



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole – Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Biokjemisk sammensetning og bioaktivitet i hydrolysert sjøpølse, mikroalger og mesopelagiske organismer

Signy Antonette Linge Killingmo

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap FSK-3960 (60 stp) mai 2021

Biokjemisk sammensetning og bioaktivitet i hydrolysert sjøpølse, mikroalger og mesopelagiske organismer

Signy Antonette Linge Killingmo

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp)

Norges fiskerihøgskole

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

UiT – Norges arktiske universitet



Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på fem lærerike år på Norges fiskerihøgskole. Derfor vil jeg bruke denne muligheten til å takke de som har gjort denne tiden uforglemmelig.

Først og fremst vil jeg takke min fantastiske hovedveileder Mari Johannessen Walquist, som har gitt uvurderlig veiledning og støtte. Jeg vil også takke mine biveiledere Karl-Erik Eilertsen og Edel Oddny Elvevoll for spesielt gode diskusjoner.

I tillegg vil jeg takke alle i sjømatgruppa og spesielt Guro Kristine Edvinsen og Tone Friis Aune som har hjulpet meg med analysene på sjømatlaben. I tillegg vil jeg rette en stor takk til Chun Li, Kirsti Helland og Marte Albrigtsen for god hjelp til analyser på Marbio.

Sist, men ikke minst vil jeg takke mine medstudenter som har gjort disse fem årene ikke bare lærerike, men også morsomme. Jeg vil spesielt trekke frem Henning, Tomas og Oda som har bidratt med glede og motivasjon i de mest hektiske og frustrerende tider.

Signy Antonette Linge Killingmo

Tromsø, mai 2021

Sammendrag

Havet utgjør mer enn 70 % av overflaten til jordkloden, men står bare for 7 % av alt protein konsumert i verden. For å utnytte havet i større grad kan man høste på et lavere trofisk nivå i næringskjeden. Hele 90 % av energien tapes mellom hvert trofiske nivå og lite utnyttede arter i de lavere nivåene er derfor en stor potensiell ressurs. Disse artene kan muligens utnyttes til humant konsum, eller de kan prosesseres videre og undersøkes for biologisk aktivitet. Marine proteiner har fått økt interesse som forskningsfelt da det er rapportert at de kan være opphav til biologisk aktive komponenter. Formålet med denne oppgaven var derfor å karakterisere biokjemisk sammensetning og undersøke biologisk aktivitet i proteinhydrolysat fra lite utnyttede arter i de lavere nivåer i næringskjeden.

Artene undersøkt i denne oppgaven var sjøpølsene, *P. tremulus* og *C. frondosa*, mikroalgen, *P. glacialis*, og et trålhål med ulike mesopelagiske organismer. Disse er alle lite utnyttede arter på et lavt trofisk nivå med potensial for utnyttelse. Alle artene ble kvernet og frysetørket før protein- og fettinnholdet ble analysert. Videre ble artene enzymatisk hydrolysert i tre paralleller, i tillegg til en hydrolyse kontroll uten enzym. Proteinhydrolysatene ble testet for antidiabetisk, antiinflammatorisk og antioksidativ effekt.

Alle artene ble funnet å være fullverdige og gode proteinkilder. De inneholdt alle aminosyrer og hadde et innhold av essensielle aminosyrer over referansenivået fastsatt av Verdens helseorganisasjon. Fettinnholdet varierte mellom artene og ble bestemt til 0,8 %, 6,2 %, 1,7 % og 12,9 % for henholdsvis *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Alle artene hadde et høyt innhold av langkjedede fettsyrer og en fordelaktig omega-6/omega-3 som kan bidra til å utjevne forskjellen mellom disse fettsyrene i kostholdet. Den enzymatiske hydrolysen økte kun proteinutbytte i *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Den antioksidative kapasiteten målt med oksygenradikal absorbansekapasitet (ORAC) var 297-4021 $\mu\text{mol TE/g}$. Mesopelagiske organismer hadde det høyeste proteininnholdet og den høyeste antioksidative aktiviteten. Ingen av proteinhydrolysatene viste antidiabetisk eller antiinflammatorisk aktivitet. Basert på resultatene i denne oppgaven kan mesopelagiske organismer ha et potensiale for å bli utnyttet til proteinhydrolysat, men alle artene bør undersøkes mer for videre kartlegging.

Summary

The ocean covers more than 70% of Earth's surface, but only accounts for 7% of all protein consumed in the world. In order to increase the exploitation of the ocean it will be important to harvest at a lower trophic level in the food chain. Simply 90% of the energy is lost between each trophic level and unutilized species in the lower levels are therefore a great potential resource. These species can possibly be utilized for human consumption, or they can be further processed and examined for biological activity. Marine proteins have gained increasing interest as a field of research, as it has been reported that they may be the origin of biologically active components. The purpose of this thesis was therefore to characterize biochemical composition and investigate biological activity in protein hydrolysate from unutilized species in the lower levels of the food chain.

The species investigated in this thesis were the sea cucumbers, *P. tremulus* and *C. frondosa*, the microalgae, *P. glacialis*, and various mesopelagic organisms. All species were ground and freeze-dried before the protein and fat contents were analyzed. Furthermore, the species were enzymatically hydrolyzed in three parallels and a hydrolysate control without enzyme. These protein hydrolysates were tested for antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant effects.

All species were considered complete and good sources of protein. They contained all amino acids and had a content of essential amino acids above the reference level set by the World Health Organization. The fat content was varied between the species and was 0,8 % 6,2 % 1,7 % and 12,9% for *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* and mesopelagic organisms, respectively. All species had a high content of long-chain fatty acids and an favorable omega-6/omega-3 ratio contributing to level out differences of these fatty acids in the diet. The enzymatic hydrolysis increased protein yield only in *P. glacialis* and mesopelagic organisms. The antioxidant capacity measured with Oxygen radical absorbance activity (ORAC) was 297-4021 $\mu\text{mol TE/g}$. Mesopelagic organisms contained the highest protein content and the highest antioxidant activity. None of the protein hydrolysates displayed antidiabetic or anti-inflammatory activity. Based on the results of this study, mesopelagic organisms may have the potential to be utilized for protein hydrolysate. However all species should be further investigated.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
2	Bakgrunn	3
2.1	Sjømat og helse	3
2.2	Lite utnyttede arter	4
2.2.1	Sjøpølse	4
2.2.2	Mikroalge	7
2.2.3	Mesopelagiske organismer	8
2.2.4	Økt verdiskapning i lite utnyttede arter	9
2.3	Biokjemisk sammensetning i sjømat.....	11
2.3.1	Proteiner	11
2.3.2	Fett.....	12
2.4	Biologisk aktivitet	13
2.4.1	Antidiabetisk aktivitet	13
2.4.2	Antiinflammatorisk aktivitet	14
2.4.3	Antioksidativ aktivitet.....	14
3	Materialer og metoder	16
3.1	Materialer	16
3.1.1	Sjøpølse	16
3.1.2	Mikroalger	16
3.1.3	Mesopelagiske organismer	16
3.2	Forsøksdesign.....	17
3.3	Metoder	18
3.3.1	Frysetørking	18
3.3.2	Biokjemisk sammensetning.....	18
3.3.3	Enzymatisk hydrolyse	21
3.3.4	Biologisk aktivitet	22

4	Resultater.....	27
4.1	Biokjemisk sammensetning.....	27
4.1.1	Proteiner	27
4.1.2	Fett.....	32
4.2	Biologisk aktivitet	34
4.2.1	Antidiabetisk aktivitet: DPP-IV inhibering.....	34
4.2.2	Antidiabetisk aktivitet: PTP1B inhibering	35
4.2.3	Antiinflammatorisk aktivitet: Sandwich ELISA	37
4.2.4	Antioksidativ aktivitet: ORAC.....	39
5	Diskusjon.....	40
5.1	Biokjemisk sammensetning.....	40
5.2	Biologisk aktivitet	46
5.3	Fremtidig forskning på feltet.....	49
6	Konklusjon	50
	Referanseliste	51
	Vedlegg 1	62

Forkortelser

AA	Aminosyre
Abs	Absorbans
AFDW	Askefri tørrvekt
ALA	Alfa-linolensyre (18:3 n-3)
AOAC	Association of official analysis chemist international
AOC	Antioksidativ kapasitet
BSA	Bovint serumalbumin
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre (22:6 n-3)
DiFMUP	6, 8-difluoro-4-metylbulliferylfosfat
DM2	Diabetes mellitus type 2
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV
EAA	Essensielle aminosyrer
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EPA	Eikosapentaensyre (20:5 n-3)
FRAP	Ferri-reduserende antioksidantkraft
GIP	Glukoseavhengig insulinotropt peptid
GLP-1	Glukagonlignende peptid-1
HK	Hydrolyse kontroll
LA	Linolsyre (18:2 n-6)
LPS	Lipopolysakkarid

MeOH	Metanol
MetS	Metabolsk syndrom
NEAA	Ikke-essensielle aminosyrer
ORAC	Oksygenradikal absorbansekapasitet
PH	Proteinhydrolysat
PMA	12-myristoyl-13-acetylforbol
pNNP	p-nitrophenyl fosfat
PTP1B	Protein tyrosin fosfatase 1B
PTP inhibitor	Protein tyrosin fosfatase inhibitor
PUFA	Flerumettede fettsyrer
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
SSA	Sulfosalisylysyre
TE	Troloxeqvivalenter
TBS	Tris-bufret saltløsning
TNF	Tumor nekrose faktor
Trolox	6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-karboksylysyre

1 Innledning

Verdens befolkning øker og det er estimert at det vil være 9 milliarder mennesker på jorda innen 2050 (Food and agriculture organization, 2020). For å oppnå en bedre og mer bærekraftig verden for den økende befolkningen har De forente nasjoners 193 land gått sammen og blitt enige om en felles arbeidsplan bestående av 17 bærekraftsmål. Disse inkluderer mål om å bevare og bruke de marine ressursene, i tillegg til å oppnå matsikkerhet og sikre god helse (De forente nasjoner, 2021). For å oppnå disse målene må verdens ressurser utnyttes optimalt. Tilgjengelige områder for dyrking av mat på land er begrenset og det er derfor naturlig å se mot havet. I 2018 ble 156 millioner tonn mat høstet fra hav og ferskvann (Food and agriculture organization, 2020), mens det ble høstet hele 7,5 milliarder tonn fra landbruk i 2011 (Fiskeri- og kystdepartementet, 2013). Likevel kom bare 7 % av alt protein konsumert fra havet i 2017 selv om havet utgjør 70 % av jordkloden (Food and agriculture organization, 2020). Dette viser til et stort uutnyttet potensial og en mulighet for økt utnyttelse av havets ressurser. I rapporten «Verdiskapning basert på produktive hav i 2050» ble det estimert at det var mulig med en femdobling av den marine verdiskapningen innen 2050 (Olafsen, Winther, Olsen & Skjermo, 2012). For å oppnå dette målet er det blant annet foreslått å høste på et lavere trofisk nivå (Olafsen et al., 2012). Ettersom 90 % av energien tapes mellom hvert av de trofiske nivåene, vil det være mulig å øke produksjonen ved å høste på et lavt nivå i næringskjeden (Aksnes et al., 2017). Norge er verdens nest største eksportør av sjømat (Food and agriculture organization, 2020) og med mål om å være verdens fremste sjømatnasjon (Fiskeri- og kystdepartementet, 2013) er Norge i en unik posisjon for å utnytte havressursene bærekraftig og høste nye lite utnyttede arter. Norge har også god kompetanse innen marin bioprospektering, noe som kan bidra til økt verdiskapning (Olafsen et al., 2012). Norge har naturgitte fortrinn med en lang kystlinje, store havområder og nærhet til arktiske farvann, i tillegg til god kompetanse innen bioteknologi (Olafsen et al., 2012). Havet har en enorm biodiversitet der arter har tilpasset seg de mest ekstreme forhold. Artene i Arktis er spesielt interessante å undersøke grunnet deres unike tilpasning til lys-, salt- og temperaturforhold (Olafsen et al., 2012).

Det er viktig å undersøke den biokjemiske sammensetningen i de lite utnyttede artene for å finne ut hvordan de kan brukes best mulig utfra deres næringsinnhold. Samtidig kan det være interessant å undersøke om artene inneholder biologisk aktive komponenter som kan møte de økende helsemessige utfordringene knyttet overvekt og livsstilssykdommer. Sjømat er ansett som noe av den sunneste maten man kan spise og er en god proteinkilde (Food and agriculture organization, 2020; Hamed, Özogul, Özogul & Regenstein, 2015). Marine proteiner har derfor

fått økt interesse som forskningsfelt. Spesielt har interessen økt for å produsere bioaktive peptider ved bruk av hydrolyse (Gao et al., 2021). Ved å hydrolysere proteiner til peptider vil biologiske egenskaper kunne frigjøres som kan gi gunstige helseeffekter. Hittil har det blitt funnet antidiabetes, antiinflammatorisk, antioksidativ, anticancer og antihypertensiv aktivitet i fiskeproteinhydrolysat (Gao et al., 2021).

I denne oppgaven er det valgt ut fire ulike lite utnyttede arter fra de lavere nivåene i næringskjeden. Råstoffet som er brukt er; rødpløse (*Parastichopus tremulus*), brunpløse (*Cucumaria frondosa*), mikroalger (*Porosira glacialis*) og en kombinasjon av mesopelagiske organismer.

Hovedmålet med oppgaven er å karakterisere biokjemisk sammensetning og undersøke biologisk aktivitet i proteinhydrolysat fra lite utnyttede arter i de lavere nivåer i næringskjeden.

Delmål:

1. Bestemme og sammenligne den biokjemiske sammensetningen i tørrstoff og hydrolysat fra de ulike artene.
2. Undersøke biologisk aktivitet i hydrolysat fra de ulike artene ved å se på; antidiabetisk, antiinflammatorisk og antioksidativ aktivitet.

2 Bakgrunn

2.1 Sjømat og helse

Siden 1975 har den globale andelen overvektige, personer med kroppsmasseindeks (kg/m^2) over 25, nær tredoblet seg (World Health Organization, 2020). Selv i lavinntektsland øker andelen overvektige og på verdensbasis er nå overvekt knyttet til flere dødsfall enn undervekt (World Health Organization, 2020). Den økende andelen overvektige har ført til økning i ikke-smittsomme sykdommer slik som hjerte- og karsykdommer, metabolsk syndrom (MetS), diabetes mellitus type 2 (DM2), muskel- og skjelettlidelser og noen former for kreft (World Health Organization, 2020). Flere av disse livsstilssykdommene som MetS og DM2, forebygges og behandles med kosthold- og livsstilsendringer, der kostholdet er basert på et lavt inntak av mettet fett og karbohydrater (Diabetesforbundet, 2020). Fisk og sjømat har et lavt innhold av karbohydrater i tillegg til en gunstig fettsyresammensetning og er derfor en naturlig del av et slikt kosthold (Larsen, Steinholt, Dahl, Luten & Lauritzsen, 2008). Tradisjonelt har det blitt forsket mest på fettsyresammensetningen i sjømat og effekter knyttet til de langkjedede omega-3-fettsyrene. Dette startet allerede på 70-tallet ettersom Bang et al. fant ulik forekomst av hjerte- og karsykdommer mellom dansker og inuitter på Grønland (Bang, Dyerberg & Nielsen, 1971). Dietten til inuittene var hovedsakelig basert på mat rik på langkjedede umettede fettsyrer (PUFA), og det ble antatt at observerte forskjeller var knyttet til dietten til inuittene (Bang et al., 1971). Denne hypotesen ble nøye undersøkt og det ble etablert sannhet at langkjedede omega-3-fettsyrer, også gitt som kosttilskudd, kunne redusere risikoen for å dø av hjerte- og karsykdommer (Helsedirektoratet, 2018). De siste årene har metaanalyser ført til usikkerhet om denne effekten er knyttet til omega-3-fettsyrer alene. Flere studier fant liten til ingen effekt på dødeligheten av hjertesykdom ved inntak av omega-3 tilskudd (Abdelhamid et al., 2018; Aung et al., 2018), mens andre konkluderte med at marine omega-3 tilskudd reduserte risikoen for å få og dø av hjerte- og karsykdommer (Hu, Hu & Manson, 2019). Disse usikkerhetene har ikke endret Helsedirektoratet sin anbefaling om et ukentlig inntak på 300-450 gram ren fisk, hvor 200 gram burde komme fra fet fisk (Helsedirektoratet, 2018), men det har ført til et økt fokus på de andre komponentene i sjømat. Det har blant annet blitt observert helsemessig effekt på MetS komponenter hos de som spiste mager fisk, sammenlignet med fet fisk (Tørris, Molin & Småstuen, 2017). I tillegg til at det har blitt rapportert en sammenheng mellom inntak av mager og fet fisk og redusert risiko for DM2 (Patel et al., 2009).

Dette viser at sjømatprodukter kan ha en positiv effekt på metabolsk helse, og at det ikke bare er fettsyresammensetningen som er interessant. Sjømat er også en svært god proteinkilde både fordi fordøyeligheten er høy, men også fordi det er en fullverdig proteinkilde som kan gi opphav til biologisk aktive peptider med positive fysiologiske egenskaper (Jensen & Elvevoll, 2016). Marine proteiner har dokumentert helseeffekt i dyrestudier knyttet til hjerte- og karsykdommer, diabetes og overvekt. Samtidig er det gjennomført få kliniske humanstudier på helseeffekten av marine proteiner og peptider og effekten på mennesker må derfor utredes videre (Jensen & Elvevoll, 2016).

