dagen etter ble ABTS^{•+}-løsningen fortynnet med 80% metanol (CH₃OH, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA) til målt absorbans ved 734 nm var 0,75 ± 0,05 (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Duisburg, Tyskland). Avionisert vann ble benyttet som referanse.

For å verifisere metoden ble det laget en standardkurve med ulike konsentrasjoner av trolox (0-500 μM , $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, CAS: 53188-07-1, Merck, Darmstad, Tyskland) fortynnet med metanol (CH_3OH , 96%, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA). Ekstraktene ble fortynnet 1:4 (100 μL ekstrakt + 300 μL metanol (CH_3OH , 80%, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA)). Blankprøven besto av metanol (80%).

For analysen ble det i prøverør tilsatt 2 mL ABTS^{*+} -løsning og 200 μL fortynnet ekstrakt/standard/blank. Videre ble dette blandet og inkubert mørkt ved romtemperatur i 6 minutter. Deretter ble absorbansen målt ved 734 nm (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Duisburg, Tyskland), med avionisert vann som referanse.

Resultatene ble regnet ut og uttrykt som radical scavenging activity (RSA) [%] vist i Formel 3. Hvor A_{Sample} er målt absorbans til den enkelte prøve og A_{Blank} er målt absorbans til blankprøven.

$$RSA [\%] = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Blank}}}\right) * 100\% \quad (3)$$

3.4.2 Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

RSA [%] for ekstraktene ble også målt ved hjelp av DPPH, i henhold til metoden beskrevet av Thiansilakul et al. (2007) og Nenadis et al. (2007), med mindre modifikasjoner etter Røsten (2023). DPPH-løsningen ble tillaget ved at 5,92 mg DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, CAS: 1898-66-4, Merck, Oslo, Norge) ble løst i 100 mL etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 96%, CAS: 64-17-5, OQEMA, Tureby, Danmark), pakket i aluminiumsfolie og satt kjølig (4°C) over natten.

Det ble forberedt fem standardløsninger med ulike konsentrasjoner av trolox (0-500 μM , $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, CAS: 52188-07-1, Merck, Darmstad, Tyskland) fortynnet med metanol (CH_3OH , 96%, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA). Det ble videre forberedt en blankprøve av metanol (80%), og ekstraktene ble fortynnet 1:3 (0,5 mL ekstrakt + 1 mL metanol (80 %)).

Prøvene ble forberedt ved å tilsette 1,5 mL ekstrakt/standard/blank og 1,5 mL DPPH i hvert prøverør og vortex-mikset. Prøvene ble inkubert mørkt ved romtemperatur i 30 min før de ble overført til kyvetter, og absorbansen målt ved 517 nm (Shimadzu UV-1800, Shimadzu, Duisburg, Tyskland). Av standardene ble det fremstilt en standardkurve som kun ble brukt til å verifisere metoden. Etanol (96%) ble brukt som referanse. RSA [%] for ekstraktene ble beregnet ved hjelp av Formel 3 i kapittel 3.4.1.

3.4.3 Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)

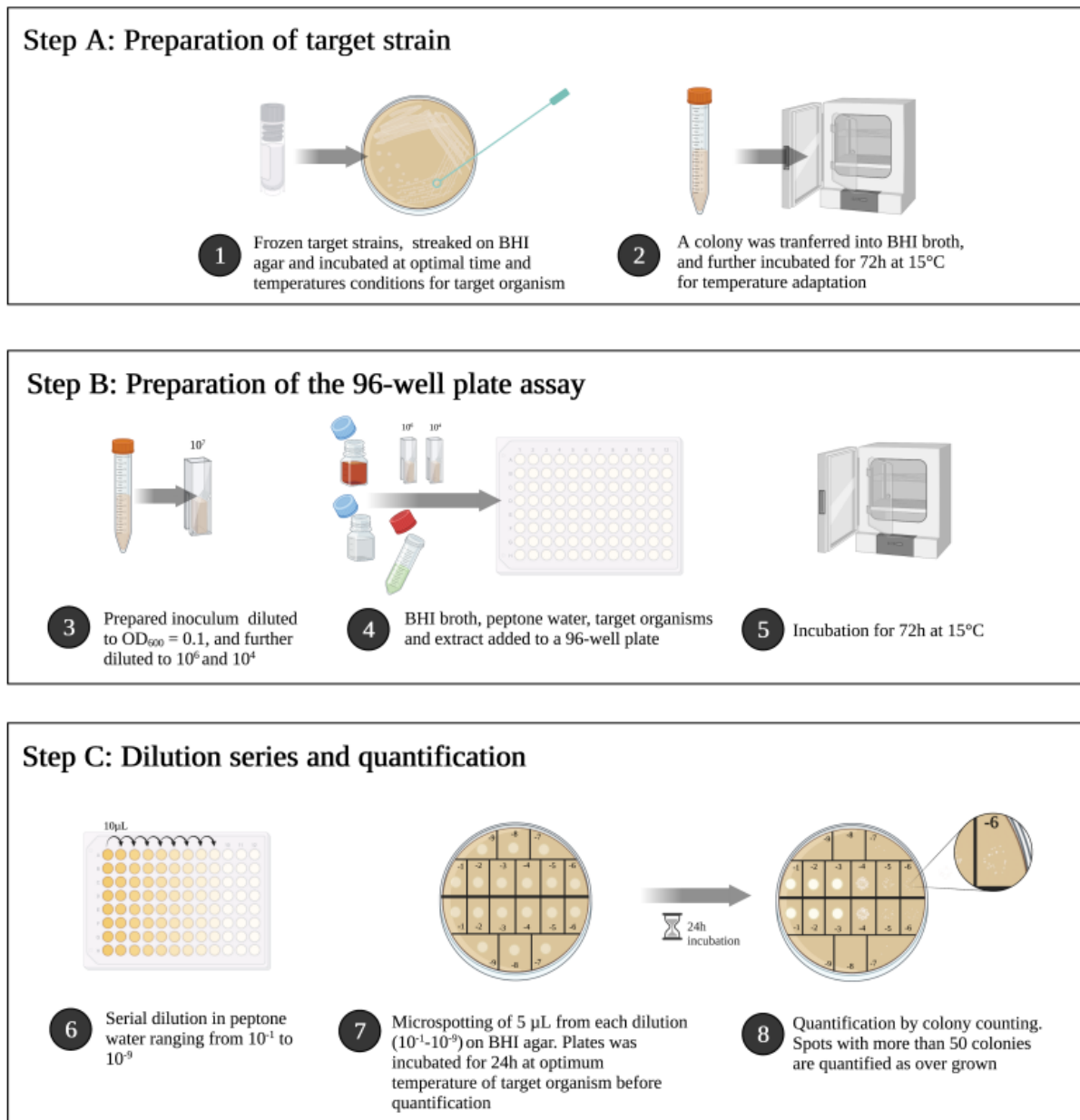
Ekstraktene ble også analysert for antioksidantkapasitet med FRAP, og analysen ble utført i henhold til metoden beskrevet av Benzie og Strain (1996), med mindre modifikasjoner etter Røsten (2023). FRAP-løsningen ble lagd ved å blande 19 mM Fe(III)-klorid-6-hydrat (CAS: 10025-77.1, Merck, Darmstad, Tyskland), 10 mM 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ, CAS: 3682-35-7, Merck, Darmstad, Tyskland) oppløst i 40 mM saltsyre (HCl, CAS: 7647-01-0, Merck, Darmstad, Tyskland), og acetatbuffer (1,505g natriumacetat (99% anhydrous, CAS: 127-09-3, Alfa Aesar, Haverhill, USA) + 8,0 mL eddiksyre (CAS: 64-19-7, Merck, Darmstad, Tyskland) tilsatt 500 mL avionisert vann, pH = 3,75). FRAP-løsningen ble inkubert ved 37°C frem til bruk.

Standardløsninger ble klargjort med trolox (0,005g, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-karboksylyse, C₁₄H₁₈O₄, CAS: 53188-07-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) løst i 20 mL metanol (CH₃OH, 96%, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA), og fortynnet med avionisert vann til konsentrasjoner fra 31,25-1000 µM. Standardkurven var lineær mellom 31,25-1000 µM trolox og kan sees i Vedlegg 3, Figur 23.

Analysene ble deretter utført i en 96-brønnsplate der hver brønn ble tilsatt 10 µL ekstrakt/standardløsning, 30 µL avionisert vann og 300 µL FRAP-løsning. Platen ble inkubert ved 37°C i 30 minutter før absorbansen ble målt ved 593 nm (PowerWaveXS Microplate, Biotek®, koblet opp mot Gen5 2.0 dataanalyseprogram). Blankprøver ble forberedt på samme måte, med avionisert vann til erstatning for ekstrakt/standardløsning. Resultatene ble uttrykt i µmol trolox ekvivalenter (TE) per g tørrvekt (µmol TE/g tørrvekt) biomasse av *A. esculenta*.

3.5 Antimikrobielle analyser

Den antimikrobielle effekten til ekstraktene ble målt med hensyn til hemming av vekst hos *Listeria innocua* (*L. innocua*) og *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). Den antimikrobielle effekten ble undersøkt ved en inhiberingsanalyse utført i en 96-brønnsplate etter metoden beskrevet av Stupar et al. (2021) og Røsten (2023). Til analysen ble PEF-ekstraktene som var forbehandlet med 4 kV/cm (nP = 10, 100 og 200), og vannekstraktene uten PEF-behandling benyttet. Valget av de benyttede PEF-ekstraktene ble gjort på bakgrunn av begrenset kapasitet til de mikrobielle analysene, og resultater fra analyser av TPC og antioksidanteffekt. Figur 10 viser en oversikt over analyseforløpet i tre steg: (A) forberedelse av målorganismer, (B) klargjøring av 96-brønnsplater, og (C) fortynning og kvantifisering.



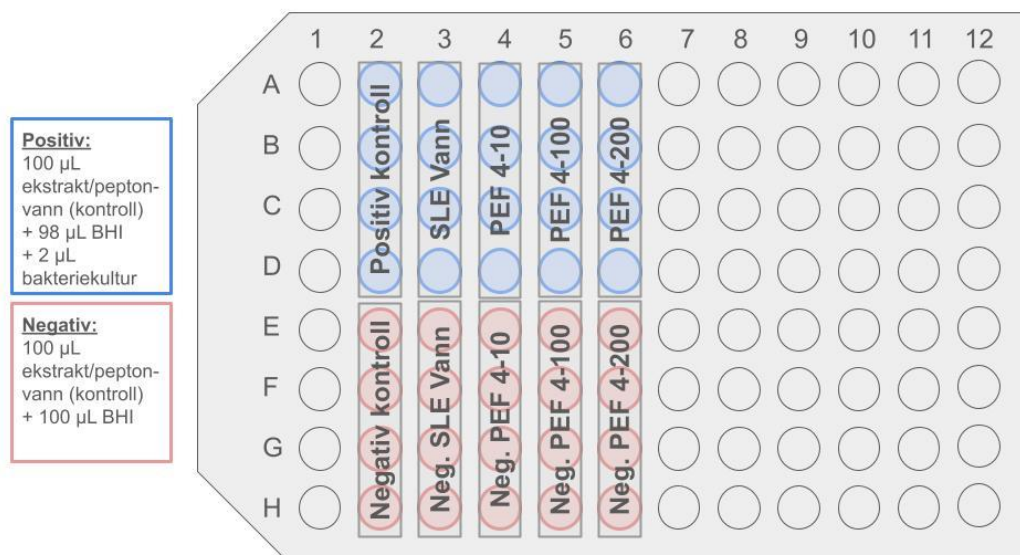
Figur 10: Hovedtrinnene i inhiberingsanalysen med 96-brønnsplate. **Steg A:** Forberedelse av målorganismen. (1) Fryste stammer av referanseorganismer ble strøket ut på plater med brain-heart infusion agar (BHIA) og inkubert ved optimale vekstvilkår. (2) Etter inkubering ble én koloni overført til prøverør med BHI-buljong og inkubert ved 15°C i 72 timer for temperaturlpasning. **Steg B:** Forberedelse av 96-brønnsplate analysen. (3) Inokulumet ble standardisert til en optisk tetthet på 0,10 før videre fortykning til ønsket cellekonsentrasjon, før (4) BHI-buljong, peptonvann, målorganisme og ekstrakter ble tilsatt i 96-brønnsplaten. (5) Platen ble inkubert ved 15°C i 72 timer. **Steg C:** Fortynningsserie og kvantifisering. (6) Hver rad fra den opprinnelige 96-brønnsplaten ble overført til nye 96-brønnsplater for seriefortynning med peptonvann til konsentrasjoner fra 10^{-1} til 10^{-9} . (7) Videre ble 5 μ L fra hver brønn mikrospottet på plater med BHIA og inkubert i 24 timer ved optimale temperaturer for de respektive målorganismene, før (8) kvantifiseringen av hver spotting ved å telle kolonier. Tilfeller hvor det ble registrert >50 kolonier ble kvantifisert som overgrodd. Figuren er lånt fra (Røsten, 2023).

3.5.1 Forberedelse av målorganismer

Målorganismene *L. innocua* (CCUG 44813) og *P. fluorescens* (CCUG 1253), lagret ved -80°C, ble podet på plater med Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Oxoid CM 1136B , Oslo, Norge) og inkubert ved optimal tid og temperatur for hver bakterie. For *L. innocua* tilsvarte dette 37°C i 24 timer, og for *P. fluorescens* 30°C i 48 timer. Etter inkubering ble en koloni av begge organismene overført til hvert sitt testrør med 10 mL Brain Heart Infusion (BHI)-buljong (Oxoid CM1135B, Oslo, Norge) og inkubert ved 15°C i 72 timer for temperaturtilpasning. Videre ble kulturene standardisert etter en optisk tetthet (eng: *optical density*) på 0,100 ved 600 nm (V-3000PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor USA) og videre fortynnet med BHI-buljong for å oppnå ønsket cellekonsentrasjon på 1×10^2 for begge målorganismene.

3.5.2 96-brønnsplate inhiberingsanalyse

I en 96-brønnsplate ble det tilsatt 98 µL BHI-buljong, 100 µL ekstrakt og 2 µL av målorganismen i hver brønn. Positive kontrollprøver ble forberedt med peptonvann (1 g/L pepton (Oxoid, Oslo, Norway) og 8,5 g/L NaCl (VWR International, Radnor, USA)), som erstatning for ekstraktvolum, mens volum av BHI-buljong og målorganismer var de samme. Det ble også forberedt negative kontrollprøver for BHI-buljongen, med 100 µL BHI-buljong og 100 µL peptonvann (1 g/L pepton (Oxoid, Oslo, Norway) og 8,5 g/L NaCl (VWR International, Radnor, USA)), og negative kontrollprøver for ekstraktene med 100 µL BHI-buljong og 100 µL ekstrakt. Platen ble deretter inkubert ved 15°C i 72 timer. Alle prøver, inklusive positive og negative kontroller, ble utført i fire paralleller (n = 4). Inhiberingsanalysen ble utført kun en gang per målorganisme. Figur 11 viser oppsettet brukt i brønnplaten.



Figur 11: 96-brønnsplate med fire paralleller for hvert *Alaria esculenta*-ekstrakt, samt positive og negative kontroller. I brønnene nummerert 3-6 ble solid-liquid ekstraktene (SLE) og ekstraktene behandlet med pulserende elektrisk felt (PEF) med ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) tilsatt, mens kontrollprøvene ble fylt med peptonvann istedenfor ekstrakt. De positive (blå på figuren) brønnene ble tilsatt bakteriekultur av *Listeria innocua* eller *Pseudomonas fluorescens*, mens de negative (lyserøde på figuren) ikke ble tilsatt bakterier. De umarkerte brønnene var ubrukte og ble kun fylt med 200 µL Brain Heart Infusion (BHI)-buljong.

Etter inkubering ble det utført en seriefortynning av platen med peptonvann (1 g/L pepton (Oxoid, Oslo, Norway) og 8,5 g/L NaCl (VWR International, Radnor, USA)) fra 10^{-1} til 10^{-9} på nye 96-brønnsplater. Deretter ble 5 µL av fortynningene mikrosponnet på plater med BHIA. De negative kontrollene ble ikke fortynnet og det ble mikrosponnet 10 µL av disse på plater med BHIA. Videre ble platene med *L. innocua* og *P. fluorescens* inkubert ved henholdsvis 37°C og 30°C i 24 timer før kvantifisering.

