

Malin Christine Kletthagen

Biokjemisk sammensetning, biologisk aktivitet og effekt av simulert fordøyelse i rød sjøpølse *Parastichopus tremulus*

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft

Veileder: Ida-Johanne Jensen

Medveileder: Dat Trong Vu

Mai 2022

Malin Christine Kletthagen

Biokjemisk sammensetning, biologisk aktivitet og effekt av simulert fordøyelse i rød sjøpølse *Parastichopus tremulus*

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft
Veileder: Ida-Johanne Jensen
Medveileder: Dat Trong Vu
Mai 2022

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne oppgaven dekker 45 studiepoeng og markerer slutten på masterprogrammet Matvitenskap, teknologi og bærekraft ved NTNU. Jeg ønsker å takke hovedveilederen min Ida-Johanne Jensen, for veldig god oppfølging, verdifull kunnskap og masse inspirasjon hele veien. Jeg vil også takke biveilederen min Dat Trong Vu for all hjelp på lab, for din tålmodighet og for at du har tatt deg tid til å svare på spørsmålene mine til alle døgnetts tider. I tillegg vil jeg takke avdelingsingeniør Tarjei Haugbro, som har hjulpet meg med alle HPLC-analyser.

En stor takk må også rettes til mine studievenninner for støtte, oppmuntring og gode råd. Vi har stått sammen i både oppturer, nedturer og perioder med mye frustrasjon, og dere har gjort disse årene både lærerike og morsomme ved å spre latter og glede. Jeg vil få takke Martine Øines Fremstad for korrekturlesing og for å alltid være en god venninne. I tillegg vil jeg takke Marianne Aag for starten på et nytt vennskap etter utallige timer sammen på lab med masse latter og noen tårer. Til slutt vil jeg få takke mine viktigste støttespillere, familien og vennene mine, for at dere alltid er der for meg når jeg trenger det.

Trondheim, 15. mai 2022

MalinChristineKletthagen

Malin Christine Kletthagen

Sammendrag

Verdens befolkning er forventet å vokse kraftig. Det er allerede en stor global utfordring å produsere nok næringsrik og helsefremmende mat til den voksende befolkningen på en bærekraftig måte. Interessen for marine proteiner og bioaktive peptider har økt de senere årene, og bedre utnyttelse av havets ressurser er en stor mulighet. Det finnes mange lite utnyttede marine arter lavere i næringskjeden. Sjøpølse er en lite utnyttet marin ressurs med et stort potensiale for kommersiell høsting i Norge, og er antatt å være en kilde til bioaktive peptider. For å kunne bruke nye arter til humant konsum er det nødvendig å undersøke næringsinnholdet og andre helsefremmende komponenter. Målene med denne oppgaven var derfor å undersøke biokjemisk sammensetning og biologisk aktivitet; antioksidativ kapasitet og antihypertensiv kapasitet i arten rød sjøpølse *Parastichopus tremulus*, og studere hvordan den biologiske aktiviteten endres gjennom fordøyelsen.

I denne oppgaven ble alle analysene utført på både rå og frysetørket *P.tremulus*. Resultatene indikerte at *P.tremulus* har et balansert næringsinnhold som er fordelaktig for menneskelig konsum. Fettinnholdet ble målt til å ligge på ca. 1 % og proteininnholdet på ca. 4 %. Proteinene var av god kvalitet, og inneholdt alle de essensielle aminosyrene som kunne detekteres. Det ble vist at frysetørkingen ikke påvirket næringsinnholdet i særlig grad. Protein-, vann- og askeinnholdet var likt, men det ble funnet signifikante forskjeller i fettinnholdet mellom rå og frysetørket rød sjøpølse. Til tross for statistisk signifikant forskjell var forskjellen liten. Cirka 70 % av aminosyreinnholdet ble bevart gjennom frysetørkingen. Frysetørkingen påvirket derimot den antioksidative kapasiteten, og alle de tre benyttede metodene viste en noe større antioksidativ kapasitet i rå enn i frysetørket sjøpølse ved omregning til våtvekt. Store variasjoner og høye standardavvik gjorde det likevel vanskelig å konkludere med eksakt hvor store forskjellene var.

Det ble etablert en simulert fordøyelsesmodell, hvor utviklingen av antioksidativ- og antihypertensiv kapasitet gjennom fordøyelsen ble undersøkt. Resultatene viste en økende antioksidativ kapasitet og en økende frigjøring av aminosyrer utover i fordøyelsen. For den antihypertensive kapasiteten var det vanskelig å konkludere, ettersom resultatene hadde svært store variasjoner og høye standardavvik både mellom hver prøve og mellom replikatene. Resultatene viste også motsatt effekt fra tidligere studier ved at den ACE-hemmende effekten økte utover i fordøyelsen.

Summary

The world's population is expected to grow rapidly. To produce enough nutritious and health promoting food to the growing population in a sustainable way is already a large, global challenge. The interest for marine proteins and bioactive peptides has increased the recent years, and better utilization of the ocean's resources is a great opportunity. There are many little utilized marine species deeper in the food chain. Sea cucumber is a little utilized marine resource with a large potential for commercial harvesting in Norway and expected to be a source of bioactive peptides. To be able to use new species to human consumption, it is necessary to investigate the nutrient content and other health promoting components. The aims with this study were to investigate biochemical composition and biological activity; antioxidative and antihypertensive capacity in the specie red sea cucumber, *Parastichopus tremulus*, and study how the bioactivity changes through digestion.

In this study, all analyzes were performed on both raw and freeze-dried *P.tremulus*. The results indicated that *P.tremulus* has a balanced nutrient content that is beneficial for human consumption. The fat content was measured to be approximately 1 % and the protein content 4 %. The proteins had good quality and contained all the essential amino acids that could be detected. It was shown that the freeze drying did not affect the nutrient content remarkable. The protein-, ash- and water content were similar for raw and freeze-dried sea cucumber, but a significant difference was found in the fat content. Despite the statistical significance, the differences were small. About 70 % of the amino acid content was preserved through freeze-drying. Freeze-drying on the other hand, affected the antioxidative capacity, and the results from all three methods showed a greater antioxidative capacity in raw compared to freeze-dried sea cucumber in wet weight. Large variations and high standard deviations made it difficult to conclude exactly how large the differences were.

A simulated digestion model was established, and the development of antioxidative and hypertensive capacity through digestion was investigated. The results showed an increasing antioxidative capacity and an increasing release of amino acids throughout the digestion. For the antihypertensive capacity, it was difficult to conclude. The results had large variations and standard deviations both between each sample and between the replicates and showed the opposite effect from previous studies with an increasing ACE-inhibiting effect throughout the digestion.

Forkortelser

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay

ACE Angiotensin-converting enzyme

APPH 2,20-azobis(iso isobutyramidine) dihydroklorid

$C_2H_3NaO_2$ Natriumacetat

$C_9H_{14}O_6S$ Sulfosalisylsyre (10 %)

$C_{10}H_{12}O_5$ Propylgallatpulver

$C_{14}H_{18}O_4$ Trolox, (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-carboxylsyre)

$C_{20}H_{12}O_5$ Fluorescein

$CaCl_2$ Kalsiumklorid

CF_3COOH Trifluoroeddiksyre, TFA

CH_3OH Metanol, MeOH

$CHCl_3$ Kloroform

DHA Dokosaheksaensyre (22:6 n-3)

DNA Deoksyribonukleinsyre

EAA Essensielle aminosyrer

EPA. Eikosapentaensyre (20:5 n-3)

FAA Frie aminosyrer

FRAP Ferric reducing antioxidative power

H_2NCH_2COOH Glysin

H_2SO_4 Svovelsyre (98 % konsentrert)

H_3BO_3 Borsyre

H_3CCOOH Eddiksyre

HCl Saltsyre

HHL N-Hippuryl-His-Leu-Hydrat

HPLC High-performance liquid chromatography

IEAA Ikke-essensielle aminosyrer

K_2HPO_4 Dikaliumfosfat

$K_2S_2O_8$ Potassumpersulfat

KCl Kaliumklorid

$MgCl_2$ Magnesiumklorid

NaCl Natriumklorid

NaOH Natriumhydroksid

ORAC Oxygen radical absorbance capacity

RAS Renin-angiotensin-systemet

RNA Ribonukleinsyre

ROS Reaktive oxygenforbindelser

TAA Totale aminosyrer

TE Troloxeqvivalenter

TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine)

TR True retention

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Summary	iii
Forkortelser	iv
1 Introduksjon	1
2 Bakgrunn	3
2.1 utfordringer knyttet til mat og matproduksjon	3
2.2 Helseeffekter ved inntak av sjømat	4
2.2.1 Endring av kostholdsvaner.....	5
2.3 Sjøpølse	6
2.3.1 Rød sjøpølse.....	7
2.4 Biokjemisk sammensetning	8
2.4.1 Proteiner og aminosyrer	8
2.4.2 Fett	10
2.5 Biologisk aktivitet	11
2.5.1 Antioksidativ kapasitet.....	11
2.5.2 Antihypertensiv kapasitet.....	13
2.6 Fordøyelsessystemet	14
2.6.1 Simulert fordøyelse	16
3 Materialer og metoder	17
3.1 Kjemikalier	17
3.2 Metoder	18
3.2.1 Fettinnhold	19
3.2.2 Vann- og askeinnhold	20
3.2.3 Proteininnhold	20
3.2.4 Totale aminosyrer	22
3.2.5 Frie aminosyrer	22
3.2.6 Simulert fordøyelse	23
3.2.7 FRAP-analyse	25
3.2.8 ABTS-analyse	25
3.2.9 ORAC.....	26
3.2.10 ACE-assay.....	27
3.3 Rød sjøpølse	27
3.4 Frysetørring	28
3.5 Statistisk analyse	28
4 Resultater og diskusjon	29
4.1 Biokjemisk sammensetning	29
4.1.1 Totale aminosyrer	30
4.1.2 Tap av AA ved frysetørring.....	32
4.1.3 Proteininnhold og essensielle aminosyrer	33
4.1.4 Frie aminosyrer	37
4.2 Biologisk aktivitet	40

4.2.1 Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse	40
4.2.2 Utvikling av antioksidativ kapasitet gjennom fordøyelsen.....	44
4.2.3 Sammenheng mellom aminosyrer og antioksidativ kapasitet.....	52
4.2.4 Antihypertensiv effekt.....	54
5 Konklusjon	57
6 Referanser	58
7 Vedlegg.....	i

1 Introduksjon

Ifølge FN er verdens befolkning forventet å øke til nesten 10 milliarder innen 2050, og det vil være behov for å produsere 60 % mer mat enn i dag gitt nåværende matforbruk (United Nations, 2020). Samtidig begynner jordas landressurser å bli brukt opp, og det samme gjør fiskebestanden (FAO, 2018). Det å produsere nok mat til hele befolkningen på en bærekraftig måte er en global utfordring, og det er behov for å tenke nytt og spise annerledes. FAO (2010) definerer et bærekraftig kosthold som et kosthold med lav innvirkning på miljøet og som bidrar til mat- og ernæringsikkerhet for nåværende og fremtidige generasjoner. En rapport fra EAT-Lancet kommisjonen (2020) dokumenterer at det kreves en akutt og stor endring i de globale matsystemene for å etablere et bærekraftig, sunt og næringsrikt kosthold for den voksende befolkningen. Denne endringen involverer å spise mye mer plantebasert og marint.

Det er godt dokumentert at det er en sammenheng mellom maten vi spiser og helsa vår. Globalt er det en økning i overvekt, fedme og livsstilssykdommer (Ernæringsrådet, 2017), sykdommer som har sammenheng med hvordan en person lever, og er særlig knyttet til kosthold og lite fysisk aktivitet (Sharma & Majumdar, 2009). Eksempler på livsstilssykdommer er diabetes, kreft og hjerte- og karsykdommer. Det er godt dokumentert at det er en sammenheng mellom omega-3 fettsyrer og bedre helse ved at de bidrar til å redusere risikoen for utviklingen av disse livsstilssykdommene (Djuricic & Calder, 2021). I tillegg til det sunne fettene, har det nå blitt mer fokus på proteiner og bioaktive peptider. Bioaktive peptider er peptider med positive effekter på fysiologiske funksjoner i kroppen (Korhonen & Pihlanto, 2006). Slike bioaktive peptider er blant annet identifisert i meieriprodukter, fisk og annen sjømat (Daliri et al., 2017; Ryan et al., 2011).

Havet er et stort matfat som dekker hele 70 % av jordoverflaten. Helseaspektene ved konsum av sjømat har først og fremst vært knyttet til de marine flerumettede omega-3 fettsyrene. Selv om kun 2 % av all mat konsumert av mennesker kommer fra havet (Havforskningsinstituttet, 2020), kommer likevel hele 17 % av alt konsumert protein fra havet (FAO, 2018). Sjømat er med andre ord en svært god proteinkilde. Det er spesielt proteiner det kan bli et problem å få nok av til den økende verdensbefolkningen. Økt utnyttelse av havets ressurser er dermed en stor mulighet. Selv om norske fiskere henter opp enorme rikdommer fra havet, er det fremdeles arter langt ned i næringskjeden som er lite utnyttet.

Sjøpølsa er en art som lever på et lavt trofisk nivå og som finnes langs hele den norske kystlinja. Til tross for at den er en delikatesse i mange asiatiske land, er den en lite utnyttet ressurs her i Norge. Grunnen til at sjøpølsa er så ettertraktet i Asia, både på restauranter og som helsekostprodukter, er på grunn av de antatte ernæringsmessige fordelene (Kjerstad, 2020). Næringsinnholdet i sjøpølse har tidligere blitt karakterisert, men det er lav dokumentasjon på biologisk aktivitet. Det kan også være interessant å undersøke om sjøpølsa inneholder biologisk aktive komponenter som kan bidra til å møte de helsemessige utfordringene knyttet til livsstilssykdommer.

Hovedmålet med denne oppgaven var å karakterisere biokjemisk sammensetning og undersøke biologisk aktivitet i rød sjøpølse, *P.tremulus*.

Delmål:

- Sammenligne biokjemisk sammensetning og aminosyresammensetning i rå og frysetørket *P.tremulus*.
- Etablere en simulert fordøyelse, samt en metode for å måle antihypertensiv effekt
- Undersøke bioaktivitet og utviklingen gjennom fordøyelsen; antioksidativ effekt og antihypertensiv aktivitet, samt å undersøke frigjøring av aminosyrer gjennom fordøyelsen

2 Bakgrunn

2.1 utfordringer knyttet til mat og matproduksjon

Mat er den sterkeste spaken for å optimere både menneskehelse og miljømessig bærekraft på jorda, og slik situasjonen er nå kan maten være en trussel for både helsa og planeten vår (EAT-Lancet-kommisjonen, 2020). Det å kunne mette den voksende verdensbefolkningen, som innen 2050 anslås å stige til nesten 10 milliarder, på en bærekraftig og næringsrik måte, er allerede en enorm global utfordring (United Nations, 2020). Det vil være behov for et mye mer bærekraftig kosthold, som innebærer å spise mer plantebasert og marint enn det som gjøres per i dag (EAT-Lancet-kommisjonen, 2020; Mouritsen & Styrbæk, 2020). Det er stort samsvar mellom et kosthold som anbefales for å fremme helse og et kosthold som er mer bærekraftig. I Norge skyldes et stort flertall av dødsfall før fylte 75 år livsstilssykdommer, som er ikke-smittsomme sykdommer, og i stor grad kan knyttes til det vi spiser og hvordan vi lever (Folkehelseinstituttet, 2014). Ifølge Verdens helseorganisasjon (2021) utgjør ikke-smittsomme sykdommer, som hjerte- og karsykdommer, diabetes og kreft årsaken til mer enn 70 % av alle globale dødsfall. Et usunt kosthold er også blant de største risikofaktorene for livsstilssykdommer og tidlig død, både i Norge og resten av verden.

I 2015 fastsatte alle FNs 193 medlemsland 17 mål, vist i figur 1, for å sikre en bærekraftig utvikling av jorda vår med fokus på å bekjempe klimaendringer (Morton et al., 2017). Hele 12 av disse bærekraftsmålene er relatert til ernæring og innebærer nettopp at det vil være utfordrende å produsere nok næringsrik mat på en bærekraftig måte til den økende befolkningen. Matproduksjonen er nødt til å foregå på en måte som ikke ødelegger eller bruker opp ressursene for å bevare økosystemene og redusere global oppvarming.



Figur 1: FNs 17 bærekraftsmål (UN, 2015).

Flere av bærekraftsmålene er direkte relevante for matproduksjon, spesielt relevant er mål 14 som omhandler bevaring og bærekraftig bruk av havene og marine ressurser. Uten handling vil fremtidige generasjoner arve en alvorlig forringet planet, hvor en stor del av befolkningen vil kunne lide av underernæring og ha sykdommer som kunne ha vært forebygget (EAT-Lancet-kommisjonen, 2020).

Ifølge en rapport fra WWF (2021) bruker vi per i dag naturressurser som om vi hadde 1,7 jordkloder. Det er ventet at klimaendringene vil ha en negativ påvirkning på jordbruket i flere regioner, blant annet gjennom mindre avlinger grunnet endrede temperatur- og nedbørsmønstre, og stigende havnivåer (EEA, 2021). Produksjon og forbruk av mat står for en stor andel av klimagassutslippene, hvor verdens kjøttforbruk er estimert til å stå for rundt 15 % av disse utslippene (Gerber et al., 2013). I tillegg krever også kjøttproduksjon mye landareal, vann og andre ressurser. Studier (EAT-Lancet-kommisjonen, 2020) viser at en reduksjon i kjøttforbruket er den enkeltendringen i folks matvaner som vil ha størst innvirkning på klimaet. Ifølge kostholdsradene (2021b) må forbruket av blant annet rødt kjøtt og sukker reduseres med mer enn 50 % for å nå målet om et bærekraftig kosthold. Jordas landressurser ødelegges og begynner å bli brukt opp, og det er dermed nødvendig å finne alternative matressurser og kosthold. Havet dekker rundt 70 % av jordoverflaten vår, og det er et stort potensiale for utnyttelse av havets ressurser (Rosa et al., 2008).

2.2 Helseeffekter ved inntak av sjømat

Sjømat er velkjent som en god kilde til mange viktige næringsstoffer. Slik som de marine omega-3 fettsyrene, eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA), i tillegg til protein, vitamin B12, jod og selen (Helsedirektoratet, 2021a; Innes & Calder, 2020). Tidligere har helseeffektene ved inntaket av sjømat hovedsakelig vært knyttet til det marine fett med en høy andel omega-3 fettsyrer, og det lave innholdet av mettet fett. De senere årene har det blitt en økende interesse rundt de marine proteinene med et høyt innhold av essensielle aminosyrer.

Bioaktive komponenter, særlig peptider, har også fått økt oppmerksomhet. Bioaktive peptider er proteinfragmenter med positive effekter på fysiologiske funksjoner i kroppen (Korhonen & Pihlanto, 2006). Disse kan frigjøres gjennom fordøyelsen eller enzymatisk hydrolyse av

proteiner. Bioaktive peptider kan forhindre oksidasjon og mikrobiell nedbrytning i matvarer, forbedre behandlingen av ulike sykdommer og lidelser, og dermed også øke livskvaliteten (Sánchez & Vázquez, 2017).

2.2.1 Endring av kostholdsvaner

Kjøtt har vært en viktig og næringsrik del av menneskelig kosthold gjennom hele menneskets evolusjon, både fordi det er en svært god proteinkilde (Wyness, 2016), men også grunnet den proteinaktige smaken. Ved å kutte kjøtt fra kostholdet er det nødvendig å finne gode alternativer for å unngå næringsstoffmangel. I 2020 var kjøttforbruket i Norge på gjennomsnittlig 75 kg per person i året, mens forbruket av fisk og sjømat lå på rundt 20 kg per person (Helsedirektoratet, 2021b). Undersøkelser viser likevel at folk begynner å bli mer oppmerksomme på kostholdsrisikoer knyttet til livsstilssykdommer og miljøpåvirkninger, og er villige til å gjøre kostholdsendringer. I den nasjonale folkehelseundersøkelsen 2020 (2021b) kom det frem at 10 % rapporterte å ha endret til et mer plantebasert kosthold de siste tre årene.

En ting et plantebasert kosthold vil mangle, og som er viktig for mange, er umamismaken. Umami er den femte grunnsmaken, og forbindes ofte med den typiske protein- eller kjøttsmaken (Schmidt et al., 2021). Umamismaken er en indikator for tilstedeværelsen av verdifulle aminosyrer eller oligopeptider, og stammer fra natriumglutamat, et salt av aminosyren glutamin (Wang et al., 2020). Smaken dannes ved at glutamat binder seg til umami-reseptoren, som er et stort protein som finnes i smaksløkene på tunga og i munnhulen (Schmidt et al., 2021).

Umamistoffer er vidt distribuert i matvarer, og forbedrer vanligvis den generelle smaken av mat, som å modulere søt smak, forbedre salt smak og undertrykke surhet og bitterhet. Barrierene for å spise nok grønnsaker og frukt kan være av både psykologisk, fysiologisk, sosial og kulturell art. Og mennesker har over evolusjonære tidsskalaer blitt tilberedt til å lengte etter de grunnleggende smakene søtt og umami (Schmidt & Mouritsen, 2020). I tradisjonell mat er aminosyrer, organiske syrer, nukleotider og oligopeptider alle viktige umami-molekyler (Wang et al., 2020). En mulighet for å gjøre det enklere å spise plantebasert kan være å lage en type smakstilsetter av marine ressurser med umamismak. Krydderet kan eksempelvis brukes på plantebasert mat for å gi smaken av kjøtt. På denne måten kan sjømat brukes som ekstra smak eller krydder til et plantebasert kosthold.

Til tross for at kun 2 % av all mat konsumert av mennesker kommer fra havet (Havforskningsinstituttet, 2020), utgjør mat fra havet hele 17 % av alt konsumert protein (FAO, 2018). Likevel er flere av fiskebestandene utrydningstruet og overbelastet. Endringene for å oppnå et bærekraftig kosthold vil som nevnt i tillegg til å spise mer plantebasert, kreve en bedre utnyttelse av marine ressurser fra havet til mat og fôr, særlig fra lavere trofiske nivåer (Ernæringsrådet, 2017; Havforskningsinstituttet, 2020). I dag er 93 % av verdens fiskebestander overbeskattet eller fullt utnyttet, og nærmer seg kollaps grunnet for stort press på fiskeressursene (FAO, 2018; WWF, i.d.). Dypere i næringskjeden finnes det mange arter som er lite utnyttet, og har stort potensiale for utnyttelse.

2.3 Sjøpølse

Sjøpølse er et marint virvelløst dyr, som hører til i klassen Holothuroidea og familien Stichopodidae (Kjerstad et al., 2020). Det finnes rundt 1250 ulike arter av sjøpølse (Bordbar et al., 2011). Størrelsen varierer fra art til art, og enkelte arter kan bli opptil en halv meter lang. Kroppen er lang og fleksibel, og enkelte arter kvitter seg med en stor del av sine indre organer når de føler seg truet.

I flere land i Asia er sjøpølse et luksusprodukt og en delikatesse. I tillegg til å bruke den som eksklusiv mat i flere århundrer, bruker også asiaterne sjøpølse i medisiner og helsekost grunnet den antatt gode biologiske aktiviteten (Toral-Granda et al., 2008). I Asia anses sjøpølse som et produkt med flere helsefremmende egenskaper og et produkt som er rikt på viktige proteiner, vitaminer og mineraler, og de kaller den derfor ofte for «havets ginseng» (Toral-Granda et al., 2008). Resultatene fra en tidligere studie (Takashi et al., 2005) utført på frysetørket svart sjøpølse studert i serum- og leverlipidprofiler hos rotter, viste at mat som inneholdt sjøpølse reduserte total kolesterolnivået betydelig sammenlignet med kontrolldietten uten sjøpølse. Det har også kommet frem tidligere at sjøpølse inneholder en interessant kombinasjon av verdifulle aminosyrer (Bordbar et al., 2011).