2.2 Lite utnyttede arter

Lite utnyttede arter har vært et svært aktuelt tema etter det økende fokuset på bærekraft og matsikkerhet, både på verdensbasis og i Norge, de siste ti årene. I stortingsmelding 20 (2019-2020) etterspurte regjeringen mer kunnskap om spesifikke artsgrupper i de lavere nivåene av næringskjeden, spesielt lavtrofiske bunnlevende organismer og mesopelagiske arter (Klima- og miljødepartementet, 2020). Artene i denne oppgaven er valgt på grunnlag av denne etterspørselen.

2.2.1 Sjøpølse

Sjøpølse tilhører rekken pigghuder (*Echinodermata*) og klasse *Holothuroidea*. Artene i denne rekken kjennetegnes ved at de er femdelt radiærsymmetriske, har et kalkbasert hudskjelett og et karakteristisk vannkanalsystem (Gosner, 1999). Tradisjonelt har sjøpølse blitt brukt som folkemedisin mot blant annet høyt blodtrykk, astma og revmatisk sykdom i asiatiske land (Hossain, Dave & Shahidi, 2020; Khotimchenko, 2018). Beche-de-mer (prosessert og tørket sjøpølsekinn) var ansett å være en delikatesse forbeholdt eliten, eller spesielle høytider, i Asia, ettersom prisen på produktet var høy (Purcell, Lovatelli, Vasconcellos & Ye, 2010). Eksempelvis ble den mest verdifulle sjøpølsearten, *Apostichopus japonicus* (*A. japonicus*), solgt for >\$3500 per kilo beche-de-mer i 2016 (Purcell, Williamson & Ngaluafe, 2018). De siste årene har levestandarden økt betraktelig, spesielt i Kina, noe som også har ført til økt etterspørsel og overfiske av de tradisjonelle sjøpølseartene (Purcell et al., 2018). Den høye prisen og den økende etterspørselen gjør det attraktivt å se på om de norske sjøpølseartene kan introduseres til dette markedet. På bakgrunn av eksisterende kunnskap om sjøpølser er det

interesse for å utnytte to sjøpølsearter fra norsk farvann, *Parastichopus tremulus* (*P. tremulus*) og *Cucumaria frondosa* (*C. frondosa*) (Havforskningsinstituttet, 2019; Kjerstad, Ringvold, Søvik, Knott & Thangstad, 2015)

2.2.1.1 Rødpølse (*Parastichopus tremulus*)

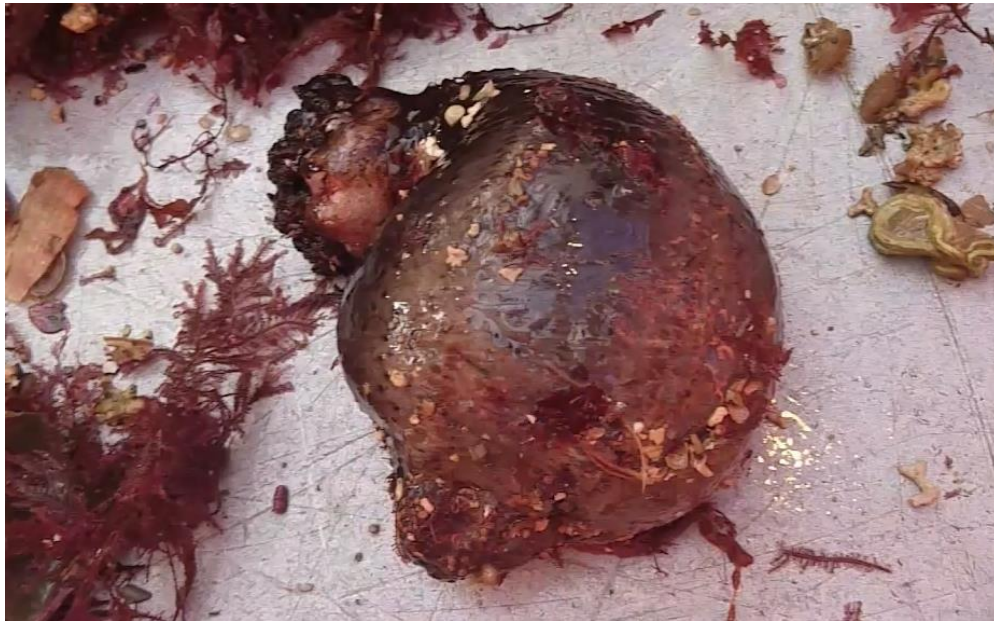
P. tremulus, vist i figur 1, er detritusspiser, det vil si at de livnærer seg av det organiske avfallet på og nær havbunnen (Kjerstad, Bjørkevoll & Christophersen, 2020). Denne arten er utbredt fra Finnmark i nord, til Kanariøyene i sør (Kjerstad et al., 2020). Møreforskning har utført prøvefiske, og funnet at *P. tremulus* ofte oppholder seg på bløtbunn mellom 100 og 400 meters dyp (Rønneberg & Kjerstad, 2007). I Norge er *P. tremulus* en vanlig bifangst i reke- og krepsefiske på Vestlandet, og fiskere har rapportert bifangst av denne arten på opptil 1000 kg (estimert) på et hal, noe som kan tyde på en betydelig biomasse (Rønneberg & Kjerstad, 2007). For å sikre god kvalitet og en bærekraftig kvote er det nødvendig med mer kunnskap om alt fra biologi og biomasse til fangstmetode (Christophersen, Bjørkevoll, Bakke & Kjerstad, 2020; Rønneberg & Kjerstad, 2007). Møreforskning har påbegynt dette arbeidet for på sikt å kunne drive oppdrett av *P. tremulus* (Christophersen et al., 2020). *P. tremulus* tilhører samme familie som den verdifulle *A. japonicus*, og har derfor «automatisk» mer interesse i markedet (Kjerstad et al., 2015), men fordi sjøpølseforbrukerne er kresne, er det viktig at produktet også har et godt næringsinnhold. Det optimale næringsinnholdet er karakterisert av et høyt proteininnhold og et lavt innhold av fett (Ringvold & Kjerstad, 2018).



Figur 1: Rødpølse, *P. tremulus*. Foto: Erling Svensen (Havforskningsinstituttet, 2019).

2.2.1.2 Brunpølse (*Cucumaria frondosa*)

C. frondosa, vist i figur 2, er en kjent art i Canada og Maine i USA, og har blitt fangstet i dette området siden 1971 (Bruckner, Johnson & Field, 2003). I Canada ble det i 2017 fangstet i underkant av 10 000 tonn *C. frondosa* (Hossain et al., 2020). Arten lever også i Norskehavet, Barentshavet, Nordsjøen og i området rundt Island (Hossain et al., 2020). Likevel har den ikke blitt sett på som en ressurs i Norge og biomassen er ikke kartlagt. *C. frondosa* lever av plante- og dyreplankton, i motsetning til de fleste andre sjøpølsearter som er detritusspisere (Hossain et al., 2020). Arten kan få en lengde på 50 cm, og oppholder seg fra tidevannssonen og ned til dyp på 300 meter, hvor den trives på steinete og hard havbunn (Bruckner, 2006; Hamel & Mercier, 1996). *C. frondosa* er også allerede etablert på det kinesiske markedet, men er ansett som å være en av de rimeligere alternativene, ettersom man kan finne produkter i prisklassen \$20-360 per kilo avhengig av hvordan den er behandlet (Hossain et al., 2020).

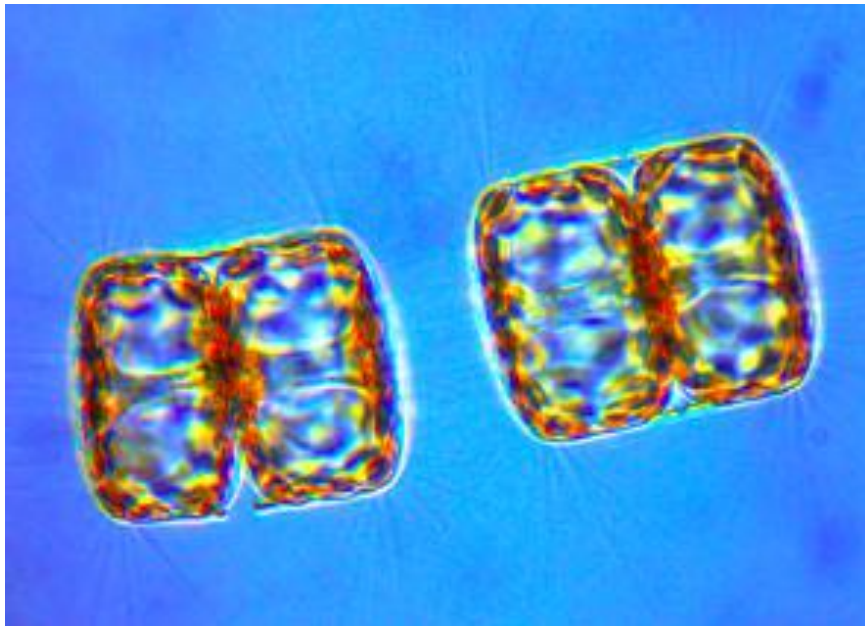


Figur 2: Brunpølse, *Cucumaria frondosa*.

2.2.2 Mikroalge

2.2.2.1 Kieselalge (*Porosira glacialis*)

Mikroalger er den største gruppen organismer i havet. De er fundamentet for nesten alt liv og fotosyntesen fra mikroalger står for omtrent 50 % av alt oksygenet i atmosfæren (Havforskningsinstituttet, 2020). I tillegg er det den eneste organismen, som vi med sikkerhet, vet syntetiserer omega-3 PUFA naturlig (Havforskningsinstituttet, 2020). Mikroalger kan deles inn i tre grupper; kieselalger, dinoflagellater og små flagellater. *Porosira glacialis* (*P. glacialis*) er en psykrofil encellet kieselalge, som ofte vokser bundet sammen i lange kjeder i havet, vist i figur 3. Ved kultivering av *P. glacialis* har næringsinnholdet vist seg å variere med mange innsatsfaktorer og produksjonsregimer, slik som tilgjengelig CO_2 og veksttemperatur. Det er hovedsakelig fettinnholdet og fettsyresammensetningen som har blitt undersøkt i denne arten tidligere (Artamonova, Vasskog & Eilertsen, 2017; Svenning et al., 2020), men mikroalger kan ha mange anvendelsesområder. Andre mikroalgearter blir utnyttet til alt fra human kost og funksjonell mat (García, de Vicente & Galán, 2017) til biodrivstoff (Yao et al., 2019).



Figur 3: *Porosira glacialis*. Foto: Algelaben, Norges fiskerihøgskole, Norges arktiske universitet (gjengitt med tillatelse).

2.2.3 Mesopelagiske organismer

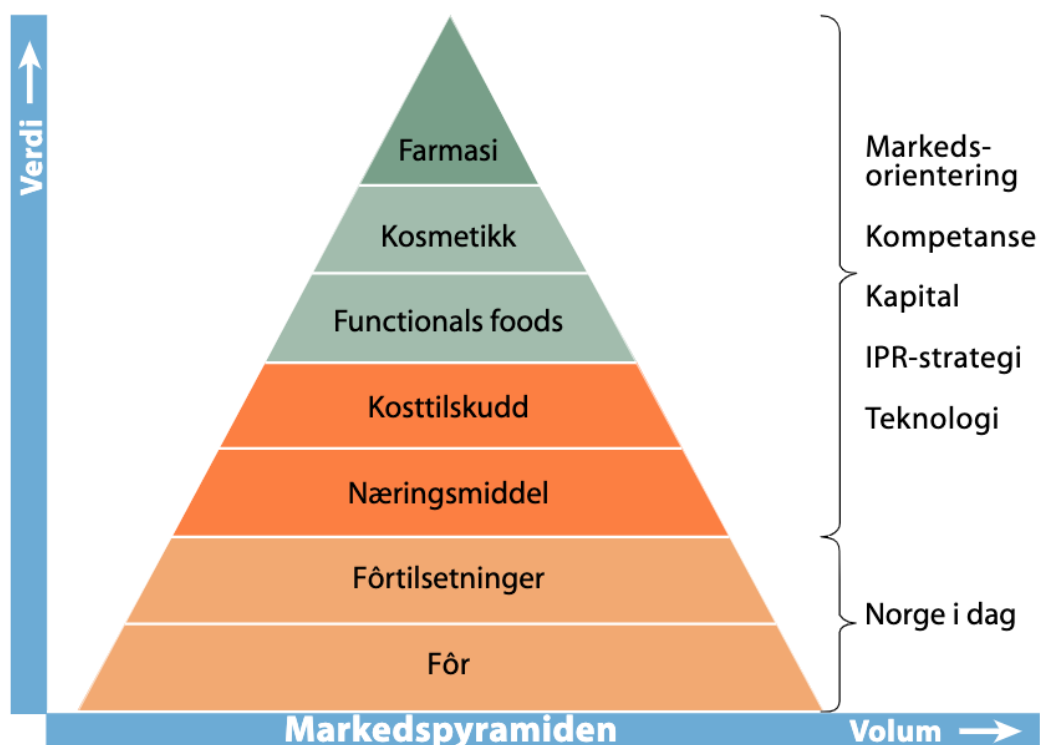
Begrepet mesopelagisk kommer fra gresk og består av «meso» som betyr «i midten» og «pelagisk» som betyr «fins i åpent hav». Mesopelagiske organismer, eksempelvis krill, maneter, reker, blekksprut og små fisk, vist i figur 4, er en samlebetegnelse for arter som på dagtid oppholder seg på 200-1000 meters dyp (Hauge, 2018). Mesopelagiske organismer trives i mørket og tilpasser seg lysstyrken ved å bevege seg vertikalt i vannsøylen (Gjøsaeter & Kawaguchi, 1980). Det har blitt knyttet et stort potensial til disse organismer etter Irigoien et al. estimerte en samlet biomasse på 10 000 millioner tonn mesopelagisk fisk på verdensbasis i 2014 (Irigoien et al., 2014). Dette estimatet var en tidobling fra tidligere estimat og har ført til et økt fokus på denne gruppen med organismer. I Norge har Havforskningsinstituttet estimert biomassen til laksesild (*Maurolicus muelleri*), en vanlig mesopelagisk art i Norge, til 15 000 tonn i Norskerenna (Lorentzen, 2020). Dette er ikke betydelige mengder, men toktet ble utført på et relativt lite område og på et tidspunkt på året hvor det var lite fisk i området og man anslår at den faktiske biomasse er mye høyere (Lorentzen, 2020). Arbeidet med å utnytte denne ressursen er godt i gang, men for at denne artsgruppen skal kunne bli utnyttet i Norge trengs det mer kunnskap om biologien til de ulike artene, i tillegg til utvikling av fangst- og prosesseringsteknologi (Bjordal & Thorvaldsen, 2020). Mesopelagiske organismer har vanligvis gått til produksjon av fiskemel og -olje, men andre anvendelser kan også være interessante (Bjordal & Thorvaldsen, 2020; Faglig forum for norske havområder, 2019).



Figur 4: Mesopelagiske organismer i et trålhal. Fotograf: Webjørn Melle (Lorentzen, 2020).

2.2.4 Økt verdiskapning i lite utnyttede arter

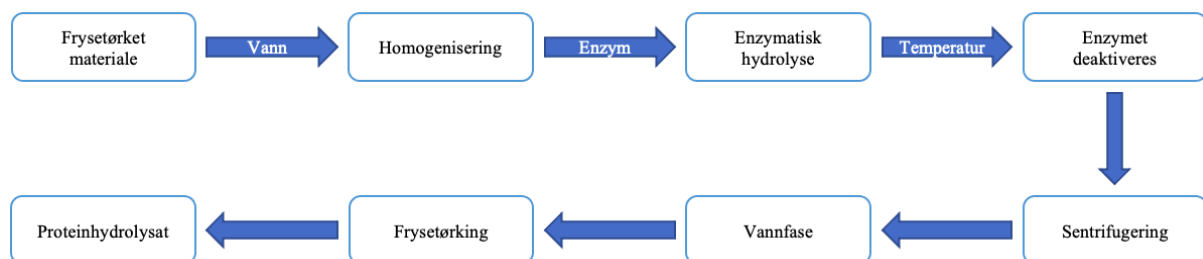
For å utnytte potensiale til de lite utnyttede artene kan de ses i sammenheng med verdi-volumpyramiden, vist i figur 5, for å produsere produkter med høyest mulig verdi. Dersom artene prosesseres for å komme høyere opp i pyramiden vil de kunne frembringe en høyere pris. Dokumentert biologisk aktivitet eller effekt vil kunne løfte produkter opp til blant annet funksjonell mat (Gao et al., 2021). Proteinhydrolysat (PH) av en lite utnyttet art med dokumentert bioaktivitet vil dermed kunne flytte seg flere nivåer i pyramiden, sammenlignet med hvis det hadde blitt brukt til fôr, slik mye restråstoff og bifangst blir i dag (Myhre, Richardsen, Nystøyl & Strandheim, 2020). Ulempen med PH fra marint råstoff er at det ofte har uønsket lukt og smak (Jamshidi, Shabanpour, Pourashouri & Raeisi, 2018). For at et hydrolysat skal være attraktivt på markedet, burde det ikke tilføre produktet noe mer enn de positive fysiologiske egenskapene (Jamshidi et al., 2018). Et PH som har gunstig dokumentert effekt på helsen kan dermed gi både økonomisk og helsemessig gevinst.



Figur 5: En verdi-volumpyramide som viser hvordan verdien på et produkt øker ved at det flyttes oppover i pyramiden (Rubin, 2007).