Kvantifiseringen ble utført ved telling av kolonier, og plater med > 50 kolonier ble ansett som overgrodd. Antall kolonier ble omgjort til CFU/mL (Colony Forming Units/mL) ved en logaritmisk skala. For bestemmelsen av vekstinhivering (log-reduksjon av CFU/mL) ble Formel 4 benyttet, hvor \bar{x} er gjennomsnittet av positive kontrollprøver (n = 4) og x er gjennomsnittet av prøvene med ekstrakt og målorganisme (n = 4).

$$\text{logreduksjon} \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \bar{x} \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{målorganisme} - x \log \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{målorganisme med ekstrakt} \quad (4)$$

3.6 Dataanalyse og statistikk

For å vurdere PEF-parameterne sin påvirkning på ekstraksjonen, ut ifra analyseresultater, ble det benyttet en Generalisert Lineær Modell (GLM) hovedeffektsanalyse med to faste faktorer, elektrisk feltstyrke (E [kV/cm]) og antall pulser (nP). Videre ble det benyttet en enveis variansanalyse (ANOVA), etterfulgt av en Tukeys Honest Significant Difference (Tukeys HSD) post hoc test med parvis sammenligning for å finne eventuelle signifikante forskjeller mellom de ulike parameterinnstillingene for PEF-ekstraktene.

Det ble også benyttet ANOVA, etterfulgt av Tukeys HSD for å finne eventuelle signifikante forskjeller i resultater mellom alle PEF- og SLE-ekstrakter. For å undersøke korrelasjonen mellom kjemisk karakteristikk og antioksidativ effekt ble det videre utført Pearsons parvise korrelasjonsanalyser.

De statistiske analysene ble utført ved hjelp av MiniTab Statistical Software 22 (versjon 22.1.0, Minitab LLC, USA). Signifikansnivået ble satt til 95% ($p < 0,05$) og resultater er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik for hver måling.

4 Resultater

I denne oppgaven ble det undersøkt om forbehandling med PEF før ekstraksjon ville gi høyere utbytte av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, sammenlignet med SLE uten PEF-behandling hvor både vann og etanol:vann (30:70) ble brukt som løsemiddel. Ekstraktene ble analysert for innhold av polyfenoler, fukoxanthin og pH, antioksidative egenskaper og antimikrobielle egenskaper, i et forsøk på å kvantifisere de ulike behandlingene sin effekt på ekstraktens grad av bioaktivitet. Ekstraksjonsmetodene ble sammenlignet med hverandre i hver analyse, med unntak av de antimikrobielle analysene som kun sammenlignet et utvalg av ekstraktene.

4.1 Kjemisk karakteristikk

Ekstraktens kjemiske karakteristikk ble undersøkt ved analyse av TPC, innhold av fukoxantin og ekstraktens pH-verdi. For PEF-ekstraktene ble det i tillegg målt temperaturendringer før og etter behandling med PEF. Alle analyser ble utført i paralleller på tre ($n = 3$).

4.1.1 Totalt polyfenolinnhold (TPC)

Det totale innholdet av polyfenoler ble analysert ved hjelp av metoden Folin-Ciocalteu som beskrevet av (Singleton et al., 1999) med modifikasjoner etter (Røsten, 2023). De satte PEF-parameterne påvirket ekstraksjonen av polyfenoler, hvor den elektriske feltstyrken var en signifikant faktor som bidro til variasjoner mellom gruppene (GLM: $F = 8,52$, $p = 0,002$). Feltstyrken på 4 kV/cm ga høyest innhold av polyfenoler og var signifikant høyere enn 6 kV/cm uavhengig av antall pulser (Tabell 3). En feltstyrke på 2 kV/cm var imidlertid ikke signifikant forskjellig fra 4 eller 6 kV/cm. Den andre faste faktoren, antall pulser, viste seg derimot å ikke være en signifikant faktor med hensyn til ekstraktens TPC-verdier (GLM: $F = 1,52$, $p = 0,245$). Den høyeste detekterte TPC-verdien var på $1,7 \pm 0,09$ g GAE/100 g tørrvekt, og ble oppnådd med en feltstyrke på 4 kV/cm med 100 pulser. Gjennomsnittlige resultater fra TPC-analysen og enveis ANOVA med Tukeys HSD som analyserte for signifikante forskjeller mellom parameterinnstillingene er vist i Tabell 3.

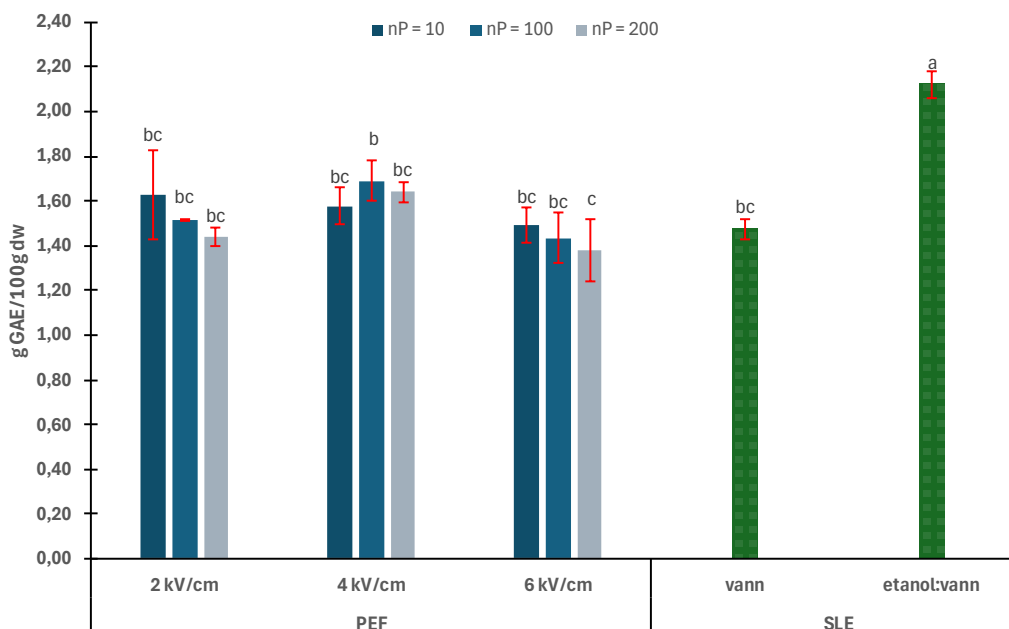
Tabell 3: Det totale innholdet av polyfenoler (TPC) i prøvene med *Alaria esculenta*, gitt som gram gallisk syre-ekvivalenter per 100 g tørrvekt (g GAE/100 g dw), ble analysert for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene (n = 3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultatene er gitt som et gjennomsnitt ± standardavvik.

Antall pulser^A (nP)				
Elektrisk feltstyrke^A (E)	10	100	200	p-verdi*
2 kV/cm	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,006 ^{ab}	1,4 ± 0,04 ^{ab}	0,217
4 kV/cm	1,6 ± 0,08	1,7 ± 0,09 ^a	1,6 ± 0,05 ^a	0,257
6 kV/cm	1,5 ± 0,08	1,4 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,1 ^b	0,491
p-verdi*	0,506	0,024	0,023	

^AGenerell Lineær Modell (GLM) hovedeffektsanalyse: GLM_{Antall pulser}: $F = 1,52$, $p = 0,245$, GLM_{Elektrisk feltstyrke}: $F = 8,52$, $p = 0,002$.

*Superskript (^{ab}) innad i hver kolonne indikerer signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom grupper ved enveis ANOVA og Tukeys HSD pairwise comparison test.

Innholdet av polyfenoler i SLE-ekstraktene ble signifikant påvirket av løsemiddelet benyttet med en TPC på $1,5 \pm 0,05$ og $2,1 \pm 0,06$ g GAE/100 g tørrvekt, for henholdsvis vann og etanol:vann (30:70) (Figur 12). SLE med etanol:vann hadde signifikant høyere TPC enn resten av ekstraktene. PEF-ekstraktet oppnådd med $E = 4$ kV/cm og $nP = 100$ hadde en signifikant høyere TPC enn ekstraktet med $E = 6$ kV/cm og $nP = 200$ (Figur 12).



Figur 12: Resultatene fra analysen av totalt polyfenolinnhold (TPC) i ekstraktene med *Alaria esculenta*, hvor pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid-liquid ekstraktens (SLE) totale polyfenolinnhold ble målt og gjengitt i g gallisk syre ekvivalenser per 100 g tørrvekt (g GAE/100 g dw), for PEF-ekstrakter og SLE-ekstrakter (n=3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (abc) representerer signifikante forskjeller beregnet med Tukeys HSD pairwise comparison test.

4.1.2 Fukoxantin

Ekstraktenes innhold av fukoxantin skulle blitt detektert og kvantifisert ved hjelp av HPLC. Metoden ga derimot ingen detekterbare verdier for de analyserte PEF- og SLE-ekstraktene.

4.1.3 Temperaturendring under PEF behandling og pH

Ved forbehandling av *A. esculenta* med PEF ble det målt temperatur før og etter PEF-behandlingen. Temperaturendringen ble beregnet og uttrykt i $\Delta^{\circ}\text{C}$. Videre ble det utført en GLM hovedeffektsanalyse for å undersøke hvordan parameterinnstillingene påvirket endringen i temperatur. Faktoren nP ble identifisert som den sterkeste signifikante faktoren som bidro til størst variasjon i temperaturendringer (GLM: $F = 480,5$; $p < 0,001$) hvor 200 pulser ga signifikant høyere temperaturøkninger enn 10 og 100 pulser (Tabell 4). Faktoren E var også signifikant (GLM: $F = 378,4$; $p < 0,001$) med hensyn til temperaturendringene hvor 6 kV/cm ga signifikant høyere temperaturendring enn 2 og 4 kV/cm. Isolert sett var også alle parameterinnstillinger signifikant forskjellig fra hverandre (Tabell 4).

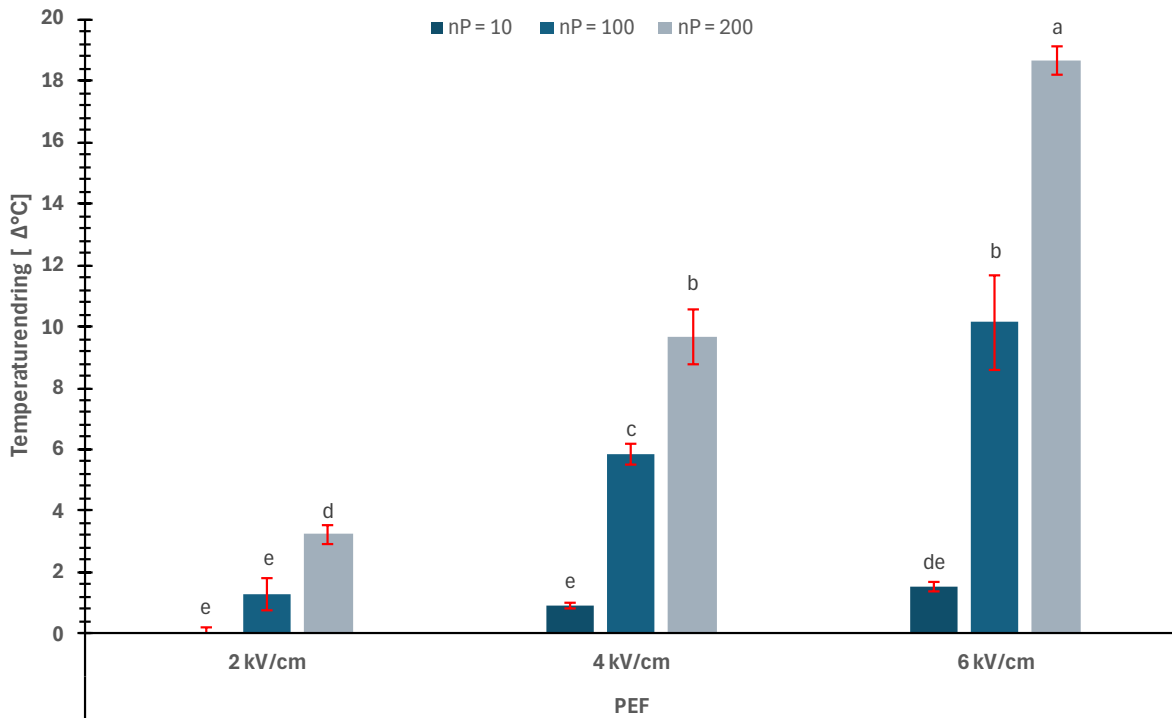
*Tabell 4: Gjennomsnittlige temperaturendringer [$\Delta^{\circ}\text{C}$] ble utregnet for ekstraktene av *Alaria esculenta* som ble forbehandlet med pulserende elektrisk felt (PEF). Temperaturendringene tilsvarer forskjellen i prøvens temperatur før og etter PEF-behandling ($n=3$). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultater er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik.*

Antall pulser^A (nP)				
Elektrisk feltstyrke^A (E)	10	100	200	p-verdi*
2 kV/cm	0,07 \pm 0,1 ^{x, a}	1,3 \pm 0,5 ^{y, a}	3,2 \pm 0,3 ^{z, a}	<0,001
4 kV/cm	0,9 \pm 0,1 ^{x, b}	5,8 \pm 0,4 ^{y, b}	9,7 \pm 0,9 ^{z, b}	<0,001
6 kV/cm	1,5 \pm 0,2 ^{x, c}	10,1 \pm 1,6 ^{y, c}	18,7 \pm 0,5 ^{z, c}	<0,001
p-verdi*	<0,001	<0,001	<0,001	

^AGenerell Lineær Modell (GLM) hovedeffektsanalyse: $GLM_{\text{Antall pulser}}$: $F = 480,5$; $p < 0,001$, $GLM_{\text{Elektrisk feltstyrke}}$: $F = 378,4$; $p < 0,001$.

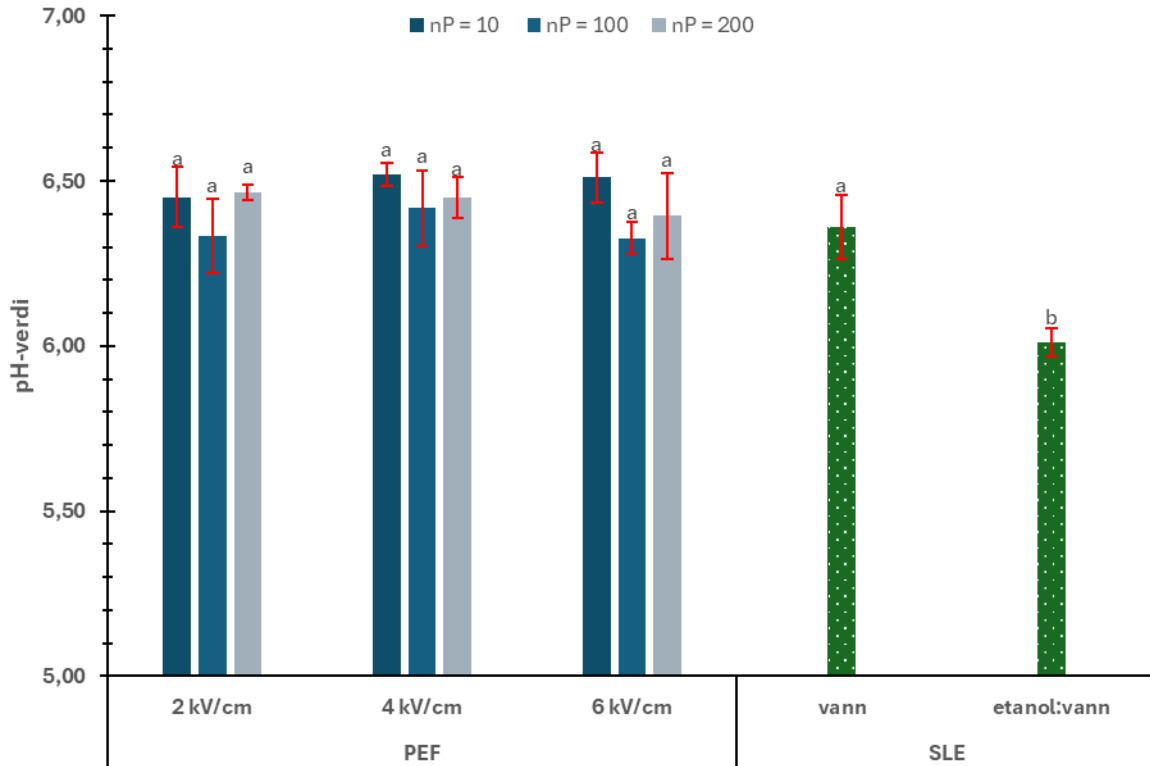
* Ulik superskript (^{abc}) innad i hver kolonne (nP) og (^{xyz}) i hver rad (kV/cm) indikerer signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom grupper ved enveis ANOVA og Tukeys HSD pairwise comparison test.