Sjøpølse er et av de best betalte sjømatproduktene i verden (Kjerstad et al., 2020). Det er ingen kommersiell høsting av sjøpølse i Norge, og sjøpølsene forekommer som oftest som bifangst under reketraling eller ved kreps- og hummerfiske (Christophersen et al., 2021). De tilberedes som oftest enten ferske eller tørket (bêche-de-mer) i forskjellige retter, men kan også brukes

hele, stekte eller friterte (Kjerstad et al., 2020). Sjøpølse har senere blitt et populært produkt internasjonalt og selges til svært høy pris på markedet (Pangkey et al., 2012). Ettersom sjøpølsa er kostbar og populær i Asia, har stor markedsetterspørsel resultert i ukontrollert utnyttelse og dermed er flere arter allerede overfisket (Roggatz et al., 2016). Mer enn 70 % av alle sjøpølsefiskerier i verden er fulle eller overutnyttet (González-Wangüemert et al., 2018). På verdensbasis blir ikke sjøpølse per dags dato forvaltet effektivt eller tilstrekkelig, noe som fører til synkende bestander og tap av biologisk mangfold (Purcell et al., 2013).

2.3.1 Rød sjøpølse

Rød sjøpølse, *Parastichopus tremulus* (figur 2), regnes som en verdifull ressurs. Arten er enda ikke utnyttet eller dyrket i Norge, men har et stort potensiale for kommersiell utnyttelse (Christophersen et al., 2021). *P. tremulus* trives best på myk havbunn, og finnes langs kysten helt fra Finnmark i nord til Kanariøyene i sør. Langs norskekysten er det registrert høyest forekomst av arten på 100-300 m dyp (Christophersen et al., 2020). Ettersom havtemperaturen på dette dypet ligger på 2-8 °C betegnes den røde sjøpølsa som en kaldtvannsart (Furevik, 2001), noe som indikerer en relativt langsom vekstrate. Fullvoksne *P. tremulus* fra Nordsjøen kan bli opptil 50 cm lange, 10 cm brede og nå en våtvekt på 300 g (Schagerström & Sundell, 2021). *P. tremulus* har to kjønn, men individene har ingen ytre kjennetegn som differensierer de to kjønnene (Christophersen et al., 2021).



Figur 2: Rød sjøpølse *Parastichopus tremulus* (Christophersen et al., 2021)

Til tross for at arten har blitt studert i mange år, finnes det lite biologisk og økologisk informasjon. Det er et mål om å oppnå kommersiell utnyttelse av rød sjøpølse i Atlanterhavet, men dette krever mer kunnskap om blant annet livshistorietrekk og genetikk, ellers kan arten stå ovenfor trusselen om overutnyttelse (Christophersen et al., 2021). For å lykkes med kontrollert produksjon av en ny marin art, er det nødvendig med store investeringer i forskning

og utvikling. Ettersom arten er utrydningstruet må det benyttes oppdrett for å kunne utnytte artens store potensiale (Christophersen et al., 2021).

2.4 Biokjemisk sammensetning

Det er nødvendig å undersøke den biokjemiske sammensetningen i en art slik at ressursene kan brukes på best mulig måte utfra deres næringsinnhold. Her blir det gjerne sett på fett-, proteinvann- og askeinnhold. Den biokjemiske sammensetningen kan ofte variere avhengig av art, hvor den lever, kjønn, alder, årstid, ernæringsstatus og aktivitetsnivå (Kjerstad et al., 2020).

2.4.1 Proteiner og aminosyrer

Proteiner er makromolekyler, essensielle for alle levende organismer, og de er svært viktige for flere funksjoner i kroppen (Whitford, 2005). Proteiner finnes i alle cellene i kroppen, og spiller en viktig rolle i immunforsvaret, i bygging og vedlikehold av bein, muskler, hud, slim, enzymatiske prosesser og er nødvendige for å transportere oksygen og næringsstoffer i blodet (Nelson & Cox, 2017). Et protein er bygd opp av mindre bestanddeler, aminosyrer, bundet sammen i lange kjeder ved hjelp av peptidbindinger (Astrup et al., 2006). Det finnes 20 ulike aminosyrer og alle proteiner har unike aminosyrerekkefølger. Proteiner og aminosyrer trengs til mange viktige prosesser i kroppen vår, og er derfor livsnødvendige for human helse. En del av aminosyrene er kroppen i stand til å produsere selv, men ni av de er essensielle, noe som vil si at kroppen ikke klarer å syntetisere de selv og de må tilføres via kosten (Aristoy & Toldrá, 2012). De essensielle aminosyrene (EAA) som ofte er begrensende i kosten vår er lysin, metionin, tryptofan og treonin (FAO/WHO/UNU, 2007). Lysin er oftest den begrensende aminosyren i kosten, og blir klassifisert som en uunnværlig diettaminosyre på tvers av arter (Ball et al., 2007). Arginin er en annen aminosyre som kan ha varierende grad av uunnværlighet blant arter grunnet variabel kapasitet for endogen argininsyntese (Ball et al., 2007). Dette forholdet kan være særlig interessant å studere ettersom det tidligere er vist at et lavt lysin/arginin-forhold i et protein har hypokolesterolemiske effekter (Gudbrandsen et al., 2005; Rajamohan & Kurup, 1997).

Alle proteiner har ikke samme næringsverdi. Det er blitt sagt (Undeland et al., 2009) at den relative konsentrasjonen av EAA er hovedfaktoren til å bestemme næringsverdien av matproteiner. En oversikt over anbefalt inntatt mengde EAA per g protein og anbefalt mengde

EAA per kg kroppsvekt per dag (FAO/WHO/UNU, 2007) er presentert i tabell 1. Ifølge Helsedirektoratet (2012) vil et kosthold som inneholder 10-20 E% protein dekke behovet for EAA for de aller fleste. Proteiner i næringsmidler har ulik kvalitet og næringsverdi, og disse anbefalte inntakene fastsatt av FAO, FNs organisasjon for ernæring og landbruk (2007), er mengden EAA proteiner minst inneholde for å kunne kalles høykvalitetsproteiner. Det er viktig å vurdere proteinkvaliteten til relevante arter for å forstå potensialet til nye proteinkilder i fremtidig mat (Malla et al., 2022). I fisk og sjømat anses proteinene å være av svært god kvalitet. Det betyr at proteinet inneholder tilstrekkelige mengder av alle EAA (Tessari et al., 2016) og kan tas opp i tarmen.

Tabell 1: Oversikt over de ni essensielle aminosyrene (EAA) med anbefalt inntatt mengde EAA for friske, voksne mennesker per gram protein, og anbefalt mengde EAA en person bør få i seg per kilogram kroppsvekt per dag (FAO/WHO/UNU, 2007).

Essensielle aminosyrer	mg EAA/g protein	mg EAA/kg/dag
Histidin	15	10
Isoleucin	30	20
Leucin	59	39
Lysin	45	30
Metionin	16	15
Valin	39	26
Tryptofan	6	4
Fenylalanin	38	25
Treonin	23	15
Totalt	271	184

Peptider er kortere kjeder av aminosyrer. Gjennom kroppens naturlige fordøyelse brytes proteiner ned til peptider ved at peptidaser produsert av bukspyttkjertelen angriper peptidbindingene og korter ned peptidkjedene (Astrup et al., 2006). Proteinene kan også omdannes til peptider ved enzymatisk hydrolyse, hvor det tilsettes enzymer, som klipper proteinene i mindre peptider (Nelson & Cox, 2017). En sammensetning med to og tre aminosyrer kalles di- og tripeptider. For å utnytte proteinene må magen og tarmen bryte ned proteinene vi spiser til di- og tripeptider. Nedbrytningen er nødvendig for å gjøre proteinene små nok til å krysse tarmbarrieren og kunne tas opp i blodomløpet (Astrup et al., 2006). I tillegg til å opptre som byggeklosser har de også andre bioaktive funksjoner. Forskjellige peptider har

forskjellig bioaktiv effekt fordi det nøyaktige aminosyreinnholdet og sekvensen av aminosyrer til et spesifikt protein bestemmer den biologiske aktiviteten til det proteinet (Aristoy & Toldrá, 2012). Næringsverdien eller kvaliteten til strukturelt ulike proteiner varierer, og er bestemt av aminosyreinnholdet, mengden og forholdet av EAA og hvor mottakelige proteinene er for nedbrytning til peptider gjennom fordøyelsen (Undeland et al., 2009)

2.4.2 Fett

Fett, eller lipider, er en heterogen gruppe av stoffer som har til felles at de er uløselige i vann, kan ekstraheres fra biologisk materiale med organiske løsemidler og er svært utsatte for oksidasjon. Disse kjemiske egenskapene er til stede i flere ulike molekyler som fettsyrer, fosfolipider og steroler, hvor fettsyrene er de ernæringsmessige mest interessante (Fahy et al., 2011). I menneskers kosthold er fett, etter karbohydrater, den nest viktigste kilden til energi.

Fettsyrer består av en kjede med karbonatomer, hvor det i den ene enden av kjeden er en karboksylsyregruppe (COOH) og i den andre enden en metylgruppe (CH₃) (Desbois & Smith, 2010). Fettsyrene deles ofte inn etter antall dobbeltbindinger i karbonkjeden. Mettede fettsyrer har kun enkeltbindinger mellom karbonatomene, mens umettede fettsyrer har en eller flere dobbeltbindinger. Fettsyrer med én dobbeltbinding kalles enumettede og fettsyrer med to eller flere dobbeltbindinger kalles flerumettede. Fettsyresammensetningen i sjømat er generelt preget av et lavt innhold mettede fettsyrer, noe som anbefales ettersom det er en antatt sammenheng mellom høyt inntak av mettet fett og utvikling av livsstilssykdommer som hjerte- og karsykdommer (Hamed et al., 2015).

Videre differensieres de flerumettede fettsyrene etter hvor på karbonkjeden den første dobbeltbindingen er. Dersom den første dobbeltbindingen er ved karbonatom nummer 3 eller 6 fra metylenden har man henholdsvis en omega-3 eller omega-6 fettsyre. Både omega-3 og omega-6 fra essensielle fettsyrer kan omdannes videre til hormonlignende eikosanoider, som er vist å ha positiv effekt på både immunresponser og inflammasjon (Calder, 2019). De mest biologisk aktive formene for omega-3-fettsyrer er DHA og EPA, som hovedsakelig kommer fra marine kilder som sjømat og alger. EPA og DHA er to livsnødvendige essensielle fettsyrer, som må tilføres gjennom kosten. Det anbefales et inntak på 1 g/ dag av de to omega-3-fettsyrene EPA og DHA for forebygging av hjerte- og karsykdommer, behandling etter hjerteinfarkt,

forebygging av plutselig død og sekundær forebygging av kardiovaskulær sykdom (von Schacky & Harris, 2007).

2.5 Biologisk aktivitet

Biologisk aktivitet eller bioaktivitet er felles for ulike positive fysiologiske egenskaper. Bioaktive peptider er definert som proteinfragmenter med bruk i næringsmiddel- og farmasøytisk industri, som har positive effekter på fysiologiske funksjoner i kroppen som immunforsvar, hjerte- og karsystem, fordøyelse, nervefunksjoner og metabolske prosesser (Ucak et al., 2021). Blant de ulike bioaktivitetene som er relevante for disse peptidene, er antioksidativ, antihypertensiv, antimikrobiell, antitrombotisk og immunmodulerende aktivitet (Chakrabarti et al., 2014).

I næringsmiddelindustrien brukes slike bioaktive peptider blant annet som konserveringsmidler eller antioksidanter for å hindre matforringelse (Ucak et al., 2021). Proteiner har utmerket potensial som antioksidanttilsetningsstoffer i næringsmidler, ettersom de kan hemme lipidoksidasjon gjennom flere veier i tillegg til å fjerne frie radikaler (Elias et al., 2008). Mange bioaktive peptider har strukturelle egenskaper som inkluderer en relativt kort peptidrestlengde, med hydrofobe aminosyrer (Hong et al., 2008). I fordøyelsen brytes proteinene som inntas gjennom kosten ned til peptider. Dette kan skje gjennom naturlig fordøyelse og enzymatisk hydrolyse, og er derfor særlig interessant for proteinrik mat.

2.5.1 Antioksidativ kapasitet

I kroppen kan det dannes frie radikaler som et biprodukt fra kroppens energiforbrenning eller ved ytre påvirkninger. Frie radikaler er ustabile og reaktive forbindelser, med ett eller flere frie elektroner i det ytterste skallet (Fang et al., 2002). For å oppnå stabilitet vil de enkelt reagere med andre molekyler. Dette kan føre til oksidativt stress og celleødeleggelse over tid dersom det blir mye frie radikaler og lite antioksidanter i kroppen. Oksidativt stress er en kjemisk prosess som igangsettes gjennom unormale mengder reaktive oksygenforbindelser (ROS) i kroppen, og er en beskrivelse av nivået av oksidativ skade på en celle, et vev eller et organ forårsaket av ROS (Blomhoff, 2008). Hvis forholdet mellom ROS og kroppens antioksidantforsvar kommer i ubalanse kan oksidativ skade hope seg opp i cellene, og ved stor

oppbygning av oksidativt stress kan cellenes funksjon skades over tid, og føre til utvikling av sykdommer (Blomhoff, 2008).

Oksidativt stress er antatt å være en medvirkende årsak til aldringsprosessen, skader og forandring av struktur på viktige komponenter som deoksyribonukleinsyre (DNA), ribonukleinsyre (RNA) og cellemembran, og er i tillegg sett i sammenheng med en rekke vanlige sykdommer som diabetes, kreft og hjerte- og karsykdommer (Lobo et al., 2010). Mange epidemiologiske studier viser en sterk sammenheng mellom et økt inntak av antioksidantrike frukt og grønnsaker, og en redusert risiko for en rekke kroniske sykdommer assosiert med oksidativt stress (Sannaveerappa et al., 2007).

Antioksidanter er naturlige stoffer som beskytter cellene i kroppen vår mot frie radikaler og oksidativt stress. Antioksidantene kan donere et elektron til de frie radikalene for å stabilisere de og unngå at de skader cellene våre, og på den måten beskytte kroppen mot sykdommer (Lobo et al., 2010). Noen antioksidanter produserer kroppen selv, mens andre må tilføres gjennom kosten. Mage- og tarmkanalen er kjent for å være hovedstedet for oksidasjon i menneskekroppen, og her kan de oksidative forholdene påvirke egenskapene til antioksidanter fra mat (Sannaveerappa et al., 2007).

I løpet av de siste tiårene har det vært en økende interesse for studier av antioksidativ kapasitet i næringsmidler og kosthold. Dette knyttet til kjente implikasjoner av frie radikaler i utviklingen av tidlig aldring og sykdommer (Gulcin, 2020). Oksidasjon inkluderer mange ulike reaksjoner, og det er derfor blitt etablert ulike metoder for å undersøke og måle antioksidantegenskapene og kapasiteten til kommersielle antioksidanter, matvarer og farmasøytiske produkter. Målet med metodene er det samme, men prinsippet for metodene er ulike. Antioksidantforbindelser utøver sin aktivitet ved to hovedmekanismer: hydrogenoverføring og elektrondonasjon (Lorenzo et al., 2018). Ettersom de ulike metodene måler forskjellige mekanismer, og ofte utføres under forskjellige forhold, som ulik pH og temperatur, er det derfor vanskelig å sammenligne metodene med hverandre (Gulcin, 2020).

Kjente metoder for å måle antioksidativ kapasitet er oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidative power (FRAP) og 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). ORAC baserer seg på overføringen av hydrogenatomer og måler fluorescensen som oppstår når et radikal oksiderer. Metoden bruker

en areal-under-kurve-teknikk, og kombinerer inhiberingstid og hemmingsgrad av frie radikalers virkning av en antioksidant i en enkelt mengde (Gulcin, 2020). FRAP måler jern(metall)bindingskapasitet ved elektrondonering og kan ikke oppdage forbindelser som virker ved hydrogenoverføring (Gulcin, 2020). ABTS reduserer ABTS i nærvær av hydrogendonerende antioksidanter (Gulcin, 2020), og kan estimere antioksidativ kapasitet for både hydrofile og hydrofobe antioksidanter (Lorenzo et al., 2018). Det anbefales å bruke minst to av disse metodene for å få omfattende informasjon om antioksidantkapasiteten til et produkt, med hensyn til anvendelighet, fordeler og ulemper (Pérez-Jiménez et al., 2008).

2.5.2 Antihypertensiv kapasitet

Blodtrykket styres av en rekke forskjellige biokjemiske interaksjonsveier, og økes eller reduseres avhengig av hvilke veier som dominerer (Hong et al., 2008). Blodtrykkskontroll assosieres ofte med renin-angiotensin-systemet (RAS), som spiller en viktig rolle i å regulere arterielt trykk (Hong et al., 2008).

Angiotensin er peptider som innsnevrer små arterier slik at blodtrykket stiger. Enzymet renin omdanner angiotensinogen fra leveren til angiotensin I (Dostal & Baker, 1999). Angiotensin-konverterende enzym (ACE) er et enzym som spiller en viktig rolle i reguleringen av blodtrykket i menneskekroppen (Vermeirssen et al., 2002). Enzymet spalter angiotensin I med 10 aminosyrer fra plasmaproteinet angiotensinogen, til det bioaktive angiotensin II med 8 aminosyrer (Cushman & Cheung, 1971). Angiotensin II er en vasokonstriktor, noe som vil si at den fører til en sammentrekning av blodårene og resulterer i en økning i blodtrykket.

Mange typer bioaktive peptider som hemmer angiotensin I, ACE og angiotensin II type 1 reseptor (AT1) i det kardiovaskulære systemet, bidrar til forebygging og behandling av hypertensjon. Hypertensjon er en av de viktigste risikofaktorene for utvikling av hjerte- og karsykdommer, hjerneslag og kronisk nyresykdom (Escudero et al., 2012). I 2020 ble 55 % av Norges befolkning mellom 70 og 74 år behandlet med blodtrykkssenkende medisiner, og det er ikke uvanlig at disse medisinene gir en rekke bivirkninger (Ariansen et al., 2021). Det er tidligere vist (Hong et al., 2008) at antihypertensive peptider, som ACE-hemmere, kan senke blodtrykket helt uten bivirkninger. Disse er avledet fra mange matproteinkilder eller kunstige syntetiske produkter, blant annet fra melke-, mais- og fiskeprotein (Kitts & Weiler, 2003). Tidligere har ACE-hemmende peptider blitt isolert fra flere typer sjømat, slik som fiskeskjell,

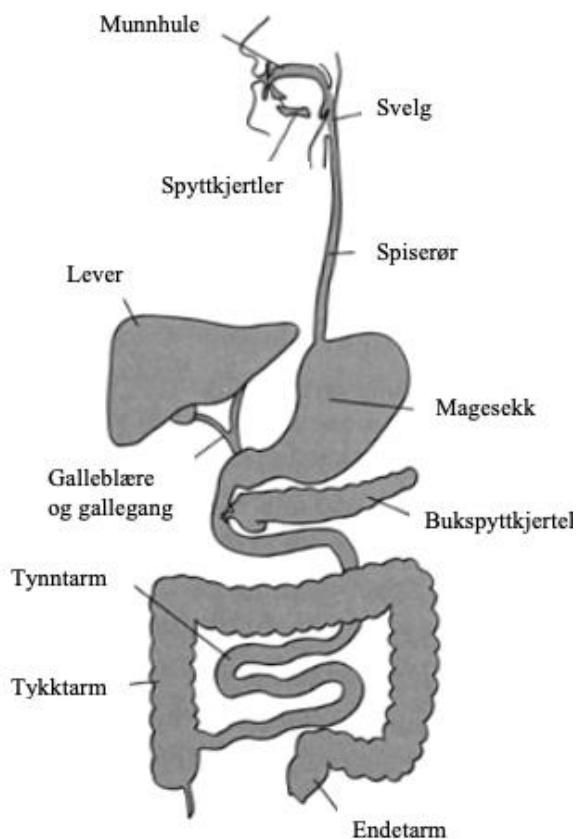
hydrolyserte torskeshoder, reker og fiskesaus (Bordenave et al., 2002; Fahmi et al., 2004; Hai-Lun et al., 2006; Ichimura et al., 2003).

En vanlig metode for å måle antihypertensiv kapasitet er ACE-assay. Det er en enzymhemmingsanalyse, som kromatografisk måler ACE-hemming.

2.6 Fordøyelsessystemet

Fordøyelse vil si den mekaniske og kjemiske nedbrytningen som maten gjennomgår fra den spises til den tas opp i tarmen (Pedersen et al., 2012). De energigivende næringsstoffene fett, karbohydrat og protein foreligger ofte som store molekyler og kan ikke passere inn i tarmcellene uten at de brytes ned til mindre molekyler. Karbohydrater må spaltes til monosakkarider, fett til fettsyrer eller monoglyserider og protein til aminosyrer eller peptider (Pedersen et al., 2012).

Fordøyelsessystemet hos mennesker strekker seg fra munnen til anus, og består hovedsakelig av munnhulen, svelget, spiserøret, magen og tarmene, i tillegg til de tilliggende organene bukspyttkjertel, galleblære, lever og spyttkjertler (Schibye & Klausen, 2011). Figur 3 viser en illustrasjon av de forskjellige delene av fordøyelsessystemet. I munnhulen tygges maten og blandes med spytt slik at den enklere kan svelges, i tillegg bryter tyggingen ned strukturen i maten og åpner celleveggen for at fordøyelsesenzymene enklere kommer til (Pedersen et al., 2012). Spiserørets funksjon er å sende maten fra munnhulen til magesekken. Det er i magesekken den kjemiske fordøyelsen av føden begynner, i tillegg til finfordeling av fast føde (Astrup et al., 2006). I den påfølgende tarmfasen er pH økt og fordøyelsesenzymer, som pepsin, starter den kjemiske nedbrytelsen av proteiner ved at den spalter og bryter ned bindevev og muskelfibre til kortere peptidkjeder og frie aminosyrer (Astrup et al., 2006). Her brytes peptidene videre ned, og di-, tripeptider og aminosyrer tas opp gjennom tarmveggen, føres med blodbanen rundt i kroppen og blir til byggematerialer for kroppens egne proteiner (Nelson & Cox, 2017). I tillegg til å være byggemateriale, bidrar de også til biologiske funksjoner i kroppen.



Figur 3: Fordøyelsessystemet med tilhørende kjertler (Astrup et al., 2006)

Enzymer er naturlige verktøy, som enten setter to komponenter sammen eller deler opp en komponent i flere deler. Fordøyelsesenzymene bryter ned maten vi spiser til små partikler slik at kroppen kan ta opp næringsstoffer fra kostholdet vårt, og disse er helt sentrale i nedbrytningsprosessen. Magesekken er livsnødvendig for sin produksjon av proteinet «intrinsic factor», som binder B12 og derfor er nødvendig for opptaket av B12 i tarmen (Astrup et al., 2006).

Videre i fordøyelsen porsjoneres maten fra magesekken til tynntarmen, hvor mesteparten av opptaket og absorpsjonen av næringsstoffene foregår. Her har innholdet en mer eller mindre flytende konsistens. Tolvfingertarmen er den første delen av tynntarmen, og her blandes det sure innholdet med fordøyelsvæsker fra bukspyttkjertelen, galleblæren og tynntarmens små kjertler (Pedersen et al., 2012). Mot slutten av fordøyelsen kommer maten til tykktarmen. I tykktarmen er fordøyelsen og absorpsjonen så godt som avsluttet. Her vil rundt 99 % av vannet absorberes, innholdet vil få en fastere konsistens og tømningrefleksjonen vil utløses når tarminnholdet trykker mot endetarmen (Pedersen et al., 2012).

2.6.1 Simulert fordøyelse

En simulert fordøyelse vil si en modell av kroppens fordøyelsessystem som er etablert in vitro. Det vil si at den er fremstilt i glass i laboratorium. Mange felt innen mat og ernæring benytter ofte en simulert modell av fordøyelsessystemet. Dette fordi menneskelige forsøk ofte involverer et stort antall mennesker og kan være både ressurskrevende, kostbare og etisk kontroversielle (Minekus et al., 2014). Simulerte fordøyelsessystemer inneholder vanligvis den orale, gastriske og tynntarmfasen, og tar hensyn til tilstedeværelsen av fordøyelsesenzymer og deres konsentrasjoner, pH, fordøyelsestid og saltkonsentrasjoner (Minekus et al., 2014). Dyrestudier kan også bli benyttet, men resultatene er ikke alltid sammenlignbare med mennesker grunnet forskjeller i tarm- og enzymssystem.

3 Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier

I tabell 2 er kjemikaliene benyttet i denne oppgaven ramset opp. Dersom ikke annet er spesifisert, er alle kjemikalier analytisk gradert.