2.2.4.1 Hydrolyse av fiskeprotein

Enzymatisk hydrolyse, termisk hydrolyse og autolyse, er alle metoder for å bryte ned proteiner til mindre peptider og aminosyrer (AA) (Khan et al., 2020). Enzymatisk hydrolyse har blitt trukket frem som den mest lovende metoden for å produsere PH (Khan et al., 2020; Petrova, Tolstorebrov & Eikevik, 2018). Det er en rekke enzymer som anvendes ved enzymatisk hydrolyse av marine proteiner og hvilket enzym som brukes vil påvirke proteininnholdet og den biologiske aktiviteten til det endelige PH (Khotimchenko, 2018). Det kan benyttes enzymer av animalsk (trypsin, pepsin), plante (papain, bromelain) eller mikrobiell (alkalase, neutrase, flavourzyme) opprinnelse (Gao et al., 2021). En generell metode for å produsere PH er skjematisk fremvist i figur 6. Råmaterialet kvernes og homogeniseres før det tilsettes vann (ofte 1:1 ved våtvekt). Det er et kostnadsspørsmål knyttet til hvor mye vann som skal tilsettes, ettersom det å fjerne vann fra proteinfasen i etterkant er en kostbar prosess (Petrova et al., 2018). Enzymet tilsettes etter homogeniseringen, og betingelsene må tilpasses enzymets optimum med tanke på pH, temperatur og tid for å få best utbytte (Khan et al., 2020). Enzymhydrolysen blir inaktivert ved å øke temperaturen til 75-100 °C i 5-30 min (Petrova et al., 2018). For å få et tilnærmet rent produkt er det vanlig å sentrifugere materialet for å skille fett-, protein- og sedimentsfasen. PH burde ikke inneholde >0,5 % fett siden fettoksidasjon kan påvirke kvaliteten på produktet (Petrova et al., 2018). Det foretrekkes å produsere PH i pulverform ettersom det er mer stabilt, har lenger holdbarhet og er enklere å transportere, selv om PH også kan produseres i væskeform (Petrova et al., 2018).



Figur 6: Generell oversikt over enzymatisk hydrolyse av proteinhydrolysat. Modifisert fra (Khan et al., 2020).

2.3 Biokjemisk sammensetning i sjømat

Den biokjemiske sammensetningen i sjømat har stor variasjon, men det er likevel noen fellestrekk som skyldes at artene er en del av den samme næringskjeden. Fettinnholdet kan variere, men fettsyresammensetningen inkluderer ofte de samme langkjedete omega-3-fettsyrene som mikroalgene syntetiserer (Larsen et al., 2008). Sjømat generelt er gode proteinkilder, som har høy fordøyelighet og inkluderer alle essensielle aminosyrer (EAA) (Jensen & Elvevoll, 2016). I tillegg inneholder sjømat lite karbohydrater, selv om skjell og skalldyr vanligvis har et litt høyere innhold sammenlignet med fisk. Enkelte typer sjømat er gode kilder til viktige vitaminer slik som vitamin A, D, E og B12. Dette er vitaminer det ikke er mye av i annen mat, men som er positiv for vår helse med tanke på syn, kalsiumopptak, antioksidativ kapasitet og for energiomsetningen i kroppen (Larsen et al., 2008). Det er også anbefalt med inntak av fisk for å dekke det daglige behovet for selen og jod. Med bakgrunn i dette er det generelt anbefalt å øke inntaket av fisk og sjømat i det daglige kostholdet (Vitenskapskomiteen for mat og miljø, 2014).

2.3.1 Proteiner

Proteiner er en av de grunnleggende byggesteinene i kroppen og er nødvendig for alt liv. Oppbygging av ny celler, utførelsen av biokjemiske reaksjoner og dekoding av DNA hadde ikke vært mulig uten proteiner (Damodaran & Parkin, 2017). Til sammen er det 20 AA som kan bygge opp proteiner i mennesker. Av disse er ni essensielle, fenylalanin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, threonin, tryptofan og valin og elleve ikke-essensielle aminosyrer (NEAA), alanin, arginin, asparagin, asparaginsyre, cystein, glutamin, glutamatsyre, glycin, prolin, serin og tyrosin (Lopez & Mohiuddin, 2020). EAA må tilføres gjennom kosten, ettersom kroppen ikke er i stand til å syntetisere disse selv. Proteinkvaliteten kategoriseres ut fra sammensetning AA, mengde EAA, biologisk aktivitet og fordøyelighet (Comerford & Pasin, 2016). Høykvalitetsproteiner er karakterisert som de proteinene som har alle EAA over referansenivåene fastsatt av Verdens helseorganisasjon, presentert i tabell 1 (World Health Organization, 2007). De AA som ofte er begrensende i kostholdet, under referansenivået, er theronin, metionin, lysin og tryptofan. Proteinkilder med et høyt innhold av disse er derfor gunstige for å unngå mangel på viktige EAA. Taurin er en svovelholdig AA som ikke er proteinbundet, men som inngår i, blant annet, regulering av kalsium og dannelse av gallesalt. I tillegg er det knyttet en sammenheng mellom taurin og bedre blodsukkerkontroll, uten at dette

er bekreftet i humane studier. (Ripps & Shen, 2012). Taurin er en NEAA, men det er anbefalt å innta taurin i kosten for å få best utbytte av dens gunstige egenskaper (Ripps & Shen, 2012).

Tabell 1: Oversikt over anbefalt mengde essensielle aminosyrer for voksne friske mennesker (World Health Organization, 2007).

Essensielle aminosyrer	Milligram per gram protein
Histidin	15
Theronin	23
Isoleucin	30
Leucin	59
Valin	39
Lysin	45
Metionin	16
Fenylalanin	38
Tryptofan	6

2.3.2 Fett

Lipider er en heterogen molekylgruppe som har til felles at de er uløselige i vann, men løselige i organiske løsemidler (Fahy, Cotter, Sud & Subramaniam, 2011). Fettsyrer er en del av denne gruppen og består av karbonkjeder med en metylgruppe i den ene enden og en karboksylgruppe i den andre. Det er vanlig å skille mellom essensielle og ikke-essensielle fettsyrer. De to fettsyrene som er essensielle for oss mennesker er linolsyre (LA; 18:2 n-6) og alfa-linolensyre (ALA; 18:3 n-3) (Gramlich, Ireton-Jones, Miles, Morrison & Pontes-Arruda, 2019). LA kan forlenges til arakidonsyre (ARA; 20:4 n-6), mens ALA er forløperen til dannelsen av de lange omega-3-fettsyrene eikosapentaensyre (EPA; 20:5 n-3), og dokosaheksaensyre (DHA; 22:6 n-3). Omdannelsesprosessen fra ALA er generelt ikke ansett å være effektiv nok til å produsere de mengdene EPA og DHA som er nødvendig for gunstig helse og utvikling i mennesker. Derfor er det anbefalt å innta EPA og DHA direkte fra for eksempel sjømat (Olsen, 2017). ARA og EPA/DHA har veldig ulik effekt og i kroppen dannes metabolitter fra disse fettsyrene som kalles eikosanoider. Eikosanoidene som dannes fra ARA blir ansett som proinflammatoriske, mens EPA/DHA gir opphav til antiinflammatoriske, anti-arytmiske og anti-aterotrombotiske eikosanoider. Fordi det er de samme enzymene (elongaser og desaturaser) som syntetiserer både ARA og EPA/DHA, vil det være konkurranse om hvilke fettsyrer og metabolitter som skal

dannes (Olsen, 2017). Det er den relative konsentrasjonen av fettsyrene som bestemmer hva som blir brukt som substrat, derfor er det viktig å få i seg riktig mengde av disse slik at det forholdet mellom fettsyrene er balansert (Cleland, James & Proudman, 2005). I det vestlige kostholdet er n-6/n-3 forholdet omtrent 10:1, mens det anbefalte forholdet er under 4-2:1 for optimal helseeffekt (Wien, Rajaram, Oda & Sabaté, 2010). Det er derfor anbefalt å få i seg mer omega-3-fettsyrer for å utjevne n-6/n-3 forholdet.

2.4 Biologisk aktivitet

Biologisk aktivitet eller bioaktivitet er en samlebetegnelse for ulike, som regel, positive fysiologiske egenskaper. Peptider med biologisk aktivitet kan være inaktive når de har sin naturlige plass i et stort protein, men hvis de blir spaltet kan denne aktiviteten frigjøres, og egenskapene endres sammenlignet med det opprinnelige proteinet (Korhonen & Pihlanto, 2006; Rønning, 2016). Effekten av de bioaktive peptidene er blant annet avhengig av AA komposisjon og størrelse (Sarmadi & Ismail, 2010). Restråstoff og bi-produkter fra havet har blitt testet for bioaktivitet de siste tiårene og det er funnet å ha positive helseeffekter (Hamed et al., 2015; Petrova et al., 2018). Biologisk aktivitet som allerede er identifisert i marine PH inkluderer blant annet antidiabetisk, antiinflammatorisk, antioksidativ, anticancer og antihypertensiv aktivitet (Gao et al., 2021).

2.4.1 Antidiabetisk aktivitet

En stor andel av de med DM2 trenger medisiner for å leve normalt, men mange av medisinene tilgjengelig gir ulike bivirkninger (Kerru, Singh-Pillay, Awolade & Singh, 2018). Det er derfor ønskelig å undersøke om det finnes molekyler fra tilgjengelige ressurser med naturlig antidiabetisk aktivitet. En av metodene for å studere antidiabetisk aktivitet i laboratoriet er å undersøke om en forbindelse kan hemme enzymet dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). DPP-IV er et enzym som er lokalisert i plasmamembranen på celleoverflaten til epitelet i de fleste organene i kroppen. I tarmen produseres peptidene glukoseavhengig insulinotrop peptid (GIP) og glukagonlignende peptid-1 (GLP-1). Disse virker som hormoner involvert i frigjøringen av insulin fra bukspyttkjertelen når man spiser glukose og DPP-IV virker ved å hemme effekten av GIP og GLP-1 (Green, Flatt & Bailey, 2006). Pasienter med DM2 har redusert effekt av GIP (Nauck et al., 1993). Siden hemmere av DPP-IV vil inaktivere/reducere DPP-IV slik at GIP og

GLP-1 forblir aktive og stimulerer produksjon av insulin, kan slike hemmere brukes i behandlingen av DM2 pasienter. En annen metode for å studere antidiabetisk aktivitet på laboratoriet er ved å undersøke protein tyrosin fosfatase 1B (PTP1B) inhibering. PTP1B er en del av PTP familien som er en gruppe med enzymer som er involvert både i immunresponsen og metabolismen i kroppen (Kerru et al., 2018). PTP1B defosforilerer insulinreseptoren direkte, og hemmer effekten insulinet har på cellene (Minor, 2006; Salmeen, Andersen, Myers, Tonks & Barford, 2000). I tillegg har PTP1B vist å ha økt aktivitet i insulinresistente DM2 pasienter (Salmeen et al., 2000).

2.4.2 Antiinflammatorisk aktivitet

Inflammasjon er kroppens naturlige reaksjon for å eliminere infeksjoner og skader, men kan også komme av stress eller skader i vevet (Medzhitov, 2008). Inflammasjon karakteriseres av hevelse, rødhet, varme og smerte i det utsatte område (Dar et al., 2016). Kronisk inflammasjon er utbredt i personer med DM2 og er ofte forårsaket av stress i vevet (Medzhitov, 2008; Turner, Nedjai, Hurst & Pennington, 2014). Dette kommer av at kroppen frigjør cytokiner (signalmolekyler) for å eliminere patogener eller de pro-inflammatoriske agensene. Et vanlig cytokin involvert i inflammasjonsprosessen er tumor nekrose faktor (TNF) (Turner et al., 2014). Flere antar at antiinflammatoriske medikamenter, for eksempel TNF-blokkere, kan påvirke insulinsensitiviteten (Donath & Shoelson, 2011; Rehman & Akash, 2016). En mye brukt metode for å studere antiinflammatorisk aktivitet er å undersøke om en forbindelse hemmer produksjonen av TNF i humane makrofagcellelinjer (THP-celler) stimulert med bakterietoksin.

2.4.3 Antioksidativ aktivitet

Oksidasjon kan defineres som alle prosesser der elektroner blir avgitt (Pedersen, 2019). I biologisk og medisinsk sammenheng defineres oksidasjon som reaksjoner som inkluderer alle reaktive oksygenforbindelser (ROS). De fleste ROS er frie radikaler og inkluderer alle stoffer som kan eksistere uavhengig av ett eller flere uparede elektron og som vil reagere raskt med andre stoffer for å oppnå stabilitet (Li, Jia & Trush, 2016). På grunn av ROS sin reaktive natur kan de gjøre skade på lipider, proteiner og DNA og dermed gi skade på celler og vev i kroppen. Dette omtales ofte som oksidativt stress (Elias, Kellerby & Decker, 2008). Oksidasjon i proteiner har også blitt knyttet til sykdommer som Alzheimer og diabetes (Elias et al., 2008;

Halliwell & Gutteridge, 2007). Antioksidanter er stoffer som kan forebygge, redusere eller reparere ROS skade i vev (Li et al., 2016). Antioksidanter deles inn i høymolekylære og lavmolekylære antioksidanter. Siden de høye molekylære antioksidantene ikke kan tilsettes mat og er avhengig av kofaktorer, er det de lavmolekylære antioksidantene som er fokuset i denne oppgaven. De lavmolekylære antioksidantene består av mindre fettløselige eller vannløselige stoffer som kan være naturlige eller kunstig fremstilt. Peptider og AA er i den størrelsesordenen at de tilhører lavmolekylære antioksidanter (Halliwell & Gutteridge, 2007). Alle AA kan potensielt fungere som antioksidanter, men de mest reaktive er de AA hvor sidekjeden er aromatisk (tryptofan, tyrosin og fenylalanin) eller inneholder svovel (taurin, cystein og metionin), men også lysin og histidin har vist seg å ha antioksidativ kapasitet (AOC) (Elias et al., 2008; Sarmadi & Ismail, 2010). Ettersom oksidasjon inkluderer et bredt spekter av reaksjoner, er det mange metoder for å undersøke AOC. Antioksidierende metoder er som regel basert på hydrogenatomoverføring eller singlet elektronoverføring (Huang, Ou & Prior, 2005). Oksygenradikal absorbansekapasitet (ORAC) er basert på hydrogenatomoverføring og måler fluorescensen som oppstår når et radikal oksiderer. I denne metoden vil man kunne påvise antioksidanter som defineres som radikalfangere. Hvis stoffet man undersøker reduserer radikalet så vil det dannes mindre farge og fluorescensnivået er dermed omvendt korrelert med antioksidative aktiviteten (Huang et al., 2005).

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Sjøpølse

P. tremulus, var fangstet på omtrent 200 m dyp utenfor vestkysten av Norge juni 2018 og oppbevart på -18 °C. *C. frondosa*, var fangstet på 10-15 m dybde utenfor Tromsø i januar 2020 og ble fraktet direkte til Norges fiskerihøgskole og fryst ned til -40 °C. Sjøpølsene ble tint i 24 timer i kjøleskap før 32 individer av *P. tremulus* og 4 individer av *C. frondosa* ble kvernet hver for seg i halvfrossen tilstand, deretter fryst ned og senere frysetørket.

3.1.2 Mikroalger

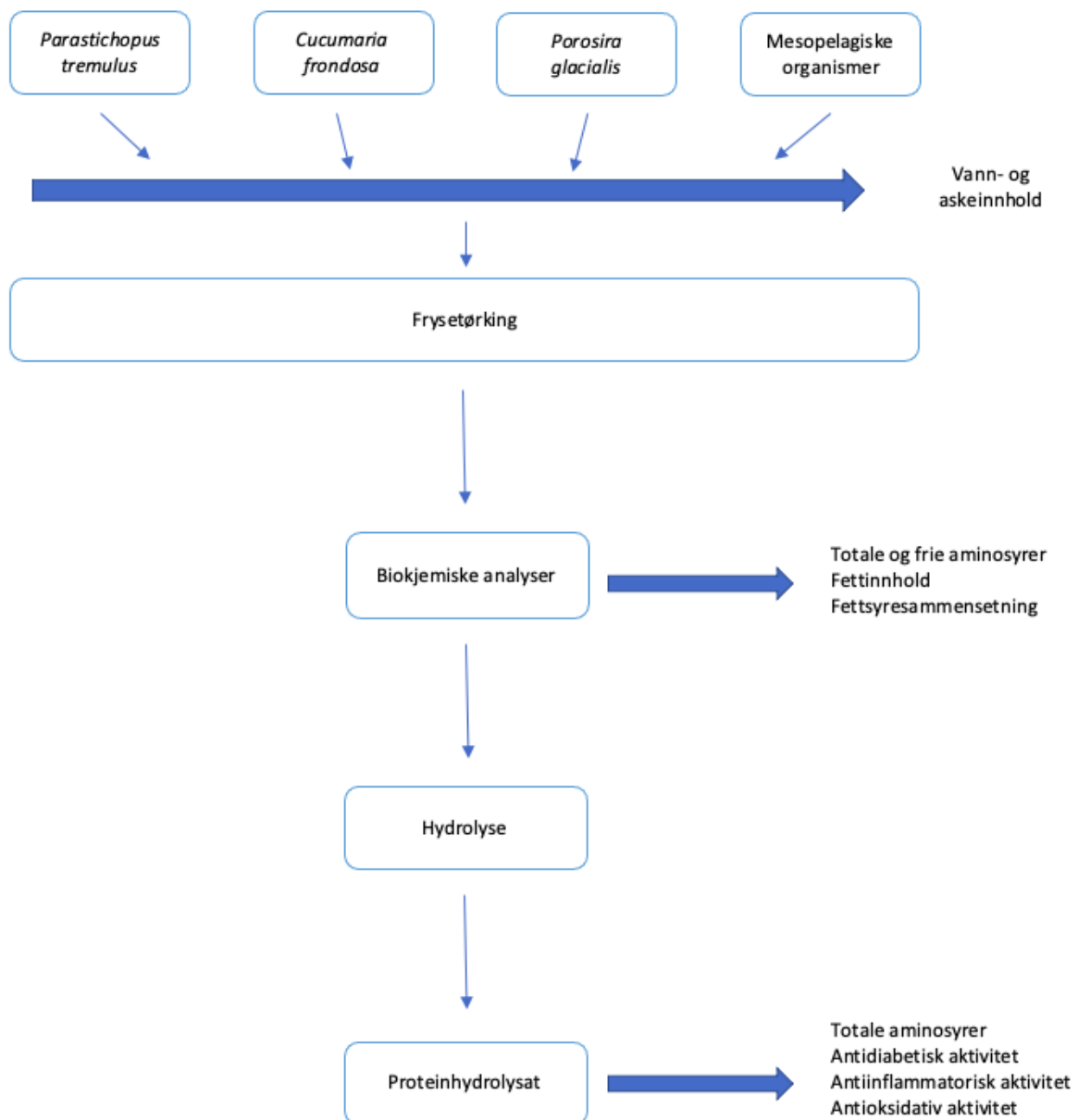
P. glacialis, ble høstet 9. juni 2020 fra en kontinuerlig kultur opprettholdt i en eksponentiell vekst. Monokulturen ble kultivert i en 300 000 liter vertikale foto-bioreaktorer plassert ute på Finnfjordbotn, der vanntemperaturer var 8-11 °C. Kulturen ble tilsatt røykgass med 6-12 % CO₂ og opprettholdt en pH på 7,4-8,1. Prøvene ble høstet fra tankene med et trommelfilter, sentrifugert, fryst ned og senere frysetørket.