Resultatene for $\Delta^{\circ}\text{C}$ for alle grupper er presentert i Figur 13. SLE-ekstraktene er ikke inkludert i analysen da de ble holdt ved en konstant temperatur under hele ekstraksjonsforløpet.



Figur 13: Gjennomsnittlige temperaturendringer [$\Delta^{\circ}\text{C}$] i de ulike ekstraktene med *Alaria esculenta* etter pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling ($n=3$). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (abcde) indikerer signifikante forskjeller mellom grupper.

Effekten av PEF-parameterne på ekstraktens pH-verdi ble analysert med GLM. Analysen viste at faktoren E ikke hadde en signifikant innvirkning på pH-verdien i ekstraktet (GLM: $F = 1,02$; $p = 0,381$). Faktoren nP var derimot en signifikant faktor (GLM: $F = 5,74$; $p = 0,012$). Ved sammenlikning med Tukeys HSD ble det vist at nP = 10 ga en signifikant høyere gjennomsnittlig pH-verdi enn nP = 100. nP = 200 var derimot ikke signifikant forskjellig fra 10 eller 100 pulser. Valg av løsemiddel hadde en signifikant innvirkning på ekstraktens pH, hvor ekstraktet med etanol:vann hadde en signifikant lavere pH enn alle de andre ekstraktene. Resultater fra pH-analysen og ANOVA med Tukeys HSD er oppsummert i Figur 14.



Figur 14: Gjennomsnittlige pH-verdier for alle ekstraktene av *Alaria esculenta* som ble ekstrahert med solid-liquid ekstraksjon (SLE) eller forbehandlet med pulserende elektrisk felt (PEF) ($n=3$). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) for PEF-behandling ble brukt. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (a,b) indikerer signifikante forskjeller mellom grupper.

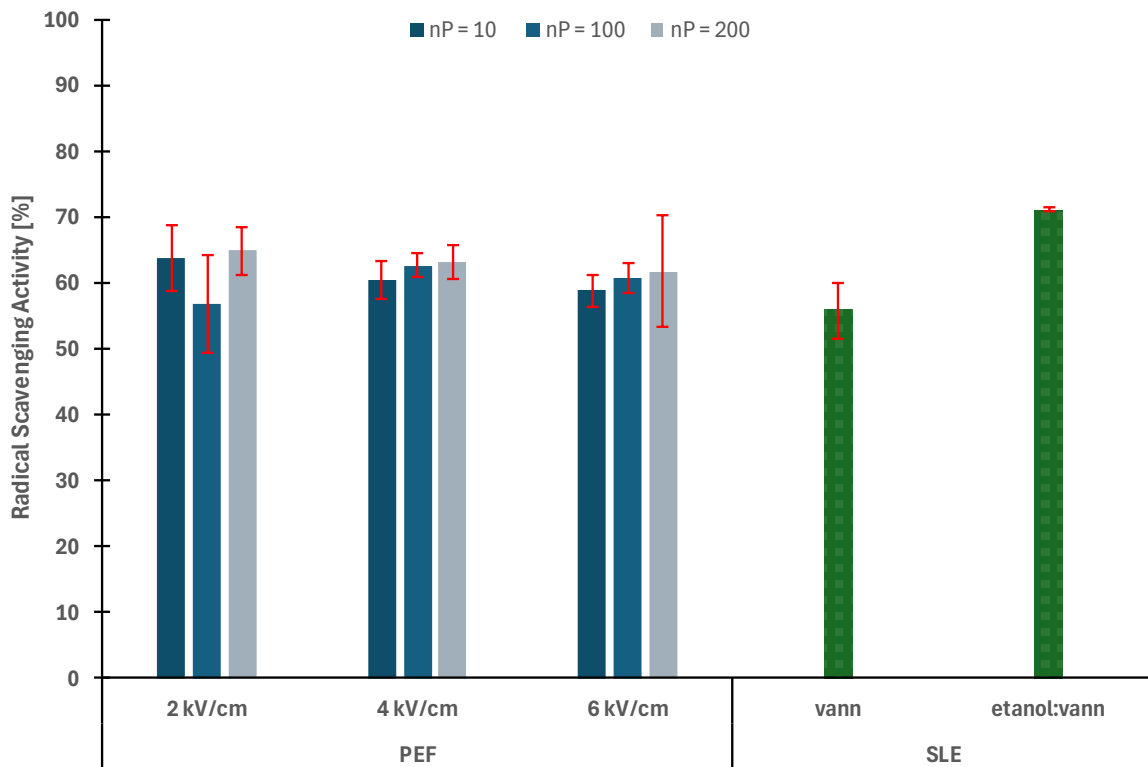
4.2 Antioksidative analyser

Det ble utført tre *in vitro* antioksidantanalyser for å evaluere ekstraktene sin antioksidative aktivitet. DPPH og ABTS måler evnen til å nøytralisere frie radikaler og singlett oksygen, FRAP måler evnen til å redusere Fe^{2+} til Fe^{3+} . Analysene ble utført på alle PEF- og SLE-ekstrakter i parallell på tre ($n = 3$).

4.2.1 Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)

ABTS-analysen ble utført etter metoden beskrevet av Re et al. (1999), Nenadis et al. (2004) og Nenadis et al. (2007) med modifikasjoner etter Røsten (2023). Resultater ble uttrykt i RSA [%] og statistisk resultatbehandling med GLM viste at hverken faktorene E (GLM: $F = 0,32$; $p = 0,733$) eller nP (GLM: $F = 1,15$; $p = 0,340$), hadde signifikant innvirkning på resultatet. Den høyeste detekterte verdien fra ABTS for PEF-ekstraktene var på $65,0 \pm 3,6$ % RSA, og ble oppnådd med en elektrisk feltstyrke på 2 kV/cm og 200 pulser (Figur 15).

For SLE-gruppene ble resultatet signifikant påvirket av benyttet løsemiddel, med RSA [%] på henholdsvis $71,3 \pm 0,2$ og $55,9 \pm 4,2$ for etanol:vann og vannekstraktene. Enveis ANOVA viste at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom noen av ekstraktene ($p = 0,065$) (Figur 15).

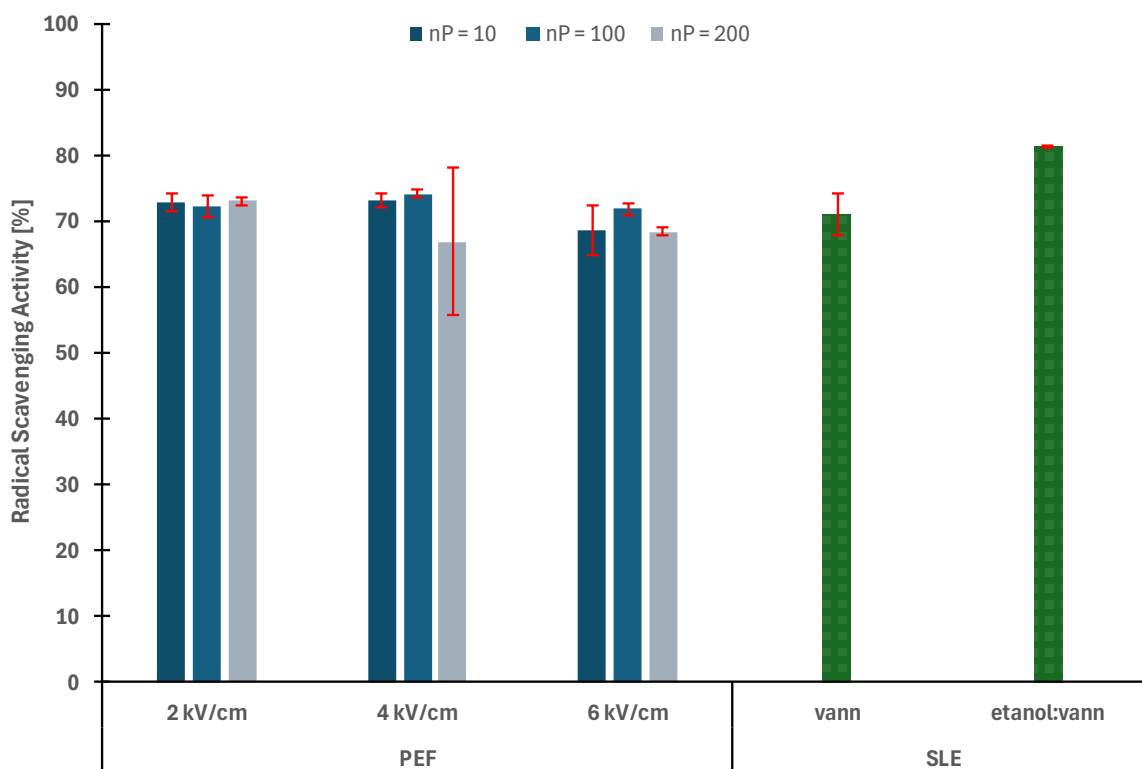


Figur 15: Resultatene fra 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre)(ABTS)-analysen, hvor *Alaria esculenta*-ekstraktens radical scavenging activity (RSA) [%] ble målt, for solid-liquid (SLE)- og pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstrakter ($n=3$). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt for PEF-behandlingen. Enveis ANOVA: $p = 0,065$, indikerer ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

4.2.2 Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Antioksidativ kapasitet ved RSA ble analysert med DPPH. Statistisk resultatbehandling med GLM viste at hverken faktorene E (GLM: $F = 1,29$; $p = 0,298$) eller nP (GLM: $F = 1,58$; $p = 0,234$) hadde signifikant innvirkning på resultatet. Den høyeste detekterte verdien fra DPPH for PEF-ekstraktene, $74,4 \pm 0,6\%$ RSA, ble oppnådd med en elektrisk feltstyrke på 4 kV/cm og 100 pulser (Figur 16).

Enveis ANOVA viste at det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene ($p = 0,051$). Resultatene fra DPPH for alle PEF- og SLE-ekstrakter vises i Figur 16. Det er verdt å nevne at standardavviket til gruppen 4 kV/cm med 200 pulser er relativt høyt i forhold til de andre gruppene ($\pm 11,1\%$ RSA).



Figur 16: Resultatene fra 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)-analysen av ekstraktene med *Alaria esculenta*, hvor solid-liquid (SLE)- og de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktenes radical scavenging activity (RSA) [%] ble målt ($n=3$). Enveis ANOVA: $p = 0,051$, som indikerer ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

4.2.3 Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Analysen av ekstraktens evne til å redusere Fe²⁺ til Fe³⁺ (FRAP) ble utført ved hjelp av metoden beskrevet av Benzie og Strain (1996) og uttrykt i µmol TE/g tørrvekt. E ble identifisert som en signifikant faktor med hensyn til den antioksidative effekten (GLM: F = 13,06; p < 0,001) hvor 2 og 4 kV/cm ga ekstrakter med signifikant høyere reduksjonsevne enn 6 kV/cm, men 2 og 4 kV/cm var ikke signifikant forskjellig fra hverandre. 2 kV/cm var imidlertid ikke signifikant forskjellig fra 4 eller 6 kV/cm ved 200 pulser. nP var ikke en signifikant faktor (GLM: F = 0,82; p = 0,458). Den høyeste detekterte verdien fra FRAP for PEF-ekstraktene, 35,9 ± 1,2 µmol TE/g tørrvekt, ble oppnådd med en elektrisk feltstyrke på 4 kV/cm og 10 pulser (Tabell 5).

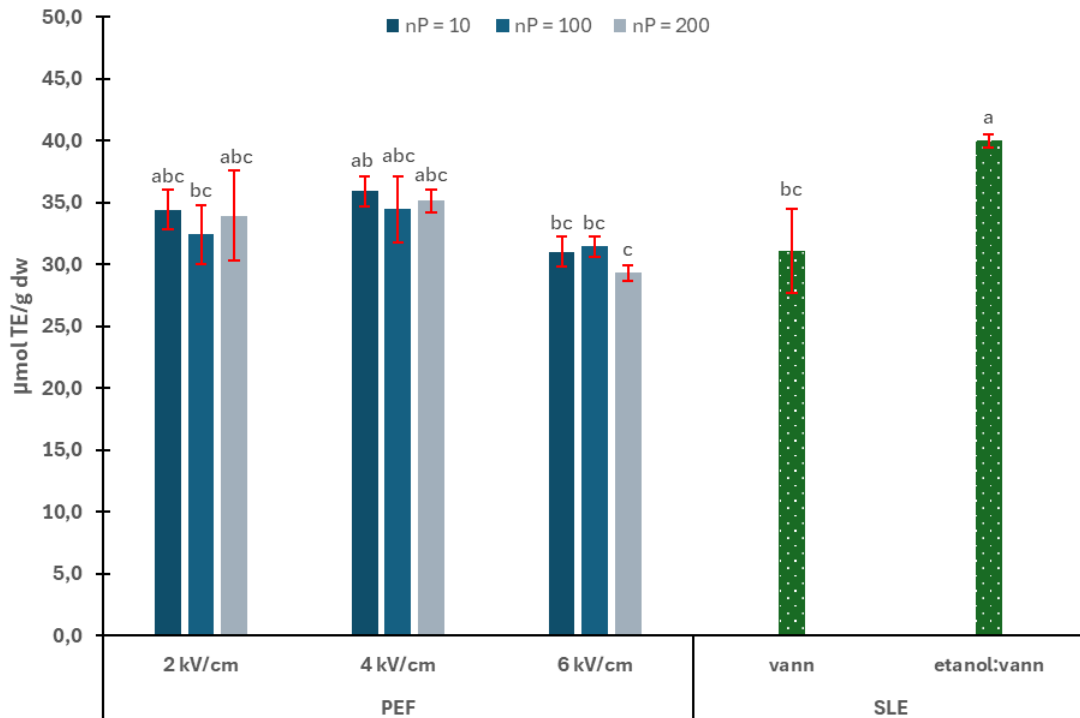
Tabell 5: Antioksidativ kapasitet målt ved hjelp av ferric reducing antioxidant power (FRAP) i prøvene med Alaria esculenta, gitt som µmol trolox-ekvivalenter per g tørrvekt (µmol TE/g dw), ble analysert for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene (n = 3). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt. Resultatene er gitt som et gjennomsnitt for hver gruppe ± standardavvik.

Antall pulser^A (nP)				
Elektrisk feltstyrke^A (E)	10	100	200	p-verdi*
2kV/cm	34,4 ± 1,6 ^a	32,4 ± 2,4	33,9 ± 3,7 ^{ab}	0,657
4kV/cm	35,9 ± 1,2 ^a	34,5 ± 2,6	35,1 ± 0,9 ^a	0,620
6kV/cm	31,0 ± 1,2 ^b	31,5 ± 0,8	29,3 ± 0,7 ^b	0,059
p-verdi*	0,011	0,282	0,040	

^AGenerell Lineær Modell (GLM) hovedeffektsanalyse: GLM_{Antall pulser}: F = 0,82; p = 0,458, GLM_{Elektrisk feltstyrke}: F = 13,06; p < 0,001.

*Superskript (^{ab}) innad i hver kolonne indikerer signifikante forskjeller (p < 0,05) mellom grupper ved enveis ANOVA og Tukeys HSD pairwise comparison test.

For SLE-ekstraktene var valg av løsemiddel en signifikant faktor med hensyn til ekstraktens reduksjonsevne av Fe²⁺. Etanol:vann var signifikant bedre enn vannekstraktet med henholdsvis 40,0 ± 0,5 mot vannekstraktets 31,1 ± 3,4 µmol TE/g tørrvekt (p < 0,001) (Figur 17). Etanol:vann-ekstraktet hadde også en signifikant (p < 0,001) høyere reduksjonsevne enn alle PEF-ekstrakter behandlet med 6 kV/cm, samt ekstraktet behandlet med 4 kV/cm og 100 pulser (Figur 17). Blant PEF-ekstraktene hadde ekstraktet behandlet med 4 kV/cm og 10 pulser en signifikant høyere reduksjonsevne enn ekstraktet behandlet med 6 kV/cm og 200 pulser (p < 0,001) (Figur 17).