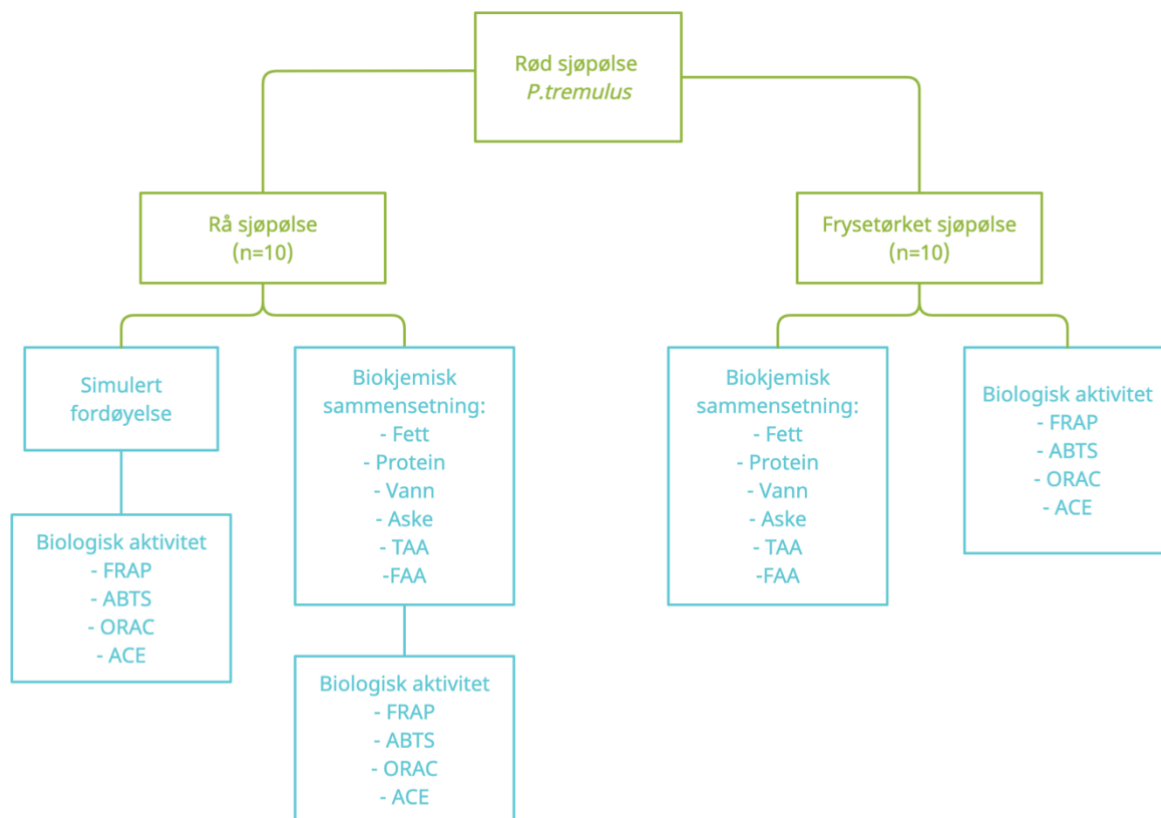
Tabell 2: Informasjon om kjemikalier anvendt i oppgaven

Kjemikalier	CAS-nummer	Produsent	Produksjonssted
ABTS stockløsning, 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay	30931-67-0	Merck	Darmstadt, Tyskland
ACE-enzym, angiotensin konverterende enzym	9015-82-1	Merck	Darmstadt, Tyskland
APPH, 2,20-azobis(iso isobutyramidine)dihydroklorid	2997-92-4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Borsyre, H ₃ BO ₃	10043-35-3	Merck	Darmstadt, Tyskland
Dikaliumfosfat, K ₂ HPO ₄	7758-11-4	Merck	Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre, H ₃ CCOOH	64-19-7	Merck	Darmstadt, Tyskland
Fe ³ , jern(III)klorid 6-hydrate	10025-77-1	Merck	Darmstadt, Tyskland
Fluorescein, C ₂₀ H ₁₂ O ₅	2321-07-5	Merck	Darmstadt, Tyskland
Galleekstrakt (B8631)	8008-63-7	Merck	Darmstadt, Tyskland
Glysin, H ₂ NCH ₂ COOH	56-40-6	Merck	Darmstadt, Tyskland
HHL, N-Hippuryl-His-Leu-Hydrat	207386-83-2	Merck	Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	7447-40-7	Merck	Darmstadt, Tyskland
Kalsiumklorid, CaCl ₂	10043-52-4	Merck	Darmstadt, Tyskland
Kloroform, CHCl ₃	67-66-3	Merck	Darmstadt, Tyskland
Magnesiumklorid, MgCl ₂	22189-08-8	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Metanol, CH ₃ OH	67-56-1	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	127-09-3	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Natriumhydroksid, NaOH	1310-73-2	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl	7647-14-5	Merck	Darmstadt, Tyskland
Nitrogen 5.0, N ₂ -gass	7727-37-9	Linde Gass	Oslo, Norge
Pankreatin (P1750)	8049-47-6	Merck	Darmstadt, Tyskland

Pepsin (P6887)	9001-75-6	Merck	Darmstadt, Tyskland
Potassumpersulfat, $K_2S_2O_8$	7727-21-1	Merck	Darmstadt, Tyskland
Propylgallatpulver, $C_{10}H_{12}O_5$	121-79-9	Merck	Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	7647-01-0	Merck	Darmstadt, Tyskland
Sulfosalisylysyre (10 %), $C_9H_{14}O_6S$	5965-83-3	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Svovelsyre (98 % konsentrert), H_2SO_4	7664-93-9	Merck	Darmstadt, Tyskland
TFA trifluoroeddiksyre, CF_3COOH	76-05-1	Honeywell	Harvey, USA
TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine)	3682-35-7	Merck	Darmstadt, Tyskland
Trolox, (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-carboxylsyre), $C_{14}H_{18}O_4$	53188-07-1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

3.2 Metoder

I denne oppgaven ble det sett på biokjemisk sammensetning i rå og frysetørket rød sjøpølse, i tillegg ble biologisk aktivitet; antioksidativ effekt og antihypertensiv effekt, bestemt for frysetørkede sjøpølser og for rå sjøpølser som har gjennomgått en selvtablert simulert fordøyelse. Figur 4 viser et forsøksdesign for hele oppgaven, hvor alle utførte analyser er inkludert.



Figur 4: Forsøksdesign for oppgaven. For både rå sjøpølse (n=10) og frysetørket sjøpølse (n=10) ble biokjemisk sammensetning undersøkt ved å finne innholdet av fett, protein, vann, aske, totale aminosyrer (TAA) og frie aminosyrer (FAA). I tillegg ble biologisk aktivitet undersøkt for rå (både ufordøyd og fordøyd) og frysetørket sjøpølse ved å benytte ferric reducing antioxidative power (FRAP), 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre) (ABTS), oxygen radical absorbance capacity (ORAC) og angiotensin converting enzym (ACE).

3.2.1 Fettinnhold

Fettinnholdet i sjøpølsene ble bestemt ved bruk av Bligh & Dyers mikrometode (1959), hvor kloroform og metanol ble benyttet som ekstraksjonsmedium.

Rå prøve (1 g) eller frysetørket prøve (0,5 g), ble tilsatt destillert vann (1 ml), kloroform (CHCl₃) (2 ml) og kald metanol (MeOH) (4 ml) før homogenisering i 2 minutter ved 17 000 rpm ved hjelp av Ultra Turrax (IKA T25 Digital). Etter homogeniseringen ble ytterligere 2 ml kloroform tilsatt, før homogenisering i 30 sekunder. Videre ble destillert vann (2 ml) tilsatt, før prøven nok en gang ble homogenisert i 30 sekunder. Prøvene ble deretter sentrifugert på 10 000 g i 10 minutter, før kloroformfasen (den nedre fasen, 2 ml) ble overført til et forhåndsveid Kimax-rør. Røret ble deretter veid før det ble varmet på 60 °C med strømming av N₂-gass i 30 minutter. Til slutt ble rørene avkjølt og veid. Hver prøve ble analysert med to replikater. Fettinnholdet ble bestemt gravimetrisk ved bruk av formel (1):

$$(1) \quad \% \text{ Fettinnhold} = \frac{\text{mengde (g)fett etter inndamping} * \text{mengde (ml)tilsatt kloroform} * 100 \%}{\text{mengde (ml) inndampet kloroform} * \text{Innveid g prøve}}$$

3.2.2 Vann- og askeinnhold

Vann- og askeinnholdet i prøvene ble bestemt som beskrevet tidligere i AOAC (2005). Rå sjøpølse (1 g) eller frysetørket sjøpølse (0,5 g), ble veid inn i forhåndsveide porselenskåler, før de ble tørket på 105 °C i 24 timer. Etter tørkingen ble skålene veid på nytt og vanninnholdet ble bestemt fra formel (2). Hver prøve ble analysert med to replikater.

$$(2) \quad \% \text{ Vanninnhold} = \frac{\text{Vekt}_{(\text{før tørking})} - \text{Vekt}_{(\text{etter tørking})}}{\text{Vekt}_{(\text{før tørking})}} * 100 \%$$

Videre ble de tørkede prøvene brent i en forbrenningsovn på 550 °C over natta for å bestemme askeinnhold. Askeinnholdet ble bestemt ved å bruke formel (3):

$$(3) \quad \% \text{ Askeinnhold} = \frac{\text{Vekt}_{(\text{etter brenning})}}{\text{Vekt}_{(\text{mengde prøve før tørking})}} * 100 \%$$

3.2.3 Proteininnhold

Proteininnholdet ble bestemt ved å bruke Kjeldahls metode, og ble utført slik som beskrevet i «Application Note 114/2013» fra Büchi Sveits (2013).

Rå sjøpølse (1,2 g) eller frysetørket sjøpølse (0,5 g) ble veid inn på et veiepapir, og plassert i oppslutningsrør og tilsatt to Kjeldahlstabletter og 15 ml svovelsyre (98 % kons.). To oppslutningsrør var blankprøver og inneholdt kun veiepapir, og to oppslutningsrør ble tilsatt glysin (0,2 g) som referanse. Hver prøve ble analysert med to replikater.

Oppslutningsrørene ble plassert i en Kjeldigester K-449 (Büchi Sveits, 2013) med en ferdig innstilt prosedyre. Her ble prøvene fullstendig hydrolysert, mengde nitrogen ble målt og mengde protein ble kalkulert ved å multiplisere med omregningsfaktor 6,25, basert på at det er cirka 16 % nitrogen i protein. Tabell 1 i vedlegg 1 viser hvor lenge de forskjellige temperaturene ble holdt.

Da reaksjonen var fullført, ble prøvene nedkjølt til romtemperatur før de ble destillert og titrert ved å bruke KjelMaster K-375 med KjelSampler K-376. Under destilleringen ble de oppløste prøvene titrert mot lut (32 % NaOH) for å øke pH-en, som førte til omdannelse av ammoniumioner til ammoniakk-gass (NH₃). Videre ble borsyre tilsatt for å fange opp ammoniakk-gassen og for å beregne mengden nitrogen i prøven. Destillering- og titreringsdelen tok 6-7 minutter per oppslutningsrør. Mengde protein ble bestemt ved å bruke formel 4-7 (Büchi Sveits, 2013):

$$(4) \quad W_N = \frac{(V_{prøve} - V_{blank}) * z * c * f * M_N}{m_{prøve} * 1000}$$

$$(5) \quad \% N = W_N * 100 \%$$

$$(6) \quad \% P = W_N * PF * 100 \%$$

$$(7) \quad \% N_{Gly} = \frac{\% N * 100}{P}$$

W_N = vektfraksjon av nitrogen,

$V_{prøve}$ = mengde titrant for prøven (ml)

V_{blank} = mengde titrant for blankprøven (ml)

z = molar valensfaktor

c = titrantkonsentrasjon (mol/l)

f = titrantfaktor

M_N = molekylvekt for nitrogen

$m_{prøve}$ = mengde prøve (g)

$\% N$ = vektprosent nitrogen

$\% N_{Gly}$ = vektprosent nitrogen korrigert for renheten til referankestoffet glycin

$\% P$ = vektprosent protein

P = renheten til referankestoffet glycin

PF = prøvespesifikk proteinfaktor (6.25)

3.2.4 Totale aminosyrer

Bestemmelse av totale aminosyrer ble utført som beskrevet av Blackburn (1968). Rå sjøpølse (0,5 g) eller frysetørket sjøpølse (0,05 g) ble veid opp og tilsatt HCl (1 ml, 6M), før de ble satt til hydrolyse i et varmeskap i 22 timer på 105 °C med korkene løst på. Etter en halvtime ble korkene skrudd til.

Prøvene ble kjølt ned noen minutter før de ble nøytralisert til en pH på rundt 7 ved titrering med NaOH. Prøvene ble deretter vakuumfiltrert gjennom et Whatman glassmikrofiberfilter CF/C ved hjelp av vann, før de ble overført til en glasskolbe (10 ml), som ble fylt opp med destillert vann til indikatorstreken. Prøvene ble fortynnet til 1:500 med destillert vann, og ble filtrert gjennom 0,22 µm filter. Til slutt ble den filtrerte prøven (0,205 ml) overført til små analyserør og analysert på HPLC av avdelingsingeniør Tarjei Haugbro. Proteininnholdet ble bestemt ved å subtrahere et vannmolekyl fra hver av de detekterte aminosyrene, før de ble summert sammen. TAA er oppgitt i mg/g prøve.

3.2.5 Frie aminosyrer

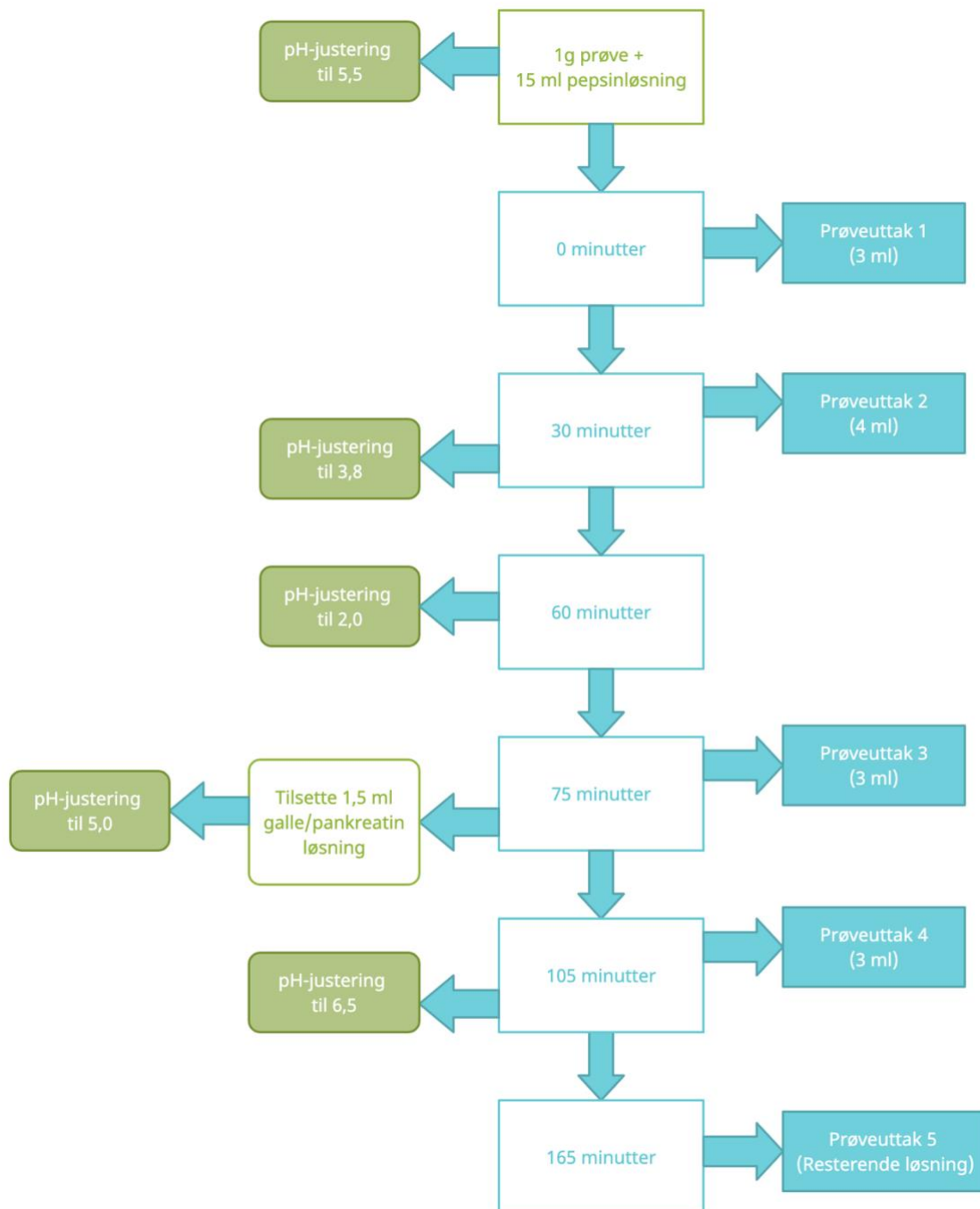
Bestemmelse av frie aminosyrer ble utført som beskrevet av Osnes og Mohr (1985).

Det ble først laget til en proteinekstraktløsning, bestående av rå sjøpølse (1 g) eller frysetørket sjøpølse (0,1 g), løst i destillert vann (5 ml), homogenisert med en Ultra Turrax på 18 000 rpm i 1 minutt og sentrifugert på 9000 rpm i 10 minutter. Deretter ble proteinekstraktet (1 ml) overført til eppendorfrør, tilsatt 10 % sulfosalisylysyre, ristet godt og satt i kjøleskap. Etter 30 minutter, ble rørene sentrifugert i 10 minutter på 5000 rpm. Hver prøve ble analysert med to replikater.

Om det ble dannet bunnfall i rørene, ble supernatanten (1 ml) tilsatt 10 % sulfosalisylysyre, ristet, satt i kjøleskap og sentrifugert på nytt til det ikke ble dannet bunnfall. Videre ble supernatanten fortynnet 1:25 (0,2 ml prøve og 4,8 ml destillert vann), før den ble filtrert gjennom et filter med porestørrelse 0,2 µm og analysert på HPLC av avdelingsingeniør Tarjei Haugbro. FAA er oppgitt i mg/g prøve.

3.2.6 Simulert fordøyelse

En simulert fordøyelse ble etablert for å simulere fordøyelsen i mage og tarm (Sannaveerappa et al., 2007) (figur 5). Det ble laget til en pepsinløsning (0,5 l) bestående av 0,462 % pepsin, 49 mM NaCl, 12 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 2,4 mM MgCl₂ og 3,5 mM K₂HPO₄. I tillegg ble en galle/pancreatin-løsning (0,05 l) bestående av 0,1 mM NaHCO₃, 1,25 g galle og 0,2 g pankreatin løst i destillert vann (0,05 l) laget til.



Figur 5: Oversikt over pH-justeringer, tilsetninger og uttak til forskjellige tider i den selvtablerte simulerte fordøyelsesmodellen.

Selve fordøyelsen startet med at oppveid prøve (1 g) ble tilsatt pepsinløsning (15 ml) og pH-justert til 5,5 med HCl og NaOH, før det ble tatt ut 3 ml prøve (uttak 1). Etter 30 minutter inkubering ble det tatt ut 4 ml prøve (uttak 2). Videre ble pH justert til 3,8. Etter 60 minutter inkubering ble pH justert ned til 2,0, og etter 75 minutter ble 3 ml prøve tatt ut (uttak 3) og bile/pancreating-løsning ble tilsatt (1,5 ml). Deretter ble pH justert til 5,0, og etter inkubering i 105 minutter ble 3 ml prøve tatt ut (uttak 4). Til slutt ble pH justert til 6,5, og etter inkubering på 165 minutter ble resterende prøveløsning tatt ut (uttak 5). For hver fordøyelse ble det kjørt en kontroll med vann, som ikke inneholdt prøve av sjøpølse. Og for hver sjøpølse ble det kjørt en prøve uten tilsatt enzym. Figur 6 viser oppsettet av den simulerte fordøyelsen. Prøvene sto til enhver tid under omrøring ved 37 °C dekket til med parafilm.



Figur 6: Oppsettet av selvetablert simulert modell av fordøyelsessystemet etter tilsetning av enzymer. Kolben til venstre inneholder kontrollprøven uten sjøpølse med tilsatt enzym, kolben i midten inneholder sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym og kolben til høyre inneholder sjøpølse fordøyd uten tilsatt enzym.

For hvert av de 5 uttakene ble løsningen først sentrifugert ved 4 °C, 4500 g i 5 minutter, før supernatanten ble overført og satt på vannbad ved 90 °C i 5 minutter for å inaktivere enzymene. Prøvene ble oppbevart på is frem og deretter lagret i fryseren på -80 °C. For videre utregninger ble det gjort den antakelse at løsningene fra den simulerte fordøyelsen er homogene, og at tilsatt volum ved pH-justeringene var neglisjerbare.

3.2.7 FRAP-analyse

Analyse av FRAP ble utført som beskrevet av Benzie og Strain (1996) med noen modifikasjoner.

FRAP-løsningen ble laget ved å blande 5 ml Fe(III)klorid-6-hydrat-løsning (19 mM) med 5 ml 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-2-triazyn (TPTZ) (10 mM løst i 40 mM HCl) og 50 ml acetatbuffer (1,505 g natriumacetat + 8 ml eddiksyre tilsatt 500 ml destillert vann), som ble inkubert på 37 °C frem til bruk. Trolox, løst i MeOH og fortynnet i vann til konsentrasjoner fra 31,25 µM til 1000 µM, ble brukt som standard. Prøvene ble opparbeidet ved at 0,3 g rå sjøpølse eller 0,1 g frysetørket sjøpølse ble løst i 5 ml dH₂O og homogenisert med en Ultra Turrax (IKA T25 Digital) på 13 000 rpm. Hver prøve ble analysert med to replikater. Prøvene fra den simulerte fordøyelsen ble overført direkte fra prøverøret til mikroplaten.

Til en brønn i en 96-brønns mikroplate ble prøve/standardløsning (10 µl), destillert vann (30 µl) og FRAP-løsning tilsatt (300 µl). Platen ble inkubert i 30 minutter på 37 °C før den ble lest av ved 593 nm i et spektrofotometer.

Fortynningsfaktoren ble multiplisert med konsentrasjonen, før denne verdien senere ble multiplisert med forholdet mellom mengde prøve og volumet av løsningen (g/L). Antioksidativ kapasitet ble presentert som µmol troloxequivalenter (TE)/g prøve.

3.2.8 ABTS-analyse

Måling av antioksidativ kapasitet med 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay ble utført som beskrevet av Nenadis et al. (2007) og Re et al. (1999).

En ABTS stock løsning (7 mM, 0,1 l), og en potassium persulfat, diammonium salt-løsning, K₂S₂O₈ (140mM, 0,01 l) ble først laget. Deretter ble en ABTS reaksjonsløsning laget til ved å blande ABTS stock løsning (25 ml) og potassium persulfat (440 µl). ABTS reaksjonsløsningen ble inkubert mørkt over natta før analyse. ABTS reaksjonsløsningen ble videre fortynnet 1:90 (v:v) i 80 % metanol (MeOH). Absorbansen av løsningen ble målt, og ble justert med ABTS reaksjonsløsning eller 80 % MeOH til 0,75 ± 0,05.

Propylgallat stock løsning (PG-løsning) ble laget som standardløsning ved å løse propylgallatpulver (10 mM, 0,25 l) i 80 % MeOH, som ble brukt til å lage en serie fortyndinger med konsentrasjonene 10-50 μ M, i tillegg til 0 μ M (blank med kun 80 % MeOH).

Selve analysen ble gjennomført ved å blande ABTS working-løsning (2 ml) med prøve (200 μ l). For rå sjøpølser (0,15 g løst i 5 ml 80 % MeOH) og for frysetørkede sjøpølser (0,025 g prøve løst i 5 ml 80 % MeOH) ble det veid opp prøve som ble homogenisert ved å bruke en Ultra Turrax (IKA T25 Digital) på 13 000 rpm i ca. 30 sekunder. For prøver som har gjennomgått simulert fordøyelse ble prøvene tint og prøve (200 μ l) ble overført direkte fra disse rørene. Videre ble rørene med blandingen av ABTS working løsning og prøve vortexet i noen sekunder, før de ble inkubert mørkt i 6 minutter. Absorbansen ble deretter lest av ved 734 nm i et spektrofotometer med vann som referanse. Hver prøve ble analysert med to replikater.