3.1.3 Mesopelagiske organismer

Trålhalet ble utført 1. juli 2019 fra kl. 09:33 til 16:46 på omtrent 200 m dyp. Fangsten ble tatt ved 60°49 N og 3°00 Ø til 60°30 N og 3°13 Ø. Ifølge landingseddelen inneholdt trålhalet: 4000 kg laksesild (*Maurolicus muelleri*), 6000 kg kolmule (*Micromesistius poutassou*), 3000 kg rødflekkglassreke (*Eusergestes arcticus*) og 400 kg strømsild (*Argentina sphyraena*). I batchen brukt i denne oppgaven ble det bare identifisert *Eusergestes arcticus* (*E. arcticus*) og *Maurolicus muelleri* (*M. muelleri*), men enkelttilfeller av de andre artene kan ikke utelukkes. Mesopelagiske organismer ble brukt videre, og fryst ned før de ble frysetørket og homogenisert med morter.

3.2 Forsøksdesign

Vann- og askeinnholdet ble først bestemt fra homogeniserte, tinte prøver av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Etter frysetørking ble de biokjemiske analysene, totale og frie AA, fettinnhold og fettsyresammensetning, utført. Prøvene ble hydrolysert (tre paralleller og en kontroll uten enzym) og frysetørket til et PH i pulverform. De respektive PH ble så undersøkt for antidiabetisk, antiinflammatorisk, og antioksidativ aktivitet, i tillegg til at de ble analysert for totale AA. En oversikt over forsøksdesignet er illustrert i figur 7.



Figur 7: Forsøksdesign for oppgaven.

3.3 Metoder

3.3.1 Frysetørking

Frysetørking ble utført med Genesis EL35 freeze dryer (VirTis SP Scientific, NY, USA). Omtrent 2,5 kg *P. tremulus*, 1,1 kg *C. frondosa*, 1,3 kg *P. glacialis* og 1,3 kg mesopelagiske organismer ble fryst ned til -70 °C og frysetørket til vekten var konstant.

3.3.2 Biokjemisk sammensetning

3.3.2.1 Vann- og askeinnhold

Vann- og askeinnholdet ble bestemt gravimetrisk ved bruk av en modifisert metode av Association of official analysis chemist international (AOAC) 950.46b og 938.08 (Association of Official Analysis Chemists International, 2005). For alle artene ble tre paralleller med 10 g prøve plassert i forhåndsveide aluminiumsbeger. Aluminiumsbegrene ble plassert i varmeskap på 105 °C til vekten var konstant. Prøvene ble veid på nytt og vanninnholdet ble beregnet ved bruk av formelen under.

$$\% \text{ Vann} = \frac{\text{Vekt}_{(\text{før tørking})} - \text{Vekt}_{(\text{etter tørking})}}{\text{Vekt}_{(\text{før tørking})}} \times 100\%$$

Prøvene fra vannanalysen ble brukt til å bestemme askeinnholdet. De tørkede prøvene ble videre forbrent i forbrenningsovn (Nabertherm GmbH. Program Controller S27, Lilienthal, Tyskland) på 540 °C i 16 timer. Askeinnholdet ble beregnet ved bruk av formelen under.

$$\% \text{ Aske} = \frac{\text{Vekt} (\text{før tørking og forbrenning}) - \text{Vekt} (\text{etter tørking og forbrenning})}{\text{Vekt} (\text{før tørking og forbrenning})} \times 100 \%$$

3.3.2.2 Fettinnhold

Fettinnholdet ble utført som beskrevet i Svenning et al. (Svenning et al., 2020) modifisert fra Folchs metode (Folch, Lees & Sloane Stanley, 1957). Alle kjemikalier som ikke er spesifisert i denne metodebeskrivelsen var fra VWR chemicals Inc. (Fontenay-sous-Bois, Frankrike). Tre paralleller på omtrent 0,2 g frysetørket materiale ble veid ut i 15 ml sentrifugerør og tilsatt 10 ml diklormetan:metanol (DCM:MeOH) (2:1, v/v) og internstandard heptadekanoidsyre (Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA) tilsvarende omtrent 10 % av fettinnholdet i prøvene. Etter risting i rotator (Labinco, Breda, Nederland) i 30 minutter på 50 rpm, ble prøvene

sentrifugert i Heraeus multifuge 1 S-R (Thermo Scientific, MA, USA) i 10 minutter ved 4000 xg. Supernatanten ble helt over i 15 ml sentrifugerør, mens restene ble reekstrahert i 2 ml DCM:MeOH (2:1, v/v) før de ble sentrifugert i 10 minutter på 4000 xg. Supernatantene ble kombinert, tilsatt 2,7 ml 0,9 % NaCl, ristet godt og igjen sentrifugert i 10 minutter ved 4000 xg. En 5 ml finpipette ble brukt for å fjerne største delen av den polare, øverste, fasen med vann og heptan, før en glasspipette ble brukt for å fjerne den siste delen. Deretter ble en glasspipette brukt til å pipettere ut den upolare, nederste, fasen bestående av lipider og DCM over i forhåndsveide 8 ml glassrør. Prøven ble dampet til tørrhet med en Block heater SBH130D/3 og Sample concentrator SBHCONC/1 (Stuart Scientific, Stafford, England) og fettinnholdet ble beregnet med formelen under.

$$\% \text{ Fett} = \frac{R\theta r_{med\ innhold} - R\theta r_{tomt}}{\text{Innveid mengde prøve}} \times 100 \%$$

3.3.2.3 Fettsyresammensetning

Prøvene fra fett ekstraksjonen ble brukt videre for å bestemme sammensetningen og mengde fettsyrer i de ulike materialene med bruk av metoden beskrevet av Stoffel et al. (Stoffel, Chu & Ahrens, 1959). Alle kjemikalier som ikke er spesifisert i denne metodebeskrivelsen var fra VWR chemicals Inc. (Fontenay-sous-Bois, Frankrike). Fettekstraktene ble først løst til en konsentrasjon på 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1, v/v). Deretter ble det tilsatt 100 µl prøve, 0,9 ml DCM og 2 ml 2 % H₂SO₄ (Honeywell, Charlotte, NC, USA) i metanol (v/v) i Kimax-rør med skrukork. Rørene ble plassert i varmeblokk Drybath Std (Thermo Scientific, MA, USA) i 1 time på 100 °C, før 3,5 ml heptan og 3,5 ml 5 % NaCl ble tilsatt og rørene ristet godt for hånd. Den øverste fasen, bestående av lipider og heptan, ble pipettert over i 8 ml glassrør og dampet til tørrhet med nitrogen-gass. Prøvene ble deretter løst opp i 100 µl heptan og væsken overført til 1,5 ml analyserør og analysert ved å bruke en Agilent 6890N gaskromatograf utstyrt med en 7683B autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor og en Varian CP7419 kapillærkolonne (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Helium ble brukt som bæregass og fettsyrene ble identifisert ved hjelp av kjente standarder. Andelen kjente fettsyrer ble beregnet ut fra arealprosenten.

3.3.2.4 Totale aminosyrer

Analyse av totale AA ble utført som beskrevet av Moore & Stein (Moore & Stein, 1963). Frysetørket materiale og hydrolysat ble veid ut til omtrent 40 mg i 15 ml sentrifugerør, tilsatt 0,7 ml milliQ H₂O, 0,5 ml internstandard 20mM DL-norleucine (Sigma-Aldrich, MO, USA), og 1,2 ml saltsyre (37 %) (Honeywell, Charlotte, NC, USA). Prøvene ble mettet med nitrogengass i 10-15 sekunder, før de ble inkubert i varmeskap i 22-24 timer på 105 °C. Deretter ble 1 ml prøve overført til 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert (sentrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) i 5-10 minutter ved 14 000 xg. Etter at 100 µl supernatant var overført til 1,5 ml analyserør og dampet til tørrhet med nitrogengass, ble prøvene løst ut i 1 ml lithium loading buffer, pH 2,2 (Biochrom, Cambridge, UK) og analysert med Biochrom 30 aminosyreanalysator (Biochrom 30+ aminosyreanalysator. Biochrom Co, Cambridge, Storbritannia). Aminosyrene ble påvist ved postkolonne-derivatisering med ninhydrin, detektert ved 440 og 540 nm, identifisert ved hjelp av kjente standarder basert på retensjonstiden, og kvantifisert relativt til internstandard. Proteininnholdet ble beregnet ved å subtrahere et vannmolekyl fra hver av de 17 proteinbundne aminosyrene, før disse ble summert.

3.3.2.5 Frie aminosyrer

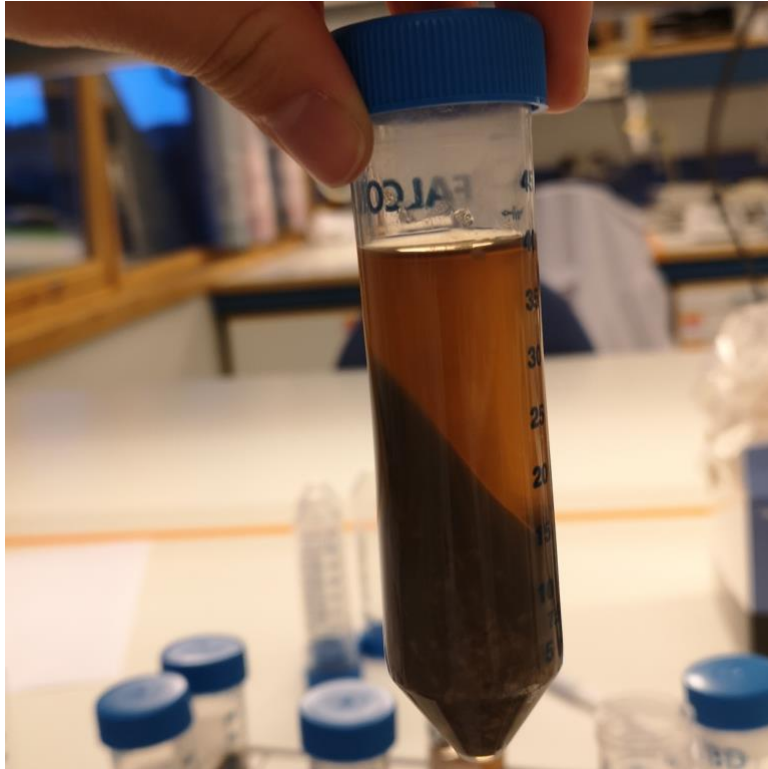
Analyse av frie AA ble utført som beskrevet i Mæhre et al. (Mæhre, Edvinsen, Eilertsen & Elvevoll, 2016) modifisert fra Mierke-Klemeyer et al. (Mierke-Klemeyer et al., 2008). Frysetørket materiale ble veid ut til omtrent 200 mg i 15 ml sentrifugerør, tilsatt 9 ml milliQ H₂O og 1 ml internstandard, 20 mM DL-norleucine (Sigma-Aldrich, MO, USA,) før massen ble homogenisert i 15 sekunder med en ultraturrax (Ultra-turrax T 25 basic. IKA-Werke, Staufen, Tyskland). Etter tilsetning av 1 ml 35 % sulfosalisyre (SSA, og sentrifugering ved 4000 xg i 10 minutter (25 °C), ble 1 ml supernatant overført til 1,5 ml eppendorfrør og ytterligere sentrifugert (sentrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 14 000 xg i 10 minutter. Til slutt ble 200 µl supernatant og 800 µl lithium loading buffer, pH 2,2 (Biochrom, Cambridge, UK) pipettert over i 1,5 ml analyserør og analysert på aminosyreanalysatoren.

3.3.3 Enzymatisk hydrolyse

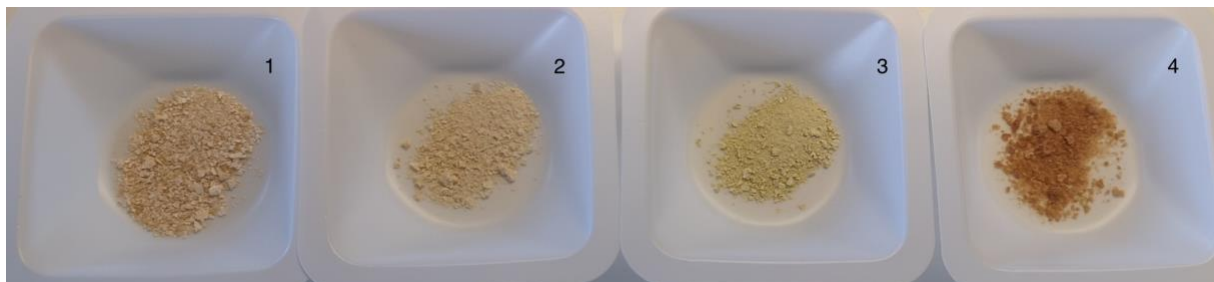
Fire paralleller på omtrent 65 g frysetørket materiale ble veid ut i hver sin 1 liter glassbeholder. Materialet ble tilsatt 150-180 ml destillert H₂O (dH₂O) og varmet opp til 55 °C (figur 8). Tre av parallellene ble tilsatt alkalase (Novozymes, Bagsvard, Danmark), tilsvarende 0,2 % av prøvevekten. Den fjerde parallellen ble ikke tilsatt enzym. Etter 1 time på 55 °C, med omrøring, ble hver parallell fordelt på fem 50 ml sentrifugerør og plassert i vannbad på 90 °C i 20 minutter. Deretter ble rørene sentrifugert (Eppendorf AG Centrifuge 5804, Hamburg, Tyskland) ved 8900 xg i 40 minutter (2 x 20 minutter). Materialet skilte seg i ulike faser (figur 9). Vannfasen ble pipetert ut i nye 50 ml sentrifugerør og ytterligere sentrifugert ved 8900 xg i 10 minutter. Den klare vannfasen ble pipetert ut og frysetørket. De ferdige frysetørkede hydrolysatene er vist i figur 10.



Figur 8: Frysetørket materiale oppvarmet, tilsatt væske og enzym under omrøring.



Figur 9: Sediment- og vannfase etter sentrifugering.



Figur 10: Frysetørket hydrolysat fra *Parastichopus tremulus* (1), *Cucumaria frondosa* (2), *Porosira glacialis* (3) og mesopelagiske organismer (4).

3.3.4 Biologisk aktivitet

3.3.4.1 Antidiabetisk aktivitet: DPP-IV hemmende aktivitet

Metoden ble utført som beskrevet i Van Amerongen (Van Amerongen, 2009), med modifikasjoner forklart i Lacroix & Li-Chan (Lacroix & Li-Chan, 2012). Først ble hydrolysat fortynnet til en konsentrasjon på 1 mg/ml med Tris-HCl pH 8,0. Til ulike brønner i en 96-brønners mikroplate ble det tilsatt tre paralleller 25 μ l fortynnet hydrolysat, 25 μ l 100 mM Tris-HCl, og 25 μ l Diprotin A (Sigma-Aldrich, MO, USA). Etter at 25 μ l 1,6 mM Gly-Pro-p-nitroanilide (Merck, Kenilworth, NJ, USA) var inkludert i alle brønnene ble mikroplaten dekket til med sølvpapir og inkubert i 10 minutter ved 37 °C. Deretter ble 50 μ l DPP-IV (Merck,

Kenilworth, NJ, USA) tilsatt alle brønnene og mikroplaten ble igjen dekket til og inkubert i 60 minutter ved 37 °C. For å stoppe reaksjonen ble 100 µl 1 M natriumacetat, pH 4,0, tilsatt til hver brønn. Absorbansen (Abs) ble målt ved 405 nm med en Envision® mikroplateleser (Waltham, MA, USA) og aktiviteten ble regnet ut ved bruk av formelen under.

$$\% \text{ DPP IV hemming} = \frac{\text{Abs (negativ)} - \text{Abs (prøve)}}{\text{Abs (negativ)}} * 100 \%$$

Prøvene ble regnet som aktive dersom enzymaktiviteten var >50 % høyere sammenlignet med kontroll.