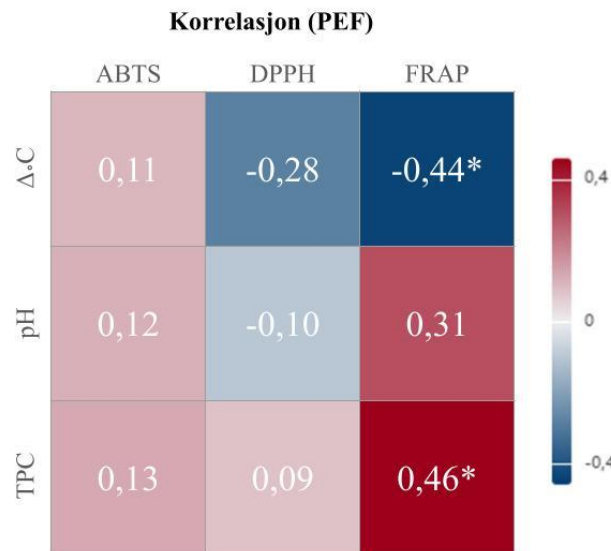
Figur 17: Resultatene fra ferric reducing antioxidant power (FRAP)-analysen, hvor pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid liquid ekstraktene (SLE) av *Alaria esculenta* sin evne til å redusere Fe^{3+} ble målt ($n=3$) i μmol trolox-ekvivalenter per g tørrvekt ($\mu\text{mol TE/g}$ tørrvekt). Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble brukt for PEF-behandlingen. Enveis ANOVA: $p < 0,05$. Ulike bokstaver (abc) representerer signifikante forskjeller beregnet med Tukeys HSD pairwise comparison test.

4.3 Pearsons parvise korrelasjonsanalyser

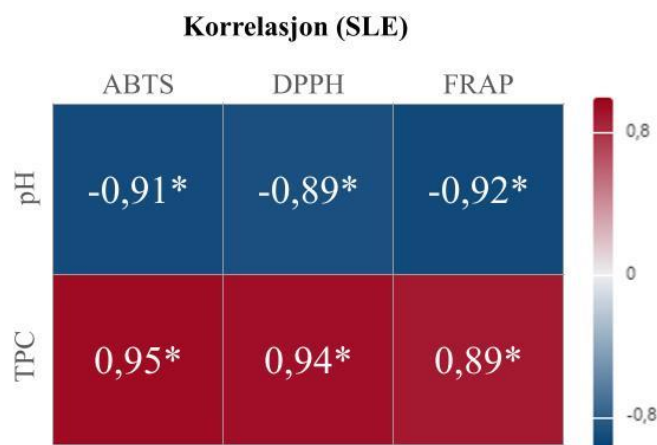
For å undersøke hvorvidt det fantes signifikante sammenhenger mellom PEF- og SLE-ekstraktens kjemiske karakteristikk og antioksidative effekt, ble det utført en Pearsons korrelasjonsanalyse med parvis sammenlikning ved $\alpha = 0,05$. Korrelasjonskoeffisientene (r) med tilhørende p -verdier er presentert i Tabell 9, Vedlegg 4.

For PEF-ekstraktene ble det funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom TPC og FRAP ($r = 0,46$; $p = 0,016$). Dette viser en sammenheng mellom økende innhold av polyfenoler og evne til å redusere Fe^{2+} til Fe^{3+} . Videre ble det funnet en signifikant negativ korrelasjon mellom temperaturøkning og FRAP ($r = -0,44$; $p = 0,022$), som viser en sammenheng mellom høyere temperaturøkning under PEF og redusert reduksjonsevne av jernioner.

Det ble imidlertid funnet signifikante korrelasjoner mellom alle parametere for SLE-ekstraktene ($p < 0,05$). Forholdet mellom ekstraktens pH og antioksidative effekt viste en negativ korrelasjon, som indikerer en bedret effekt ved lavere pH. Figur 18 og 19 viser korrelasjonsmatriser for parvise sammenlikninger av kjemiske karakteristikk og antioksidative analyser for PEF- og SLE-ekstrakter.



Figur 18: Korrelasjonsmatrise som viser parvis sammenlikning av korrelasjonen mellom antioksidativ kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)) og kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC), pH og temperaturøkning) for de pulserende elektrisk felt (PEF)-behandlede ekstraktene av *Alaria esculenta*. * indikerer signifikant korrelasjon ($p < 0,05$).



Figur 19: Korrelasjonsmatrise som viser parvis sammenlikning av korrelasjonen mellom antioksidant kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)) og kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC) og pH) for solid liquid ekstraktene (SLE) av *Alaria esculenta*. * indikerer signifikant korrelasjon ($p < 0,05$).

4.4 Antimikrobielle analyser

De antimikrobielle analysene bestod av inhiberingsanalyser, hvor ekstraktenes evne til å hemme vekst av *L. innocua* og *P. fluorescens* ble vurdert. Til analysene ble kun PEF-ekstraktene behandlet med 4 kV/cm og vannekstraktene benyttet. Resultatene ble uttrykt i log-reduksjon CFU/mL, som representerer forskjellen mellom den gjennomsnittlige cellekonsentrasjonen til målorganismen (positiv kontroll), og cellekonsentrasjonen til målorganismen som ble tilsatt ekstrakt. Oppsummerte resultater i form av gjennomsnitt \pm standardavvik, samt p-verdier fra enveis ANOVA er vist i Tabell 6. Negative kontrollprøver bekreftet at resultatene ikke var utsatt for kontaminasjon fra ekstraktene.

Tabell 6: Inhiberende effekt av pulserende elektrisk felt (PEF) ekstrakter og solid liquid ekstrakter (SLE) fra Alaria esculenta på bakteriene Listeria innocua og Pseudomonas fluorescens. Kun PEF-ekstraktene behandlet med elektrisk feltstyrke (E) = 4 kV/cm ble benyttet. Inhiberingseffekten er gitt som log-reduksjon CFU/mL, som representerer forskjellen mellom den gjennomsnittlige cellekonsentrasjonen (CFU/mL) til målorganismen (positiv kontroll), og cellekonsentrasjonen til målorganismen som ble tilsatt ekstrakt.

Målorganisme	Ekstrakt	Log-reduksjon CFU/mL
<i>L. innocua</i> (n = 4)	PEF 4-10	-0,3 \pm 0,09 ^a
	PEF 4-100	-0,06 \pm 0,08 ^{ab}
	PEF 4-200	0,02 \pm 0,09 ^{ab}
	SLE (vann)	0,2 \pm 0,3 ^b
	p-verdi*	0,013
<i>P. fluorescens</i> (n = 4)	PEF 4-10	0,4 \pm 0,4 ^b
	PEF 4-100	-0,04 \pm 0,1 ^{ab}
	PEF 4-200	-0,03 \pm 0,2 ^{ab}
	SLE (vann)	-0,2 \pm 0,1 ^a
	p-verdi*	0,025

*Ulike superskript (^{ab}) indikerer signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom gruppene ved enveis ANOVA og Tukey HSD pairwise comparison test

For *L. innocua* ble det kun vist positiv log-reduksjon for SLE-ekstraktet, og for PEF-ekstraktet forbehandlet med $E = 4 \text{ kV/cm}$ og $nP = 200$, men det var ingen signifikant forskjell i inhibering mellom disse. SLE-ekstraktet var derimot signifikant bedre enn PEF-ekstraktet forbehandlet med $E = 4 \text{ kV/cm}$ og $nP = 10$ ($p = 0,013$). For *P. fluorescens* var det imidlertid kun PEF-ekstraktet, forbehandlet ved $E = 4 \text{ kV/cm}$ og $nP = 10$, som hadde en observert log-reduksjon. PEF-ekstraktet var også signifikant bedre enn SLE-ekstraktet ($p = 0,025$).

Den høyeste verdien observert på inhiberingsanalysen av *L. innocua* var på $0,2 \pm 0,3$ log-reduksjon CFU/mL for vannekstraktet. For *P. fluorescens* var den høyeste verdien observert $0,4 \pm 0,4$ log-reduksjon CFU/mL med PEF-ekstraktet med $E = 4 \text{ kV/cm}$ og $nP = 10$.

5 Vurdering

5.1 Prosessoptimalisering

Det overordnede målet med prosessoptimaliseringen var å finne parameterinnstillinger som ga høyest utbytte av bioaktive forbindelser. Dette skulle fortløpende vurderes basert på kjemiske analyser for polyfenolinnhold og fukoxantin. Vedlegg 1 forklarer optimaliseringsprosessen og bakgrunnen for valg av forsøksdesignet. Det er verdt å nevne at mye tid og testing gikk med til å få PEF-behandlingen av *A. esculenta* til å fungere optimalt, og noe av grunnen for dette var at PEF-maskinen ved NTNU var ny, og det var relativt lav kompetanse for bruk av PEF ved institusjonen. Som resultat av dette ble det begrenset tid til å teste et bredt utvalg parametere ved like betingelser. Forsøksdesignet gjorde det mulig å innhente data om forskjellen på elektrisk feltstyrke fra 2-6 kV/cm og varierende antall pulser 10-200. Men det ble for eksempel ikke tid til å se på endret pulsbredde og frekvens, som også kan være av betydning for optimaliseringen. Forsøksdesignet dekker noe av det litteraturen for PEF-behandling av *A. esculenta* har benyttet av parametere, men litteraturen burde ha blitt anvendt i større grad som utgangspunkt ved starten av arbeidet. Å benytte 1 Hz i stedet for 5 Hz kunne for eksempel ha vært hensiktsmessig å teste, med bakgrunn i funn fra studier listet opp i Tabell 1 (2.4.2). Basert på de nevnte manglene i optimaliseringsprosessen kan det ikke utelukkes at det eksisterer mer optimale parameterinnstillinger på PEF for *A. esculenta* enn det denne studien viser, og det vil absolutt være av interesse å utforske dette grundigere for videre arbeid.

Fra de tre første forsøkene med prosessoptimalisering (Vedlegg 1) på PEF, ble det erfart hvilke parameterinnstillinger og verdier for konduktivitet som var for høye til at prøvene kunne behandles med PEF uten feilmeldinger. Ifølge den presenterte teorien vil en prøve med for høy konduktivitet medføre generering av høy strøm på grunn av manglende resistans (Amiali et al., 2006) – derav feilmeldingen «Resistance too low». Dette førte videre til ohmsk oppvarming som i flere av omgangene gjorde prøveinnholdet betydelig varmere. Noen av prøvene viste en temperaturøkning på nærmere 20°C (Figur 13). Oppvarming av prøvene kan være ugunstig for lite varrestabile forbindelser, og diskuteres videre i kapittel 5.2.3.

For det endelige forsøket ble prøvekonsentrasjoner på 11,11 g/L i PEF-kammeret testet, som før PEF-behandling hadde en gjennomsnittlig konduktivitet på 4,9 mS/cm (Vedlegg 2). Tilstrekkelig lav konduktivitet (< 10 mS/cm) var nødvendig for at prøvene kunne kjøres i PEF-maskina uten feilmeldinger. Dette resulterte i en relativt lav konsentrasjon av råstoff sammenlignet med andre studier. Castejon et al. (2021) benyttet en konsentrasjon på 50,0 g/L

og Einarasdóttir et al. (2022) benyttet en konsentrasjon på 17,14 g/L. I tillegg rensset Einarasdóttir et al. (2022) råstoffet to ganger med vann for å senke konduktiviteten før PEF. En slik rensing kunne også med fordel ha blitt forsøkt i denne oppgaven, for å kunne benytte mer råstoff, og dermed fått mer konsentrerte ekstrakter. Rensing før frysetørking ville fjernet salter og mineraler på overflaten av råstoffet, og sannsynligvis senket konduktiviteten. Det høye saltinnholdet til makroalger er en kjent utfordring når det kommer til optimalisering av PEF-parametere (Levkov et al., 2020).

5.2 Kjemisk karakteristikk

5.2.1 Totalt polyfenolinnhold (TPC)

Resultatene fra TPC viser at SLE med gruppen etanol:vann ga signifikant høyest utbytte av polyfenoler. Polyfenoler er generelt mer løselig i polare organiske løsemidler, som for eksempel metanol, etanol og aceton, enn i vann. Blandinger med organiske løsemidler og vann er derfor effektive for ekstraksjon av polyfenoler (Koivikko et al., 2005), og ut ifra dette er det ikke så overraskende at etanol:vann-ekstraktet fikk høyest utbytte av disse forbindelsene. Einarasdóttir et al. (2022) derimot, fant at PEF-behandlet vannekstrakt av *A. esculenta* hadde høyere innhold av polyfenoler sammenlignet med ekstraktene med 15% etanol som løsemiddel, både med og uten PEF-behandling. Det er verdt å merke seg at studien brukte betydelig lavere etanolkonsentrasjon (15 %) enn denne oppgaven (30 %). Flere studier peker mot at en høyere etanolkonsentrasjon må til for å maksimere utbytte av polyfenoler; 50% for ekstraksjon av polyfenoler fra druefrø (Nawaz et al., 2006), 60% for polyfenoler fra olivenblader (Mylonaki et al., 2008) og 60-80% for florotanniner fra makroalgen *Sargassum swartzii* (Nawaz et al., 2006; Quoc Toan et al., 2021). Litteratursøket i forbindelse med denne oppgaven fant ingen optimal etanolkonsentrasjon for ekstraksjon av polyfenoler fra *A. esculenta*, men det kunne med fordel undersøkes for å sammenligne PEF-behandling opp mot etanolkonsentrasjonen med maksimalt utbytte.

Resultatene fra TPC viser at den elektriske feltstyrken var en viktigere faktor enn antall pulser for utbyttet av polyfenoler fra *A. esculenta* ($p = 0,002$). Dette samsvarer med funnene til Souli et al. (2023) som observerte at grad av permeabilisering av cellene til daddelfrukt var tett knyttet til valg av elektrisk feltstyrke for PEF. Studien til Souli et al. (2023) målte grad av permeabilisering ved å se på *cell disintegration index* (Z) hvor man så en signifikant økning i

permeabilisering ved økende elektrisk feltstyrke fra 1 til 2 kV/cm. Dette henger også sammen med teorien om at valg av elektrisk feltstyrke er sentralt for å overgå cellenes kritiske verdi.

Ekstraktene behandlet med $E = 4$ kV/cm ga ifølge GLM signifikant høyere utbytte av polyfenoler enn ekstraktene behandlet med $E = 6$ kV/cm generelt. ANOVA viste at $E = 4$ kV/cm, $nP = 100$ hadde signifikant høyere utbytte av TPC sammenlignet med $E = 6$ kV/cm, $nP = 200$ (Figur 12). Resultatene tyder på at økningen fra 4 til 6 kV/cm kan bli for kraftig behandling med hensyn til polyfenolene. En forklaring på dette kan være at økt temperatur som følge av en mer intens behandling kan ha resultert i degradering av lite varmestabile polyfenoler (López-Gómez et al., 2021). Kapittel 5.2.3 diskuterer temperaturøkningen under PEF-behandlingen nærmere. En annen mulig forklaring kan være at den elektriske behandlingen i seg selv har bidratt til å degradere polyfenoler.

Den høyeste detekterte TPC-verdien for PEF-ekstraktene ble oppnådd med $E = 4$ kV/cm, $nP = 100$. Denne har en numerisk økning på $14,6 \pm 6,8\%$ i utbytte av TPC sammenlignet med vannekstraktet, men ikke signifikant økning ($p < 0,05$), med henholdsvis $1,7 \pm 0,09$ g GAE/100g tørrvekt og $1,5 \pm 0,05$ g GAE/100g tørrvekt. Fra litteraturen fikk til sammenligning PEF-behandlede vannekstrakter av *A. esculenta* på sitt høyeste omtrent $0,937 \pm 0,0407$ g GAE/100g tørrvekt (4,8% økt utbytte fra kontroll) for Castejón et al. (2021) og $1,04 \pm 0,37$ g GAE/100g tørrvekt (38,7% økt utbytte fra kontroll) for Einarsdóttir et al. (2022). Disse studiene fant heller ingen signifikant forskjell i polyfenolinnholdet mellom vannekstrakter med og uten PEF-behandling.