Antioksidativ kapasitet ble presentert som μ mol PG/g prøve.

3.2.9 ORAC

Antioksidativ kapasitet målt ved å bruke ORAC (oksygenradikal absorbanskapasitet) ble utført som beskrevet av Dávalos et al. (2004).

Det ble først laget til en fosfatbufferløsning (75 mM, 10,649 g Na_2HPO_4 per liter destillert vann) med pH 7,4. I tillegg ble det laget en fluoresceinløsning (88 mM), og en APPH-løsning (153 mM) som begge ble løst i fosfatbuffer (PB). Trolox ble brukt som standard, og det ble laget til en standardkurve av med konsentrasjonene 6,25-100 μ l. Det ble i tillegg benyttet en blank kun bestående av fosfatbuffer (200 μ l).

Rå eller frysetørket sjøpølse (0,1 g) ble veid opp og løst i PB (15 ml), mens fordøyde sjøpølser (300 μ l) ble løst i PB (2,7 ml). Det ble benyttet en Nunc 96-brønners mikroplate, hvor prøve (25 μ l) og fluorescein (150 μ l) ble tilsatt i hver brønn før platen ble inkubert på 37 °C i 15 minutter, deretter ble hver brønn tilsatt APPH-løsning (50 μ l) og kjørt i 90 minutter i en Tecan Spark 20M. Her ble fluorescensen målt kinetisk hvert minutt ved 485 nm og 535 nm. Hver prøve ble analysert med to replikater.

Den antioksidative kapasiteten/ORAC ble bestemt ved å sammenlikne arealet mellom fluorescenskurven til gitt prøve og blankprøven/nullprøven, med arealet mellom

fluorescenskurven til kjent standard og nullprøven. Resultatene ble oppgitt i μmol troloxequivalenter (TE)/g prøve, ettersom trolox ble benyttet som standard.

3.2.10 ACE-assay

For å måle antihypertensiv kapasitet ble ACE-assay benyttet og gjennomført slik beskrevet av Cushman og Cheung (1971), med modifikasjoner beskrevet av Dragnes et al. (2009)

En substratløsning (32,21 mg Hippuryl-Histidine-Leucine, HHL) ble fortynnet i 30 ml boratbuffer (6,18 g borsyre og 17,53 g NaOH løst i 0,9 ml destillert vann, pH 8,3). For hver prøve ble det laget til en stockløsning med 1:50 fortynning (200 mg frysetørket sjøpølse løst i 10 ml boratbuffer, og 0,5 ml fordøyd og ufordøyd løsning løst i 5 ml boratbuffer). For hver prøve ble det laget en fortynningsrekke bestående av stockløsning og boratbuffer med 2,5-50 μg prøve i reaksjonen.

Til assayet ble det benyttet en brønnplate med 48 brønner, hvor hver brønn ble tilsatt 100 μl substratløsning og 25 μl prøve. Brønnplaten ble satt til inkubering i 30 minutter på 37 °C før hver brønn ble tilsatt 50 μl ACE-enzym. Deretter ble rørene nok en gang inkubert i 30 minutter på 37 °C. Etter inkuberingen ble hvert rør ble tilsatt HCl (215 μl , 1 M) for å stoppe reaksjonen. For hver fortynningsløsning ble det brukt tre paralleller.

Løsningene i hvert av rørene ble filtrert gjennom et 0,22 μm filter, før de ble overført til HPLC-analyserør og analysert på HPLC ved bruk av programmet «1260 Dad + Rid». En IC_{50} -verdi ble regnet ut og presentert som mengde (μg) prøve som trengs for å hemme 50 % av enzymaktiviteten til 1 mU ACE. Hvor en lavere IC_{50} -verdi indikerer høyere ACE-hemmende effekt.

3.3 Rød sjøpølse

Røde sjøpølser (*Parastichopus tremulus*) ble fangstet med en bunntåler fra NTNU's forskningsfartøy «Gunnerus» utenfor Trondheimsysten i oktober 2020, ved 63° 30,917 N og 10° 25,107 Ø. Sjøpølsene ble lagret levende frem til slakting i august 2021 i tanker med gjørmesediment for å etterligne deres naturlige habitat, og fôret med laksepellets knust i små partikler.

Under slakteprosessen ble sjøpølsene (n=20) mellomlagret i rent sjøvann. Sjøpølsene ble tatt opp, og tørket med papir, før de ble veid og sløyet. Sjøpølsene var ikke kjønnsmodne ved slakting, og lengden varierte mellom 5 til 20 cm. Tarmene, gonadene og vann ble fjernet før pølsene ble veid, og lagret på -80 °C inntil videre analyser. Før analysene ble halvparten av sjøpølsene kværnet (n=10), mens de resterende sjøpølsene (n=10) ble frysetørket og kværnet til pulver.

3.4 Frysetørking

Halvparten av sjøpølsene (n=10) ble fryst ned til -80 °C og frysetørket i 72 timer (Labconco FreeZone 12), (figur 7).



Figur 7: De frysetørkede sjøpølsene i frysetørkeren.

3.5 Statistisk analyse

Resultatene ble presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik, og er behandlet i statistikkprogrammet IBM SPSS Statistics, versjon 27 (IBM, New York, USA). Det ble antatt normalfordeling av all data, og ANOVA og deretter Tukey post hoc test ble benyttet for å teste for statistiske forskjeller mellom uttakene og de ulike prøvene benyttet i fordøyelsen. T-test ble benyttet for å teste for statistiske forskjeller mellom rå og frysetørket sjøpølse. Signifikanslevelen ble satt til 5 % ($<0,05$).

4 Resultater og diskusjon

4.1 Biokjemisk sammensetning

Et av målene for oppgaven var å karakterisere den biokjemiske sammensetningen både for rå og frysetørket rød sjøpølse. Fettinnholdet ble bestemt ved Blich and Dyers mikrometode, vann- og askeinnholdet ble bestemt ved tørking og forbrenning og proteininnholdet ble bestemt ved å benytte Kjeldahls metode. Resultatene er presentert i tabell 3.

Resultatene viser en biokjemisk sammensetning i rød sjøpølse med ca. 1,2 % fett, 90 % vann, 4 % aske og 4,4 % protein. I det frysetørkede råstoffet var den biokjemiske sammensetningen på ca. 8,5 % fett, 3,4 % vann, 36 % aske og 43 % protein.

Tabell 3: Oversikt over den biokjemiske sammensetningen i rå og frysetørket rød sjøpølse *Parastichopus tremulus* presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik.

Biokjemisk sammensetning	Rå (% av våtvekt)	Tørket (% av tørrvekt)
Fett	1,2 \pm 0,4*	8,5 \pm 2,2
Vann	89,6 \pm 0,9	3,4 \pm 0,2
Aske	3,9 \pm 0,4	36,2 \pm 0,4
Protein	4,4 \pm 0,7	43,1 \pm 2,4

*signifikant forskjell mellom rå og frysetørket *P.tremulus* ved t-test ($<0,05$)

Konsentrasjonen av næringsstoffene i de frysetørkede sjøpølsene var betydelig høyere enn for de rå. For å få en enklere sammenligning mellom de rå og frysetørkede sjøpølsene ble tørrvekten i de frysetørkede sjøpølsene regnet om til våtvekt ved å benytte formel 3 i vedlegg 7. Resultatene viste et fettinnhold på 0,9 %, et proteininnhold på 4,5 %, et vanninnhold på 90,2 % og et askeinnhold på 3,7 % av våtvekt for de frysetørkede sjøpølsene. For disse resultatene ble det funnet signifikant forskjell i fettinnholdet mellom rå og frysetørket rød sjøpølse, med et noe lavere fettinnhold i de tørkede sjøpølsene enn i de rå. Det må påpekes at til tross for at det ble funnet statistisk signifikante forskjeller, så var forskjellene svært små. Når det gjelder protein-, vann- og askeinnholdet var det ingen signifikante forskjeller mellom de rå og de frysetørkede sjøpølsene, og verdiene var tilnærmet like. Frysetørkingsprosessen virket dermed ikke å påvirke næringsinnholdet i sjøpølsene basert på disse resultatene.

Den biokjemiske sammensetningen i rød sjøpølse, *P.tremulus*, presentert i denne oppgaven viste seg å være relativt lik resultater som har blitt beskrevet tidligere, med unntak av at

fettinnholdet var noe høyere enn i tidligere studier. En studie utført av Sea Snack og Møreforskning (Ringvold & Kjerstad, 2018) viste at *P. tremulus* inneholdt 89,7 % vann, 4,2 % protein, 0,4 % fett og 4,3 % aske. En av årsakene til ulike resultater kan være hvor i landet og når på året sjøpølsene er fangstet. Det er antatt at den biokjemiske sammensetningen kan variere med blant annet årstid og levested (Kjerstad, 2020). De røde sjøpølsene i studien ble hentet opp i perioden februar til mai i Bodø-området. Etersom sjøpølsene brukt i denne oppgaven ble hentet opp i oktober rett utenfor Trondheim kan dette være en årsak til de små forskjellene i fettinnholdet. En annen rapport utført av Møreforskning (Kjerstad et al., 2020) viste store endringer i næringsinnholdet mellom juni og september for rå *P.tremulus* hentet opp med samme tråler på samme sted. Fettinnholdet var lavest i juni med 0,4 % og høyest i september med 0,9 %. Det samme gjaldt proteininnholdet som var lavest med 3,3 % i juni og høyest med 5,3 % i september. Askeinnholdet var stabilt gjennom hele perioden på 3,5 %, mens vanninnholdet var høyest i juni med 91 % og lavest i september med 88 %. Her kom det tydelig frem at det er store sesongmessige variasjoner, og at det kan være naturlige årsaker til avvik mellom resultater fra ulike studier. Den samme studien (Ringvold & Kjerstad, 2018) viste en biokjemisk sammensetning på tørket *P.tremulus* på 31,1-32,6 % protein, 0,9-2,3 % fett, 8,4 % vann og 55,4 % aske. Protein- og fettinnholdet var dermed høyere i denne oppgaven enn i studien, mens vann- og askeinnholdet var lavere. Det er hensiktsmessig å nevne at det også kan være store sesongmessige variasjoner i antioksidativ kapasitet (Chrysargyris et al., 2021).

En annen årsak til de ulike resultatene kan være hvilke metoder som har blitt benyttet til å bestemme resultatene. Både i denne oppgaven og i studien til Sea Snack og Møreforskning ble Kjeldahls metode brukt for å undersøke proteininnhold, men for å bestemme fettinnhold ble det benyttet to forskjellige metoder, Bligh and Dyer i denne oppgaven og NS9402 i studien. Dermed kan det også være en forklaring på at resultatene ble ulike. Bligh and Dyer, som ble benyttet til å undersøke fettinnholdet i denne oppgaven, kan være noe unøyaktig ved at mange trinn i metoden kan føre til upresise resultater. Det må likevel presiseres at forskjellene i fettinnholdet var veldig små. Ofte når det er så lite som rundt 1 % fett, er variasjonene så store at det er vanskelig å bestemme fettinnholdet eksakt.

4.1.1 Totale aminosyrer

Innholdet av totale aminosyrer for rå og frysetørket *P.tremulus* er presentert i tabell 4 og i vedlegg 2 og 3. Det ble identifisert 15 ulike aminosyrer, som er inkludert i tabellen, hvor glysin

og arginin er slått sammen. Taurin, prolin og cystein ble ikke analysert med den benyttede metoden, og ble dermed ikke tatt med i beregningen av det totale aminosyreinnholdet.

Tabell 4: Innhold av aminosyrer i rå (n=9) og frysetørket (n=9) rød sjøpølse (*P.tremulus*) presentert som gjennomsnitt ± standardavvik.

Totale aminosyrer		
Aminosyre	Rå <i>P.tremulus</i> (mg/g våtvekt)	Frysetørket <i>P.tremulus</i> (mg/g tørrvekt)
Histidin	0,4 ± 0,1	3,6 ± 0,3
Treonin	2,4 ± 0,7	17,8 ± 1,2
Metionin	0,7 ± 0,2	4,3 ± 0,5
Valin	1,7 ± 0,5	13,3 ± 0,8
Fenylalanin	1,4 ± 0,4	11,2 ± 0,8
Isoleucin	1,2 ± 0,3	9,8 ± 0,6
Leucin	2,4 ± 0,7	17,7 ± 1,2
Lysin	1,6 ± 0,5	12,8 ± 0,9
Tryptofan*	ID	ID
Total EAA	11,8 ± 1,3	90,5 ± 2,4
Asparginsyre**	4,7 ± 1,3	34,6 ± 2,4
Glutaminsyre**	6,2 ± 1,6	43,6 ± 3,2
Serin	2,3 ± 0,7	15,2 ± 1,0
Glysin/arginin	5,6 ± 1,5	79,9 ± 5,8
Alanin	2,5 ± 0,7	18,4 ± 1,2
Tyrosin	1,2 ± 0,3	9,0 ± 1,0
TOTAL IEAA	22,5 ± 2,8	200,7 ± 7,3
Total AA	34,3 ± 3,1	291,2 ± 7,7

*Tryptofan ødelegges under syrehydrolyse og ble ikke detektert.

**Asparagin og glutamin blir deaminert under syrehydrolyse, og er derfor inkludert i henholdsvis asparagin- og glutaminsyre.

EAA, essensielle aminosyrer; IEAA, ikke essensielle aminosyrer.

I resultatene kommer det tydelig frem hvilke aminosyrer som dominerte i rå og frysetørket *P.tremulus*. Resultatene viser at *P.tremulus* hadde et høyt innhold av aminosyrene glutamin/glutaminsyre, glysin/arginin og asparagin/asparginsyre, men inneholdt også mindre mengder av alle EAA utenom tryptofan. Tryptofan ødelegges under syrehydrolysen og ble ikke

detektert i denne oppgaven. En tidligere studie (Ringvold & Kjerstad, 2018) viste at tørket *P.tremulus* hadde høyest nivå av taurin (23 mg/100 mg), men om taurin skal utelates, ble det vist høyest nivå av aminosyren glysin (0,86 mg/100 mg). I denne oppgaven ble ikke taurin tatt med i beregningen av aminosyreinnholdet, men resultatene viser et høyt innhold av glysin både i rå og frysetørket sjøpølse. Metoden som ble benyttet til å bestemme aminosyreinnholdet i denne oppgaven skilte ikke mellom glysin og arginin, dermed er det vanskelig å konkludere med den eksakte mengden av hver av disse to aminosyrene siden de var slått sammen. Etersom innholdet av glysin/arginin var høyt, tyder det på et høyt innhold av aminosyren glysin i både rå og frysetørket sjøpølse. Tidligere studier (Bordbar et al., 2011) viste at glysin er hovedkomponenten i de fleste arter av sjøpølse som er identifisert, og det samsvarer med det resultatene i denne oppgaven viser for arten *P.tremulus*. Det er vist (Wang et al., 2013) at denne aminosyren spiller en viktig rolle i metabolsk regulering og antioksidative reaksjoner, og at den har blitt brukt til å forbedre antioksidativ kapasitet. I tillegg er det dokumentert at inntak av mat rik på glysin kan bidra til reduksjon av totalt kolesterolnivå (Roggatz et al., 2016). Det er dermed flere gunstige helsefordeler knyttet til et høyt innhold av glysin.

Det kom også frem fra resultatene at *P.tremulus* hadde et høyt innhold av aminosyren glutamin/glutaminsyre. Det er denne aminosyren umamismaken stammer fra. Ubehandlet plantebasert mat har lite å tilby når det gjelder smaker som søtt og umami (Mouritsen & Styrbæk, 2020). Dette kan være en av utfordringene med å integrere et mer plantebasert kosthold hos befolkningen, ettersom disse smakene tradisjonelt har inngått i menneskers kosthold siden evolusjonen (Schmidt & Mouritsen, 2020). Innholdet av denne aminosyren tyder på at rød sjøpølse kan ha en litt proteinaktig smak, slik som kjøtt. Dette kan gjøre den godt egnet som smakstilsetter og smaksforsterker til et ellers plantebasert kosthold. Aminosyren glysin har i tillegg en søt smak, som kan sammenlignes med glukose (Wu, 2021). Med et høyt innhold av både glutamin/glutaminsyre og glysin kan *P.tremulus* gi mye smak.

4.1.2 Tap av AA ved frysetørking

Sjøpølse er et produkt som svært ofte selges og konsumeres tørket. Det er derfor relevant å se på tapet av næringsinnhold i frysetørket sjøpølse sammenlignet med rå sjøpølse. I tabell 5 er retensjon av aminosyrer i de tørkede rød sjøpølsene presentert. Utrekningene er vist i vedlegg 6. Resultatene viser at frysetørket sjøpølse inneholdt rundt 70 % av aminosyreinnholdet som rå sjøpølse inneholdt, og at næringsinnholdet ble tapt med rundt 30 % ved frysetørking. Unntaket var glysin/arginin hvor retensjonen ble utregnet til 143 %. Det er åpenbart at

aminosyreinnholdet ikke kan ha økt etter tørkeprosessen, og dette resultatet skyldes blant annet at to aminosyrer er slått sammen, noe som kan være årsak til upresist resultat. I tillegg ble beregningene basert på gjennomsnittet av aminosyreinnholdet i ni sjøpølser og gjennomsnittet av vekt etter frysetørking basert på ti sjøpølser. Frysetørking er en svært skånsom tørkemetode (Kamiloglu et al., 2016), som kan produsere produkter med kvalitet tilsvarende det ferske produktet hvor de varmfølsomme biomolekylene opprettholdes (Chong et al.). Det var derfor ikke forventet store forskjeller i næringsinnholdet mellom rå og frysetørkede sjøpølser.

Tabell 5: True retention (TR %) for aminosyrer i rå (n=9) og frysetørket sjøpølse (n=10). Utregningen er vist i vedlegg 6.

Aminosyre	TR %
Asp	74,13
Glu	69,69
His	72,50
Ser	63,77
Gly/Arg	143,67
Thr	74,68
Ala	71,26
Tyr	75,52
Met	61,86
Val	78,78
Phe	75,19
Ile	75,91
Leu	71,29
Lys	75,82

Til tross for at EAA er de viktigste og mest relevante å undersøke, så er tap av glutaminsyre også av stor interesse. Den er en viktig kilde til nitrogen, er involvert i smaksoppfatningen og bidrar til umamismaken (Gómez-Limia et al., 2021). Den antas dermed å bidra med mye smak, så tap av denne vil kunne gå på bekostning av smaken i sjøpølsene.

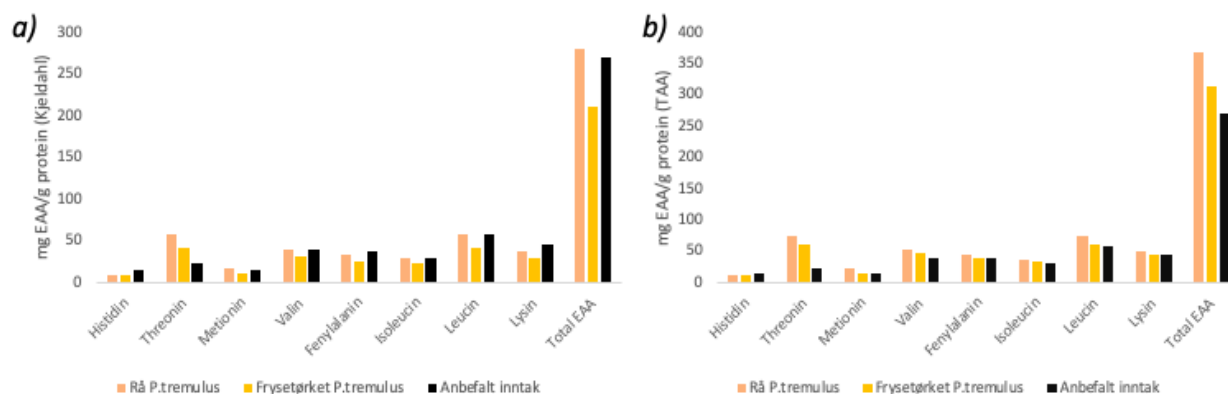
4.1.3 Proteininnhold og essensielle aminosyrer

Proteininnholdet i rød sjøpølse ble målt til 34,3 mg/g våtvekt ved bestemmelse av TAA. Dette tilsvarer 3,43 % protein, og er litt lavere sammenlignet med proteininnholdet bestemt ved

Kjeldahls metode på 4,2 %. Når det gjelder de frysetørkede sjøpølsene ble proteininnholdet målt med Kjeldahls metode bestemt til å være 43,1 %. Mens ved bestemmelse av TAA viste proteininnholdet 291,2 mg/g tørrvekt, noe som tilsvarte 29,12 %. Her ble det bestemt et lavere proteininnhold ved aminosyreanalyse enn ved Kjeldahls metode. Ved Kjeldahls metode måles det totale nitrogeninnholdet, og proteininnholdet overestimeres ofte ettersom det finnes andre nitrogenholdige forbindelser enn aminosyrer (Jung et al., 2003). Ved aminosyreanalyse brytes proteinet ned ved syrehydrolyse og frigjorte aminosyrer blir bestemt kromatografisk. Noen av aminosyrene vil utelates ved denne metoden ettersom de blir fullstendig oppløst av hydrolysen og dermed ikke kan detekteres. Derfor kan denne metoden underestimere proteininnholdet. Dette vil dermed føre til en lavere verdi for proteininnholdet målt ved TAA. Basert på dette var resultatene for proteininnholdet i denne oppgaven fra disse to metodene forventet.

Resultatene viser at både rå og frysetørket sjøpølse inneholdt samtlige EAA som ble detektert med metoden. Innholdet av EAA ble bestemt til å være 11,8 mg EAA/g våtvekt og 90,5 mg EAA/g tørrvekt for henholdsvis rå og frysetørket sjøpølse (tabell 4). Basert på proteininnholdet bestemt med Kjeldahls metode tilsvarer dette totalt 281,0 mg EAA/g protein for rå sjøpølse og totalt 210,2 mg EAA/g protein for frysetørket sjøpølse. Med proteininnholdet bestemt fra aminosyreanalyse tilsvarer det 368,8 mg EAA/g protein for rå sjøpølse og 314,5 mg EAA/g protein for frysetørkede. Utrekningene er vist i vedlegg 4.

FAO (2007) har etablert verdier for anbefalt inntak av mg EAA/g protein vist i figur 8. Det er valgt å sammenligne det anbefalte inntaket med proteininnholdet bestemt ved både aminosyreanalyse og Kjeldahls metode. Proteininnholdet bestemt med aminosyreanalyse anbefales som den mest pålitelige metoden av FAO (2007), men de fleste publikasjoner har benyttet Kjeldahls metode. Kjeldahls metode er den internasjonale referansemotoden som brukes til å bestemme proteininnhold i mat og fôr (Jung et al., 2003).



Figur 8 a) og b): Innhold av essensielle aminosyrer (EAA) per g protein i rå og frysetørket sjøpølse, samt anbefalt inntak av essensielle aminosyrer (EAA) per g protein (FAO/WHO/UNU, 2007), målt med a) Kjeldahls metode og b) totale aminosyrer (TAA). Det anbefalte inntaket av EAA per g protein er presentert som svarte stolper.

Som figurene ovenfor viser var anbefalt mengde av hver aminosyre per g protein i rå *P.tremulus*, målt med både aminosyreanalyse og Kjeldahls metode, over den anbefalte totale mengden på 270 mg EAA/g protein som er fastsatt av FAO og Verdens helseorganisasjon (2007). Innholdet av EAA for rå sjøpølse bestemt ved Kjeldahls metode er relativt likt det anbefalte inntaket for de fleste EAA, unntakene er treonin hvor *P.tremulus* inneholdt godt over den anbefalte mengden, og histidin og lysin hvor *P.tremulus* inneholdt noe under det anbefalte. For rå sjøpølse målt med aminosyreanalyse var proteininnholdet høyere enn det anbefalte inntaket for samtlige EAA presentert i figuren.