3.3.4.2 Antidiabetisk aktivitet: PTP1B inhibering

PTP1B inhiberingsassay ble utført som beskrevet av Minor (Minor, 2006). Først ble buffer laget med; 2,975 g 25 mM HEPES, 1,461 g 50 mM NaCl, 0,32 g 2 mM dithiothreitol, 0,365 g 2,5 mM ethylendiamin tetraacetic acid (EDTA) og 5 mg bovine serum albumin (BSA) i 500 ml milli-Q H₂O, pH ble justert til 7,2 med HCl. Enzymet, substratet og den positive kontrollen ble klargjort ved å tilsette 18 µl PTP1B (Merck Calbiochem, Darmstadt, Tyskland), 50 µl 6,8-difluoro-4-metyllumbelliferylfosfat (DiFMUP) (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA) og 80 µl PTP inhibitor i henholdsvis 30 ml, 25 ml og 5 ml buffer. Alle kjemikalier og enzymer som ikke er spesifisert i denne metodebeskrivelsen var fra Sigma-Aldrich, (MO, USA). Hydrolysat ble først fortynnet til 400 µg/ml med dH₂O. Til ulike brønner i en svart, flatbrønnet mikroplate (Nunc 96-brønn Thermo-Fisher Scientific, MA, USA) ble tre paralleller 25 µl fortynnet hydrolysat, 25 µl buffer (negativ kontroll) og 25 µl positiv kontroll tilsatt i ulike brønner. Etter tilsetning av 50 µl enzymløsning (PTP1B) til alle brønnene, ble platen inkubert i mørket i 30 minutter ved 37 °C (Termaks, Heraeus). Før ytterligere 10 min inkubering ved 37 °C i mørket, ble 25 µl substratløsning tilsatt alle brønnene. Til slutt ble fluorescensen målt ved eksitasjon 360 nm og emisjon 465 nm i en DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, CA, USA). Absorbansverdiene ble brukt for å regne ut resultatet med formelen under.

$$\% \text{ PTP1B aktivitet} = \frac{\text{Prøve} - \text{Positiv kontroll}}{\text{Negativ kontroll} - \text{Positiv kontroll}} * 100$$

Prøvene ble regnet som aktive dersom enzymaktiviteten var < 30 %, usikre ved 30-50 % og inaktive ved > 60 %, sammenlignet med kontroll. Aktive prøver ble undersøkt videre i en fortynningsrekke med konsentrasjoner på 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml og 10 µg/ml.

3.3.4.3 Antiinflammatorisk aktivitet

Antiinflammatorisk aktivitet ble undersøkt ved bruk av THP-1 celler, en human akutt leukemi monocyttcellelinje (ATCC no TIB-202), dyrket ved sterile betingelser. Tilstanden til cellekulturen ble vurdert ved å visuelt kontrollere cellene i mikroskop før assayet ble utført og arbeidet ble gjennomført i sterilbenk. Alle kjemikalier og enzymer som ikke er spesifisert i denne metodebeskrivelsen var fra Sigma-Aldrich, (MO, USA). Cellekulturen ble overført til 50 ml sentrifugerør før de ble sentrifugert i Multifuge 1 s, Heraeus (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA) i 5 minutter ved 150 xg. Væsken ble aspirert fra sentrifugerøret, og cellepelleten ble løst ut i 25 ml RPMI-1640 lavt endotoksin (tilsatt 10 % føtalt kalveserum (Biowest, Nuaille, Frankrike), 10 µg/ml Gentamycin (Biochrom, Berlin, Tyskland) og 2 mM L-ala-L-glu (Biowest, Nuaille, Frankrike)) varmet opp til 37 °C. Konsentrasjonen av levende celler ble estimert ved å tilsette 50 µl cellekultur og 450 µl 0,4 % trypanblå i et 1,5 ml eppendorfrør, før 10 µl ble overført til et tellekammer og telt under mikroskop. Cellekulturen ble fortynnet til en konsentrasjon på 10⁶ celler/ml, med RPMI-1640 (tilsatt 50 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)) (37 °C) og 100 µl av denne løsningen ble tilsatt hver brønn i en 96-brønners mikroplate nunclon™ (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA). Mikroplaten ble inkubert i 48 timer i Heracell Vios 160i CO₂incubator (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA) (37 °C, 5 % CO₂), med kontroll i mikroskop etter 24 timer. Videre ble cellene vasket med fosfatbufret saltløsning, før 100 µl nytt mediet (37 °C) ble tilsatt brønnene og mikroplaten ble inkubert i ytterligere 24 timer (37 °C, 5 % CO₂). Mediet ble fjernet fra brønnene og ny RPMI-1640 (37 °C) ble tilsatt mikroplaten med ulik mengde utfra om det ble tilsatt prøve (80 µl), lipopolysakkarid (LPS) kontroll (90 µl), eller cellekontroll (100 µl). Etter at 10 µl av de ulike hydrolysatenes (1 mg/ml fortynnet i dH₂O) i to paralleller var tilsatt sine respektive brønner, ble mikroplaten inkubert i 1 time (37 °C, 5 % CO₂). Deretter ble 10 µl LPS (1 ng/ml) tilsatt alle brønnene med prøve og LPS kontroll. Til slutt ble mikroplaten inkubert i 6 timer (37 °C, 5 % CO₂), og deretter fryst ned (-80 °C) frem til analysen med sandwich ELISA-assay.

3.3.4.4 TNF sandwich ELISA-assay

Først ble bufferløsningene laget, tris-bufret saltløsning (TBS) med 12,1 g TRIZMA base og 88 g NaCl løst i 1 liter dH₂O, pH ble justert til 7,4 med HCl, før TBS ble fortynnet 1:10. Dietanolaminbuffer 1 M ble laget med 100 mg MgCl₂ og 97 ml dietanolamin i 1 liter dH₂O pH ble justert til 9,8 med HCl. Vaskebuffer ble laget med 500 µl 0,5 % Tween i 1 liter TBS, mens blokkingsbuffer og assayløsning ble laget med henholdsvis 2 % BSA og 1% BSA i TBS. Alle

kjemikalier og enzymer som ikke er spesifisert i denne metodebeskrivelsen var fra Sigma-Aldrich, (MO, USA).

En Nunc Maxisorp 96F-well ELISA plate (VWR, PA, USA) ble tilsatt 100 µl anti-human TNF purified (eBioscience, CA, USA) (2 µg/ml fortynnet i TBS) i alle brønnene og inkubert på 4 °C til neste dag. Etter inkuberingen ble platen vasket med vaskebuffer i Aquamax4000 platevasker (Molecular device, CA, USA) før 200 µl blokkingsbuffer ble tilsatt hver av brønnene. Platen ble deretter inkubert med risting i mikroplaterister TiMix 5 (Edmund Bühler GmbH, Tyskland) i 1 time på romtemperatur, før den igjen ble vasket. Brønnene ble tilsatt 5 µl prøve, 5 µl LPS kontroll og 50 µl cellekontroll opparbeidet fra det antiinflammatoriske assayet, før assayløsning ble tilsatt slik at totalvolumet ble 100 µl i hver brønn. Human TNF recombinant protein (eBioscience, CA, USA) ble brukt som standard. En standardkurve ble laget med en startkonsentrasjon på 2000 pg/ml, seriefortynnet 1:2 med assayløsning hvor den siste fortynningen bare besto av assayløsning. Det ble tilsatt 100 µl standardkurve i to paralleller, og platen ble inkubert med risting i 2 timer på romtemperatur før vaskeprogrammet ble gjentatt. Anti-human TNF biotin (eBioscience, CA, USA) ble fortynnet til 3 µg/ml i assayløsning og 100 µl ble tilsatt alle brønnene. Platen ble inkubert med risting på romtemperatur i 1 time, før den ble vasket og 100 µl ExtrAvidin®-alkalisk fosfatase (fortynnet 1:20 000) ble tilsatt i hver brønn. Videre ble P-nitrophenyl fosfat (pNPN) løst ut og fortynnet til 1 mg/ml i 1 M dietanolamin buffer, mens platen inkuberte med risting i ytterligere 30 minutter på romtemperatur. Til slutt ble platen vasket med «ELISA SOAK WASH», før 100 µl pNPN substratløsning ble tilsatt alle brønnene, og platen ble inkubert i 45-50 minutter på romtemperatur. Platen ble avlest i DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, CA, USA) ved 405 nm. Absorbansverdiene fra LPS kontrollen og prøvene ble tolket i sammenheng med standardkurven og deretter multiplisert med 20 siden prøvene var fortynnet 1:20. Prøvene ble da uttrykt som TNF verdi og LPS kontrollen var et mål for fullstendig produksjon av TNF. Prosentvis hemming ble deretter regnet ut med formelen under.

$$\% \text{ Hemming} = 100 - \frac{\text{TNF verdi}}{\text{LPS kontroll}} * 100\%$$

Prøvene ble regnet som aktive ved >50 % hemming, usikre ved 40-50 % hemming og inaktive ved <40 % hemming, sammenlignet med kontroll. Prøver som ble regnet som usikre eller aktive ble undersøkt videre i en fortynningsrekke med konsentrasjoner på 100 µg/ml, 50 µg/ml og 25 µg/ml.

3.3.4.5 Antioksidativ aktivitet: Oksygenradikal absorbansekapasitet

ORAC ble utført som beskrevet i Dávalos et al. (Dávalos, Gómez-Cordovés & Bartolomé, 2004) med modifikasjoner. Fosfatbuffer ble laget til en konsentrasjon på 75 mM med NaHPO₄ (Merck, Darmstadt, Tyskland) løst i dH₂O, før pH ble justert til 7,4 ved bruk av HCl. Fluorescein natrium salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) og 2,2-azobis-(isobuttersaureamidin) dihydroclorid (AAPH) (Sigma-Aldrich, MO, USA) ble fortynnet i fosfatbuffer til en konsentrasjon på henholdsvis 88 nM og 153 mM. Videre ble 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylkroman-2-karboksylysyre (trolox) (Sigma-Aldrich, MO, USA) brukt som standard og trolox fortynnet med fosfatbuffer til følgende konsentrasjoner ble brukt til standardkurve 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, og 0 µM (bare fosfatbuffer).

I ulike brønner i en svart Nunc 96-brønners mikroplate (Thermo Scientific, MA, USA) ble det tilsatt tre paralleller 25 µl fortynnet hydrolysat, 25 µl standardkurve og 200 µl plateblank (kun fosfatbuffer). Alle brønnene, med unntak av plateblank, ble tilsatt 125 µl fluorescein natrium salt før platen ble inkubert i 15 minutter på 37 °C. Etter inkuberingen ble 50 µl AAPH tilsatt alle brønnene, unntatt plateblank, og fluorescensen ble målt ved 485 nm (eksitasjon) og 520 nm (emisjon) i SpectraMax i3 (Molecular Devices, CA, USA). Prøvene ble avlest kinetisk hvert minutt i 1 time og 20 minutter, og platen ble ristet 5 sekunder før første avlesning og 3 sekunder før hver avlesning. En regresjonsligning ble opparbeidet ved å regne ut arealet mellom kurvene ved å trekke fra 0-verdien i standardkurven. Denne ligningen ble brukt til å regne ut AOC i hydrolysatet og multiplisert med 8 siden prøvene var fortynnet 1:7. Fordi trolox ble brukt som standard i assayet ble resultatene oppgitt i troloxequivalenter (TE) per gram prøve.

4 Resultater

4.1 Biokjemisk sammensetning

Den biokjemiske sammensetningen ble bestemt ved hjelp av biokjemiske analyser på våtvekt, frysetørket materiale og frysetørket hydrolysat. Vann- og askeinnholdet ble undersøkt fra våtvekt, mens fett- og proteininnhold ble undersøkt på frysetørket materiale og hydrolysat.

Den biokjemiske sammensetningen i *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer er vist i tabell 2, hvor vann- og askeinnholdet er undersøkt på våtvekt, mens protein- og fettinnholdet er beregnet fra tørrvekt. Det laveste vanninnholdet hadde mesopelagiske organismer med 74,8 %, mens *P. tremulus* hadde det høyeste vanninnholdet med 89,3 %. Askeinnholdet varierte fra 2,8-5,7 %, hvor *P. glacialis* hadde det høyeste innholdet og mesopelagiske det laveste.

Tabell 2: Oversikt over den biokjemiske sammensetningen i *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis*, og mesopelagiske organismer i våtvekt. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=3$) \pm standardavvik.

Biokjemisk sammensetning	% av våtvekt			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Vann	89,3 \pm 0,1	81,9 \pm 0,8	87,6 \pm 0,4	74,8 \pm 0,3
Aske	3,60 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	5,7 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1
Protein	3,7*	8,6*	3,1*	10,6*
Fett	0,8*	6,2*	1,7*	12,9*

*Regnet ut fra tørrvekt

4.1.1 Proteiner

4.1.1.1 Totale aminosyrer

Proteininnholdet i frysetørket materiale fra de fire artene, *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer varierte mellom 233 og 361 mg/g, vist i tabell 3. Det høyeste proteininnholdet hadde mesopelagiske organismer, mens *P. glacialis* hadde det laveste. Innholdet av EAA varierte mellom 88 og 151 mg/g, hvor *P. glacialis* hadde det laveste innholdet og mesopelagiske organismer det høyeste.

Tabell 3: Aminosyresammensetning i frysetørket materiale av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis*, og mesopelagiske organismer. Inndelt i ni essensielle aminosyrer og ti ikke-essensielle aminosyrer. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). ID = ikke detektert. EAA = essensielle aminosyrer, NEAA = ikke-essensielle aminosyrer.

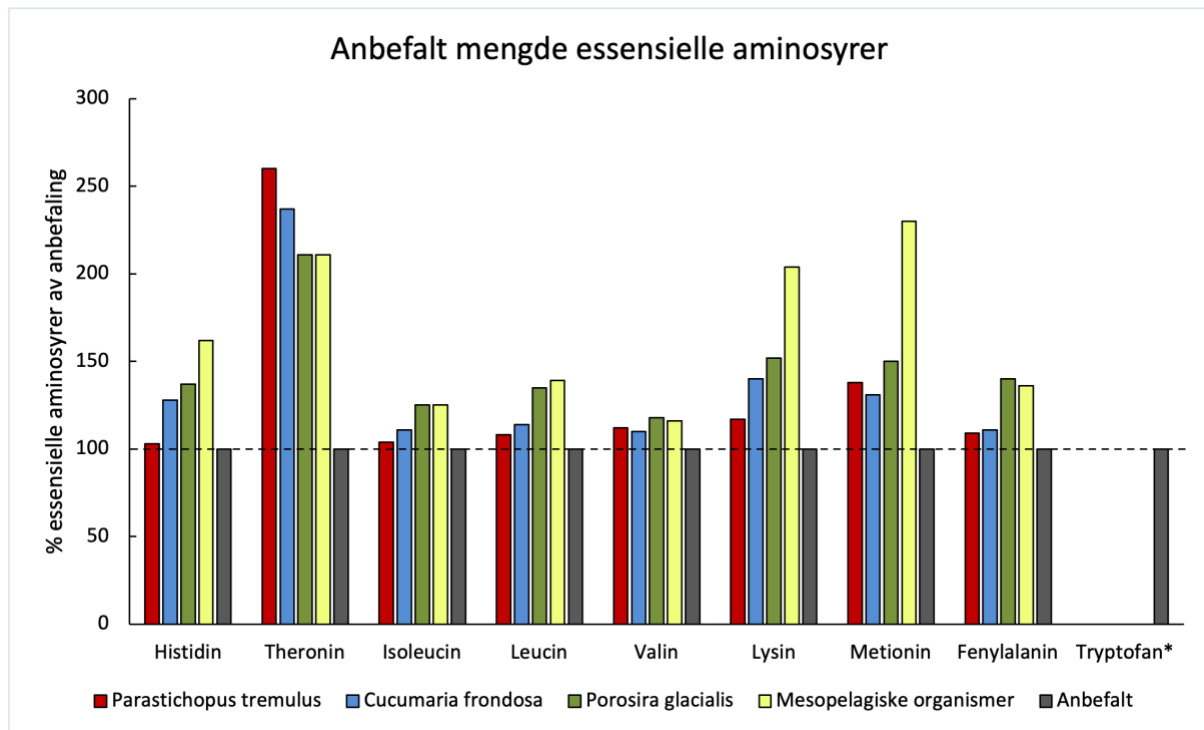
Aminosyrer	Milligram/gram frysetørket materiale			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Histidin	4,9 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1	4,8 \pm 0,9	8,8 \pm 1,1
Theronin	18,9 \pm 0,6	18,8 \pm 0,0	11,3 \pm 2,1	17,5 \pm 1,0
Isoleucin	9,9 \pm 0,1	11,5 \pm 0,2	8,7 \pm 1,7	13,5 \pm 1,0
Leucin	20,1 \pm 0,2	23,2 \pm 0,1	18,6 \pm 4,0	29,6 \pm 1,5
Valin	13,8 \pm 0,3	14,8 \pm 0,1	10,7 \pm 2,2	16,3 \pm 1,3
Lysin	16,6 \pm 0,0	21,7 \pm 0,1	15,9 \pm 2,4	33,1 \pm 1,7
Metionin	7,0 \pm 0,5	7,2 \pm 0,1	5,6 \pm 0,6	13,3 \pm 2,6
Fenylalanin	13,1 \pm 0,2	14,5 \pm 0,1	12,4 \pm 2,4	18,6 \pm 1,8
Tryptofan*	ID	ID	ID	ID
Σ EAA	104,3 \pm 1,8	118,3 \pm 0,3	87,9 \pm 16,3	150,8 \pm 12,0
Arginin	27,4 \pm 0,5	30,7 \pm 0,2	15,7 \pm 2,2	25,3 \pm 3,5
Alanin	19,0 \pm 0,8	21,8 \pm 0,7	22,7 \pm 2,3	24,4 \pm 1,1
Asparaginsyre**	30,5 \pm 1,0	30,8 \pm 0,2	24,3 \pm 3,2	32,8 \pm 2,7
Cystein	4,1 \pm 0,2	5,4 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2	4,1 \pm 0,7
Glysin	33,2 \pm 2,0	30,2 \pm 0,1	12,5 \pm 2,1	20,8 \pm 0,9
Glutaminsyre**	50,0 \pm 1,1	54,9 \pm 0,3	32,6 \pm 4,5	57,6 \pm 4,1
Prolin	20,0 \pm 1,2	19,5 \pm 0,4	15,6 \pm 1,4	15,5 \pm 1,0
Serin	17,3 \pm 0,6	19,9 \pm 0,0	11,0 \pm 1,7	16,9 \pm 1,3
Tyrosin	10,7 \pm 0,3	13,0 \pm 0,1	8,8 \pm 1,9	12,9 \pm 2,2
Taurin***	ID	3,0 \pm 0,1	ID	10,8 \pm 0,2
Σ NEAA	212,3 \pm 6,8	226,2 \pm 0,1	145,0 \pm 19,6	210,3 \pm 17,6
Σ Proteinbundet AA	316,6 \pm 8,5	344,5 \pm 0,2	232,9 \pm 35,8	361,1 \pm 29,5
EAA/NEAA	0,49	0,52	0,61	0,71

*Tryptofan ødelegges under syrehydrolysen og ble ikke detektert.