Det er imidlertid ikke spesielt hensiktsmessig å sammenligne polyfenolinnholdet fra ulike studier direkte opp mot hverandre på grunn av flere faktorer. For det første varierer TPC-innholdet i *A. esculenta*, og alger generelt, mye med sesong. Gager et al. (2020) fant betydelige sesongvariasjoner hos *A. esculenta*. På høsten kunne polyfenolinnholdet bli over 30 g GAE/100g tørrvekt, mens det på våren kunne bli lavere enn 2 g GAE/100g tørrvekt. Røsten (2023) fant også sesongvariasjoner for TPC-innhold for *A. esculenta* med samme metode fra år til år. I mai 2021 var TPC-innholdet høyere enn i mai 2022 med henholdsvis $1,22 \pm 0,05$ g GAE/100g tørrvekt og $1,07 \pm 0,03$ g GAE/100g tørrvekt. For det andre finnes det mange eksperimentelle studier på PEF, men det er stor variasjon i valg av forsøksdesign, metode, parameterinnstillinger og løsemiddel for råstoffet. Dette gjør sammenligning av verdier for utbytte opp mot andre studier mer utfordrende.

5.2.2 Fukoxantin

Resultatene for de analyserte ekstraktene fra denne studien ga verdier for fukoxantin under deteksjonsgrensen for metoden benyttet. Hovedårsaken til dette er sannsynligvis en for lav prøvekonsentrasjon og at fukoxantin er lite løselig i vann. Som nevnt i kapittel 5.1 var lav prøvekonsentrasjon nødvendig for å ha lav nok konduktivitet for PEF-behandlingen, men det resulterte også i en lavere konsentrasjon enn hva valgt metode for kvantifisering av fukoxantin greide å detektere. Tidligere gjennomførte forsøk under prosessoptimaliseringen (med høyere konsentrasjon tare) ga detekterbare verdier med samme metode, så det er derfor sannsynlig at for liten mengde råstoff, og dermed lav mengde fukoxantin, var årsaken til de manglende resultatene. Dette burde det tas hensyn til ved videre forsøk. På grunn av tidsbegrensning ble det ikke rom for å finne andre metoder for å kvantifisere innholdet av fukoxantin. Med hensyn til fukoxantin er det derfor i denne studien ingen data på om PEF-behandling kan gi økt utbytte av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*.

Fukoxantin har generelt lav løselighet i vann. Forbindelsen løses bedre i organiske løsemidler enn i vann, som for eksempel etanol eller en kombinasjon av etanol og vann (Einarsdóttir et al., 2022). Einarsdóttir et al. (2022) benyttet olje, olje + lecitin og 60% etanol for ekstraksjon av fukoxantin fra *A. esculenta*. Særlig 60% etanol ga høyt ekstraksjonsutbytte for fukoxantin. Det viste seg derimot ikke å være signifikant forskjell i utbytte av fukoxantin mellom PEF-behandlede og ikke-behandlede ekstrakter (Einarsdóttir et al., 2022).

En ettertanke er at under kverningen av frysetørket *A. esculenta* ble det observert varmeutvikling, særlig i nedre sjiktet av kvernen nær metallbladene. Det ble ikke målt hvor stor denne temperaturøkningen var, men det kan ha hatt betydning for lite temperaturstabile forbindelser som fukoxantin eller polyfenoler. Dette bør unngås eller begrenses ved videre forsøk ved å kverne i korte, kontrollerte intervaller.

5.2.3 Temperaturøkning under PEF behandling

Temperaturen under ekstraksjonsprosessen av bioaktive forbindelser er en kritisk faktor, både med tanke på forbindelsenes stabilitet og effektiviteten av ekstraksjonen. Souli et al. (2023) fant at utbyttet av polyfenoler fra PEF-assistert ekstraksjon av daddelfrukt økte ved bruk av høyere temperaturer under ekstraksjonsprosessen. Temperaturene 20°C, 40°C og 50°C ble testet. Det var en signifikant økning av utbytte mellom ekstraktene behandlet ved 20°C og 50°C (Souli et al., 2023). Imidlertid fant Røsten (2023) ut at ved mikrobølgeassistert ekstraksjon av polyfenoler fra *A. esculenta* var 120°C med en holdetid på 5 minutter mest optimalt. En videre

økning av temperatur til 140°C førte derimot til et lavere polyfenolinnhold og tyder på varmedegradering av polyfenolene (Røsten, 2023). Metoden til Einarsdóttir et al. (2022) innebar en temperaturøkning på 25 °C ved PEF-behandlingen. Her ble alle ekstraktene som ikke skulle PEF-behandles temperert i vannbad opp til 55 °C for at temperaturøkningen skulle bli tilsvarende.

I denne oppgaven viste GLM-analysen av temperaturøkningen ved PEF-behandlingen (Figur 13) at både elektrisk feltstyrke og antall pulser var signifikante faktorer for temperaturøkningen ($p < 0,001$). Den spesifikke energitilførselen hadde også innvirkning på temperaturøkningen. Ved å sammenligne temperaturøkningen (Figur 13, kap. 4.1.3) med den spesifikke energitilførselen til ekstraktene (Vedlegg 2, Figur 20), kan en se at økt antall pulser og elektrisk feltstyrke både gir økt mengde tilført energi og høyere generert varme – og derav større temperaturforskjell. For eksempel har $E = 6 \text{ kV/cm}$, $nP = 200$ fått tilført betydelig mer energi enn $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 100$ henholdsvis 211,2 kJ/kg og 34,6 kJ/kg, og temperaturøkningen før og etter PEF er henholdsvis 18,7°C og 5,8°C.

De bioaktive forbindelsenes ustabilitet overfor varme blir nevnt gjentatte ganger i vurderingen av resultatene. Likevel vurderes ikke temperaturøkningen i seg selv som så kraftig at det burde ha ødelagt forbindelsene, ettersom flere studier (Tziveleka et al., 2021; Wei et al., 2016) beskriver godt utbytte av samme type forbindelser ved høyere temperaturer enn det prøvene i denne oppgaven ble utsatt for.

5.2.4 pH

Variasjoner i ekstraktens pH-verdi kan være en indikasjon på ulikt innhold av andre forbindelser som for eksempel organiske syrer, som også kan ha antioksidativ og/eller antimikrobiell effekt (Tziveleka et al., 2021; Wei et al., 2016). Effekten av PEF-parametrene på ekstraktens pH ble analysert med GLM og resultatene viste at elektrisk feltstyrke ikke var en signifikant faktor med hensyn til ekstraktens pH-verdi. Antall pulser var derimot en signifikant faktor ($p = 0,012$). Tukeys HSD ga at $nP = 10$ hadde høyere gjennomsnittlig pH-verdi enn $nP = 100$. Dette kan bety at ekstraktene behandlet med $nP = 100$ kan ha ført til større utbytte av organiske syrer eller andre vannløselige forbindelser som har medført redusert pH. Lav F-verdi ($F = 5,74$) gjør likevel pulsens signifikans usikker, også med tanke på at de fleste andre analysene peker på den elektriske feltstyrken som signifikant faktor.

Resultatet fra ANOVA på pH-verdiene til ekstraktene viser at etanol:vann har signifikant lavere pH-verdi fra de andre ekstraktene ($p < 0,05$). Siden etanol, som vann, også har ca.

pH = 7, kan de lave verdiene i resultatet bety at denne gruppen har fått et større utbytte av organiske syrer, noe som kan være på grunn av løsemidlets polaritet som generelt egner seg bedre enn kun vann (Oliveira et al., 2013). Dette kan ses i sammenheng med etanol:vann sitt høyere utbytte av polyfenoler, og Tabell 9, Vedlegg 4, hvor korrelasjonsanalysen viser at det er signifikante negative korrelasjoner mellom pH og TPC ($p = 0,028$) for SLE. Den negative korrelasjonen indikerer et høyere utbytte av polyfenoler ved lavere pH. For eksempel er fenolsyrer en gruppe polyfenoler som kan finnes i makroalger som etanol:vann kan ha ekstrahert ut i løsemiddelet (Kumar et al., 2022).

5.3 Antioksidative analyser

5.3.1 Analyse ved 2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS)

Resultatene fra ABTS-analysen viste ingen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene med hensyn til RSA. Sammenlignet med TPC, som fant at etanol:vann hadde signifikant høyere polyfenolinnhold enn resten av gruppene, indikerer de utjevnedde forskjellene fra ABTS at PEF-ekstraktene har større antioksidantkapasitet i forhold til etanol:vann, enn det TPC indikerte. Dette kan bety at PEF-behandlingen har ekstrahert en høyere andel andre antioksidanter enn polyfenoler, i forhold til det etanol:vann har gjort. Selv om PEF-ekstraktene ikke var signifikant forskjellig fra vannekstraktene i hverken TPC eller ABTS, kan en ikke-signifikant tendens observeres i Figur 15 fra ABTS, hvor resultatene for PEF-gruppene ser ut til å generelt ligge mellom vann og etanol:vann gruppene, mens de i Figur 12 fra TPC er omtrent likt som vannekstraktene. Denne observasjonen tyder også på det samme som nevnt over, at PEF-behandlingen har bidratt til ekstraksjonen av antioksidanter som ikke ble kvantifisert med TPC.

Polysakkarider kan være en slik udetektert gruppe antioksidanter som ble ekstrahert ved hjelp av PEF, men disse ble ikke forsøkt kvantifisert i denne oppgaven. Fukoxantin er en annen kraftig antioksidant som skal finnes i betydelige mengder i brunalger. Denne studien fikk ikke detektert fukoxantin med den anvendte metoden, men det er ikke dermed sagt at ekstraktens sammensetning av bioaktive forbindelser ikke inneholder en betydelig andel av denne antioksidanten. Det viser heller at metoden for kvantifisering av fukoxantin (HPLC) var en begrensende faktor, sammenlignet med metoden for kvantifisering av polyfenoler (TPC) som var mer følsom for ekstraktens lave konsentrasjoner.

Det at PEF-ekstraktene er statistisk lik ekstraktene fra både vann- og etanol:vann-ekstraksjon, samtidig som etanol:vann er signifikant bedre enn vann, kan gi inntrykk av at PEF gir verdier

en plass i mellomsjiktet. Men statistisk sett kan man altså ikke konkludere med at PEF har høyere utbytte av antioksidanter enn når vann benyttes som et ekstraksjonsmiddel alene.

5.3.2 Analyse ved 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Resultatene fra DPPH-analysen viste heller ingen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene med hensyn til RSA. På grunn av at DPPH-analysen ga færre signifikante forskjeller mellom PEF-ekstraktene og etanol:vann-ekstraktene enn hva TPC-analysen gjorde, kan det indikere at PEF-behandlingen ekstraherte en høyere andel antioksidanter som ikke ga utslag på TPC, slik som diskutert i kapittel 5.3.1.

Resultatene fra DPPH skiller seg litt fra ABTS ved at det ikke ser ut til å finnes en tendens hvor PEF-ekstraktene generelt presterte bedre enn vannekstraktene (Figur 16). Resultatene fra DPPH gir derfor ikke like mye grunnlag som ABTS for å tro at PEF har ekstrahert en større andel ikke-identifiserte antioksidanter. Både DPPH og ABTS måler RSA, men med ulike metoder, og forskjellen kan muligvis tilskrives metodenes ulikhet. Trenden fra ABTS var heller ikke signifikant, og kan være en tilfeldighet.

Til slutt kan det nevnes at standardavviket til PEF-gruppen med $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 200$ er høyt i forhold til de andre gruppene ($\pm 11,1\%$ RSA) for denne analysen. Det er ikke kjent at det foreligger en spesiell grunn for at det var stor variasjon mellom de ulike parallellene, og det kan for eksempel skyldes tilfeldigheter eller menneskelige feil under forsøket.

5.3.3 Analyse ved ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Resultatene fra FRAP viste at den elektriske feltstyrken var en signifikant faktor for resultatene, mens antall pulser ikke ble identifisert som signifikant. Dette samsvarer med resultatene fra TPC, hvor det også var feltstyrken som ble identifisert som en signifikant faktor for ekstraksjon av polyfenoler, og med andre studier som ble diskutert i kapittel 5.2.1 (Souli et al., 2023). Resultatet fra FRAP bygger derfor opp under eksisterende teori om at feltstyrken er tett knyttet til PEF sin evne til å øke cellenes permeabilitet, og dermed utbyttet av intracellulære forbindelser.

Videre viste FRAP at PEF-ekstraktene med $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 10$, hadde signifikant bedre evne til å redusere Fe^{2+} , enn $E = 6 \text{ kV/cm}$, $nP = 200$. Analysene av TPC ga også at $E = 6 \text{ kV/cm}$, $nP = 200$ var prøven som fikk lavest utbytte av polyfenoler, så dette resultatet fra FRAP stemmer overens med forventningene fra TPC. ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD viste at etanol:vann ga signifikant høyere verdier enn både vannekstraktene og PEF ved $E = 6 \text{ kV/cm}$,

uavhengig av antall pulser ($p < 0,05$). Dette kan tyde på at behandlingen med $E = 6$ kV/cm var for kraftig for prøvene, og at ønskede forbindelser kan ha blitt ødelagt under behandlingen. Gruppen som ble behandlet med $E = 6$ kV/cm hadde klart størst temperaturøkning, hvor den høyeste var ved 200 pulser hvor temperaturen økte med $18,7^{\circ}\text{C}$ (Figur 13, kap. 4.1.3). Korrelasjonsanalysen i Figur 18 viste signifikant negativ korrelasjon mellom temperaturøkningen i PEF-ekstraktene og lavere verdier i resultatet fra FRAP. Dette antyder at temperaturøkningen henger sammen med dårligere ekstraksjon eller ødeleggelse av antioksidative forbindelser. På den annen side var ikke temperaturøkningen høy i forhold til hva andre studier har brukt, som diskutert i kapittel 5.2.3 Det vurderes derfor som mer sannsynlig at det er selve den elektriske behandlingen som eventuelt kan ha ødelagt forbindelser, enn at temperaturen har vært for høy.

De fleste PEF-prøvene behandlet med $E = 2$ og 4 kV/cm (med unntak av $E = 2$ kV/cm, $nP = 100$), var ikke signifikant forskjellige fra etanol:vann (Figur 17). Dette tyder på at PEF-behandlingen med lavere elektrisk feltstyrke generelt har ekstrahert en høyere andel antioksidanter med evne til å redusere Fe^{2+} som ikke ble kvantifisert med TPC, enn det etanol:vann gjorde. Korrelasjonsanalysene for PEF i Figur 18 og SLE i Figur 19 viste at FRAP for både PEF-ekstraktene og SLE hadde signifikant korrelasjon med TPC, men med betydelig lavere korrelasjonskoeffisient for PEF-ekstraktene. Dette indikerer også at for SLE var polyfenoler en større bidragsyter til den antioksidative kapasiteten enn for PEF-ekstraktene, som da muligens har ekstrahert en større andel andre antioksidanter.

En generell bemerkning for vurderingen av de antioksidative analysene er at Holdt og Kraan (2011) pekte på at brunalger i familien *Laminaria* får en betydelig lavere antioksidativ effekt hos prøver som er tørket, sammenlignet med ferske prøver. Forsøksdesignet benyttet i denne oppgaven kan derfor ha vært mindre optimalt med hensyn til ekstraktens antioksidative effekt.

5.4 Antimikrobielle analyser

I utførelsen av de antimikrobielle analysene ble kun PEF-ekstraktene behandlet ved 4 kV/cm og vannekstraktene benyttet. Begrenset mengde tid gjorde det nødvendig å kutte i antallet analyserte ekstrakter. PEF-ekstraktene ble valgt på grunnlag av TPC-analysen hvor elektrisk feltstyrke var en signifikant faktor, samt at 4 kV/cm hadde signifikant høyere utbytte av polyfenoler enn 6 kV/cm. Forventningen var at disse ekstraktene ville ha høyere grad av antimikrobielle egenskaper. Optimalt burde likevel alle PEF-ekstrakter blitt testet. Etanol:vann-ekstraktene ble ikke analysert, på grunn av etanol sine egne antimikrobielle egenskaper (Ingram, 1990).

Resultatene ga signifikante forskjeller mellom to grupper. Fra inhiberingsanalysen av *L. innocua* indikerte resultatene at vannekstraktet hemmet veksten av bakteriene signifikant bedre enn PEF-ekstraktet behandlet med $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 10$ ($p = 0,013$). For inhiberingsanalysen av *P. fluorescens*, derimot, ga resultatene at PEF-ekstrakt $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 10$ var signifikant bedre enn SLE ($p = 0,025$). Dette kan indikere at PEF-ekstraktene ikke hadde en antimikrobiell effekt utover SLE mot *L. innocua*. For *P. fluorescens* kan det indikere at PEF-ekstrakt $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 10$ hadde antimikrobiell effekt utover SLE. Det skal likevel legges vekt på at generelt lave verdier for log-reduksjonene (nær 0) med høye standardavvik (Tabell 6, kap. 4.4), samt relativt få antall paralleller ($n = 4$), gjør resultatene usikre, til tross for tilstedeværende signifikante forskjeller mellom SLE og PEF-ekstrakt $E = 4 \text{ kV/cm}$, $nP = 10$.