Målt med aminosyreanalyse hadde frysetørket sjøpølse et totalinnhold av EAA over det anbefalte inntaket bestemt av FAO, men proteininnholdet målt med Kjeldahl viste seg å være under det anbefalte inntaket. For frysetørket sjøpølse målt med Kjeldahl lå innholdet for hver av aminosyrene litt under det anbefalte, med unntak av treonin hvor mengden lå godt over det anbefalte inntaket. Målt med aminosyreanalyse inneholdt de frysetørkede sjøpølsene like stor mengde EAA som anbefalt for metionin, isoleucin og leucin, men litt mindre enn anbefalt for histidin og lysin. Treonin og valin fantes i mengder store nok til å dekke det anbefalte inntaket.

En annen måte å sammenligne på er å se på forholdet EAA/IEAA. Forholdet EAA/IEAA ble i denne oppgaven målt til å være 0,64 for rå sjøpølse og 0,45 for frysetørket sjøpølse. Dette viste at det er en høyere andel EAA enn IEAA i rå sjøpølse og en noe lavere andel EAA i frysetørket sjøpølse. Dette kan tyde på at en større andel av EAA, sammenlignet med IEAA, forsvinner i frysetørkingsprosessen. Disse resultatene var betydelig høyere enn fra en tidligere studie

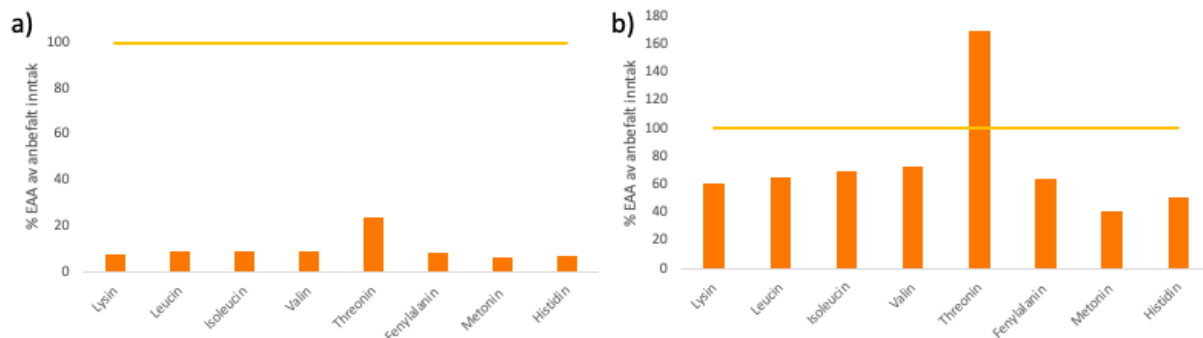
(Ringvold & Kjerstad, 2018), som viste et EAA/IEAA-forhold på 0,35 i rå *P.tremulus*. Her var ikke tryptofan regnet med, noe den heller ikke var i denne oppgaven. I en studie (Wen et al., 2010) utført på åtte ulike arter av sjøpølser, varierte EAA/IEAA-forholdet mellom 0,38 og 0,60 for de forskjellige artene, hvor arten med det høyeste forholdet var *Thelenota ananas*. Denne arten er allerede godt etablert, og er en av de mest populære konsumerte sjøpølsene i Kina og i deler av sørøst Asia (Yu et al., 2014). Resultatene fra denne oppgaven tilsier at rå *P.tremulus* kan sammenlignes og at EAA/IEAA-forholdet er tilsvarende som for *T.ananas*. Når matvarer har en høy andel EAA er proteinet av høy kvalitet og kan kalles et fullverdig protein (Malla et al., 2022).

Den samme studien utført av Ringvold og Kjerstad (2018) viste et lysin/arginin-forhold på 0,64 for rå *P.tremulus*. I denne oppgaven ble lysin/arginin-forholdet målt til å være 0,30 for rå og 0,16 for frysetørket sjøpølse. Lysin/arginin-forholdet ble tidligere målt i åtte ulike arter av sjøpølse, og resultatet viste en variasjon mellom 0,15 og 0,39 (Wen et al., 2010). Disse forholdene tilsvarte resultatene for både rå og frysetørket *P.tremulus* i denne oppgaven. Dette forholdet kan være interessant å se på siden det tidligere har blitt antydnet (Gudbrandsen et al., 2005; Rajamohan & Kurup, 1997; Roggatz et al., 2016) at et lavt lysin/arginin-forhold i et protein har hypokolesterolemiske effekter. Proteinkvaliteten til *P.tremulus* var dermed god sammenlignet med andre arter som allerede er etablert på markedet. Det er verdt å merke seg at i denne oppgaven var ikke arginin helt ren og er sammenslått med glysin. Dette kan gi noe usikre tall, og det kan være en mulighet for at forholdet er høyere enn det som fremkom i denne studien.

Det er kjent at fisk og generelt sjømatproteiner anses som høykvalitetsproteiner på grunn av deres balanserte innhold av aminosyrer, spesielt innhold av alle EAA (Aristoy & Toldrá, 2009). Basert på mengde EAA tyder det på at kvaliteten i både rå og frysetørket *P.tremulus* er god totalt sett. Frysetørket *P.tremulus* inneholdt alle EAA som kunne detekteres, og kan betegnes som en fullverdige proteinkilde.

FAO (2007) har fastsatt et anbefalt daglig inntak per kg kroppsvekt av EAA. Disse er presentert som 100 %-linjen i figur 9, og grafene representerer prosentvis mengde av hver EAA som inntas ved å konsumere 100 g rå og 100 g frysetørket sjøpølse. Som resultatene i figuren viser dekket 100 g rå sjøpølse i underkant av 10 % av det daglig anbefalte inntaket EAA, med unntak av for treonin som ble dekket med 24 %. Inntak av 100 g frysetørket sjøpølse dekket rundt 70 % av

det daglige anbefalte inntaket for alle EAA med unntak av treonin, som dekket hele det anbefalte daglige inntaket med god margin.



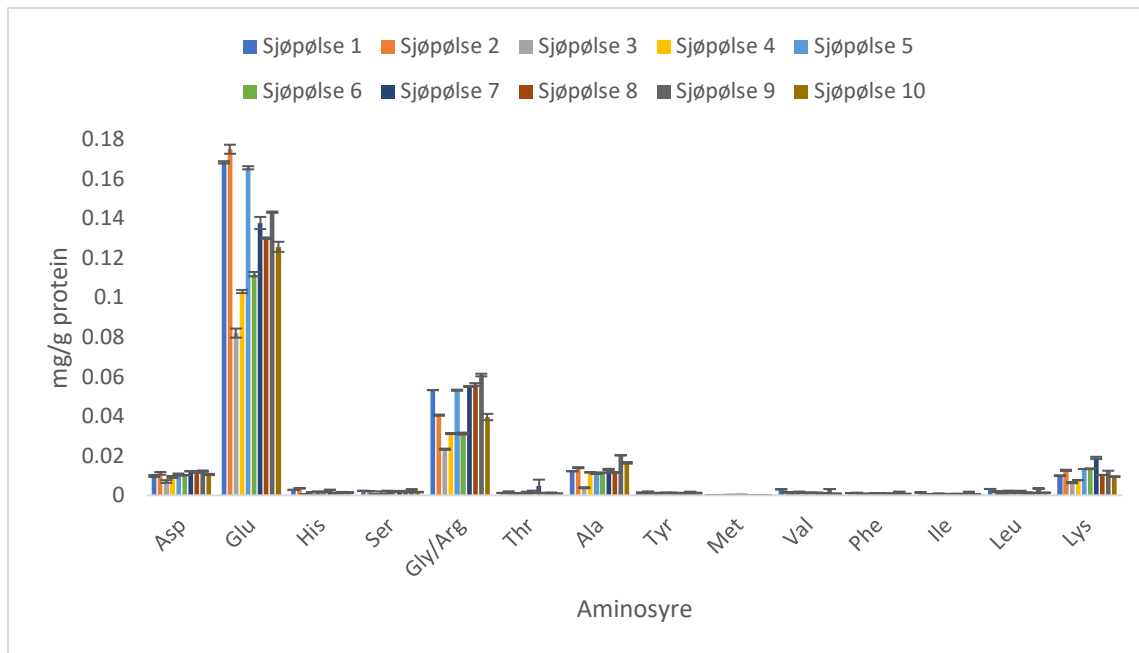
Figur 9 a) og b): Oversikt over hvor stor del av det daglige anbefalte inntaket av EAA som dekkes av a) 100 g rå sjøpølse og b) 100 g frysetørket sjøpølse for en gjennomsnittsperson på 70 kg.

Dette viste at 100 g rå sjøpølse kun bidrar med en liten del av det daglige anbefalte inntaket av EAA/kg kroppsvekt/dag, og at det er nødvendig å spise mye rød sjøpølse for å få dekket hele det daglige behovet, noe som ikke er realistisk. Det kom frem at 100 g frysetørket sjøpølse dekket en vesentlig større del av det anbefalte inntaket EAA/kg kroppsvekt/dag, men det må påpekes at det skal en del til å få i seg 100 g tørket sjøpølse hver dag og at det kun ble tatt med for sammenligningens del. Rød sjøpølse er derimot godt egnet som et bidrag til proteiner og EAA, som en del av et variert kosthold med andre proteinkilder i tillegg.

4.1.4 Frie aminosyrer

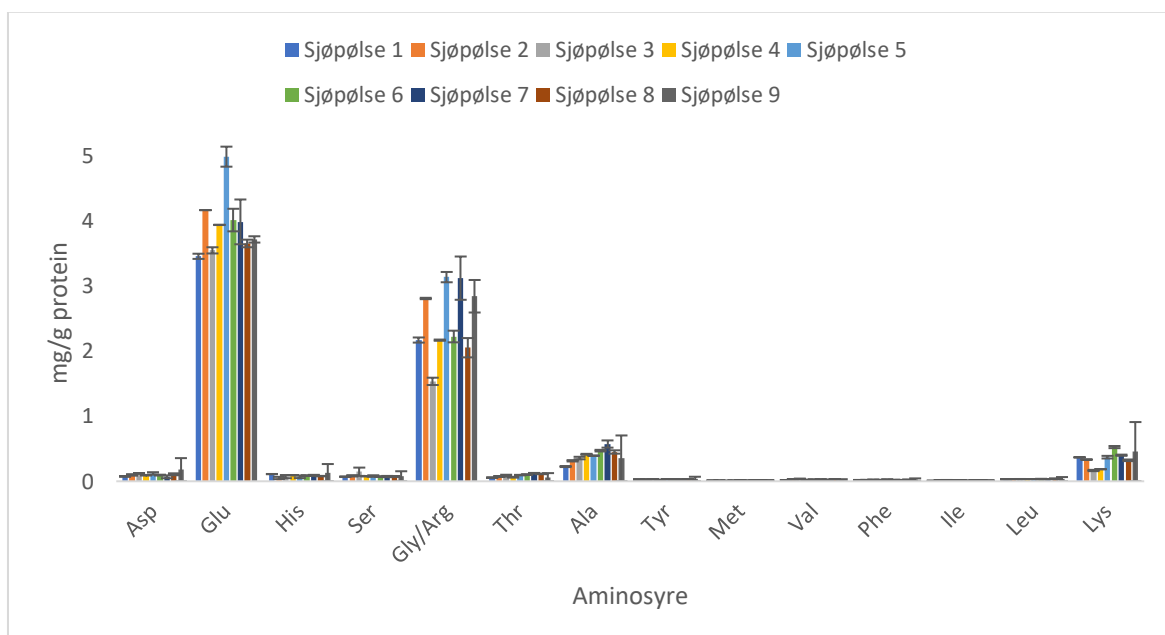
Frie aminosyrer (FAA) ble bestemt ved å fjerne store peptider fra rå og frysetørket *P.tremulus*, og resultatene presenteres i figurene 10 og 11, og i tabell 4 i vedlegg 5. De fleste FAA ble ikke detektert, og forekom kun i svært små mengder både for rå og frysetørket rød sjøpølse. Resultatene blir derfor bedre illustrert i figurene enn i tabellen.

Det kom frem fra resultatene at rå *P.tremulus* inneholdt mest glutaminsyre med et gjennomsnitt på 0,1343 mg TAA/g, etterfulgt av glysin/arginin med et gjennomsnitt på 0,0444 mg TAA/g (figur 10). Det ble også vist et lite utslag på aminosyrene asparginsyre, glutamin, alanin og lysin i figuren, men de forekom i så små mengder at de ikke vises i tabellen.



Figur 10: Innhold av frie aminosyrer (FAA) i 10 stk. rå sjøpølser, *P.tremulus*. Presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik.

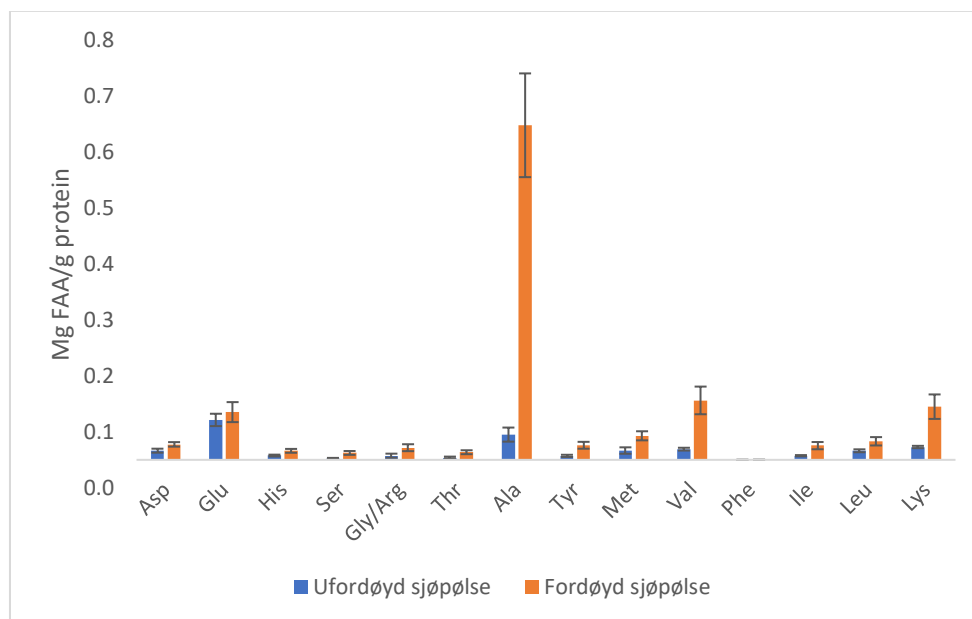
Resultatet av frie aminosyrer i frysetørket *P.tremulus* er presentert i figur 11. Resultatene var tilsynelatende tilsvarende som for rå sjøpølse, men i litt høyere konsentrasjoner. Glutaminsyre dominerte med et gjennomsnitt på 3,9 mg FAA/g protein, etterfulgt av glysin/arginin med et gjennomsnitt 2,5 mg FAA/g protein.



Figur 11: Innhold av frie aminosyrer (FAA) i 9 stk. frysetørkede sjøpølser, *P.tremulus*. Presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik.

Innholdet av FAA var svært lavt i både rå og frysetørket sjøpølse. De fleste hadde for lave mengder til å kunne vises i tabellen, men ble så vidt synlige i figurene. Dette var forventet siden innholdet av FAA i organisk materiale som oftest er lavt ettersom aminosyrer i kroppen er bundet sammen og brukes som bestanddeler i proteiner.

Det som derimot er svært interessant, er å se på utviklingen av mengden aminosyrer som blir frigjort under fordøyelsen. Figur 12 viser en sammenligning av innholdet av FAA i ufordøyd og fordøyd sjøpølse.



Figur 12: Innholdet av frie aminosyrer (FAA) i ufordøyd og fordøyd sjøpølse, gjennomsnitt ($n=4$) \pm standardavvik.

Det er tidligere vist at frigjøringen av aminosyrer øker utover i fordøyelsen, og at tynntarmfasen er i stand til å frigjøre flere aminosyrer enn magesekkkfasen (Suwaluk et al., 2021). Protein- og peptidfordøyelsen foregår i stor grad i tynntarmen. Dette samsvarer med resultatet målt i denne oppgaven, hvor det ble funnet høyere mengder frigjøring av samtlige aminosyrer i de ferdig fordøyde sjøpølsene sammenlignet med de ufordøyde. Dette skyldes at enzymer bryter ned proteiner og peptider, og vil på den måten øke mengden frie aminosyrer i en prøve. Vanligvis er det et lavt innhold av frie aminosyrer i organisk vev, noe som samsvarer med resultatene i denne oppgaven. Det er derfor naturlig å se en lav mengde FAA i den opprinnelige prøven sammenlignet med de fordøyde prøvene tilsatt enzymer.

4.2 Biologisk aktivitet

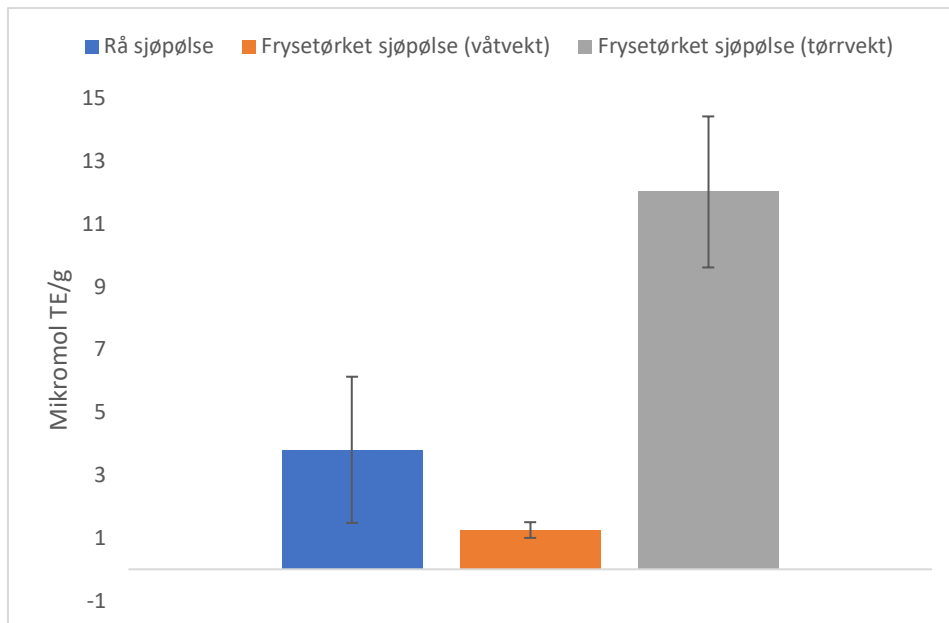
Det er tidligere beskrevet sammenhenger mellom god helse og ulike bioaktiviteter (Chakrabarti et al., 2014; Lin et al., 2018; Suwaluk et al., 2021). I denne oppgaven ble rød sjøpølse *P.tremulus*, rå og frysetørket, samt rå fordøyd, undersøkt for antioksidativ og antihypertensiv kapasitet. Dette er mye brukte assay og kan gi en indikasjon som kan tas videre til dyrestudier.

4.2.1 Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse

Antioksidativ kapasitet ble målt ved å benytte de mye brukte metodene: FRAP, ABTS og ORAC. For de frysetørkede sjøpølsene ble tørrvekten regnet om og presentert i våtvekt, for enklere sammenligning av antioksidativ kapasitet i de rå og frysetørkede sjøpølsene. Utregningene ble gjort ved å benytte formel 3 i vedlegg 7. vedlegg

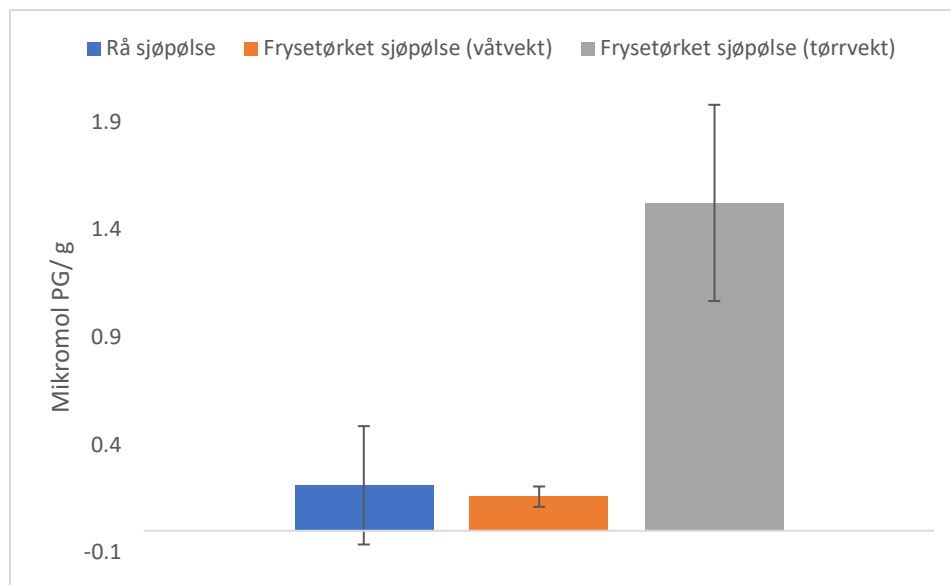
Tilgangen på ferskt råstoff kan være varierende ute i industrien. Tørking er en mye brukt konserveringsmetode, og det er svært vanlig at råstoffet tørkes før det eksporteres. Sjøpølse spises ofte tørket og brukes tørket i kosttilskudd. I denne oppgaven ble det derfor undersøkt om bioaktiviteten påvirkes av frysetørkingsprosessen ved å sammenligne frysetørket og rå sjøpølse. En gjennomsnittlig verdi ($n=10$) \pm standardavvik av den antioksidative kapasiteten for rå og frysetørket rød sjøpølse ble derfor regnet ut ved å bruke FRAP, ABTS og ORAC. Resultatene fra de ulike metodene er presentert i $\mu\text{mol/g}$ i figur 13, 14 og 15.

Den antioksidative kapasiteten målt ved å benytte FRAP-assayet er presentert i figur 13. Den viser høyest antioksidativ kapasitet i frysetørket sjøpølse med $12,01 \mu\text{m TE/g}$ tørrvekt. Rå sjøpølse hadde et gjennomsnitt på $3,81 \mu\text{m TE/g}$ våtvekt. Når resultatene for frysetørket sjøpølse ble regnet om til våtvekt utgjorde det et gjennomsnitt på $1,25 \mu\text{m TE/g}$ våtvekt.



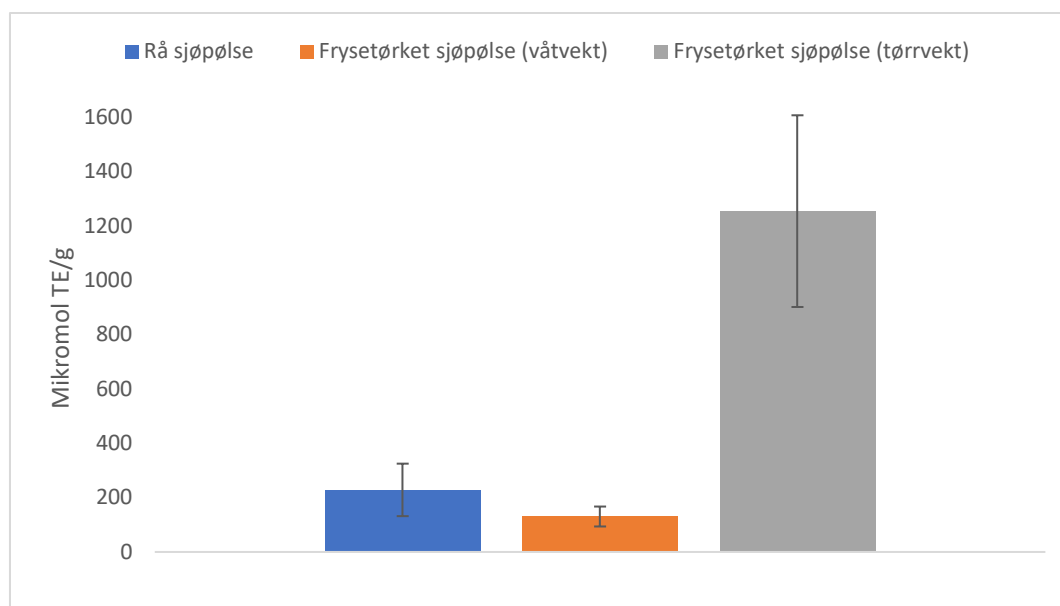
Figur 13: Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse bestemt med ferric reducing antioxidant power (FRAP). Den blå stolpen representerer rå sjøpølse, den oransje stolpen representerer frysetørket sjøpølse regnet om til våttvekt og den grå stolpen presenterer frysetørket sjøpølse i tørrvekt. Presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik.