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

*** Taurin er ikke inkludert i utregningen av proteinbundet AA.

De anbefalte mengdene EAA per protein er presentert i figur 11. Alle de fire artene hadde et innhold av de EAA over referansenivåene fastsatt av Verdens helseorganisasjon (World Health Organization, 2007).



Figur 11: Oversikt over prosentvis innhold av essensielle aminosyrer av anbefalt mengde (World Health Organization, 2007). Linjen ved 100 % indikerer om innholdet er over referansenivået. *Tryptofan ble ikke detektert med denne metoden å beregne proteininnhold.

Proteininnholdet i frysetørket hydrolysat fra *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer er presentert i tabell 4 og varierte mellom 120 og 588 mg/g. Hydrolyse kontrollene (HK) hadde et proteininnhold mellom 89 og 555 mg/g. Hydrolysatet hadde et høyere innhold av EAA og NEAA i alle artene sammenlignet med HK. Det hydrolysatet med lavest innhold av EAA og NEAA var *C. frondosa* med henholdsvis 24 mg/g og 96 mg/g, mens hydrolysatet av mesopelagiske organismer hadde det høyeste innholdet av EAA og NEAA med henholdsvis 239 mg/g og 348 mg/g. Dette var også tilfelle i HK hvor innholdet av EAA og NEAA var henholdsvis 17 mg/g og 72 mg/g i *C. frondosa* og 222 mg/g og 332 mg/g i mesopelagiske organismer. Glutaminsyre var den aminosyren som dominerte i alle prøvene. Hydrolysatet fra mesopelagiske organismer inneholdt alle aminosyrene som kunne detekteres med denne metoden.

Tabell 4: Aminosyresammensetning i frysetørket hydrolysat (H) og hydrolyse kontroll (HK) av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis*, og mesopelagiske organismer. Aminosyrene er inndelt i ni essensielle aminosyrer og ti ikke-essensielle aminosyrer. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). ID = ikke detektert. EAA = essensielle aminosyrer, NEAA = ikke-essensielle aminosyrer.

Aminosyrer	Milligram/gram hydrolysat							
	<i>Parastichopus tremulus</i>		<i>Cucumaria frondosa</i>		<i>Porosira glacialis</i>		Mesopelagiske organismer	
	H	HK	H	HK	H	HK	H	HK
Histidin	2,3 \pm 0,0	ID	ID	ID	4,8 \pm 0,1	ID	12,6 \pm 0,2	11,5 \pm 0,3
Theronin	12,8 \pm 0,3	6,0 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	13,2 \pm 0,6	6,3 \pm 0,1	28,3 \pm 0,5	25,5 \pm 0,0
Isoleucin	4,6 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	ID	8,9 \pm 0,5	3,5 \pm 0,1	21,6 \pm 0,4	19,9 \pm 0,2
Leucin	10,7 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2	5,3 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2	18,4 \pm 0,8	7,6 \pm 0,0	47,3 \pm 0,8	44,5 \pm 0,5
Valin	7,7 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	3,4 \pm 0,0	2,2 \pm 0,1	12,4 \pm 0,5	6,1 \pm 0,1	27,5 \pm 0,7	25,5 \pm 0,4
Lysin	7,1 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	7,6 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	21,7 \pm 0,4	11,7 \pm 0,1	58,1 \pm 0,6	56,2 \pm 1,1
Metionin	3,5 \pm 0,3	2,7 \pm 0,2	ID	ID	7,0 \pm 0,3	2,7 \pm 0,0	18,9 \pm 0,1	17,4 \pm 0,5
Fenylalanin	4,9 \pm 0,1	4,1 \pm 0,2	ID	ID	10,9 \pm 0,5	4,1 \pm 0,0	24,9 \pm 0,1	21,7 \pm 0,4
Tryptofan*	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Σ EAA	53,6\pm0,4	31,2\pm0,6	23,8\pm0,0	17,3\pm0,2	97,2\pm3,7	42,1\pm0,1	239,3\pm2,8	222,2\pm3,4
Arginin	26,9 \pm 1,4	10,1 \pm 0,2	9,5 \pm 1,0	7,0 \pm 0,5	17,5 \pm 1,3	6,6 \pm 0,3	43,5 \pm 0,7	43,6 \pm 1,0
Alanin	19,5 \pm 0,0	6,8 \pm 0,0	11,1 \pm 0,2	8,7 \pm 0,0	34,7 \pm 1,5	28,5 \pm 0,0	40,0 \pm 0,7	38,1 \pm 0,9
Asparaginsyre**	21,4 \pm 0,4	8,8 \pm 0,0	8,6 \pm 0,0	5,8 \pm 0,1	33,2 \pm 1,2	22,4 \pm 0,1	52,4 \pm 0,5	48,8 \pm 1,0
Cystein	ID	ID	ID	ID	ID	ID	5,2 \pm 0,2	4,6 \pm 0,0
Glysin	44,9 \pm 0,1	7,8 \pm 0,2	20,1 \pm 0,1	13,8 \pm 0,0	14,4 \pm 0,6	8,8 \pm 0,1	35,2 \pm 0,7	34,7 \pm 0,6
Glutaminsyre**	46,9 \pm 1,2	20,2 \pm 0,1	32,8 \pm 0,2	28,6 \pm 0,1	46,3 \pm 1,8	31,7 \pm 0,0	99,4 \pm 1,0	96,0 \pm 1,8
Prolin	21,3 \pm 0,0	5,9 \pm 0,6	6,9 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	24,7 \pm 1,6	21,7 \pm 0,8	26,1 \pm 0,6	24,6 \pm 0,9
Serin	13,8 \pm 0,3	4,8 \pm 0,0	6,8 \pm 0,0	4,5 \pm 0,1	13,0 \pm 0,5	6,6 \pm 0,3	26,2 \pm 0,3	23,9 \pm 0,0
Tyrosin	4,6 \pm 0,0	2,8 \pm 0,1	ID	ID	9,4 \pm 0,2	4,2 \pm 0,0	20,4 \pm 0,3	18,0 \pm 0,5
Taurin***	ID	2,4 \pm 0,0	9,7 \pm 0,2	10,3 \pm 0,5	ID	ID	22,9 \pm 0,2	24,8 \pm 0,7
Σ NEAA	199,4\pm3,4	67,3\pm0,6	95,9\pm1,1	71,6\pm0,1	193,1\pm8,7	130,5\pm0,7	348,3\pm5,0	332,3\pm6,6
Σ Proteinbundet AA	253,0\pm3,8	98,5\pm1,2	119,7\pm1,1	88,9\pm0,1	290,3\pm12,4	172,6\pm0,9	587,6\pm7,9	554,5\pm10,0
EAA/NEAA	0,27	0,46	0,25	0,24	0,50	0,32	0,69	0,67

*Tryptofan ødelegges under syrehydrolysen og ble ikke detektert.

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

*** Taurin er ikke inkludert i utregningen av proteinbundet AA.

4.1.1.2 Frie aminosyrer

Frie aminosyrer ble bestemt ved å fjerne store proteiner og peptider med SSA. I tabell 5 er frie aminosyrer i det frysetørkede materiale av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer presentert og innholdet varierte mellom 8,9 og 42,7 mg/g prøve. Det høyeste innholdet av frie aminosyrer hadde mesopelagiske organismer og *P. tremulus* hadde det laveste.

Tabell 5: Frie aminosyrer i frysetørket materiale fra *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Inndelt i ni essensielle aminosyrer og ti ikke-essensielle aminosyrer. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). ID = ikke detektert. EAA = essensielle aminosyrer, NEAA = ikke-essensielle aminosyrer.

Aminosyrer	Milligram/gram prøve			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Histidin	ID	ID	ID	ID
Theronin	ID	ID	ID	1,2 \pm 0,1
Isoleucin	ID	ID	ID	1,0 \pm 0,0
Leucin	ID	ID	1,5 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
Valin	ID	ID	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
Lysin	ID	1,4 \pm 0,0	1,9 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1
Metionin	ID	ID	ID	ID
Fenylalanin	ID	ID	ID	1,3 \pm 0,1
Tryptofan*	ID	ID	ID	ID
Σ EAA	ID	1,4 \pm 0,0	4,3 \pm 0,3	11,5 \pm 0,0
Arginin	2,0 \pm 0,7	1,5 \pm 0,3	ID	4,7 \pm 0,3
Alanin	1,5 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	11,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,0
Asparaginsyre**	ID	ID	5,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0
Cystein	ID	ID	ID	1,3 \pm 0,1
Glysin	0,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	4,4 \pm 0,1
Glutaminsyre**	3,6 \pm 1,0	5,1 \pm 0,4	7,9 \pm 0,0	ID
Prolin	ID	ID	8,2 \pm 0,6	2,5 \pm 0,3
Serin	ID	ID	ID	1,4 \pm 0,0
Tyrosin	ID	ID	ID	1,7 \pm 0,4
Taurin	1,2 \pm 0,0	3,3 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	11,0 \pm 0,1
Σ NEAA	8,9 \pm 1,5	13,5 \pm 0,6	35,1 \pm 1,1	31,2 \pm 1,0
Σ Frie AA	8,9 \pm 1,5	14,9 \pm 0,6	39,3 \pm 1,4	42,7 \pm 1,0

*Tryptofan ble ikke detektert, da det ødelegges under syrehydrolysen.

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

4.1.2 Fett

Fettinnholdet i det frysetørkede materialet av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer var på henholdsvis 7 %, 25 %, 12 % og 43 %, vist i tabell 6. Etter hydrolysering hadde alle prøvene et fettinnhold <0,5 %.

Tabell 6: Fettprosent og standardavvik fra frysetørket materiale og hydrolysat av *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=3$).

	% fett i frysetørket materiale			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Frysetørket materiale	7,3 \pm 0,4	24,8 \pm 2,2	11,9 \pm 0,1	42,7 \pm 1,0
Hydrolysat	0,0 \pm 0,0	0,16 \pm 0,03	0,17 \pm 0,12	0,41 \pm 0,03

Fettsyresammensetningen i *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer er presentert som prosentandel av totale fettsyrer i tabell 7. Den høyeste andelen PUFA hadde *P. glacialis* med 52 %, mens de andre artene *P. tremulus*, *C. frondosa*, og mesopelagiske organismer hadde henholdsvis 42 %, 30 % og 46 %. Innholdet av omega-3-fettsyrer var henholdsvis 30 %, 28 %, 42 % og 44 % i *P. glacialis*, *P. tremulus*, *C. frondosa*, og mesopelagiske organismer. EPA var den PUFA som dominerte i de fleste artene, med unntak av mesopelagiske organismer, hvor C20:4 n-3 hadde den største prosentvise andelen. *P. tremulus* og mesopelagiske organismer inneholdt 11 % og 2 % omega-6-fettsyrer som førte til et n-6/n-3 forhold på 0,37 og 0,04.

Tabell 7: Fettsyresammensetningen (arealprosent) i frysetørket materiale *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Kategorisert i uidentifiserbare, mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. Forholdet mellom omega 3 og omega 6 er inkludert og resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik (n=3). ID = Ikke detektert.

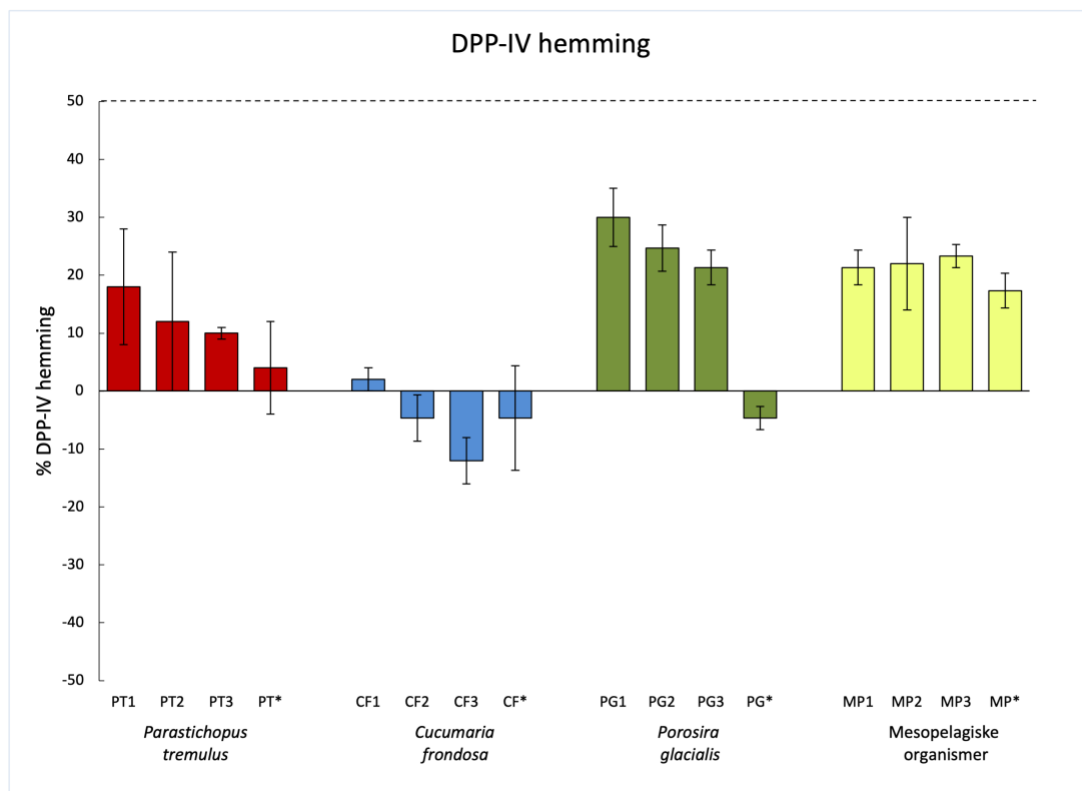
Fettsyrer	% fettsyresammensetning			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Uidentifiserbare fettsyrer	11,4 \pm 0,0	34,4 \pm 8,8	16 \pm 9,7	0,6 \pm 0,1
C14:0	3,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,7	6,6 \pm 0,2	8,5 \pm 1,6
C16:0	7,6 \pm 0,1	3,5 \pm 0,7	2,4 \pm 2,6	18,3 \pm 3,2
C18:0	6,8 \pm 0,1	4,4 \pm 1,0	ID	2,0 \pm 0,3
C20:0	1,6 \pm 0,0	ID	ID	ID
Σ mettede fettsyrer	19,6\pm0,3	10,3\pm2,4	9,0\pm2,8	28,8\pm5,1
C12:1	ID	ID	1,5 \pm 0,2	ID
C14:1	4,4 \pm 0,1	ID	ID	ID
C16:1 n-7	7,8 \pm 0,4	19,0 \pm 2,4	5,0 \pm 4,6	3,0 \pm 0,4
C18:1 n-7	7,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	ID	1,3 \pm 0,1
C18:1 n-9	2,5 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1	16,3 \pm 0,1	6,0 \pm 0,4
C20:1 n-9	1,7 \pm 0,0	ID	ID	14,5 \pm 1,0
C24:1 n-9	3,4 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	ID	0,9 \pm 0,1
Σ enumettede fettsyrer	27,3\pm0,7	25,8\pm2,9	22,8\pm4,9	24,7\pm1,9
C16:2 n-4	ID	1,1 \pm 0,1	2,3 \pm 2,2	ID
C16:3 n-4	ID	ID	7,9 \pm 0,0	ID
C18:2 n-6 LA	1,4 \pm 0,0	ID	ID	1,7 \pm 0,3
C18:3 n-3 ALA	ID	ID	ID	1,5 \pm 0,3
C18:4 n-3	3,0 \pm 0,0	3,8 \pm 0,6	5,2 \pm 0,0	4,2 \pm 0,2
C20:4 n-3	1,1 \pm 0,0	0,9 \pm 0,2	ID	29,2 \pm 0,8
C20:4 n-6 ARA	10,0 \pm 0,1	ID	ID	ID
C20:5 n-3 EPA	16,0 \pm 0,1	23,7 \pm 7,0	32,0 \pm 0,2	3,2 \pm 0,6
C22:5 n-3	1,2 \pm 0,0	ID	ID	ID
C22:6 n-3 DHA	9,2 \pm 0,1	ID	4,8 \pm 0,0	6,1 \pm 1,2
Σ flerumettede fettsyrer	41,8\pm0,4	29,5\pm7,9	52,3\pm2,5	45,9\pm3,4
n-3	30,4 \pm 0,3	28,4 \pm 7,8	42,0 \pm 0,2	44,2 \pm 3,1
n-6	11,3 \pm 0,1	0	0	1,7 \pm 0,3
n-6/n-3	0,4 \pm 0,4	0	0	0,0 \pm 0,1

4.2 Biologisk aktivitet

Hydrolysatene ble undersøkt for tre ulike bioaktiviteter. Antidiabetiskeffekt ble undersøkt i DPP-IV og PTP1B inhiberingsassay. Antiinflammatorisk aktivitet ble undersøkt med hemming av TNF, og målt i et sandwich ELISA assay. Antioksidativ kapasitet ble undersøkt i et ORAC assay.