Totalt ga fem av ekstraktene negativ log-reduksjon som kan indikere at bakteriene vokste bedre enn de ville gjort uten tilførsel av ekstrakt. Dette var uventede resultater med tanke på at det var forventet tilstedeværelse av bioaktive forbindelser med antimikrobielle egenskaper. Goecke et al. (2012) fant at makroalgeekstrakt kan ha varierende effekt på ulike bakteriestammer, alt fra antimikrobiell virkning som hemmer vekst til stimulering for økt vekst. Den negative log-reduksjonen kan derfor skyldes at ekstraktene har tilført næringsstoffer til bakteriene som faktisk har økt deres veksthastighet i større grad enn antimikrobielle forbindelser har inhibert dem (Goecke et al., 2012). Det er derimot stor usikkerhet rundt dette, da de observerte log-reduksjonene var små.

Det skal ikke utelukkes at feilfaktorer under forsøket har spilt inn på resultatet, som menneskelige feil (pipetteringsteknikk, feil i avlesning av kolonier, etc.) eller at konsentrasjonen av bioaktive forbindelser i ekstraktene kan ha vært lavere enn minste inhiberende konsentrasjon som gjelder for de aktuelle forbindelsene mot *L. innocua* og *P.*

fluorescens. Dette vil si at ekstraktene ikke inneholdt nok veksthemmende stoffer til at det ville gitt utslag på analysene. Ut ifra resultatene for fukoxantin-analysene som indikerte at konsentrasjonen av fukoxantin var for lav til å detekteres med metoden, vurderes det som sannsynlig at den generelle konsentrasjonen av bioaktive forbindelser er relativt lav, og at metoden for de mikrobielle analysene er begrensende. Resultatene virker dessuten noe selvmotstridende med tanke på at mange av ekstraktene viste negativ log-reduksjon, og at vannprøven viste størst inhibering mot *L. innocua* selv om vannekstraktet ikke har utpekt seg positivt på noen av de øvrige analysene. Svært få av resultatene har dessuten statistisk signifikans. Særlig de høye standardavvikene gjør det vanskelig å trekke sikre konklusjoner for om de analyserte ekstraktene hadde antimikrobiell effekt eller ikke. Selv om ANOVA-testen viste statistisk signifikans kan de være et resultat av statistisk variabilitet heller enn reelle biologiske effekter.

Med bakgrunn i disse argumentene vurderes alle resultatene for de antimikrobielle analysene som svært usikre. SLE og PEF-ekstraktens antimikrobielle egenskaper vurderes derfor som ikke-observerte i denne studien. En oppkonsentrering av ekstraktene for videre inhiberingsanalyser kunne ha vært hensiktsmessig for å undersøke om dette ville gitt andre utslag på resultatene.

En annen feilkilde er også at ekstraktene ble avglemt på kjølerom (4°C) i to uker, i stedet for å bli fryst ned (-80°C), i forkant av analysen. Dette kan ha vært uheldig ettersom frysing kan hindre degradering av aktive forbindelser over tid, noe som vil bevare deres antimikrobielle effekt (Riediker et al., 2004).

I analyser gjort av Røsten (2023) på samme råstoff, ble ekstraktens antimikrobielle effekt mot *L. innocua* funnet til å være større ($1.25 \pm 0,11$ log-reduksjon CFU/mL) enn hva som ble funnet i denne studien. Det ble imidlertid forventet at ekstraktens antimikrobielle effekt skulle være noe tilsvarende det som ble funnet av Røsten (2023). Dette begrunnes med at denne studien fant høyere innhold av polyfenoler enn hva Røsten (2023) fant, med henholdsvis ($1,7 \pm 0,9$ g GAE/100g tørrvekt) og ($1,22 \pm 0,06$ g GAE/100g tørrvekt). På en annen side fikk Røsten (2023) detekterbare verdier for fukoxantin med samme metode, noe som antagelig kan forklares med en høyere benyttet konsentrasjon av råstoff i ekstraktene. Den høyere konsentrasjonen av råstoff, i kombinasjon med innhold av fukoxantin, kan være en mulig forklaring på at Røsten (2023) fikk en bedre inhibering med sine ekstrakter.

6 Konklusjon

Med hensyn til oppgavens hovedmål, viste resultatene at PEF som forbehandling for ekstraksjon fra *A. esculenta* med de anvendte parameterne – elektrisk feltstyrke (2, 4 og 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100 og 200) – og metodene som ble beskrevet i oppgaven *ikke* ga økt utbytte av bioaktive forbindelser sammenlignet med SLE. SLE med etanol:vann ga generelt høyere verdier for både kjemisk karakteristikk og antioksidant kapasitet, og det var ingen signifikante forskjeller mellom PEF-ekstraktene og vannektstraktene. Det er likevel mye resterende arbeid som gjenstår for videre optimalisering av prosessen, og det kan ikke utelukkes at PEF kan prestere bedre under andre betingelser enn de som ble benyttet i denne studien.

Delmålet om å optimalisere PEF-parameterne for størst mulig utbytte av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, ble ikke fullstendig oppfylt. Videre har delmålet hvor kvantifisering av PEF-ekstraktens antioksidative egenskaper skulle utføres, gitt indikasjon på at valg av riktig elektrisk feltstyrke har signifikant betydning for ekstraksjon av antioksidanter fra *A. esculenta*. Resultatene kan indikere at PEF-ekstraktene har ekstrahert andre bioaktive forbindelser enn polyfenoler, med antioksidative egenskaper, i større grad enn SLE. Delmålet som omhandlet kvantifisering av ekstraktens antimikrobielle egenskaper, indikerte at PEF-ekstraktene kan ha hatt svak inhiberende virkning på *P. fluorescens*, men resultatene her var svært usikre, og konsentrasjonene var mest sannsynligvis for lave til å ha gitt utslag på analysene.

I henhold til oppgavens problemstilling, og med utgangspunkt i de metodene som ble benyttet i denne oppgaven, vurderes PEF som en teknologi som kan være egnet som forbehandling for ekstraksjon av bioaktive forbindelser fra *A. esculenta*, med forutsetning om videre optimalisering av prosessparametere og metode. Forbedringspotensialet i metodene vurderes som betydelig, og det vil være svært relevant å undersøke problemstillingen videre.

7 Videre arbeid og generelle bemerkninger

Arbeidet utført i denne oppgaven har undersøkt effekten av PEF som forbehandling på ekstraksjonsutbyttet av TPC fra tørket *A. esculenta*, samt hvordan dette har påvirket ekstraktens bioaktivitet sammenlignet med ekstrakter oppnådd med SLE. PEF-behandlingen klarte ikke å utkonkurrere SLE-ekstraktet med etanol:vann som løsemiddel, men oppnådde ved flere anledninger tilsvarende resultater uten signifikante forskjeller. Det er verdt å merke seg at etanol er et meget effektivt løsemiddel. Videre arbeid med PEF-assistert ekstraksjon kan undersøke hvordan forbehandling med PEF i kombinasjon med ulike konsentrasjoner av løsemidler, som etanol, påvirker utbyttet av bioaktive forbindelser. Dersom PEF i kombinasjon med etanolekstraksjon kan gi høyere utbytte ved samme konsentrasjon av løsemiddel, kan dette føre til en mer bærekraftig produksjon av bioaktive forbindelser, enten ved å bruke mindre løsemiddel for samme utbytte eller ved å redusere mengden biomasse brukt i produksjonen. Det kan heller ikke utelukkes at det finnes gunstigere parameterinnstillinger enn de som ble brukt i denne studien. For videre arbeid er en grundigere prosessoptimalisering av stor interesse, hvor et bredere spektrum av kombinasjoner utforskes.

Videre kan alternative behandlingsmetoder av råstoff før PEF-behandling utforskes. For eksempel kan skylling av taren før videre prosessering være gunstig, da dette kan hjelpe med å vaske bort overflødig salt og andre mineraler og dermed senke konduktiviteten til råstoffet før behandling med PEF. En redusert konduktivitet vil, basert på erfaringer fra denne studien, muliggjøre bruk av høyere konsentrasjoner av råstoff og dermed øke mengden ekstraherte bioaktive forbindelser per batch. En oppkonsentrering av ekstraktene etter ekstraksjon kan også være ønskelig for lettere kvantifisering av innholdet av fukoxantin og ekstraktens antimikrobielle effekt.

Å benytte fersk tare til ekstraksjon i stedet for tørket burde også vurderes, da noen studier har vist at brunalger fra slekter som *Laminaria* får en redusert antioksidativ effekt etter tørking. Ved å bruke ferskt råstoff kan også ekstraksjonsprosessen bli mer effektiv, da metoder som frysetørking krever store mengder energi og tid, spesielt ved tørking av råstoff med høyt vanninnhold. Reduksjonen i energiforbruket vil også kunne gjøre ekstraksjonsprosessen mer bærekraftig. Imidlertid vil bruk av fersk tare redusere mengden av bioaktivt råstoff som behandles, da tare inneholder store mengder vann. Dette kan resultere i ekstrakter med lavere konsentrasjon av bioaktive forbindelser.

Mengden av de ulike bioaktive forbindelsene i *A. esculenta* er vist til å variere betraktelig med sesongen. Uavhengig av ekstraksjonsmetode det derfor essensielt å undersøke det optimale innhøstningstidspunktet for å utnytte råstoffet best mulig, med hensyn til høyest mulig utbytte av de bioaktive forbindelsene.

I denne studien ble det ikke gjort en normalisering av temperaturøkningen mellom PEF- og SLE-ekstraktene. I et videre arbeid kan en slik normalisering være gunstig for å øke sammenlignbarheten mellom ekstraksjonsmetodene. Dette kan innebære oppvarming av SLE-ekstraktene for å imitere temperaturøkningen som skjer under PEF-behandling. Videre kan en standardisering av starttemperaturen for PEF-ekstraktene vært nyttig for å oppnå mest mulig like forhold under ekstraksjon. Dette kan potensielt gjøres ved å forvarme PEF-kammeret til en spesifikk temperatur, for eksempel 30°C, før ekstraksjon.

Ekstraktenes kjemiske karakteristikk ble i denne studien kun evaluert basert på deres innhold av polyfenoler. Imidlertid inneholder makroalger som *A. esculenta* en rekke andre forbindelser med høy bioaktivitet. Slike forbindelser omfatter blant annet fukoxantin, polysakkarider og organiske syrer. Videre arbeid kan derfor ta sikte på å undersøke hvordan PEF påvirker ekstraksjonen av disse forbindelsene og hvordan de påvirker den antioksidative og antimikrobielle effekten til ekstraktet.

8 Referanseliste

- Amiali, M., Ngadi, M. O., Raghavan, V. G. S. & Nguyen, D. H. (2006). Electrical Conductivities of Liquid Egg Products and Fruit Juices Exposed to High Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 533-540. <https://doi.org/10.1080/10942910600596456>
- Andreou, V., Dimopoulos, G., Dermesonlouoglou, E. & Taoukis, P. (2020). Application of pulsed electric fields to improve product yield and waste valorization in industrial tomato processing. *Journal of food engineering*, 270, 109778. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109778>
- Baskar, G., Kalavathy, G., Aiswarya, R. & Abarnaebenezer Selvakumari, I. (2019). 7 - Advances in bio-oil extraction from nonedible oil seeds and algal biomass. I K. Azad (Red.), *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment* (s. 187-210). Woodhead Publishing.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- BIOTIC. (u.å.). Biotic Species Information for *Alaria esculenta*. I Biological Traits Information Catalogue (Red.). <https://www.marlin.ac.uk/biotic/browse.php?sp=4185>
- Blikra, M. J., Løvdal, T., Vaka, M. R., Roiha, I. S., Lunestad, B. T., Lindseth, C. & Skipnes, D. (2019). Assessment of food quality and microbial safety of brown macroalgae (*Alaria esculenta* and *Saccharina latissima*). *J Sci Food Agric*, 99(3), 1198-1206. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9289>
- Blikra, M. J., Skipnes, D., Noriega Fernández, E. & Skåra, T. (2020). Utfordringer knyttet til prosessering og analyse av norsk tare, med fokus på sukkertare og butare. *Nofima rapportserie*.
- Blomhoff, R., Andersen, R., Arnesen, E. K., Christensen, J. J., Eneroth, H., Erkkola, M., Gudaviciene, I., Halldórsson, Þ. I., Höyer-Lund, A. & Lemming, E. W. (2023). *Nordic Nutrition Recommendations 2023: integrating environmental aspects*. Nordic Council of Ministers.
- Buøen, N. G. & Rustad, T. (2020). Polyphenol extraction and antioxidant activity of *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. I. NTNU.
- Castejón, N., Thorarinsdóttir, K. A., Einarsdóttir, R., Kristbergsson, K. & Marteinsdóttir, G. (2021). Exploring the Potential of Icelandic Seaweeds Extracts Produced by Aqueous Pulsed Electric Fields-Assisted Extraction for Cosmetic Applications. *Mar Drugs*, 19(12), 662. <https://doi.org/10.3390/md19120662>
- Cheng, A., Lim, W. Y., Lim, P.-E., Yang Amri, A., Poong, S.-W., Song, S.-L. & Ilham, Z. (2022). Marine autotroph-herbivore synergies: Unravelling the roles of macroalgae in marine ecosystem dynamics. *Biology*, 11(8), 1209. <https://doi.org/10.3390/biology11081209>
- Ciko, A. M., Jokić, S., Šubarić, D. & Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Mar Drugs*, 16(10), 348. <https://doi.org/10.3390/md16100348>
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C. & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial crops and products*, 82, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
- Donsì, F., Ferrari, G. & Pataro, G. (2010). Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. *Food engineering reviews*, 2(2), 109-130. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9015-3>

- Duarte, C. M., Gattuso, J. P., Hancke, K., Gundersen, H., Filbee-Dexter, K., Pedersen, M. F., Middelburg, J. J., Burrows, M. T., Krumhansl, K. A. & Wernberg, T. (2022). Global estimates of the extent and production of macroalgal forests. *Global Ecology and Biogeography*, 31(7), 1422-1439.
- Einarsdóttir, R., Þórarinsdóttir, K. A., Aðalbjörnsson, B. V., Guðmundsson, M., Marteinsdóttir, G. & Kristbergsson, K. (2022). Extraction of bioactive compounds from *Alaria esculenta* with pulsed electric field. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02624-8>
- Fiskeridirektoratet. (2023). *Antall selskap og tillatelser i drift etter fylke*. Hentet 9.april fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Alger>
- Fiskeridirektoratet. (2024a). *Antall lokaliteter i sjø fordelt på fylke*. Hentet 09. april fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Alger>
- Fiskeridirektoratet. (2024b). *Antall tillatelser pr. 31. desember fordelt på fylke*. Hentet 09. april fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Alger>
- FNs bærekraftsmål*. (2024). United Nations Association of Norway. <https://fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal>
- Gager, L., Connan, S., Molla, M., Couteau, C., Arbona, J.-F., Coiffard, L., Cérantola, S. & Stiger-Pouvreau, V. (2020). Active phlorotannins from seven brown seaweeds commercially harvested in Brittany (France) detected by ¹H NMR and in vitro assays: temporal variation and potential valorization in cosmetic applications. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 2375-2386. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02022-1>
- Galal, S. A. B., Elzanfaly, E. S., Hussien, E. M., Amer, E. A. H. & Zaazaa, H. E. (2024). Spectrofluorimetric determination of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole in their combined formulation: application to butylated hydroxyanisole residual analysis in milk and butter. *Sci Rep*, 14(1), 4498-4498. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54483-1>
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. & Imhoff, J. F. (2012). Dual effect of macroalgal extracts on growth of bacteria in Western Baltic Sea. *Rev. biol. mar. oceanogr*, 47(1), 75-86. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000100007>
- Gong, B., Ma, S., Yan, Y. & Wang, Z. (2024). Progress on the biological characteristics and physiological activities of fucoxanthin produced by marine microalgae. *Frontiers in Marine Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1357425>
- Hasselström, L., Visch, W., Gröndahl, F., Nylund, G. M. & Pavia, H. (2018). The impact of seaweed cultivation on ecosystem services - a case study from the west coast of Sweden. *Mar Pollut Bull*, 133, 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.005>
- Holdt, S. L. & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543-597.
- Ingram, L. O. (1990). Ethanol tolerance in bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 9(4), 305-319. <https://doi.org/10.3109/07388558909036741>
- Jafari, S. M., Rashidinejad, A. & Simal-Gandara, J. (2023). *Handbook of Food Bioactive Ingredients : Properties and Applications* (1st 2023. utg.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Johansen, j. (u.å.). *Makroalger*. Norsk Institutt for bioøkonomi (NIBIO). Hentet 07.03.24 fra <https://nibio.no/tema/mat/makroalger>