Nedenfor er resultatene for antioksidativ kapasitet målt ved å bruke ABTS presentert i figur 14. Rå sjøpølse ble målt til å ha et gjennomsnitt på 0,21 $\mu\text{mol PG/g}$ våttvekt og frysetørkede et gjennomsnitt på 0,16 $\mu\text{mol PG/g}$ våttvekt og 1,52 $\mu\text{mol PG/g}$ tørrvekt. Ved å benytte denne metoden viste resultatene svært små forskjeller mellom rå og frysetørket sjøpølse i våttvekt. Som resultatene i figuren viser ble den antioksidative kapasiteten i rå sjøpølse målt til å være tilsynelatende noe høyere enn for frysetørket i våttvekt, men grunnet høyere standardavvik i rå sjøpølse var ikke resultatene sikre. Også med denne metoden viste resultatene stor variasjon og høye standardavvik. Når det er snakk om så lave verdier og så høye standardavvik er det vanskelig å avgjøre eksakte verdier og om det i det hele tatt er en forskjell mellom de to. Ettersom ABTS ga små forskjeller i resultatene mellom rå og frysetørket rød sjøpølse i våttvekt, tydet det på at frysetørkingsprosessen ikke påvirket sjøpølsenes evne til å redusere ABTS i særlig stor grad.



Figur 14: Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse bestemt med 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay (ABTS). Den blå stolpen representerer rå sjøpølse, den oransje stolpen representerer frysetørket sjøpølse regnet om til våttvekt og den grå stolpen presenterer frysetørket sjøpølse i tørrvekt. Presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik.

Den siste metoden som ble benyttet til å bestemme antioksidativ kapasitet var ORAC. Resultatene, presentert i figur 15, viser at denne metoden målte mye høyere antioksidative verdier enn for de to andre metodene. Med gjennomsnittsverdier på 228, 130 og 1253 $\mu\text{mol TE/g}$ for henholdsvis rå sjøpølse, frysetørket sjøpølse basert på våttvekt og frysetørket sjøpølse basert på tørrvekt, var det det samme mønsteret som gikk igjen også med denne metoden. Også her hadde rå sjøpølse en tydelig høyere antioksidativ kapasitet enn frysetørket regnet om til våttvekt. Mens frysetørket sjøpølse i tørrvekt hadde betraktelig høyere verdier.



Figur 15: Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse bestemt med oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Den blå stolpen representerer rå sjøpølse, den oransje stolpen representerer frysetørket sjøpølse regnet om til våttvekt og den grå stolpen presenterer frysetørket sjøpølse i tørrvekt. Presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik.

Resultatene viser at det ble funnet antioksidativ kapasitet både i rå og frysetørket sjøpølse ved alle de tre benyttede metodene. Til tross for svært varierende verdier ved bruk av de tre metodene, var den antioksidative kapasiteten høyest for frysetørket sjøpølse (tørrvekt). Samtlige metoder viste også høyere antioksidativ kapasitet i rå sjøpølse enn i frysetørket (våttvekt). Om resultatene omregnet til våttvekt blir benyttet, tyder dette på at frysetørkingsprosessen kan ha påvirket den antioksidative kapasiteten. Om rå sjøpølse (våttvekt) og frysetørket sjøpølse (tørrvekt) blir sammenlignet direkte så hadde de tørkede pølsene en betydelig høyere antioksidativ kapasitet. Det er tidligere blitt rapportert om høy antioksidativ kapasitet både i *P.tremulus* og også i flere andre arter av sjøpølse (Althunibat et al., 2009; Mildemberger et al., 2021; Roggatz et al., 2016). Det var dermed også forventet å finne en antioksidativ kapasitet i rød sjøpølse i denne oppgaven.

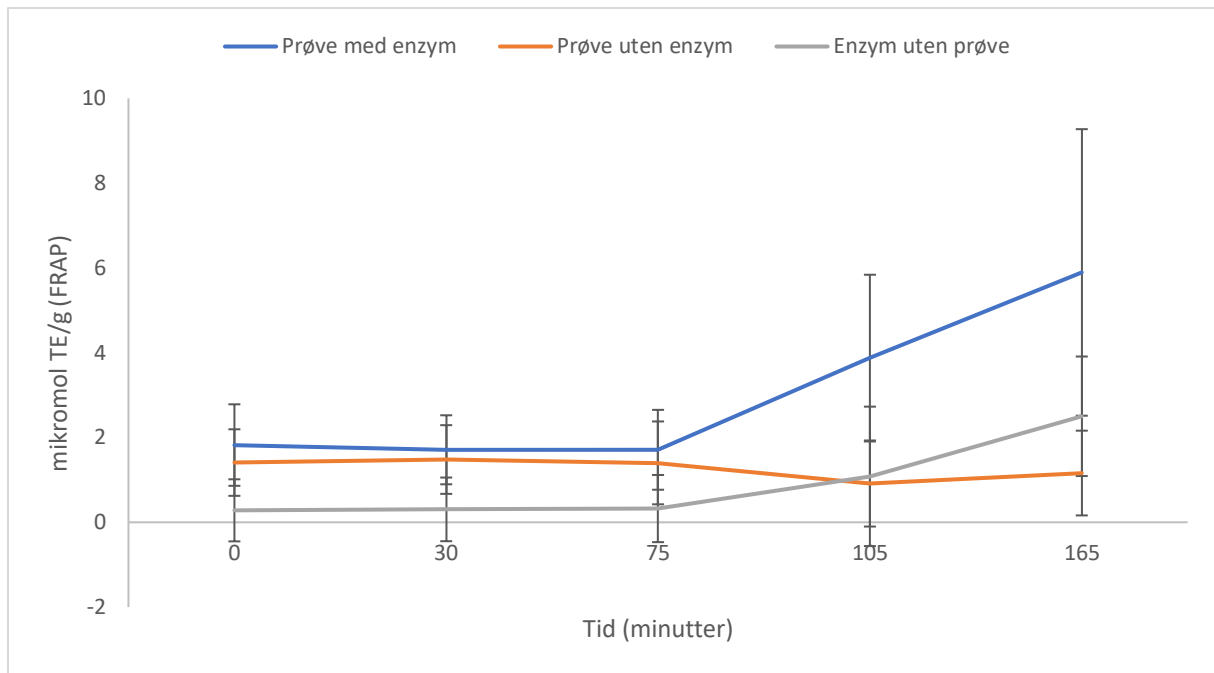
Det ble funnet signifikante forskjeller ($p<0,05$) mellom rå og frysetørkede sjøpølser i våttvekt målt med metodene FRAP og ORAC. Tørking ved hjelp av høye temperaturer og/eller langvarige prosesser kan føre til en reduksjon i antioksidantkapasitet, men det er tidligere vist at frysetørking er blant de meste skånsomme tørkemethodene som kan benyttes (Kamiloglu et al., 2016; Pérez-Jiménez et al., 2008). Nedgangen i antioksidativ aktivitet, som følge av tørking, kan være relatert til nedbrytningen av biologisk aktive forbindelser ved høye temperaturer, på grunn av kjemisk, enzymatisk eller termisk nedbrytning (Kamiloglu et al., 2016). Ettersom

materialet er dypfryst ved frysetørking vil ikke materialet skades på samme måte som ved andre tørkeprosesser. Til tross for at frysetørkingsprosessen vil bevare det meste av den opprinnelige prøvens antioksidative kapasitet, vil det være det naturlig med litt lavere verdier enn for ferskt produkt. Det er tidligere (Böhm et al., 2006) blitt sammenlignet antioksidativ kapasitet i jordbær utsatt for ulike tørkemetoder. Her ble konvektiv tørking, mikrobølgevakuumtørking og frysetørking benyttet, og resultatene viste at frysetørking var den eneste behandlingen hvor det ikke fantes betydelige tap av antioksidativ effekt sammenlignet med den opprinnelige prøven (Böhm et al., 2006). En annen studie sammenlignet den antioksidative kapasiteten i yuzu etter å ha gjennomgått ulike tørkemetoder, og også denne studien viste at det var frysetørkingsprosessen som best bevarte den antioksidative kapasiteten (Assefa & Keum, 2017). Grunnen til den gode bevaringen kan skyldes at under frysetørking brukes det lave temperaturer som kan bidra til å holde på varmfølsomme antioksidanter (Kamiloglu et al., 2016). Til tross for at frysetørking gir god kvalitet på tørkede produkter, har denne tørkemethoden høye kostnader, lang tørketid og er ikke alltid like relevant i industrien (Duan et al., 2010).

4.2.2 Utvikling av antioksidativ kapasitet gjennom fordøyelsen

Den antioksidative kapasiteten for rød sjøpølse som har gjennomgått en simulert fordøyelse ble målt ved å bruke FRAP, ABTS og ORAC. For de fordøyde prøvene ble den antioksidative kapasiteten målt ved fem uttak gjennom fordøyelsen. Illustrasjoner av hvordan antioksidativ kapasitet utviklet seg gjennom fordøyelsen, målt med de tre ulike metodene, er presentert i $\mu\text{mol/g}$ i figur 16, 17 og 18.

En oversikt over hvordan den antioksidative kapasiteten utviklet seg gjennom fordøyelsen målt ved bruk av FRAP-assay er presentert i figur 16.



Figur 16: Antioksidativ kapasitet målt med ferric reducing antioxidative power (FRAP) ved start og etter 30, 75, 105 og 165 minutter ut i fordøyelsen, presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik for sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym (den blå linja), en sjøpølse fordøyd uten tilsatt enzym (den oransje linja) og en vannprøve med enzym som ble kjørt som kontroll (den grå linja).

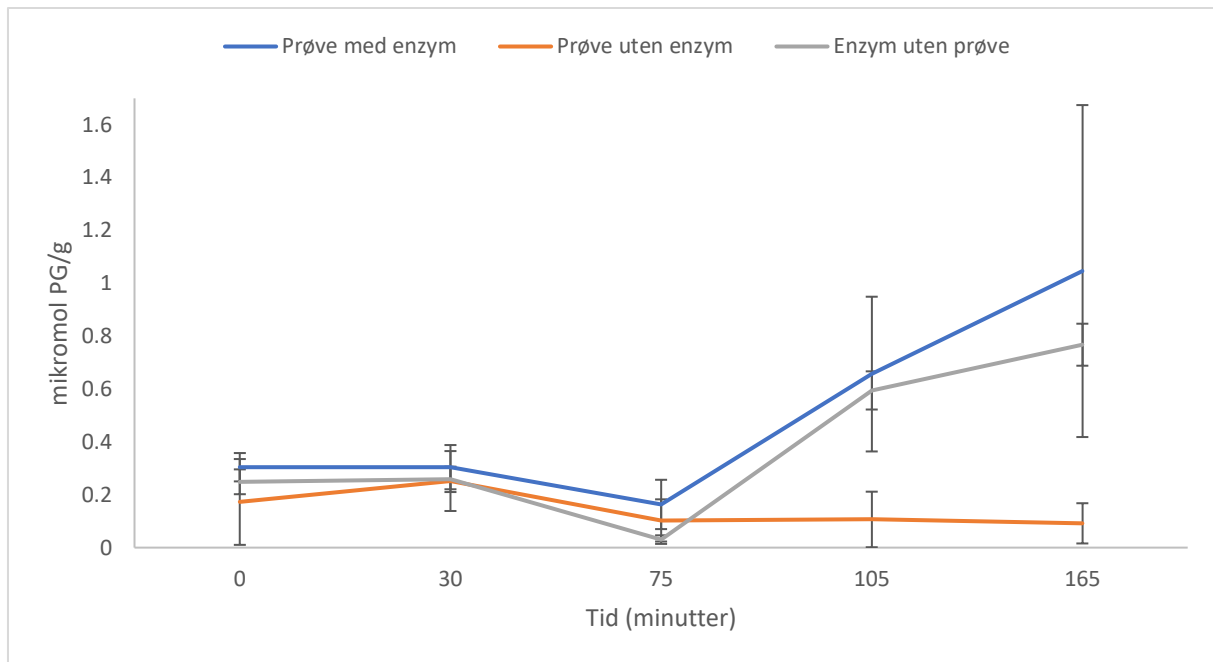
Som resultatene i figuren viser hadde sjøpølse fordøyd med enzym en uendret utvikling i antioksidativ kapasitet fra start av fordøyelsen og frem til 75 minutter, før en kraftig økning ble observert som var signifikant ($p<0,05$) etter 165 minutter (tabell 6). Sjøpølse fordøyd uten enzym hadde en relativ stabil antioksidativ kapasitet gjennom hele fordøyelsen, kun med en liten nedgang mellom 75 og 105 minutter. Som kontrollprøve ble det opparbeidet en løsning bestående av vann og enzym, men uten tilsatt sjøpølse. Resultatene for kontrollprøven viste samme mønster som prøven med enzym, med litt svakere økning etter 75 minutter, dog signifikant ($p<0,05$) etter 105 og 165 minutter (tabell 6). Dette kan tyde på at det er enzymene i seg selv som forklarer noe av økningen i den antioksidative kapasiteten. Felles for de tre prøvene var at uttakene etter 105 og 165 minutter hadde de største standardavvikene.

Tabell 6: Antioksidativ kapasitet målt med ferric reducing antioxidative power (FRAP), for sjøpølse fordøyd med enzym (n=10), sjøpølse fordøyd uten enzym (n=10) og kontrollprøve (vann) med tilsatt enzym (n=4), ved start av fordøyelsen og etter 30, 75, 105 og 165 minutter. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik. Verdier med forskjellig bokstav i samme kolonne betyr at det er finnes signifikante forskjeller mellom verdiene (p<0,05).

TID (minutter)	Prøve med enzym (mikromol TE/g)	Prøve uten enzym (mikromol TE/g)	Enzym uten prøve (mikromol TE/g)
0	1,82 ± 0,96 ^a	1,41 ± 0,78 ^a	0,88 ± 0,73 ^a
30	1,71 ± 0,81 ^a	1,48 ± 0,81 ^a	0,95 ± 0,75 ^a
75	1,81 ± 0,94 ^a	1,71 ± 0,98 ^a	0,97 ± 0,79 ^a
105	3,87 ± 1,97 ^a	1,39 ± 1,02 ^a	2,43 ± 1,64 ^b
165	7,23 ± 3,38 ^b	1,48 ± 1,00 ^a	3,67 ± 1,41 ^c

Ved å bruke FRAP, ble det ikke funnet signifikante forskjeller (p<0,05) mellom sjøpølse fordøyd med enzym, sjøpølse fordøyd uten enzym og kontrollprøven ved uttakene etter 0 og 30 minutter. For uttaket etter 75 minutter var sjøpølse fordøyd med enzym signifikant ulik kontrollprøven, men sjøpølse fordøyd uten enzym var ikke signifikant forskjellig fra de to andre prøvene. For uttaket etter 105 og 165 minutter var sjøpølse uten tilsatt enzym signifikant ulik de to andre prøvene med tilsatt enzym. Det ble tilsatt enzym rett før uttaket ved 105 minutter, og det er derfor en naturlig årsak til at prøven uten enzym skiller seg fra de to andre med tilsatt enzym.

En oversikt over hvordan den antioksidative kapasiteten utvikler seg gjennom fordøyelsen målt ved bruk av ABTS-analyse er presentert i figur 17.



Figur 17: Antioksidativ kapasitet målt med 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay (ABTS) ved start og etter 30, 75, 105 og 165 minutter ut i fordøyelsen, presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik for sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym (den blå linja), sjøpølse fordøyd uten tilsatt enzym (den oransje linja) og en vannprøve med tilsatt enzym som ble kjørt som kontroll (den grå linja).

For sjøpølse fordøyd uten tilsatt enzym viser resultatene en relativ lik utvikling i antioksidativ kapasitet gjennom hele fordøyelsen med en svak nedgang etter 75 minutter. Det ble funnet signifikante forskjeller ($p<0,05$) mellom uttaket etter 30 minutter og de andre uttakene, utenom det første uttaket som ble tatt ut ved starten av fordøyelsen (tabell 7).

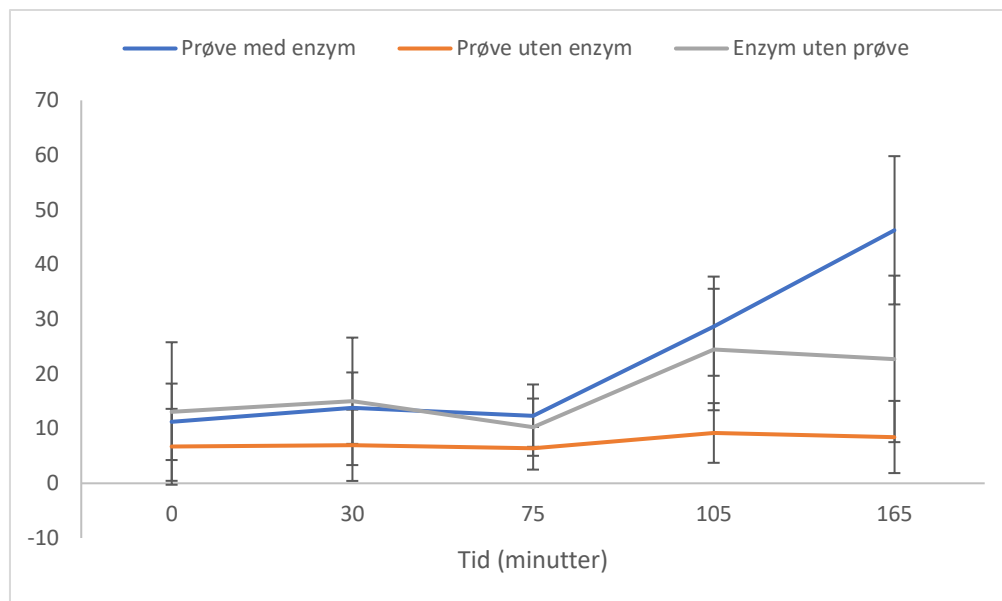
Begge prøvene med tilsatt enzymer, både med og uten sjøpølse, viste en tilnærmet lik utvikling i antioksidativ kapasitet, med nedgang fra 30 til 75 minutter, og en kraftig stigning fra 75 minutter til slutten av fordøyelsen. For begge løsningene med tilsatt enzym ble det funnet signifikante forskjeller ($p<0,05$) for uttakene gjennom fordøyelsen (tabell 7). Det siste uttaket etter fullført fordøyelse var signifikant ulikt de resterende uttakene for sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym. I tillegg var uttaket etter 75 minutter signifikant ulikt uttaket etter 105 minutter. For kontrollprøven som inneholdt enzym uten tilsatt sjøpølse, var ABTS-verdiene for alle uttakene signifikant ulike, utenom uttaket ved starten av fordøyelsen og uttaket etter 30 minutter.

Tabell 7: Antioksidativ kapasitet målt med 2,2'-Azino-bis(3-etylbenzothiazoline-6-sulfonsyre)-assay (ABTS), for sjøpølse fordøyd med enzym (n=10), sjøpølse fordøyd uten enzym (n=10) og kontrollprøve (vann) med tilsatt enzym (n=4), ved start av fordøyelsen og etter 30, 75, 105 og 165 minutter. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik. Verdier med forskjellig bokstav i samme kolonne betyr at det er finnes signifikante forskjeller mellom verdiene ($p < 0,05$).

TID (minutter)	Prøve med enzym (mikromol PG/g)	Prøve uten enzym (mikromol PG/g)	Enzym uten prøve (mikromol PG/g)
0	0,30 ± 0,05 ^{ab}	0,17 ± 0,16 ^{ab}	0,25 ± 0,04 ^b
30	0,30 ± 0,08 ^{ab}	0,25 ± 0,11 ^b	0,26 ± 0,05 ^b
75	0,16 ± 0,09 ^a	0,11 ± 0,08 ^a	0,03 ± 0,02 ^a
105	0,66 ± 0,29 ^b	0,11 ± 0,10 ^a	0,59 ± 0,07 ^c
165	1,05 ± 0,63 ^c	0,09 ± 0,07 ^a	0,77 ± 0,08 ^d

Sjøpølse fordøyd uten enzym viste signifikante forskjeller ($p < 0,05$) til sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym og kontrollprøven med tilsatt enzym for uttakene etter 105 og 165 minutter ved å benytte ABTS-assay. For det tredje uttaket etter 75 minutter var sjøpølse fordøyd med enzym signifikant ulikt kontrollprøven, men sjøpølse fordøyd uten enzym var ikke signifikant forskjellig fra de to andre prøvene, likt som for FRAP.

Figur 18 presenterer en oversikt over hvordan den antioksidative kapasiteten utviklet seg gjennom fordøyelsen målt med ORAC.



Figur 18: Antioksidativ kapasitet målt med oxygen radical absorbance capacity (ORAC) ved start og etter 30, 75, 105 og 165 minutter ut i fordøyelsen, presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik for sjøpølse fordøyd med tilsatt enzym (den blå linja), sjøpølse fordøyd uten tilsatt enzym (den oransje linja) og en vannprøve med tilsatt enzym som ble kjørt som kontroll (den grå linja).

Resultatene fra ORAC viste det samme mønsteret som for de to andre metodene. Til tross for høyere antioksidantverdier, viste også denne metoden en jevn og stabilt lik utvikling i antioksidativ kapasitet, uten signifikante forskjeller ($p<0,05$), gjennom hele fordøyelsen for sjøpølse fordøyd uten enzym (tabell 8). For begge løsningene med tilsatt enzym var utviklingen i antioksidativ kapasitet relativ lik frem til 75 minutter ut i fordøyelsen, hvor verdiene etter dette tidspunktet begynte å stige. For sjøpølse fordøyd med enzym var uttakene etter 105 og 165 minutter, signifikant ulike de tre andre uttakene (tabell 8). Forskjellen med denne metoden fra de andre metodene var at etter 105 minutter fortsatte prøven med sjøpølse tilsatt enzym å stige helt til fullført fordøyelse, mens kontrollprøven med tilsatt enzym ble synkende etter 105 minutter og frem til fullført fordøyelse. For kontrollprøven med tilsatt enzym var uttaket etter 75 minutter signifikant ulikt uttakene etter 105 og 165 minutter (tabell 8). Det er verdt å merke seg at ved å bruke denne metoden ble standardavvikene høyere enn ved de to andre metodene.

Det var stor variasjon i antioksidativ kapasitet mellom prøvene målt med ORAC, og også innad for hver prøve varierte replikatene. Det må påpekes at det dermed var veldig store standardavvik. Dette kan skyldes høye fortyninger, i tillegg til at ORAC er en meget sensitiv og ustabil metode. En feilkilde kan også være upresis analyse ettersom metoden innebærer manuell håndtering, noe som kan bidra til avvik. En annen feilkilde som gjelder for alle tre

metodene, er om prøvene ikke ble tilstrekkelig homogenisert i forkant av analysene, at det på den måten kan ha kommet med varierende mengde prøve i de forskjellige løsningene.

Tabell 8: Antioksidativ kapasitet for sjøpølse fordøyd med enzym, sjøpølse fordøyd uten enzym og kontrollprøven (vann) med tilsatt enzym målt med ORAC gjennom ved start av fordøyelsen og etter 30, 75, 105 og 165 minutter. Verdier med forskjellig bokstav i samme kolonne betyr at det er finnes signifikante forskjeller mellom verdiene ($p < 0,05$).

TID (minutter)	Prøve med enzym (mikromol TE/g)	Prøve uten enzym (mikromol TE/g)	Enzym uten prøve (mikromol TE/g)
0	11,25 ± 6,99 ^a	6,67 ± 6,93 ^a	12,89 ± 11,02 ^{ab}
30	12,38 ± 6,53 ^a	6,95 ± 6,51 ^a	12,49 ± 10,42 ^{ab}
75	13,73 ± 5,70 ^a	6,40 ± 3,90 ^a	9,66 ± 4,53 ^a
105	28,72 ± 9,06 ^b	9,20 ± 5,45 ^a	22,59 ± 9,63 ^b
165	42,38 ± 13,55 ^b	8,46 ± 6,60 ^a	20,49 ± 13,18 ^b

Slik som for FRAP og ABTS var resultatene for sjøpølse fordøyd uten enzym signifikant forskjellig ($p < 0,05$) fra de to prøvene med tilsatt enzym ved uttakene etter 105 og 165 minutter ved å benytte ORAC. Det ble dermed ikke funnet noe signifikante forskjeller mellom prøvene med tilsatt enzym og prøven uten tilsatt enzym ved de tre første uttakene i fordøyelsen.