4.2.1 Antidiabetisk aktivitet: DPP-IV inhibering

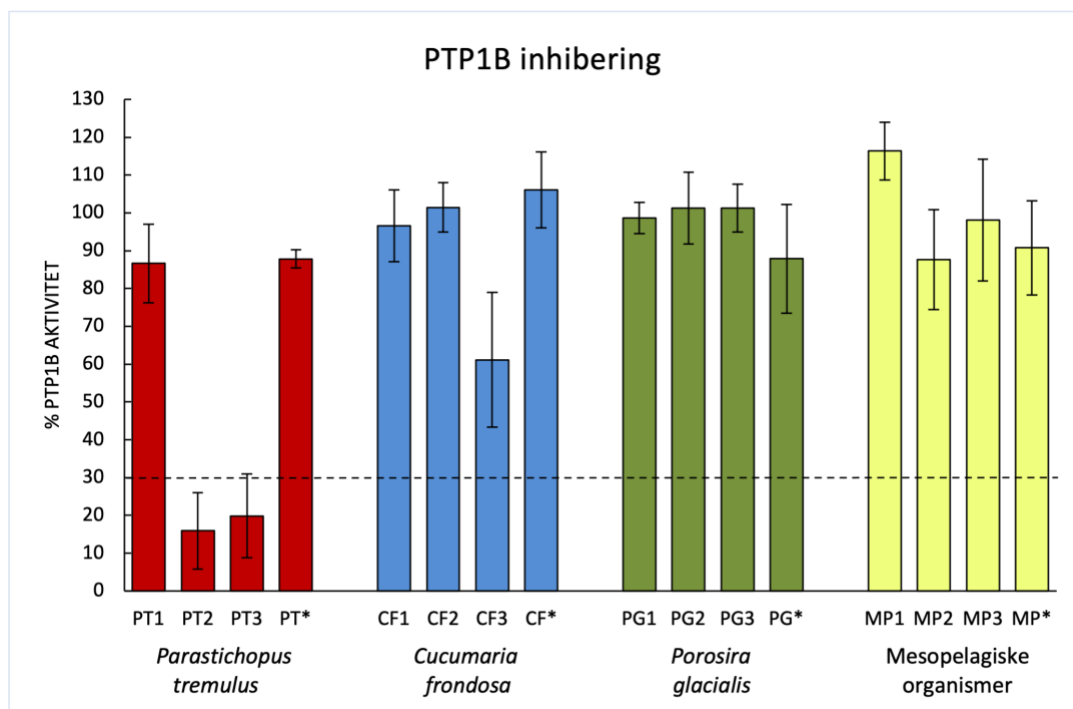
Antidiabetisk aktivitet ble undersøkt ved inhibering av DPP-IV enzymet. For at hydrolysatet skulle bli regnet som aktivt måtte DPP-IV enzymet inhiberes >50 %, sammenlignet med assay kontrollen. Det ble ikke funnet antidiabetiskeffekt ved DPP-IV inhibering i noen av artene, vist i figur 12.



Figur 12: Antidiabeteseffekt målt gjennom DPP-IV inhiberingsassay. Linjen ved 50 % inhibering viser terskelpunktet hvor prøvene regnes som aktive. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=3$). PT = *P. tremulus*, CF = *C. frondosa*, PG = *P. glacialis* og MP = Mesopelagiske organismer.

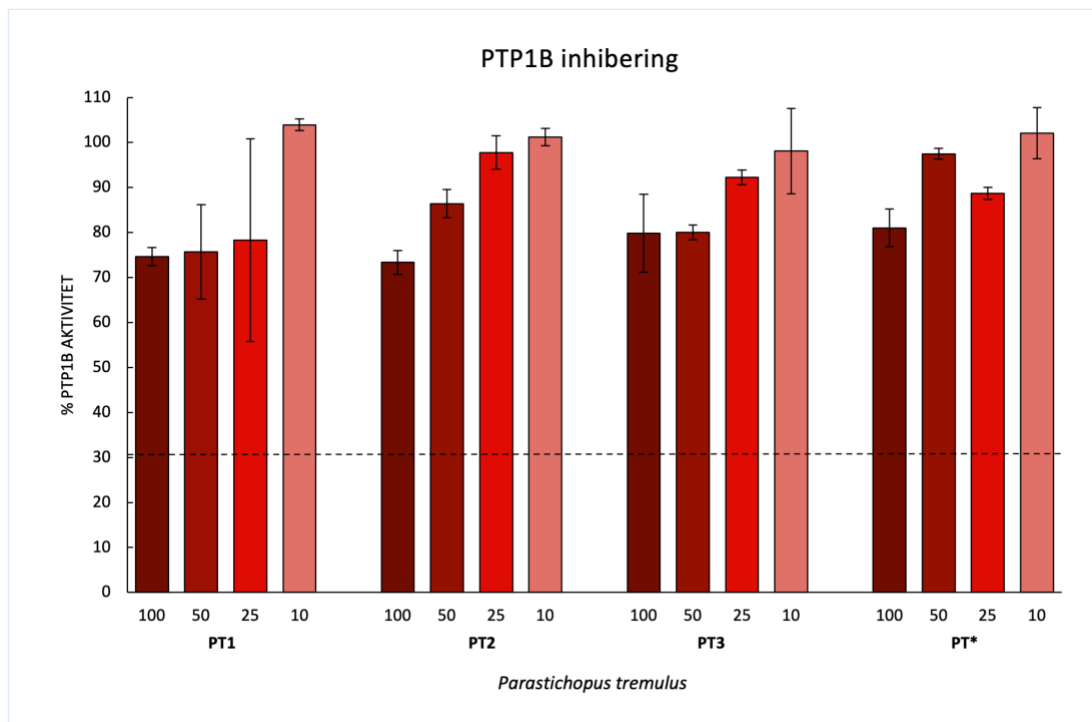
4.2.2 Antidiabetisk aktivitet: PTP1B inhibering

Antidiabetisk aktivitet ble undersøkt i et PTP1B inhiberingsassay som prosentvis hemming PTP1B aktivitet. Dersom prøvene skulle regnes som aktive måtte enzymaktiviteten være redusert til <30 %. Figur 13 viser at to av *P. tremulus* prøvene hemmet PTP1B enzymet nok til at det hadde <30 % aktivitet. Analysen ble gjentatt med *P. tremulus* i en fortynningsrekke. Ingen av de andre artene, *C. frondosa*, *P. glacialis*, og mesopelagiske organismer, kunne regnes som aktive.



Figur 13: Antidiabeteseffekt målt med PTP1B assay. Linjen ved 30 % aktivitet er en øvre terskel hvor prøven regnes som aktiv. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=3$). XX1-3 = hydrolysat, XX* = hydrolyse kontroll

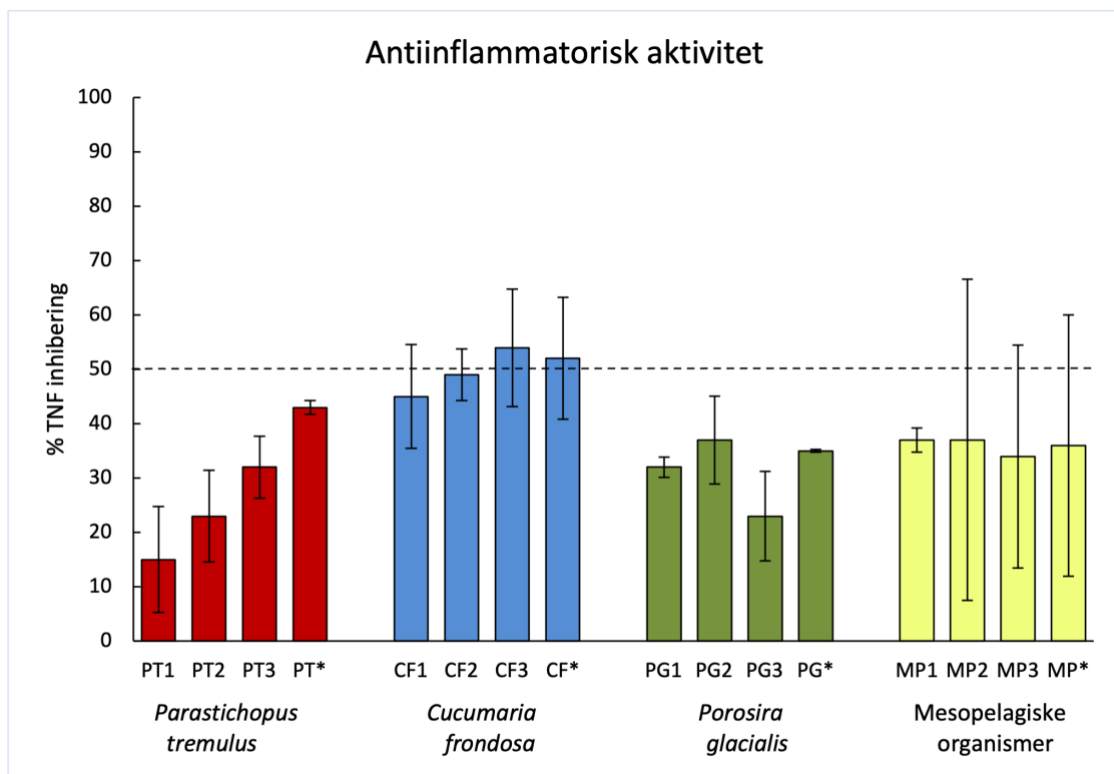
Tre hydrolysat (PT1-3) og en HK (PT*) av *P. tremulus* ble undersøkt for antidiabetiskeffekt, i et PTP1B assay, med konsentrasjonene 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml og 10 µg/ml. Det ble ikke funnet antidiabetiskeffekt ved hemming av PTP1B enzymaktivitet i hydrolysat eller HK av *P. tremulus* vist i figur 14.



Figur 14: Antidiabeteseffekt målt med PTP1B assay. Prøvene var fortynnet 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml og 10 µg/ml. Linjen ved 30 % aktivitet er en øvre terskel hvor prøven regnes som aktiv. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (n=3). PT1-3 = hydrolysat, PT* = hydrolyse kontroll.

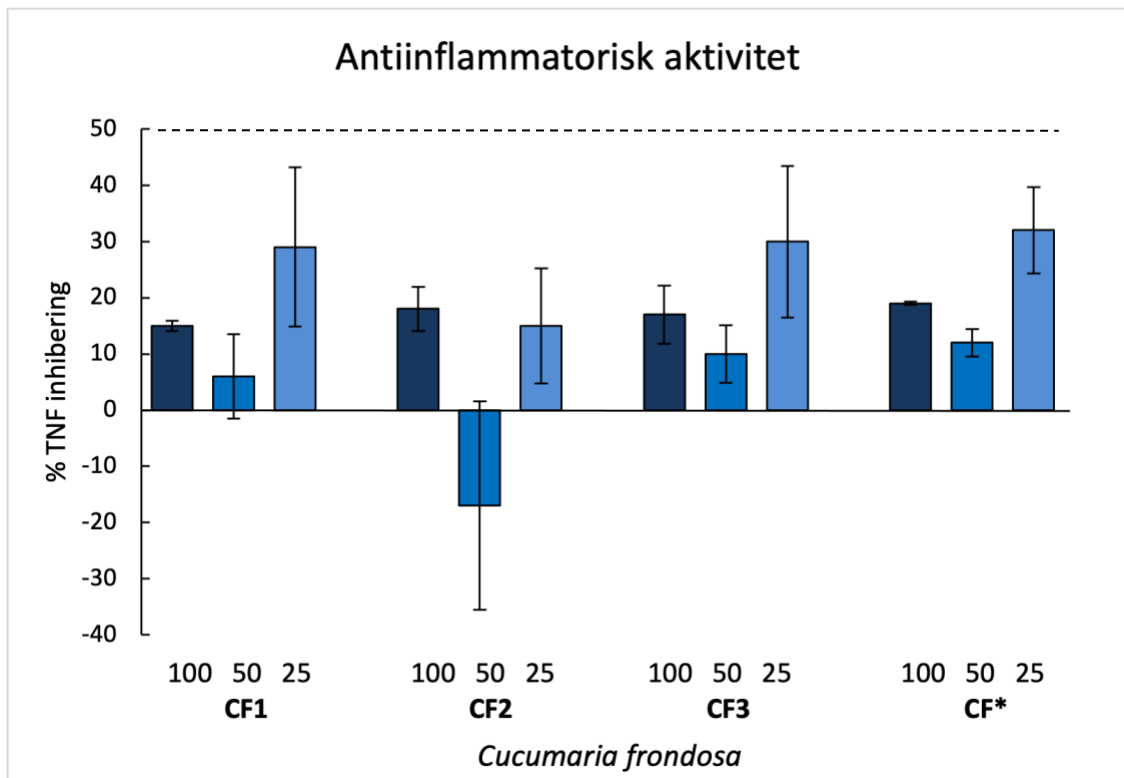
4.2.3 Antiinflammatorisk aktivitet: Sandwich ELISA

Sandwich ELISA assay målte TNF inhibering i THP1-celler etter de hadde blitt stimulert med LPS. For at hydrolysatet skulle regnes som aktivt måtte hemmingen av TNF være >50 %. To av hydrolysatene av *C. frondosa* inhiberte TNF >50 %, presentert i figur 15. Analysen ble gjentatt med *C. frondosa* i en fortynningsrekke. Det ble ikke funnet antiinflammatorisk aktivitet på LPS-indusert TNF produksjon i hydrolysatet fra de andre artene, *P. tremulus*, *P. glacialis*, og mesopelagiske organismer, i dette forsøket.



Figur 15: Antiinflammatorisk aktivitet ble undersøkt med LPS-indusert TNF produksjon i THP1-celler. Linjen ved 50 % er terskelen for når prøven regnes som aktiv. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). XX1-3 = hydrolysat, XX* = hydrolyse kontroll

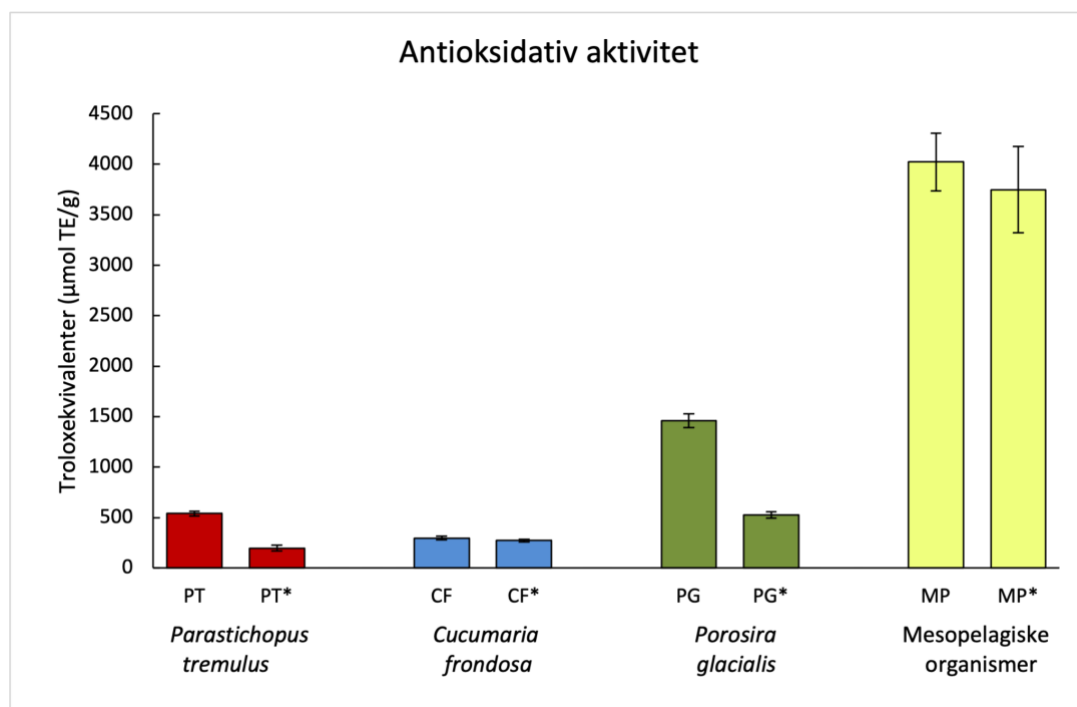
Tre hydrolysat (CF1-3) og en HK (CF*) av *C. frondosa* ble undersøkt for antiinflammatorisk aktivitet med konsentrasjonene 100 µg/ml, 50 µg/ml og 25 µg/ml presentert i figur 16. Det ble ikke funnet antiinflammatorisk aktivitet på LPS-indusert TNF produksjon i hydrolysat eller HK av *C. frondosa* i dette forsøket. Ingen av prøvene inhiberte TNF produksjonen >50 %.