- Kadam, S. U., Tiwari, B. K. & O'Donnell, C. P. (2015). Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int J Food Sci Technol*, 50(1), 24-31. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12692>
- Kanduser, M. & Miklavcic, D. (2009). *Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview* (1. Aufl. utg.). New York, NY: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79374-0>
- Karpiński, T. M., Ożarowski, M., Alam, R., Łochyńska, M. & Stasiewicz, M. (2021). What Do We Know about Antimicrobial Activity of Astaxanthin and Fucoxanthin? *Mar Drugs*, 20(1), 36. <https://doi.org/10.3390/md20010036>
- Kawai, H. & Henry, E. C. (2016). Phaeophyta. *Handbook of the Protists*, 1-38. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_31-1
- Knoerzer, K., Baumann, P. & Buckow, R. (2012). An iterative modelling approach for improving the performance of a pulsed electric field (PEF) treatment chamber. *Computers & chemical engineering*, 37, 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2011.09.002>
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T. & Jormalainen, V. (2005). Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J Chem Ecol*, 31(1), 195-212. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-0984-2>
- Krause-Jensen, D. & Duarte, C. M. (2016). Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. *Nature Geoscience*, 9(10), 737-742. <https://doi.org/10.1038/ngeo2790>
- Kraan, S. (2020). Concise review of the genus *Alaria* Greville, 1830. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 3543-3560. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02222-0>
- Kumar, Y., Tarafdar, A., Kumar, D., Saravanan, C., Badgujar, P. C., Pharande, A., Pareek, S. & Fawole, O. A. (2022). Polyphenols of Edible Macroalgae: Estimation of In Vitro Bio-Accessibility and Cytotoxicity, Quantification by LC-MS/MS and Potential Utilization as an Antimicrobial and Functional Food Ingredient. *Antioxidants (Basel)*, 11(5), 993. <https://doi.org/10.3390/antiox11050993>
- Leandro, A., Pacheco, D., Cotas, J., Marques, J. C., Pereira, L. & Gonçalves, A. M. (2020). Seaweed's bioactive candidate compounds to food industry and global food security. *Life*, 10(8), 140. <https://doi.org/10.3390/life10080140>
- Leandro, A., Pereira, L. & Gonçalves, A. M. (2019). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine drugs*, 18(1), 17.
- Levkov, K., Linzon, Y., Mercadal, B., Ivorra, A., González, C. A. & Golberg, A. (2020). High-voltage pulsed electric field laboratory device with asymmetric voltage multiplier for marine macroalgae electroporation. *Innovative food science & emerging technologies*, 60, 102288. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102288>
- Li, Y.-X. & Kim, S.-K. (2011). Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(6), 1461-1466. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0202-7>
- Lomartire, S. & Gonçalves, A. M. (2022). An overview of potential seaweed-derived bioactive compounds for pharmaceutical applications. *Marine drugs*, 20(2), 141.
- López-Gámez, G., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. & Soliva-Fortuny, R. (2021). Pulsed electric field treatment strategies to increase bioaccessibility of phenolic and carotenoid compounds in oil-added carrot purees. *Food Chemistry*, 364, 130377.

- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Prieto, M. A. & Simal-Gandara, J. (2020). Metabolites from macroalgae and its applications in the cosmetic industry: A circular economy approach. *Resources (Basel)*, 9(9), 101. <https://doi.org/10.3390/RESOURCES9090101>
- Luengo, E., Álvarez, I. & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative food science & emerging technologies*, 17, 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>
- Lyng, J. G., Arroyo, C., Alberti, O. C., Frontuto, D., Apel, C., Brunton, N., O'Sullivan, M. & Whyte, P. (2016). Harnessing the Structure Modifying Potential of Pulsed Electric Fields (PEF) – Food Processing Examples in Product Stabilization, Process Acceleration and Compound Extraction. I T. Jarm & P. Kramar (Red.), *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies : Portorož, Slovenia, September 6 –10, 2015* (1st 2016. utg., Bd. 53, s. 7-10) (IFMBE Proceedings). Springer Singapore : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-287-817-5>
- Mannino, A. M., Vaglica, V. & Oddo, E. (2017). Interspecific variation in total phenolic content in temperate brown algae. *Journal of Biological Research*, 90(1), 26-29. <https://doi.org/10.4081/jbr.2017.6578>
- Michalak, I. & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Eng. Life Sci*, 14(6), 581-591. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P. & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem*, 392(5), 977-985. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2353-9>
- Naliyadhara, N., Kumar, A., Girisa, S., Daimary, U. D., Hegde, M. & Kunnumakkara, A. B. (2022). Pulsed electric field (PEF): Avant-garde extraction escalation technology in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 238-255. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.019>
- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S. & Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 176-181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.006>
- Nenadis, N., Lazaridou, O. & Tsimidou, M. Z. (2007). Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment. *J. Agric. Food Chem*, 55(14), 5452-5460. <https://doi.org/10.1021/jf070473q>
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M. & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *J. Agric. Food Chem*, 52(15), 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Numminen, L. (2023). *Process Optimization Explained - Methods, Benefits & Tools*. <https://www.workfellow.ai/learn/what-is-process-optimization>
- Oftebro, M. (2022, 31.01). Fucoïdan - The brown seaweed joker. <https://www.ntnu.no/blogger/teknat/2022/04/07/fucoïdan-the-brown-seaweed-joker/>
- Oliveira, M. L. N., Malagoni, R. A. & Franco, M. R. (2013). Solubility of citric acid in water, ethanol, n-propanol and in mixtures of ethanol+water. *Fluid phase equilibria*, 352, 110-113. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.05.014>

- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Nicorescu, V. & Stefan, G. (2017). Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 16(6), 1243-1268. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12298>
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. & Li, Z. (2005). Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol*, 37(4), 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.10.008>
- Quoc Toan, T., Phong, T., Tien, D., Nguyen, L., Mai Anh, N., Pham, H. H., Duy, L., Nghi, D., Thi, H., Pham, T. N., Tung, H. & Tung, N. (2021). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phlorotannin From *Sargassum swartzii* (Turn.) C. Ag. With Ethanol/Water. *Natural Product Communications*, 16, 1-11. <https://doi.org/10.1177/1934578X21996184>
- Rahmah, N. L., Sukardi & Ahsan, A. M. (2020). Analysis of pulsed electric field (PEF) specific input energy and its effect to the tannin content of Areca (*Areca catechu* L.) seed powder extract. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 475(1), 12031. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012031>
- Rajauria, G. & Abu-Ghannam, N. (2013). Isolation and Partial Characterization of Bioactive Fucoxanthin from *Himantalia elongata* Brown Seaweed: A TLC-Based Approach. *Int J Anal Chem*, 2013, 802573-802576. <https://doi.org/10.1155/2013/802573>
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J. & Miklavčič, D. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative food science & emerging technologies*, 37, 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.003>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Riediker, S., Rytz, A. & Stadler, R. H. (2004). Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A*, 1054(1-2), 359-363. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01289-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01289-0)
- Røsten, S. H. (2023). *Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Alaria esculenta*, and its Antioxidant and Antimicrobial Properties* [NTNU]. Trondheim.
- Seaweed Solutions. (u.å.). *Alaria esculenta* (Winged Kelp / Wakame). Hentet 7. Mai fra <https://seaweedsolutions.com/winged-kelp-wakame-alaria-esculenta>
- Shannon, E. & Abu-Ghannam, N. (2017). Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 1027-1036. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0983-4>
- Shavandi, A., Saeedi, P. & Bekhit, A. E.-D. A. (2020). Pulsed Electric Field Processing. I (1. utg., s. 155-174). United Kingdom: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429327551-8>
- Silva, A., Silva, S. A., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Gullón, P., Fraga-Corral, M., Domingues, V. F., Barroso, M. F. & Simal-Gandara, J. (2020). Antibacterial use of macroalgae

- compounds against foodborne pathogens. *Antibiotics*, 9(10), 712. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100712>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. I *Methods in Enzymology* (Bd. 299, s. 152-178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G. & Mendiola, J. A. (2021). Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products. *Applied sciences*, 11(11), 4897. <https://doi.org/10.3390/app11114897>
- Souli, I., Chaira, N., Jemni, M., Tlahig, S., Ferchichi, A. & Lanoisellé, J. L. (2023). Optimization and Intensification of Bioactive Components and Antioxidant Activity of Extracts from Date Fruit (*Phoenix dactylifera* L.) Using Pulsed Electric Fields (PEF) Technology and Thermal Processing. *Processes*, 11(3), 884. <https://doi.org/10.3390/pr11030884>
- Stupar, J., Holøymoen, I. G., Hoel, S., Lerfall, J., Jakobsen, A. N. & Rustad, T. (2021). Diversity and antimicrobial activity towards listeria spp. And escherichia coli among lactic acid bacteria isolated from ready-to-eat seafood. *Foods*, 10(2), 271. <https://doi.org/10.3390/foods10020271>
- Surendhiran, D., Cui, H. & Lin, L. (2019). Encapsulation of Phlorotannin in Alginate/PEO blended nanofibers to preserve chicken meat from Salmonella contaminations. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100346.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 266-287. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00111.x>
- Thomas, N. V. & Kim, S.-K. (2011). Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(3), 325-335. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2020.158618>
- Tijjani, H., Zangoma, M. H., Mohammed, Z. S., Obidola, S. M., Egbuna, C. & Abdulai, S. I. (2020). Polyphenols: Classifications, Biosynthesis and Bioactivities. I *Functional foods and nutraceuticals*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42319-3_19
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tziveleka, L. A., Tammam, M. A., Tzakou, O., Roussis, V. & Ioannou, E. (2021). Metabolites with antioxidant activity from marine macroalgae. *Antioxidants (Basel)*, 10(9), 1431. <https://doi.org/10.3390/antiox10091431>
- Wan, A. H., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R. & Johnson, M. P. (2019). Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 458-492. <https://doi.org/10.1111/raq.12241>
- Wang, J., Zhang, M. & Fang, Z. (2019). Recent development in efficient processing technology for edible algae: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.032>
- Wang, T., Jónsdóttir, R. & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>

- Wang, Z., Sun, Q., Zhang, H., Wang, J., Fu, Q., Qiao, H. & Wang, Q. (2021). Insight into antibacterial mechanism of polysaccharides: A review. *Food science & technology*, 150, 111929. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111929>
- Wei, Y., Liu, Q., Xu, C., Yu, J., Zhao, L. & Guo, Q. (2016). Damage to the Membrane Permeability and Cell Death of *Vibrio parahaemolyticus* Caused by Phlorotannins with Low Molecular Weight from *Sargassum thunbergii*. *Journal of aquatic food product technology*, 25(3), 323-333. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.851757>
- Zepka, L. Q., Do Nascimento, T. C. & Jacob-Lopes, E. (2021). *Bioactive Compounds : biosynthesis, characterization and applications*. IntechOpen.

Vedlegg 1

Optimalisering av PEF-parametere

For å oppnå høyest mulig utbytte av bioaktive forbindelser fra ekstraktene som ble behandlet med PEF, ble parameterinnstillingene forsøkt optimalisert gjennom flere runder med testing. For å få en indikasjon på ekstraktens bioaktivitet underveis i optimaliseringen, skulle alle ekstrakter analyseres for totalt polyfenolinnhold (TPC) og innholdet av fukoxantin (HPLC). Disse analysene av kjemiske karakteristikk er beskrevet i kapittel 3.3.

Hver innstilling ble gjennomført i $n = 3$ paralleller, i et PEF-kammer med 2 cm mellom elektrodene og et volum på 10 mL.

Målet med optimaliseringen var å finne en kombinasjon av parametere som ga størst mulig utbytte av bioaktive forbindelser fra PEF-behandlet *A. esculenta* med vann som løsemiddel. Som resultat av veiledning og litteratursøk av prosessen og parameterne som kunne stilles inn, ble det bestemt at elektrisk feltstyrke (E) og antall pulser (nP) var innstillingene som skulle optimaliseres. Designet for prosessoptimaliseringen ble stort sett utviklet fortløpende underveis, basert på erfaringer, veiledning og litteratursøk.

Den første testrunden ble utført med $E = 12$ kV/cm gjennom en prøve med konsentrasjon 100 g/L, hvor hensikten var å undersøke hvordan maskinens maksimale innstilling for elektrisk feltstyrke påvirket ekstraktet. De øvrige parameterne ble satt som beskrevet i Tabell 7 (test 1): 10, 200 og 400 pulser, pulsbredde 7 μ s og frekvens 25 Hz. I dette første forsøket førte ohmsk overoppheting til at prøven kokte over i kammeret, og vann kom i kontakt med elektrodene slik at eksperimentet måtte avsluttes.

Tabell 7: Oversikt over de ulike parameterinnstillingene benyttet under optimaliseringen av innstillingene for pulserende elektrisk felt (PEF)-maskinen for ekstraksjon av bioaktive forbindelser, konsentrasjonen av frysetørket *Alaria esculenta* i PEF-kammeret og erfaring/lærdom fra hver testrunde.

Test	E [kV/cm]	nP	Pulsbredde [µs]	Frekvens [Hz]	Prøve-konsentrasjon I kammer [g/L]	Erfaring
1	12	10, 200, 400	7	25	100,0	Ohmsk overoppheting, mislykket kjøring
2	2 4 6	10	5	25	111,1	«Resistance too low»/ For høy konduktivitet
3	4 6	10, 100, 200 10, 100, 150	5	25	22,22	«Resistance too low»/ For høy konduktivitet
4	2 4 6	10, 100, 200	5	5	11,11	

Da det ble klart at det første designet som var planlagt ikke kunne kjøres, ble det mer fokus på å finne et forsøksdesign hvor prøvene kunne behandles uten feilmeldinger i systemet. Ved test 2 ble det derfor forsøkt å hindre overoppheting med lavere E (2, 4 og 6 kV/cm) og pulsbredde (5 µs), samt lavere volum i kammeret for å motvirke at prøven skulle koke over og vann komme i kontakt med elektrodene, derav endret prøvekonsentrasjon (111,1 g/L). Med disse innstillingene kunne alle testene kjøres, men flere fikk feilmeldingen «*Resistance too low*».

Konduktiviteten til prøvene ble dermed målt. Disse verdiene oversteg PEF-maskinens øvre grenseverdi for konduktivitet i mediet (< 10 mS/cm), og prøvene ble derfor fortynnet for å senke konduktiviteten. Test 3 i Tabell 7 ble kjørt med en prøvekonsentrasjon på 22,22 g/L, E = 4 og 6 kV/cm, og nP = 10, 100 og 200. De fleste prøvene kunne da kjøres uten problemer, mens de med høyest spenning og nP fremdeles fikk feilmeldingen «*Resistance too low*».

Ved test 4 i Tabell 7 ble prøvekonsentrasjonen i kammeret ytterligere fortynnet (11,11 g/L) for å senke konduktiviteten, samt at det ble forsøkt å senke frekvensen fra 25 Hz til 5 Hz. I tillegg ble det bestemt at prøvene skulle hydreres over natten ved 4 °C før PEF-behandling, og etter PEF-behandlingen ble de satt på benken i romtemperatur i 2 timer for passiv ekstraksjon før filtrering. Disse beslutningene ble gjort på bakgrunn av noe dårlige resultater fra de kjemiske analysene av test 3, og et litteratursøk som endte i metoden til Einarsdóttir et al. (2022). Tanken

var å sikre fullstendig hydrering av cellene for å utelukke at ufullstendig hydrering var grunnen til at PEF ikke ga større utslag på de kjemiske analysene. Passiv ekstraksjon i 2 timer etter behandling skulle gi forbindelsene tilstrekkelig tid til å diffundere ut av cellene. I denne testrunden ble de øvrige innstillingene satt til 2, 4 og 6 kV/cm; 10, 100 og 200 pulser; 5 μ s. Disse innstillingene kunne kjøres på den gitte prøvekonsentrasjonen uten problemer.