I denne oppgaven viser resultatene fra alle de tre metodene det samme mønsteret med en økende antioksidativ kapasitet utover i fordøyelsen. Tidligere studier (Elias et al., 2008; Jensen et al., 2009; Suwaluk et al., 2021) har vist at det var forventet med en økende antioksidativ kapasitet gjennom fordøyelsen. Dette fordi proteinenes totale antioksidantaktivitet kan økes ved forstyrrelse av den tertiære strukturen i proteinene ved at proteinene brytes ned og frigjør aminosyrekjeder, for å øke tilgjengeligheten av løsemidler til aminosyrerester som igjen kan fange frie radikaler (Suwaluk et al., 2021). Dette skyldes at fordøyelsesenzymmer hydrolyserer proteinene og produserer ulike peptid- og aminosyresekvenser som igjen kan vise biologisk aktivitet. Blant de forskjellige bioaktive komponentene kan det finnes biologisk aktive peptider, som ikke er aktive når de er innelukket i proteiner, men de utøver sin bioaktivitet gjennom proteinnedbrytning (Ucak et al., 2021). Dette kan forklare hvorfor den antioksidative kapasiteten økte utover i fordøyelsen ettersom fordøyelsen bryter ned proteiner til peptider og aminosyrer.

Det er tidligere rapportert (Jensen et al., 2009) om et høyere resultat av antioksidativ kapasitet i sjømat ved måling med ORAC sammenlignet med FRAP. I denne oppgaven ble det funnet signifikante forskjeller i målingene med ORAC sammenlignet med målingene med både FRAP og ABTS, for både fordøyde, rå og frysetørkede sjøpølser ($p < 0,05$). De varierende resultatene ved bruk av de tre metodene var forventet ettersom metodene måler forskjellige mekanismer, og ofte utføres under forskjellige forhold, som ved ulike pH og temperatur. Siden antioksidativ kapasitet inkluderer en rekke prosesser i kroppen, er det anbefalt å bruke flere antioksidative metoder med ulike prinsipper for å undersøke den totale antioksidative kapasiteten (Pérez-Jiménez et al., 2008). Bruk av flere metoder vil gi et bedre inntrykk av den antioksidative kapasiteten i *P.tremulus* enn ved å bare bruke en metode. FRAP måler evnen til å redusere jernkompleks ved elektronoverføring, mens ORAC og ABTS overfører hydrogenatomer. Resultatene indikerer at *P.tremulus* har en bedre kapasitet til å donere et hydrogenatom enn til å redusere et jernkompleks ettersom ORAC-verdiene var mye høyere enn FRAP-verdiene. ORAC var metoden med de største variasjonene og standardavvikene. Resultatene var derfor ikke like pålitelige som ved de to andre metodene. Det er bevist at proteiner gir høy respons på ORAC, noe som kan skyldes proteinene og peptidenes evne til å donere hydrogenatomer til frie radikaler (Sannaveerappa et al., 2007). Det var derfor forventet høye ORAC-verdier i denne oppgaven, ettersom *P.tremulus* er en god proteinkilde. FRAP er derimot ikke like godt egnet til å måle antioksidativ kapasitet i proteinrike prøver (Jensen et al., 2009), fordi metoden ikke oppdager tioler ettersom reduksjonspotensialet er lavere enn for Fe^{3+}/Fe^{2+} (Halvorsen et al., 2002). Dette kan skyldes de lave resultatene målt med FRAP.

Resultatene for alle metodene indikerte en jevn og stabil utvikling uten merkbar økning i antioksidativ kapasitet frem til 75 minutter ut i fordøyelsen for alle prøvene, både med og uten enzym. Fra 0 til 75 minutter simulerte fordøyelsesmodellen at løsningene befant seg i magesekken. Det er i magesekken fordøyelsesenzymet pepsin blir produsert. Dette enzymet spalter og bryter ned proteiner til kortere peptidkjeder og frie aminosyrer (Hernandez-Ledesma et al., 2007). I den simulerte fordøyelsesmodellen ble pepsin tilsatt ved start, og spaltningen startet umiddelbart. Etter 75 minutter, hvor galle/pankreatin-enzymløsningen ble tilsatt, steg verdiene for samtlige prøver hvor det ble tilsatt enzym. På dette tidspunktet i fordøyelsen simulerte modellen at løsningene forlot magesekken og bevegde seg videre til tynntarmen. Her ble frie aminosyrer og peptider absorbert, og det var dette som skyldtes økningen i antioksidativ kapasitet for samtlige prøver tilsatt enzym. Fordøyelsesstudier in vitro (Sánchez & Vázquez, 2017) har bevist at en blanding av peptider (2–4 aminosyrer) fra visse matproteiner ved bruk

av menneskelige fordøyelsesenzymer under fysiologiske forhold har en kraftig antioksidantaktivitet. For prøvene som ikke er tilsatt enzym vil ikke spaltningen og absorberingen til peptider og frie aminosyrer oppstå, og dermed vil det heller ikke skje en økning i den antioksidative kapasiteten. Prøven uten tilsatt enzym var forventet å være relativt lik den opprinnelige ufordøyde prøven og var forventet å være relativt stabil gjennom hele fordøyelsen. Dette samsvarer bra med resultatene i denne oppgaven.

4.2.3 Sammenheng mellom aminosyrer og antioksidativ kapasitet

Resultatene for innholdet av TAA i rå sjøpølse viste at det var gjentakende for flere av aminosyrene at en av sjøpølsene benyttet i denne oppgaven generelt hadde litt lavere verdier enn de andre sjøpølsene benyttet i analysene. Det var også en av de ti benyttede sjøpølsene som hadde et gjentakende høyere innhold TAA enn de resterende sjøpølsene. Det samme mønsteret gikk igjen for FAA i rå sjøpølse, hvor de samme sjøpølsene også her viste generelt høyere og lavere verdier enn for de resterende sjøpølsene.

I resultatene for rå sjøpølse målt med ABTS kom det frem at den samme sjøpølsa som hadde det høyeste innholdet TAA og FAA, også hadde en betydelig høyere antioksidativ kapasitet enn de resterende sjøpølsene. Der de resterende sjøpølsene målte en antioksidativ kapasitet med variasjoner mellom 0,08 – 0,18 $\mu\text{g PG/g}$ våtvekt, målte denne hele 0,98 $\mu\text{g PG/g}$ våtvekt. Samtidig var det den samme sjøpølsa med generelt lavere innhold av TAA og FAA, som målte 0,08 $\mu\text{g TE/g}$ våtvekt, og dermed hadde den laveste antioksidative kapasiteten. I dette tilfellet kunne det vært interessant å studere PG/g protein, men det ble ikke utført i denne oppgaven ettersom her blir det sett på vekten som faktisk konsumeres.

Det samme gjaldt resultatene fra ORAC, hvor også den samme sjøpølsa med høyt innhold TAA og FAA målte en antioksidativ kapasitet på 432,51 $\mu\text{g TE/g}$ våtvekt, mens verdiene for de resterende sjøpølsene varierte mellom 105,66 – 292,93 $\mu\text{g TE/g}$ våtvekt. Resultatene bestemt med ORAC viste også at den sjøpølsa med generelt lavere innhold av TAA og FAA var den sjøpølsa som målte 105,66 $\mu\text{g TE/g}$ våtvekt og var dermed den sjøpølsa med lavest antioksidativ kapasitet målt med denne metoden. Dette tyder dermed på at det kan være en sammenheng mellom innholdet av aminosyrer og antioksidativ kapasitet. Det er vist (Wang et al., 2013) at et høyt innhold av aminosyren glysin kan være en medvirkende årsak til høy antioksidativ kapasitet, noe som ser ut til å samsvare med resultatene fra denne oppgaven.

Resultatene fra FRAP viste derimot det motsatte. I resultatene fra FRAP var sjøpølsa med høyest innhold TAA og FAA blant sjøpølsene med de laveste verdiene for antioksidativ kapasitet, og sjøpølsa med lavest innhold TAA og FAA var blant sjøpølsene med høyest antioksidativ kapasitet. FRAP måler evnen til å redusere et jernkompleks ved elektrondonering, mens ORAC og ABTS er hydrogenatom-overførende assay. Resultatene indikerer at jo høyere innhold av TAA, jo bedre kapasitet har sjøpølsene til å donere hydrogenatomer enn til å redusere et jernkompleks ved elektrondonering. Den biologiske aktiviteten i et protein bestemmes av det nøyaktige aminosyreinnholdet og sekvensen av aminosyrer i det spesifikke proteinet (Aristoy & Toldrá, 2012). Det er dermed forventet at forskjellige peptider har ulik biologisk aktivitet avhengig av aminosyreinnholdet i proteinet.

Det høye innholdet av aminosyrer kan også være med å forklare den økende antioksidative effekten i *P.tremulus* gjennom fordøyelsen. Flere aminosyrer er antatt å ha antioksidativ effekt på grunn av tilstedeværelsen av reaktive grupper, og da spesielt aminosyrene histidin, metionin, valin, alanin, leucin, tryptofan og tyrosin (Jensen et al., 2009; Ucak et al., 2021; Zhang et al., 2020). Tyrosin fungerer som en sterk elektronbidragsyter på grunn av de fenoliske sidekjedene, og fungerer som en betydelig fri radikal fjerner og stopper den kontinuerlige reaksjonen av radikaler (Ucak et al., 2021).

Resultatene i denne oppgaven viste at *P.tremulus* inneholdt alle de nevnte aminosyrene, med unntak av tryptofan som ikke kunne detekteres med metoden benyttet i denne oppgaven. Alle de nevnte aminosyrene hadde en større mengde frigjøring i de fordøyde sjøpølsene sammenlignet med de ufordøyde. Dette kan være med på å forklare hvorfor den antioksidative kapasiteten økte utover i fordøyelsen.

Ettersom det kom frem i resultatene at *P.tremulus* inneholdt aminosyrer med smak, glutamin/glutaminsyre og glysin, kan det antas at *P.tremulus* har en proteinaktig og søt smak, lignende den velkjente umamismaken. Umamismaken har tradisjonelt sett vært et kjennetegn på proteiner og god ernæring, og har inngått i menneskers kosthold siden evolusjonen (Schmidt & Mouritsen, 2020). Denne smaken og søtsmaken vil mangle i ubehandlet plantebasert mat (Mouritsen & Styrbæk, 2020). En av utfordringene med å integrere et mer plantebasert kosthold hos befolkningen, kan være nettopp mangelen på disse smakene.

Det er urealistisk å tenke at sjøpølsa i seg selv skal mette den voksende befolkningen. En mulighet kan være å fremstille et slags krydder eller en smakstilsetter laget av tørket sjøpølse. Dette krydderet vil ha en kjøtt- og proteinaktig smak, lik den ettertraktede umami-smaken i kjøttprodukter.

Det vil ikke kun være smaken som blir fordelaktig i krydderet. Det har blitt rapportert om at umami-dipeptider og relaterte peptider kan ha en aktiverende effekt i den menneskelige hjernen (Okuno et al., 2020). Fra resultatene i denne oppgaven kom det frem at i tillegg til å gi en ettertraktet smak så inneholdt sjøpølsa alle EAA, samt hadde antioksidativ effekt. Ettersom sjøpølsa vil bli benyttet tørket i krydderet er det relevant å se på bevaringen av næringsstoffer etter tørking. Det blir bevist i denne oppgaven at frysetørkingsprosessen ikke påvirker næringsinnholdet negativt, og at næringsinnholdet i sjøpølse blir bevart i stor grad ved frysetørking. I denne oppgaven kom det frem at det var en bevaring av aminosyrer på ca. 70 %. Dette betyr at krydderet vil være et bidrag til å få i seg det anbefalte inntaket av EAA.

Krydderet vil dermed ikke kun være en smaksforsterker, men også et bidrag til å unngå næringsstoffmangel ved et ellers plantebasert kosthold. Det var kun den antioksidative kapasiteten som ble noe negativt påvirket av frysetørkingen, ved at alle de tre benyttede metodene i denne oppgaven viste en høyere antioksidativ kapasitet i rå enn i frysetørket sjøpølse. Forskjellene var små, og det ble funnet høye standardavvik ved å bruke enkelte av metodene. Det kan dermed være verdt å undersøke bevaringen av den antioksidative kapasiteten nærmere før man kan konkludere med at krydderet vil ha en antioksidativ effekt.

Ved å drysse krydderet over et ellers plantebasert kosthold vil det «umamifisere» og gi tilnærmet samme smaksopplevelse som ved å konsumere kjøtt. Dette kan gjøre at sjøpølse vil være et bidrag til at befolkningen enklere er villige til å kutte ned på kjøttinntaket, bidra til en enklere overgang til et plantebasert kosthold i tråd med EAT-lancet kommisjonens kostholdsanbefalinger (2020) samt bidra til å nå FNs bærekraftsmål knyttet til bærekraftig matproduksjon.

4.2.4 Antihypertensiv effekt

Den antihypertensive effekten ble bestemt ved å bruke ACE-assay, og resultatene for frysetørket, ufordøyd og fordøyd sjøpølse er presentert i tabell 9.

Fra resultatene fremkom det forskjeller i den ACE-hemmende effekten på ufordøyd og fordøyd sjøpølse. Ufordøyd sjøpølse ble målt til å ha en mer hemmende effekt ettersom det kun var behov for 16 µg prøve for å hemme enzymaktiviteten 50 %, mens for fordøyd sjøpølse ble det vist at det var behov for 48 µg prøve. Disse resultatene var betydelig høyere sammenlignet med tidligere studier (Suwaluk et al., 2021), og det er kjent at det er små peptider som har størst hemmende effekt. I den samme studien ble det vist at enzymhemmingsaktiviteten økte gjennom fordøyelsen. Andre tidligere studier (Escudero et al., 2014) har også vist at ACE-hemmende aktivitet ble holdt relativt konstant gjennom fordøyelsen. Resultatene i denne oppgaven samsvarte derfor ikke med tidligere studier og viste motsatt mønster.

Tabell 9: Oversikt over mengde (µg) av ufordøyd frysetørket, ufordøyd rå og fordøyd sjøpølse som trengs for å hemme 50 % av enzymaktiviteten til 1mU angiotensinkonverterende enzym (ACE). For frysetørket sjøpølse er konsentrasjonene 0, 2,5, 10, 20, 30 og 50 regnet med, men for ufordøyd og fordøyd er de to høyeste konsentrasjonen fjernet.

	IC ₅₀
Ufordøyd frysetørket sjøpølse (n=5)	23,1 ± 8,5
Ufordøyd rå sjøpølse (n=3)	16,2 ± 4,1
Fordøyd sjøpølse (n=3)	48,6 ± 8,9

Ifølge litteraturen (Suwaluk et al., 2021) inneholder ACE-hemmende peptider ofte en aromatisk ring eller en hydrofob aminosyrekjede på karboksylenden. Aminosyrene fenylalanin, tyrosin, leucin, metionin, prolin og tryptofan viser dermed høy potent av denne biologiske aktiviteten fordi de kan reagere på det aktive stedet for ACE. Den bioaktive peptidaktiviteten som for tiden er mest studert i matproteiner ser ut til å være den som hemmer ACE (Murray & FitzGerald, 2007). Disse ACE-hemmende peptidene kan frigjøres enzymatisk fra intakte proteiner in vitro og in vivo under henholdsvis matforedling og fordøyelsen. Resultatene fra denne oppgaven var ikke forutsett ettersom det var forventet at den hemmende effekten skulle øke utover i fordøyelsen.

Resultatene for ACE-hemmende effekt viste store variasjoner mellom replikatene. Videre ble det observert at prøvene hadde en økende hemmende effekt opp til konsentrasjon 20, før effekten ble redusert. Det ble derfor valgt å regne ut IC₅₀ basert på en konsentrasjonsrekke fra

2,5 – 20 µg. Det er hensiktsmessig å påpeke at resultatene bør gjentas før det trekkes konklusjoner, ettersom resultatene i denne oppgaven var svært usikre grunnet store variasjoner og høye standardavvik.

For frysetørket sjøpølse ble de høyeste konsentrasjonene regnet med i resultatet, ettersom det viste en jevn økt hemmende effekt gjennom alle konsentrasjonene og mulig å sette opp et brukbart resultat. Her ble det vist at det var behov for 23 µg frysetørket sjøpølse for å hemme aktiviteten til ACE-enzymet med 50 %. Det kom frem at den antihypertensive kapasiteten tapes noe etter frysetørkingen, og at frysetørket sjøpølse hadde mindre hemmende effekt enn ufordøyd/rå sjøpølse. Resultatene for frysetørket sjøpølse ga svært høye verdier, og også her var det store variasjoner både mellom hver sjøpølse og også innad for hver prøve varierte replikatene kraftig. De store variasjonene og ujevne resultatene kan skyldes at metoden ikke er ferdig etablert, og fortsatt er under utvikling.

5 Konklusjon

Rød sjøpølse *P.tremulus* så ut til å ha en fordelaktig biokjemisk sammensetning for humant konsum, og kunne regnes som en fullverdig og god proteinkilde med innhold av alle EAA som kunne detekteres. *P.tremulus* inneholdt en interessant kombinasjon av verdifulle aminosyrer, som bidrar med både mye smak og positive helseeffekter. Likevel var proteininnholdet i *P.tremulus* på kun ca. 4 %, noe som vil si at man må spise mye rød sjøpølse for å få dekket det anbefalte inntaket for protein og EAA. Næringsinnholdet ble ikke påvirket av frysetørkingen, og det var kun fettinnholdet som viste signifikante forskjeller mellom rå og frysetørkede sjøpølser. Det ble vist at ca. 70 % av aminosyreinnholdet ble bevart etter frysetørking.

Resultater fra alle de tre benyttede metodene viste antioksidativ kapasitet både for rå og frysetørkede *P.tremulus*, med noe lavere verdier i de frysetørkede sammenlignet med de rå omregnet til våtvekt. Den antioksidative kapasiteten i de frysetørkede sjøpølsene (tørrvekt) var betydelig høyere enn i de rå. I tillegg ble det vist en økende antioksidativ kapasitet og økende frigjøring av aminosyrer utover i fordøyelsen. For antihypertensiv kapasitet ble det vanskelig å konkludere. Den hemmende effekten økte gjennom fordøyelsen, noe som ikke var forventet. Store variasjoner og høye standardavvik gikk igjen for samtlige prøver og analysen bør dermed gjentas før det trekkes konklusjoner.

Basert på resultatene har rød sjøpølse *P.tremulus* potensiale for bruk til humant konsum og på den måten bidra til bedre utnyttelse av marine ressurser dypere i næringskjeden. Dette må bekreftes og deretter inn i dyrestudier før det kan benyttes til humant konsum. Dersom sjøpølsa skal kunne utnyttes og bidra til å mette en økende befolkning må den oppdrettes for å unngå overfiske, ettersom arten er utrydningstruet.

Veien videre kan være å utføre sensoriske tester på tørket sjøpølse, ved å finne ut hvor mye smak sjøpølsa faktisk har og hvor mye av smaken som tapes/bevares ved tørking. Når dette er gjort må sjøpølsa gjøres mer synlig og attraktiv for konsumentene.

6 Referanser

- Althunibat, O. Y., Hashim, R. B., Taher, M., Daud, J. M., Ikeda, M.-A., & Zali, B. (2009). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *Eur J Sci Res*, 37(3), 376-387.
- AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC (18th). Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemist
- Ariansen, I. K. H., Sulo, G., Kvåle, R., Olsen, K., & Selmer, R. M. (2021). *Hjerte- og karsykdommer i Norge*.
- Aristoy, M.-C., & Toldrá, F. (2012). Essential amino acids. *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*, 3-19.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2009). Essential amino acids. In *Handbook of seafood and seafood products analysis* (pp. 305-326). CRC Press.
- Assefa, A. D., & Keum, Y. S. (2017). Effect of extraction solvent and various drying methods on polyphenol content and antioxidant activities of yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 576-585.
- Astrup, A., Dyerberg, J., & Stender, S. (2006). *Menneskets ernæring* (2. utgave ed.). Munksgaard, 131-133.
- Ball, R. O., Urschel, K. L., & Pencharz, P. B. (2007). Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *The Journal of Nutrition*, 137(6), 1626S-1641S.
- Barstein, G. (2021). EARTH OVERSHOOT DAY 2021: NÅ HAR VI BRUKT OPP JORDAS RESSURSER FOR I ÅR. WWF.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Blackburn, S. (1968). Amino acid determination. Methods and techniques. *Amino acid determination. Methods and techniques*.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Blomhoff, R. (2008). *Antioksidanter - Den sanne historien*. Kagge forlag.
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761-1805. <https://www.mdpi.com/1660-3397/9/10/1761>
- Bordenave, S., Fruitier, I., Ballandier, I., Sannier, F., Gildberg, A., Batista, I., & Piot, J.-M. (2002). HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ACE activity. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32(1), 65-77.
- Büchi Sveits. (2013). Application note nr. 114/2013: Nitrogen and protein determination in meat products.
- Böhm, V., Kühnert, S., Rohm, H., & Scholze, G. (2006). Improving the nutritional quality of microwave-vacuum dried strawberries: A preliminary study. *Food science and technology international*, 12(1), 67-75.
- Calder, P. C. (2019). Intravenous lipid emulsions to deliver bioactive omega-3 fatty acids for improved patient outcomes. *Marine Drugs*, 17(5), 274.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed research international*, 2014.
- Chong, N. V. W., Pindi, W., Chye, F.-Y., Shaarani, S. M., & Lee, J.-S. Effects of drying methods on the quality of dried sea cucumbers from Sabah—a review.
- Christophersen, G., Bakke, S., & Sunde, J. (2021). Norwegian red sea cucumber (*Parastichopus tremulus*) fishery and aquaculture north of 60 N latitude: Feasible or fictional? *BECHE-DE-MER*, 25.

- Christophersen, G., Bjørkevoll, I., Bakke, S., & Kjerstad, M. (2020). Reproductive cycle of the red sea cucumber, *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767), from western Norway. *Marine Biology Research*, 16(6-7), 423-430.
- Chrysargyris, A., Evangelides, E., & Tzortzakis, N. (2021). Seasonal Variation of Antioxidant Capacity, Phenols, Minerals and Essential Oil Components of Sage, Spearmint and Sideritis Plants Grown at Different Altitudes. *Agronomy*, 11(9), 1766.
- Cushman, D., & Cheung, H. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
- Daliri, E. B.-M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5), 32.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 48-54.
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1629-1642.
- Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, 13(7), 2421.
- Dostal, D. E., & Baker, K. M. (1999). The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation research*, 85(7), 643-650.
- Dragnes, B. T., Stormo, S. K., Larsen, R., Ernstsens, H. H., & Elvevoll, E. O. (2009). Utilisation of fish industry residuals: Screening the taurine concentration and angiotensin converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8), 714-717.
- Duan, X., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Wang, S. (2010). Microwave freeze drying of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Engineering*, 96(4), 491-497.
- EAT-Lancet-kommisjonen. (2020). Healthy Diets from Sustainable Food Systems - Food Planet Earth *Sammendrag av rapport fra EAT-Lancet kommisjonen. Lastet ned: 14.01.22.*
- EEA. (2021). Landbruket og klimaendringene. *European Environment Agency. Lastet ned: 21.03.22* <https://www.eea.europa.eu/no/miljosignaler/miljosignaler-2015/artikler/landbruket-og-klimaendringene>.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.
- Ernæringsrådet. (2017). Bærekraftig kosthold - Vurdering av de norske kostrådene i et bærekraftsperspektiv. *IS-2678, Nasjonalt råd for ernæring*.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P., Aristoy, M., Arihara, K., & Toldrá, F. (2012). Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *Journal of Proteomics*, 78, 499-507.
- Escudero, E., Mora, L., & Toldrá, F. (2014). Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 161, 305-311.
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H.-C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.

- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the Sustainable Development Goals. *The Food and Aquaculture Organization of United Nations, Rome*.
- FAO, Burlingame, B., Dernini, S., & Division, N. a. C. P. (2010). SUSTAINABLE DIETS AND BIODIVERSITY - DIRECTIONS AND SOLUTIONS FOR POLICY, RESEARCH AND ACTION. *Proceedings of the International Scientific Symposium BIODIVERSITY AND SUSTAINABLE DIETS UNITED AGAINST HUNGER, Rome*.
- FAO/WHO/UNU. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint
FAO/WHO/UNU expert consultation. *World Health Organization, Geneva, Sveits*.
- Folkehelseinstituttet. (2014). *Global handlingsplan for forebygging og kontroll av ikke-smittsomme sykdommer – Indikatorer for utviklingen i Norge*.
- Furevik, T. (2001). Annual and interannual variability of Atlantic Water temperatures in the Norwegian and Barents Seas: 1980–1996. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 48(2), 383-404.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Gómez-Limia, L., Franco, I., & Martínez-Suárez, S. (2021). Effects of processing step, filling medium and storage on amino acid profiles and protein quality in canned European eels. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103710.
- González-Wangüemert, M., Domínguez-Godino, J. A., & Cánovas, F. (2018). The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: from a new marine resource to its over-exploitation. *Ocean & Coastal Management*, 151, 165-177.
- Gudbrandsen, O. A., Wergedahl, H., Liaset, B., Espe, M., & Berge, R. K. (2005). Dietary proteins with high isoflavone content or low methionine–glycine and lysine–arginine ratios are hypocholesterolaemic and lower the plasma homocysteine level in male Zucker fa/fa rats. *British journal of nutrition*, 94(3), 321-330.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Hai-Lun, H., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., & Bai-Cheng, Z. (2006). Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 12(11), 726-733.
- Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., & Andersen, L. F. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471.
- Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., & Regenstein, J. M. (2015). Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 14(4), 446-465.
- Havforskningsinstituttet. (2020). *Tema: Nye marine ressurser til mat og fôr*.
<https://www.hi.no/hi/temasider/hav-og-kyst/nye-marine-ressurser-til-mat-og-for/sjoplse>
- Helsedirektoratet. (2012). *Anbefalinger om kosthold, ernæring og fysisk aktivitet*.
- Helsedirektoratet. (2021a). Kostråd om fisk og annen sjømat.
<https://www.helsenorge.no/kosthold-og-ernaring/kostrad/spis-fisk-oftere/> Lastet ned: 27.01.22.

- Helsedirektoratet. (2021b). Utviklingen i norsk kosthold. *Rapport: IS-3020. Oslo.* .
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International dairy journal*, 17(1), 42-49.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062-1071.
- Ichimura, T., Hu, J., Aita, D. Q., & Maruyama, S. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and insulin secretion stimulative activity of fermented fish sauce. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(5), 496-499.
- Innes, J. K., & Calder, P. C. (2020). Marine omega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1362.
- Jensen, I.-J., Abrahamsen, H., Maehre, H. K., & Elvevoll, E. O. (2009). Changes in antioxidative capacity of saithe (*Pollachius virens*) and shrimp (*Pandalus borealis*) during in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10928-10932.
- Jung, S., Rickert, D., Deak, N., Aldin, E., Recknor, J., Johnson, L., & Murphy, P. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1169-1173.
- Kamiloglu, S., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Beekwilder, J., Hall, R. D., & Capanoglu, E. (2016). A review on the effect of drying on antioxidant potential of fruits and vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(sup1), S110-S129.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323.
- Kjerstad, M. (2020). Utnyttelse av sjøpølse og andre marine ressurser. *Møreforskning Lastet ned: 14.01.22.*
- Kjerstad, M., Bjørkevoll, I., & Christophersen, G. (2020). Sesongmessig variasjon i kvalitet hos rødpølse. *Rapport nr. MA 20-02, Møreforskning.*
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
- Lin, L., Yang, K., Zheng, L., Zhao, M., Sun, W., Zhu, Q., & Liu, S. (2018). Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and d-galactose-induced aging mice. *Journal of Functional Foods*, 47, 11-18.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., & Toldra, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147.
- Malla, N., Nørgaard, J. V., Lærke, H. N., Heckmann, L.-H. L., & Roos, N. (2022). Some Insect Species Are Good-Quality Protein Sources for Children and Adults: Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) Determined in Growing Pigs. *The Journal of Nutrition*, 152(4), 1042-1051.
- Mierke-Klemeyer, S., Larsen, R., Oehlenschläger, J., Maehre, H., Elvevoll, E. O., Bandarra, N. M., Parreira, R., Andrade, A. M., Nunes, M. L., & Schram, E. (2008). Retention of health-related beneficial components during household preparation of selenium-enriched African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets. *European Food Research and Technology*, 227(3), 827-833.

- Mildenberger, J., Remm, M., & Atanassova, M. (2021). Self-assembly potential of bioactive peptides from Norwegian sea cucumber *Parastichopus tremulus* for development of functional hydrogels. *LWT*, *148*, 111678.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., & Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, *5*(6), 1113-1124.
- Morton, S., Pencheon, D., & Squires, N. (2017). Sustainable Development Goals (SDGs), and their implementation A national global framework for health, development and equity needs a systems approach at every level. *British medical bulletin*, 1-10.
- Mouritsen, O. G., & Styrbæk, K. (2020). Design and ‘umamification’ of vegetable dishes for sustainable eating. *International Journal of Food Design*, *5*(1-2), 9-42.
- Murray, B., & FitzGerald, R. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, *13*(8), 773-791.
- Nations, F. a. A. O. o. t. U. (2020). The State of world fisheries and aquaculture 2020. *Sustainability of action*
- Nelson, D. L., & Cox, M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th edition ed.). Macmillan Higher Education.
- Nenadis, N., Lazaridou, O., & Tsimidou, M. Z. (2007). Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(14), 5452-5460.
- Okuno, T., Morimoto, S., Nishikawa, H., Haraguchi, T., Kojima, H., Tsujino, H., Arisawa, M., Yamashita, T., Nishikawa, J., & Yoshida, M. (2020). Bitterness-Suppressing Effect of Umami Dipeptides and Their Constituent Amino Acids on Diphenhydramine: Evaluation by Gustatory Sensation and Taste Sensor Testing. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *68*(3), 234-243.
- Organization, W. H. (2021, Lastet ned: 26.04.22). *Noncommunicable diseases*
- Osnes, K. K., & Mohr, V. (1985). Peptide hydrolases of Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *82*(4), 599-606.
- Pangkey, H., Lantu, S., Manuand, L., & Mokolensang, J. (2012). Prospect of sea cucumber culture in Indonesia as potential food sources. *Journal of Coastal Development*, *15*(2), 114-124.
- Pedersen, J. I., Müller, H., Hjartåker, A., & Anderssen, S. (2012). *Grunnleggende ernæringslære* (Vol. 2. utgave). Gyldendal akademisk.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, *41*(3), 274-285.
- Purcell, S. W., Mercier, A., Conand, C., Hamel, J. F., Toral-Granda, M. V., Lovatelli, A., & Uthicke, S. (2013). Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and fisheries*, *14*(1), 34-59.
- Rajamohan, T., & Kurup, P. (1997). Lysine: arginine ratio of a protein influences cholesterol metabolism. Part 1--Studies on sesame protein having low lysine: arginine ratio. *Indian journal of experimental biology*, *35*(11), 1218-1223.
- 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 radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

- Ringvold, H., & Kjerstad, M. (2018). Norwegian red sea cucumber, *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) (Holothuridea, Echinodermata): chemical and nutritional analysis. *Sea Snack, Norway and Møreforskning*
- Roggatz, C. C., González-Wangüemert, M., Pereira, H., Rodrigues, M. J., da Silva, M. M., Barreira, L., Varela, J., & Custódio, L. (2016). First report of the nutritional profile and antioxidant potential of *Holothuria arguinensis*, a new resource for aquaculture in Europe. *Natural product research*, 30(18), 2034-2040.
- Rosa, R., Dierssen, H. M., Gonzalez, L., & Seibel, B. A. (2008). Large-scale diversity patterns of cephalopods in the Atlantic open ocean and deep sea. *Ecology*, 89(12), 3449-3461.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9), 765-791.
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- Sannaveerappa, T., Westlund, S., Sandberg, A.-S., & Undeland, I. (2007). Changes in the antioxidative property of herring (*Clupea harengus*) press juice during a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(26), 10977-10985.
- Schagerström, E., & Sundell, K. S. (2021). *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) red sea cucumber, red signal sea cucumber (Sweden), rødølse (Norway and Denmark), Aspidochirotida, Stichopodidae.
- Schibye, B., & Klausen, K. (2011). *Menneskets fysiologi - hvile og arbejde* (3th edition ed.). FADLs forlag.
- Schmidt, C. V., & Mouritsen, O. G. (2020). The solution to sustainable eating is not a one-way street. *Frontiers in Psychology*, 11, 531.
- Schmidt, C. V., Olsen, K., & Mouritsen, O. G. (2021). Videnskaben bag østers med champagne. *Aktuel Naturvidenskab*.
- Sharma, M., & Majumdar, P. (2009). Occupational lifestyle diseases: An emerging issue. *Indian journal of occupational and environmental medicine*, 13(3), 109.
- Suwaluk, R., Chansuwan, W., Sirinupong, N., & Chinachoti, P. (2021). Biological properties of peptide released by in-vitro stimulated digestion of cooked eats. *Journal of Food and Nutrition Research*, 9(2), 87-95.
- Takashi, H., Nobuhiro, Z., Kyoko, Y., Ryoko, N., Xue, C., & Tatsuya, S. (2005). Recent advances in researches on physiologically active substances in holothurians. *Journal of Ocean University of China*, 4(3), 193-197.
- Tessari, P., Lante, A., & Mosca, G. (2016). Essential amino acids: master regulators of nutrition and environmental footprint? *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Toral-Granda, V., Lovatelli, A., & Vasconcellos, M. (2008). Sea cucumbers. *A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 516, 317.
- Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., & Barba, F. J. (2021). Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. *Marine Drugs*, 19(2), 71.
- UN. (2015). Sustainable Development Goals to kick in with start of new year. In L. n. <https://news.un.org/en/story/2015/12/519172-sustainable-development-goals-kick-start-new-year> (Ed.): United Nations
- Undeland, I., Lindqvist, H., Chen-Yun, Y., Falch, E., Ramel, A., Cooper, M., Gildberg, A., Luten, J., Stenberg, E., Nielsen, H. H., & Elvevoll, E. O. (2009). Seafood and health: what is the full story? In J. B. Luten (Ed.), *Marine functional food* (pp. 17-70). Wageningen Academic Publishers.

- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51(1), 75-87.
- von Schacky, C., & Harris, W. S. (2007). Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovascular Research*, 73(2), 310-315.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.019>
- Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino acids*, 45(3), 463-477.
- Wang, W., Zhou, X., & Liu, Y. (2020). Characterization and evaluation of umami taste: A review. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115876.
- Wen, J., Hu, C., & Fan, S. (2010). Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers.
- Whitford, D. (2005). Proteins: Structure and Function. *Spectroscopy*.
- Wu, G. (2021). *Amino acids: biochemistry and nutrition*. CRC Press.
- WWF. (i.d.). KAMPEN MOT OVERFISKE OG ULOVLIG FISKE. *Lastet ned: 21.03.22*
<https://www.wwf.no/dyr-og-natur/hav-og-fiske/kampen-mot-ulovlig-fiske-og-overfiske>.
- Wyness, L. (2016). The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(3), 227-232.
- Yu, L., Xue, C., Chang, Y., Xu, X., Ge, L., Liu, G., & Wang, Y. (2014). Structure elucidation of fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas*. *Food Chemistry*, 146, 113-119.
- Zhang, Y., He, S., Bonneil, É., & Simpson, B. K. (2020). Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: In vitro activity, de novo sequencing, and in silico docking for in vivo function prediction. *Food Chemistry*, 306, 125581.

7 Vedlegg

Vedlegg 1 – Temperaturoversikt for Kjeldahls metode

Vedlegg 2 – Totale aminosyrer (TAA) i rå *P.tremulus*

Vedlegg 3 – Totale aminosyrer (TAA) i frysetørket *P.tremulus*

Vedlegg 4a – Innhold essensielle aminosyrer (EAA) bestemt med proteininnhold fra Kjeldahls metode

Vedlegg 4b - Innhold essensielle aminosyrer (EAA) bestemt med proteininnhold fra aminosyreanalyse

Vedlegg 5 – Frie aminosyrer (FAA) i rå og frysetørket *P.tremulus*

Vedlegg 6 – Bevaring av aminosyrer i frysetørket sjøpølse

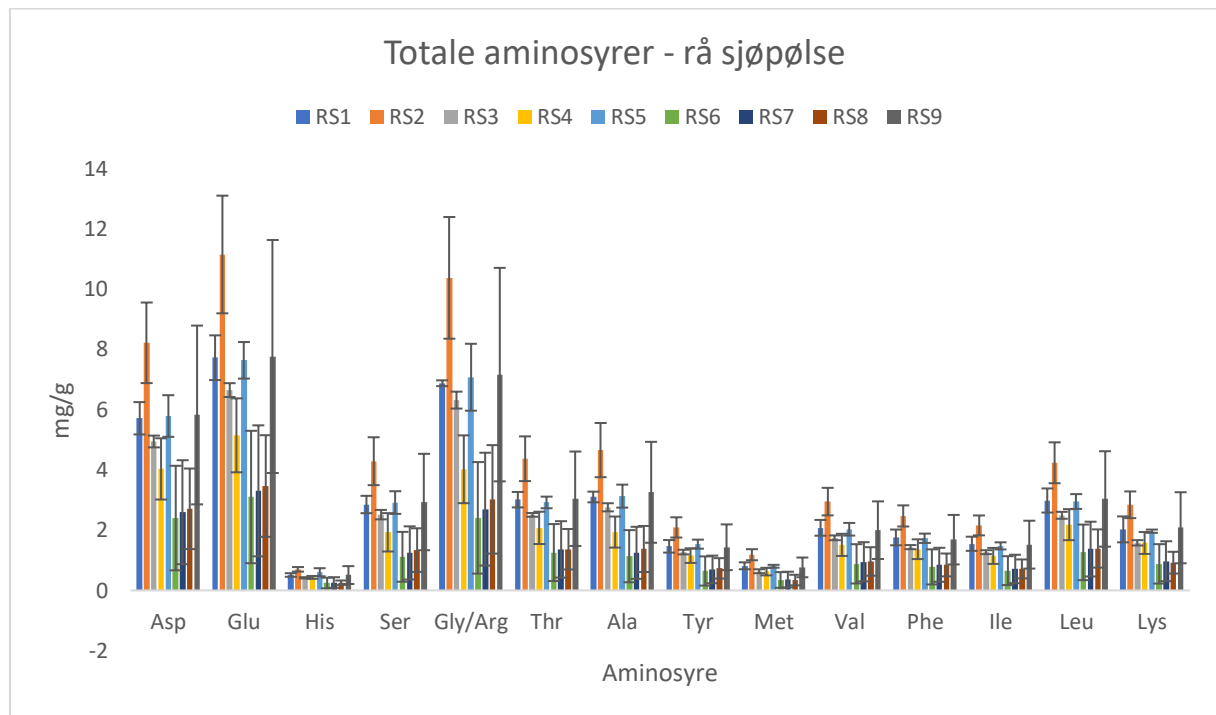
Vedlegg 7 – Formel for omregning fra tørrvekt til våtvekt

Vedlegg 1 – Temperaturoversikt, Kjeldahls metode

Tabell 1: Oversikt over hvor lenge de forskjellige temperaturene ble holdt ved fordøyelse med Kjeldigester K-449.

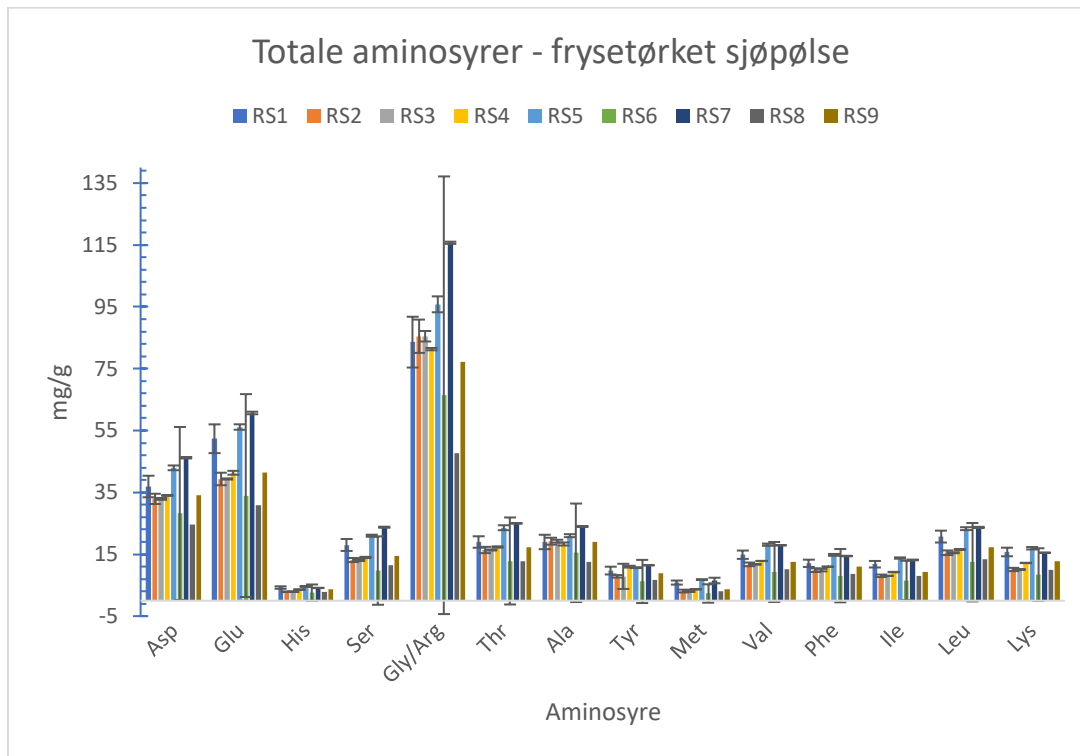
Step	Temperatur (C°)	Tid (minutter)
1	280	0
2	320	20
3	420	90
Nedkjøling	-	35

Vedlegg 2 – Totale aminosyrer i rå *P.tremulus*



Figur 1: Det totale aminosyreinnholdet (TAA) i 9 stk rå sjøpølse, gjennomsnitt (n=2) ± standardavvik.

Vedlegg 3 – Totale aminosyrer i frysetørket *P.tremulus*



Figur 2: Det totale aminosyreinnholdet (TAA) i 9 stk frysetørkede sjøpølser, gjennomsnitt (n=2) ± standardavvik.

Vedlegg 4 – Innhold av essensielle aminosyrer (EAA)

Bestemt med proteininnhold fra Kjeldahl og aminosyreanalyse ved å bruke formel 1.

$$(1) \quad Mg \ EAA/g \ protein = \frac{(mg \ EAA/g \ pr\o ve)}{proteininnhold \ \%} * 100$$

a)

Tabell 2: Innhold av essensielle aminosyrer (EAA) regnet ut ved å benytte proteininnhold bestemt med Kjeldahls metode.

Rå sjøpølse Proteininnhold: 4,2			Frysetørket sjøpølse Proteininnhold: 43,1		Anbefalt inntak
EAA	Mg EAA/g prøve	Mg EAA/g protein	Mg EAA/g prøve	Mg EAA/g protein	Mg EAA/g protein
Histidin	0,5	11,9	3,6	8,4	15
Treonin	2,5	59,5	17,8	41,3	23
Metionin	0,7	16,7	4,4	10,1	16
Valin	1,7	40,5	13,3	30,9	39
Fenylalanin	1,5	35,7	11,2	26,0	38
Isoleucin	1,3	31,0	9,8	22,8	30
Leucin	2,5	59,5	17,7	41,1	59
Lysin	1,7	40,5	12,8	29,7	45
TAA	12,4	295,2	90,6	210,2	271

b)

Tabell 3: Innhold av essensielle aminosyrer (EAA) regnet ut ved å benytte proteininnhold bestemt med aminosyreanalyse.

Rå sjøpølse Proteininnhold: 3,2			Frysetørket sjøpølse Proteininnhold: 28,8		Anbefalt inntak
EAA	Mg EAA/g prøve	Mg EAA/g protein	Mg EAA/g prøve	Mg EAA/g protein	Mg EAA/g protein
Histidin	0,5	15,6	3,6	12,5	15
Treonin	2,5	78,1	17,8	61,8	23
Metionin	0,7	21,9	4,4	15,2	16
Valin	1,7	53,1	13,3	46,2	39
Fenylalanin	1,5	46,9	11,2	38,9	38
Isoleucin	1,3	40,6	9,8	34,0	30
Leucin	2,5	78,1	17,7	61,5	59
Lysin	1,7	53,1	12,8	44,4	45
TAA	12,4	387,5	90,6	314,5	271

Vedlegg 5 – Frie aminosyrer (FAA) i rå og frysetørket *P.tremulus*

Tabell 4: Frie aminosyrer (FAA) i rå og frysetørket *P.tremulus* presentert som gjennomsnitt ($n=10$) \pm standardavvik. EAA= essensielle aminosyrer. IEAA= ikke essensielle aminosyrer.

Frie aminosyrer		
Aminosyre	Rå <i>P.tremulus</i> (mg/g våtvekt)	Frysetørket <i>P.tremulus</i> (mg/g tørrvekt)
Histidin	ID	0,1 \pm 0,0
Treonin	ID	0,1 \pm 0,0
Metionin	ID	ID
Valin	ID	ID
Fenylalanin	ID	ID
Isoleucin	ID	ID
Leucin	ID	ID
Lysin	ID	0,3 \pm 0,1
Total EAA	ID	0,5 \pm 0,1
Asparginsyre*	ID	0,1 \pm 0,0
Glutaminsyre*	0,1 \pm 0,0	3,9 \pm 0,1
Serin	ID	0,1 \pm 0,0
Glysin/arginin	ID	2,5 \pm 0,1
Alanin	ID	0,4 \pm 0,1
Tyrosin	ID	ID
Total IEAA	0,1 \pm 0,0	7,0 \pm 0,1
Frie AA	0,1 \pm 0,0	7,5 \pm 0,1

*Asparagin og glutamin blir deaminert under syrehydrolyse, og er derfor inkludert i henholdsvis asparagin- og glutaminsyre.

*Tryptofan ødelegges under syrehydrolyse og ble ikke detektert.

*Taurin og cystein ble ikke tatt med i beregningen av det totale aminosyreinnholdet.

Vedlegg 6 – Bevaring av aminosyrer i frysetørket sjøpølse

Utrekning TR% er utført som beskrevet i (Mierke-Klemeyer et al., 2008), og formel 2 er benyttet:

$$(2) \quad TR\% = \frac{\text{Mg TAA/g frysetørket sjøpølse} * \text{vekt g etter tørking}}{\text{Mg TAA/g rå sjøpølse} * \text{vekt g før tørking}} * 100$$

Vekt sjøpølse før frysetørrking, gjennomsnitt (n=10): 46,00 g

Vekt sjøpølse etter frysetørrking, gjennomsnitt (n=10): 4,63 g

Tabell 5: Utrekning av true retention (TR%) for aminosyrer i rå og frysetørket sjøpølse.

Aminosyre	Mengde TAA (mg/g)		TR%
	Vekt før frysetørrking (g)	Vekt etter frysetørrking (g)	
Asp	216,19	160,26	74,13
Glu	289,78	201,94	69,69
His	23,00	16,67	72,50
Ser	110,39	70,40	63,77
Gly/Arg	257,58	370,07	143,67
Thr	110,39	82,44	74,68
Ala	119,59	85,22	71,26
Tyr	55,20	41,69	75,52
Met	32,20	19,92	61,86
Val	78,20	61,60	78,78
Phe	69,00	51,87	75,19
Ile	59,80	45,39	75,91
Leu	114,99	81,98	71,29
Lys	78,20	59,29	75,82

Vedlegg 7 – Antioksidativ kapasitet i rå og frysetørket sjøpølse

Frysetørket våtvekt ble regnet ut ved å benytte formel 3:

$$(3) \quad \frac{(tørrvekt (g)/100)}{(100 - vanninnhold (\%))}$$