På dette punktet i oppgaven hadde mye tid gått til optimalisering, og for å få tid til de resterende analysene ble det bestemt at test 4 (Tabell 7) var de innstillingene som skulle bli implementert i prosessen, og som gruppen ville gå videre med til analyser av antioksidative og antimikrobielle egenskaper.

Det siste steget i optimaliseringsprosessen beskrevet i kapittel 1.5, vil være å kontinuerlig forbedre og analysere prosessen, hvor et nytt mål kan defineres og optimaliseringen starter på nytt. Prosessen beskrevet i dette vedlegget er preget av lite tid til å gjennomføre tilstrekkelige runder med tilbakekobling mellom testing og endring av design. For videre arbeid ville kontinuerlig forbedring vært et naturlig neste steg etter at ekstraktene har blitt analysert og resultatene bearbeidet, ettersom det sannsynligvis finnes parameterinnstillinger som kan gi bedre resultater enn dem som ble funnet i denne oppgaven.

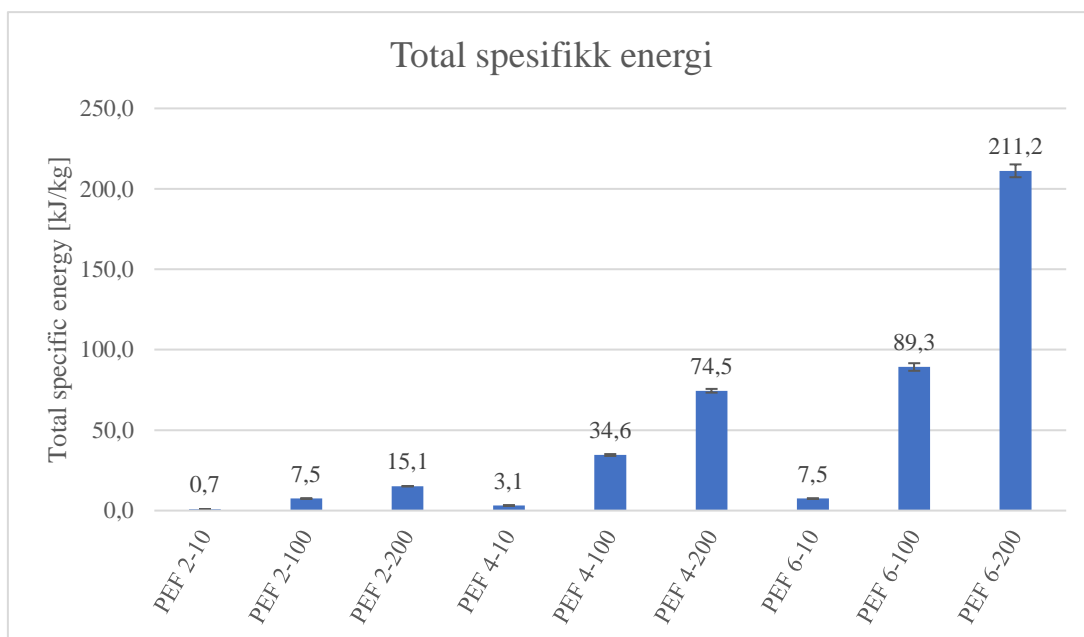
Vedlegg 2

DATA FRA PEF-BEHANDLING

Dette vedlegget inneholder øvrig data som ble registrert under PEF-behandlingene, men som ikke er tatt med i resultatdelen. Spesifikk energitilførsel (kJ/kg), konduktivitet (mS/cm), og pH under og/eller etter behandling ble registrert for ekstraktene som ble behandlet med $E = 2, 4$ og 6 kV/cm, og $nP = 10, 100$ og 200 pulser, med frekvens (5 Hz) og pulsbredde ($5 \mu\text{s}$) som faste parameterne.

Spesifikk energitilførsel

Den spesifikke energitilførselen (kJ/kg) for hvert ekstrakt ble registrert ved å lese av displayet på PEF-maskinen etter hver behandling, og er fremstilt i Figur 20. Til sammenligning brukte Einarsdóttir et al. (2022) sin studie rundt $9,3$ kJ/kg på sine ekstrakter (Tabell 1, kap. 2.4.2).



Figur 20: Spesifikk energitilførsel som ekstraktene av *Alaria esculenta* ble utsatt for under pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling. Ulike innstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ble benyttet.

Konduktivitet før og etter PEF-behandling

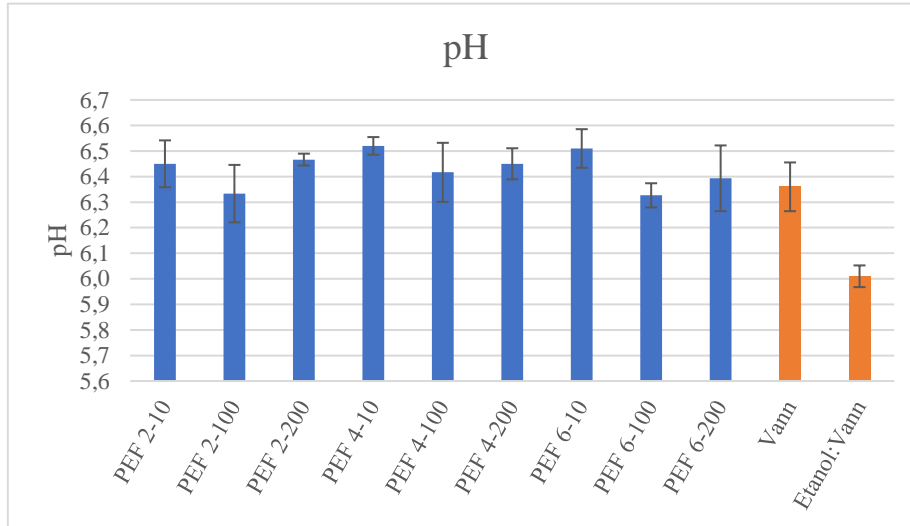
Konduktiviteten ble målt for til sammen seks prøver (tre test-prøver dag 1, og tre SLE vann-prøver dag 2) før PEF-behandling, og for alle prøvene etter PEF-behandling. Hensikten var å undersøke hvordan de ulike PEF-behandlingene påvirket prøvenes konduktivitet. Gjennomsnittlig konduktivitet i de seks homogeniserte prøvene med 0,10 g tare og 9 mL avionisert vann som ble målt uten PEF-behandling, var 4,9 mS/cm. Etter dag 1 av PEF-forsøkene ble det oppdaget at forsøksdesignet hadde en metodisk feil som gjorde sammenligning vanskelig: prøvene som representerte konduktivitet før PEF-behandling hadde et totalvolum på 9 mL, mens etter PEF-behandling ble prøvene skylt ut av kammeret med 1 mL vann, og prøvene som ble målt da hadde dermed et totalvolum på 10 mL. Feilen ble rettet opp i på dag 2 av forsøket ved å måle konduktiviteten direkte i kammeret etter PEF-behandling, men det var ikke tid til å gjøre første del på nytt. Derfor er datasettet som er brukt til beregningene av gjennomsnittlig konduktivitet etter PEF, begrenset til prøvene som ble behandlet med $E = 6$ kV/cm. Gjennomsnittlig konduktivitet i de ulike fasene av forsøket er gjengitt i Tabell 8.

*Tabell 8: Gjennomsnittlig konduktivitet for prøvene med *Alaria esculenta* før og etter pulserende elektrisk felt (PEF)-behandling med totalvolum 9 mL. Konduktivitet ble også målt etter PEF-behandling og 2 timer passiv ekstraksjon, men her var totalvolum 10 mL og disse dataene er derfor ikke umiddelbart sammenlignbare med de andre. Datasettet for målinger før PEF bestod av seks prøver. Datasettet for målinger etter PEF (9 mL) bestod av ni prøver, der alle ble behandlet med elektrisk feltstyrke (E) = 6 kV/cm.*

	Før PEF (9 mL)	Etter PEF (9 mL)	Etter PEF+2t (10 mL)
Gjennomsnittlig konduktivitet [mS/cm]	4,9	5,2	4,3

pH-målinger

Figur 21 viser verdiene som ble målt for pH av både PEF- og SLE-ekstraktene. Etanol:vann prøven skiller seg ut med litt lavere pH, men de andre prøvene er relativt like. Alle ekstraktene hadde vært fryselaagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ og tint opp igjen før pH ble målt.



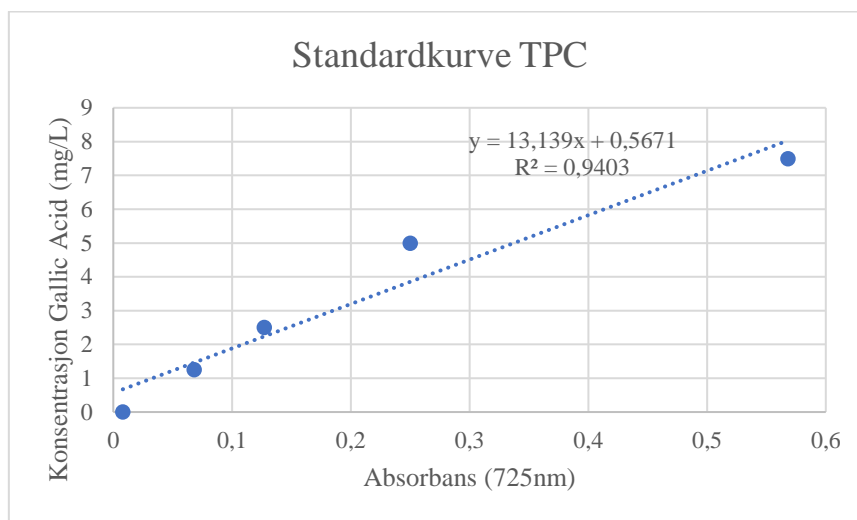
Figur 21: pH-målinger av pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstrakter og solid liquid ekstrakter (SLE) av *Alaria esculenta*. Ulike parameterinnstillinger for elektrisk feltstyrke (2 kV/cm, 4 kV/cm, 6 kV/cm) og antall pulser (10, 100, 200) ved PEF-behandling ble benyttet.

Vedlegg 3

Standardkurver fra kjemiske og antioksidative analyser

Standardkurve for totalt polyfenolinnhold

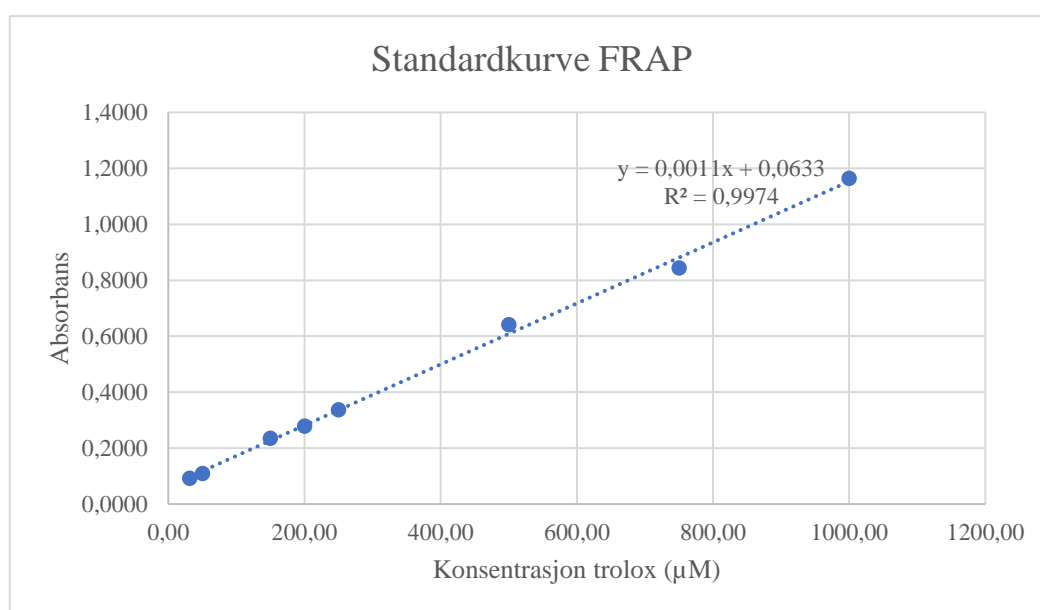
Totalt polyfenolinnhold (TPC) ble analysert ved hjelp av Folin-Ciocalteu metoden som beskrevet av Singleton et al. (1999), og modifisert etter Røsten (2023). Standardløsninger med ulike konsentrasjoner av gallisk syre (0-20 mg/L, CAS: 5995-86-8, Merck, Darmstadt, Tyskland) ble tillagd. Figur 22 viser standardkurven for standardløsningene.



Figur 22: Standardkurven for løsninger med kjent konsentrasjon gallisk syre (mg/L) som ble benyttet til utregning av totalt polyfenol innhold (TPC) i ekstrakter av *Alaria esculenta*.

Standardkurve for FRAP

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ble analysert i henhold til metoden beskrevet av Benzie og Strain (1996), med mindre modifikasjoner etter Røsten (2023). Standardløsninger med ulik konsentrasjon av trolox (0,005g, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-karboksylysyre, C₁₄H₁₈O₄, CAS: 53188-07-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) løst i 20 mL metanol (CH₃OH, 96%, CAS: 67-56-1, VWR International, Radnor, USA) ble lagd, og fortynnet med avionisert vann til konsentrasjoner fra 31,25-1000 µM. Figur 23 viser standardkurven for standardløsningene.



Figur 23: Standardkurven for løsninger med kjent konsentrasjon trolox (µM) som ble benyttet til utregning av ferric reducing antioxidant power (FRAP)-verdi for ekstrakter av *Alaria esculenta*.

Vedlegg 4

Korrelasjonsanalyse mellom kjemisk karakteristikk og antioksidativ effekt

For å undersøke hvorvidt det fantes signifikante sammenhenger mellom kjemiske karakteristikk og antioksidative effekt for ekstraktene fremstilt med pulserende elektrisk felt (PEF) assistert ekstraksjon og solid liquid ekstraksjon (SLE), ble det utført en Pearsons korrelasjonsanalyse med parvis sammenlikning ved $\alpha = 0,05$. Korrelasjonskoeffisientene (r) med tilhørende p -verdier er presentert i Tabell 9.

*Tabell 9: Korrelasjonen (r) mellom kjemisk karakteristikk (totalt polyfenolinnhold (TPC), pH), antioksidant kapasitet (2,2'-azin-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP)), og temperaturøkning, ble målt for pulserende elektrisk felt (PEF)-ekstraktene og solid liquid ekstraktene (SLE) av *Alaria esculenta* med Pearsons parvise korrelasjonsanalyse. Resultater for korrelasjonen mellom de ulike kjemiske karakteristikkene er også presentert. * indikerer signifikant korrelasjon $p < 0,05$.*

Ekstrakt	Parameter 1	Parameter 2	Korrelasjon (r)	p -verdi
PEF	DPPH (RSA%)	TPC (g GAE/100g dw)	0,085	0,672
	FRAP (Trolox eq. $\mu\text{mol/g}$)	TPC (g GAE/100g dw)	0,46	0,016*
	ABTS (RSA%)	TPC (g GAE/100g dw)	0,13	0,510
	Temp.økning	TPC (g GAE/100g dw)	-0,32	0,104
	pH	TPC (g GAE/100g dw)	0,36	0,063
	Temp.økning	DPPH (RSA%)	-0,28	0,152
	pH	DPPH (RSA%)	-0,10	0,619
	Temp.økning	FRAP (Trolox eq. $\mu\text{mol/g}$)	-0,44	0,022*
	pH	FRAP (Trolox eq. $\mu\text{mol/g}$)	0,31	0,122
	Temp.økning	ABTS (RSA%)	0,11	0,591
pH	ABTS (RSA%)	0,12	0,555	
pH	Temp.økning		-0,28	0,151
SLE	DPPH (RSA%)	TPC (g GAE/100g dw)	0,94	0,018*
	FRAP (Trolox eq. $\mu\text{mol/g}$)	TPC (g GAE/100g dw)	0,89	0,041*
	ABTS (RSA%)	TPC (g GAE/100g dw)	0,95	0,012*
	pH	TPC (g GAE/100g dw)	-0,92	0,028*
	pH	DPPH (RSA%)	-0,89	0,044*
	pH	FRAP (Trolox eq. $\mu\text{mol/g}$)	-0,92	0,025*
	pH	ABTS (RSA%)	-0,92	0,029*