Figur 16: Antiinflammatorisk aktivitet undersøkt med LPS-indusert TNF produksjon i THP1-celler i en fortynningsserie med 100 µg/ml, 50 µg/ml og 25 µg/ml fra tre hydrolysat (CF1-3) og en hydrolyse kontroll (CF*) av *Cucumaria frondosa*. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (n=2). Linjen ved 50 % er terskelverdien for når prøven regnes som aktiv.

4.2.4 Antioksidativ aktivitet: ORAC

Antioksidativ aktivitet ble undersøkt med et ORAC assay og er presentert i figur 17 i $\mu\text{mol TE/g}$ tørrstoff. *P. tremulus* og *C. frondosa* ble fortynnet til 1 mg/ml, mens *P. glacialis* og mesopelagiske organismer ble fortynnet til henholdsvis 0,25 mg/ml og 0,1 mg/ml, deretter ble dette fortynnet med 8 gangen i brønnen og det er den fortynningen som er brukt i utregningen. Det var stor variasjon i AOC mellom artene, hvor mesopelagiske organismer hadde den høyeste verdien i både hydrolysat og HK med henholdsvis 4021 $\mu\text{mol TE/g}$ og 3747 $\mu\text{mol TE/g}$. Hydrolysat av *P. tremulus*, *C. frondosa* og *P. glacialis* hadde verdier på henholdsvis 540 $\mu\text{mol TE/g}$, 297 $\mu\text{mol TE/g}$ og 1460 $\mu\text{mol TE/g}$. I samtlige arter var den AOC høyere i PH enn i HK.



Figur 17: Antioksidativ aktivitet undersøkt med ORAC i hydrolysat ($n=9$) og hydrolyse kontroll (*) ($n=3$). Resultatet er presentert som gjennomsnitt troloxekvivalenter \pm standardavvik.

5 Diskusjon

5.1 Biokjemisk sammensetning

De lite utnyttede artene i denne oppgaven var alle fullverdige proteinkilder som inneholdt alle AA som kunne detekteres med metoden brukt i denne oppgaven. Mesopelagiske organismer hadde det høyeste protein- og fettinnholdet samt den høyeste andelen EAA.

Proteininnholdet i *P. tremulus* ble målt til 317 mg/g frysetørket materiale, noe som tilsvarer 3,7 % av våtvekt. Næringsinnholdet i *P. tremulus* varierer med sesong og om analysene blir tatt av hele dyret eller bare av kroppsveggen (Kjerstad et al., 2020). Proteininnholdet har derfor variert mellom 2,3 % og 5,5 % våtvekt i tidligere studier (Kjerstad et al., 2020; Ringvold & Kjerstad, 2018). Den dårligste kvaliteten og det laveste næringsinnholdet ble rapportert å være i juni. Dette samsvarer med gyteperioden, juni til september, uten at det kunne konkluderes med at dette var grunnen til den dårligere kvaliteten (Kjerstad et al., 2020). I andre sjøpølsearter, slik som *C. frondosa*, er det rapportert om lavere kvalitet i gytelsesongen (Shearer, Åsgård, Andorsdóttir & Aas, 1994). Dette speiles også i kommersiell utnyttelse av sjøpølse der Island stopper fangst av *C. frondosa* i en måned på sommeren grunnet gyting og påfølgende dårligere kvalitet (Kjerstad et al., 2020). Juni var den måneden individene i denne oppgaven ble fangstet, noe som kan ha gitt et suboptimalt proteininnhold sammenlignet med *P. tremulus* fangstet utenfor gyteperiode. I tillegg er det vist at fryse- og tineprosessen kan redusere noe av proteininnholdet i sjøpølsene (Tan, Lin, Zu, Zhu & Cheng, 2018). *P. tremulus* hadde en EAA/NEAA ratio på 0,49. På tross av at det ikke ble detektert tryptofan, en EAA, var dette betydelig høyere enn tidligere EAA/NEAA ratio på 0,35, i samme art (Ringvold & Kjerstad, 2018). Denne ratioen tilsvarer sjøpølsen *Stichopus hermanni*, en art allerede etablert på markedet, men var fortsatt langt lavere enn EAA/NEAA ratioen til den verdifulle *A. japonicus* på 0,67 (Wen, Hu & Fan, 2010). Proteinkvaliteten til *P. tremulus* er dermed akseptabel sammenlignet med andre sjøpølsearter på markedet, men ikke i toppsjiktet.

Den biokjemiske sammensetningen i *C. frondosa* er bedre undersøkt enn *P. tremulus* ettersom arten har blitt fangstet i Canada siden 1971 (Liu, Dave, Trenholm, Ramakrishnan & Murphy, 2021; Mamelona, Saint-Louis & Pelletier, 2010a; Zhong, Khan & Shahidi, 2007). *C. frondosa* er allerede etablert på det kinesiske markedet og det er dermed fastslått at denne arten har et akseptabelt næringsinnhold. Proteininnholdet i *C. frondosa* ble målt til 345 mg/g frysetørket materialet, tilsvarende på 8,6 % våtvekt. Dette var litt høyere, men tilsvarer tidligere rapportert proteininnhold, 337 mg/g, i tørrvekt (Zhong et al., 2007). Individene i denne oppgaven ble

fangstet i januar og dette kan ha vært positivt for kvaliteten og proteininnholdet. Dette er fordi gytesesongen for *C. frondosa* i arktiske farvann er om sommeren og, det er som nevnt, registrert dårligere kvalitet av denne arten under gytesesong (Hamel & Mercier, 1995; Hamel & Mercier, 1996). Ratioen EAA/NEAA var 0,52, noe som er akseptabelt sammenlignet med andre sjøpølsearter på markedet hvor det ble funnet en ratio mellom 0,38 og 0,60 (Wen et al., 2010), men lavere enn for *C. frondosa* undersøkt i tidligere studier, 0,59 (Mamelona, Saint-Louis & Pelletier, 2010b; Zhong et al., 2007).

Proteininnholdet i marine mikroalger er lite undersøkt ettersom fettinnholdet har blitt ansett som mer interessant. Dette er også tilfelle for *P. glacialis*, der det har blitt fokusert spesielt på hvordan øke lipidutbytte (Artamonova et al., 2017; Svenning et al., 2020). Næringsinnholdet i kieselalger er ofte presentert i askefri tørrvekt (AFDW), ettersom algene består av en stor mengde aske. Proteininnholdet i *P. glacialis* ble målt til 233 mg/g, tilsvarende 41,5 % AFDW. Dette var lavt sammenlignet med de tre andre artene i denne oppgaven og sammenlignet med tidligere rapportert på 306 mg/g, tilsvarende 51,3 % AFDW (Giæver, 2020). Selv om proteininnholdet var lavt, var EAA/NEAA ratioen høy, 0,61, og tilsvarende tidligere funn, 0,59.

Mesopelagiske organismer skilte seg ut med det høyeste proteininnholdet, 361 mg/g i frysetørket materialet og 10,6 % av våtvekt, og den høyeste EAA/NEAA ratioen, 0,71, i oppgaven. Mesopelagiske organismer besto av en blanding av *M. muelleri* og *E. arcticus*. Disse artene har blitt analysert hver for seg tidligere, der det ble rapportert et proteininnhold på 12,3 % og 15,5 % i henholdsvis *M. muelleri* og *E. arcticus*. Proteininnholdet i denne oppgaven ble målt til å være noe lavere, men metoden brukt i studiet var AOAC basert på Kjeldahls metode (Alvheim, Kjellevold, Strand, Sanden & Wiech, 2020; Latimer, 2016). Mesopelagiske organismer hadde et høyt innhold av den frie aminosyren taurin. Taurin har vist seg å ha positive antioksidative egenskaper som blant annet beskytter kroppen fra oksidativt stress knyttet til inflammasjon (Marcinkiewicz & Kontny, 2014). Denne aminosyren har også vært knyttet opp mot forebygging av DM2 og har vist gunstig effekt på insulinresistens (Piao et al., 2018; Ripps & Shen, 2012).

Metoden som ble brukt til å bestemme proteininnholdet i denne oppgaven kan ha vært underestimert. Dette kommer av at metoden som ble brukt bryter ned proteinene til AA ved bruk av syrehydrolyse før molekylvekten til et H₂O molekyl subtraheres bort fra hver AA og alle AA summeres (Moore & Stein, 1963). Ulempen med denne metoden er at den vil kunne underestimere mengden protein ettersom syrehydrolysen ødelegger tryptofan fullstendig, mens

andre svovelholdige aminosyrer, som cystein og metionin kan påvirkes moderat (Mæhre, Dalheim, Edvinsen, Elvevoll & Jensen, 2018). I tillegg er dette en dyr metode som ikke er tilgjengelig for alle, og det er dermed ikke den mest utbredte for å bestemme proteininnholdet. Litteraturen på noen av artene brukt i denne oppgaven har bestemt proteininnholdet med bruk av Kjeldahls metode (Alvheim et al., 2020; Ringvold & Kjerstad, 2018). Det er en metode der det totale innholdet av nitrogen blir målt og deretter ganget med en kofaktor (Latimer, 2016). Denne kofaktoren kan tilpasses de ulike artene, men arter som er lite undersøkt, slik som artene i denne oppgaven, blir ofte multiplisert med den generelle kofaktoren på 6,25. Kjeldahls metode vil som regel overestimere mengden protein, ettersom at det også finnes andre nitrogenholdige forbindelser i disse artene enn AA (Mæhre et al., 2018). Valg av metode kan derfor føre til ulikt målt proteininnhold i samme materialet og kan forklare noen av forskjellene mellom resultatene i denne oppgaven og tidligere litteratur.

Alle artene undersøkt kan karakteriseres som fullverdige og gode proteinkilder. En god proteinkilde kjennetegnes ved at den har et høyt proteininnhold, alle AA er til stede og mengden EAA er over referansenivået fastsatt av Verdens helseorganisasjon, presentert i tabell 1 (Comerford & Pasin, 2016; World Health Organization, 2007). Samtlige arter i denne oppgaven hadde et EAA-innhold over de fastsatte referansenivåene, vist i figur 11, og kan derfor omtales som høykvalitetsproteiner. Vanligvis er theronin, metionin, lysin og tryptofan de begrensede EAA i et protein (Damodaran & Parkin, 2017). I artene undersøkt var det de tre førstnevnte EAA som hadde det høyeste innholdet sammenlignet med referansenivået. Dette er et insentiv til å utnytte disse artene i større grad enn i dag.

I tillegg til proteininnholdet er fettinnholdet og spesielt fettsyresammensetningen viktig å karakterisere i arter som skal gå til konsum. *P. tremulus* hadde det laveste fettinnholdet av artene undersøkt med 0,8 % våtvekt. Dette var i det øvre sjiktet sammenlignet med hva som var rapportert tidligere 0,4-0,9 % (Kjerstad et al., 2020; Ringvold & Kjerstad, 2018). I likhet med proteininnholdet varierte fettinnholdet utfra sesong og det laveste fettinnholdet i *P. tremulus* ble rapportert i juni (Kjerstad et al., 2020). I et av de tidligere studiene på *P. tremulus* ble det brukt Norsk Standard 9402 (Ringvold & Kjerstad, 2018). Dette er en metode utarbeidet på laks der det brukes filter for å skille væske- og sedimentsfasen. I denne oppgaven ble materiale sentrifugert istedenfor å bruke filter. Dette kan ha hatt betydning for hvorfor fettinnholdet i oppgaven var høyere enn tidligere rapportert i samme måned. I tillegg har det i tidligere studier på andre sjøpølsearter, deriblant *C. frondosa* og *A. japonicus*, blitt rapportert en høyere fettprosent i innvollene enn i kroppsvæggen (Hossain et al., 2020; Lee et al., 2012). I denne

oppgaven ble *P. tremulus* undersøkt med innvoller. Selv om *P. tremulus* inneholdt lite fett, var fettsyresammensetningen god. Innholdet av omega-3-fettsyrer var på 30 %, mens det tidligere har blitt rapportert 9,2 % (Ringvold & Kjerstad, 2018). Dette er en stor forskjell som delvis kan forklares av de ulike metodene som ble brukt, men det var også en større andel fettsyrer som ikke var inkludert i den nevnte studien (Ringvold & Kjerstad, 2018). Hvis disse hadde vært detektert eller presentert hadde kanskje dette utjevnet noen av forskjellene i fettsyresammensetningen.

I sjøpølsen *C. frondosa* ble fettinnholdet målt til 25 % i frysetørket materialet, tilsvarende 6,2 % av våtvekt. Dette var mye høyere enn det som var rapportert i tidligere artikler, hvor det i Zhong et al. ble målt 0,7 % fett i fersk *C. frondosa*, mens Mamelona et al. rapporterte 2 % fett i innvollene alene (Mamelona et al., 2010b; Zhong et al., 2007). Fettsyresammensetningen i *C. frondosa* samsvarte med tidligere studier ved at det ble funnet spesielt høyt innhold av EPA (Mamelona et al., 2010b; Zhong et al., 2007). Tidligere studier viste også et lavt innhold av DHA, sammenlignet med EPA. I tillegg sank innholdet av DHA etter rehydrering av *C. frondosa* (Zhong et al., 2007). Dette samsvarer med at fryse- og tineprosessen har blitt rapportert å påvirke næringsinnholdet i sjøpølser i negativ forstand (Tan et al., 2018). Det kan forklare hvorfor det ikke ble detektert DHA i denne oppgaven. Mengden PUFA i *C. frondosa* var den laveste blant artene undersøkt i denne oppgaven, samtidig som den hadde det høyeste innholdet av uidentifiserte fettsyrer. Det er en mulighet for at noen av de uidentifiserte fettsyrene er PUFA, men at fettsyrestandardene brukt i denne oppgaven ikke inkluderer disse og derfor ble de ikke identifisert med gasskromatografen. Selv om mengden PUFA var lav, var mengden omega-3-fettsyrer tilsvarende resultatet i *P. tremulus*.

Den arten i oppgaven som er mest interessant på grunn av sitt høye og gode fettinnhold er *P. glacialis*. I denne oppgaven ble det funnet et fettinnhold på 21 % AFDW, dette samsvarte med tidligere studier som har brukt samme metode (Svenning et al., 2020). *P. glacialis* hadde et spesielt høyt innhold av EPA noe som samsvarte med tidligere studier (Artamonova et al., 2017; Svenning, Dalheim, Eilertsen & Vasskog, 2019; Svenning et al., 2020). Ettersom *C. frondosa* spiser mikroalger og lever i samme område som *P. glacialis* er det naturlig å tro at den er en del av livsgrunnlaget til sjøpølsen. Dette viser seg i at fettsyresammensetningen i disse artene har en viss likhet. De største likhetene ligger i at de ikke inneholder omega-6-fettsyrer og har et høyt innhold av EPA.

Det høyeste fettinnholdet ble derimot funnet i mesopelagiske organismer med 13 % av våtvekt. Materialet i denne oppgaven var en blanding av mesopelagiske organismer og det gjør det utfordrende å sammenligne direkte med tidligere studier som har sortert fangstene før analyse. Det ble valgt ikke å sortere trålhalet i denne oppgaven, ettersom det er tid- og kostnadskrevende å sortere så små organismer og dermed ikke realistisk i stor skala. I tillegg er små, fettrike usløyde organismer svært utsatt for enzymatisk nedbrytning av bakterie- og innvollsenzymer. Dette kan føre til rask nedbrytning og forringelse av PUFA ved eksponering for høye temperaturer og lys (Lynum & Rustad, 1997). For å sortere disse artene måtte de blitt utsatt for lys, noe som igjen ville ført til et suboptimalt fettinnhold. Trålhalet det mesopelagiske materialet ble tatt fra inneholdt *M. muelleri* og *E. arcticus* og disse har blitt undersøkt tidligere hver for seg. Fettinnholdet ble målt til 18 % og 9 % av våtvekt i henholdsvis *M. muelleri* og *E. arcticus* (Alvheim et al., 2020). Dette samsvarer godt med resultatet i oppgaven, da fettinnholdet ligger mellom disse to artene. Fettsyresammensetningen i denne oppgaven og en tidligere studie varierte vesentlig ved at PUFA dominerte i denne oppgaven, mens mettede fettsyrer dominerte i studiet. Samtidig var det likheter ved at innholdet av omega-6-fettsyrer var lavt (Alvheim et al., 2020). Disse forskjellene kan komme fra den enzymatisk hydrolyseringen som skjer *post mortem*. I denne oppgaven ble det funnet et lavt innhold av EPA og DHA sammenlignet med det som er forventet. Disse fettsyrene er svært utsatt for harskning og det reelle innholdet av disse kunne vært høyere hvis organismene hadde blitt håndtert optimalt. Derfor er det etterspørsel etter en bedre fangst- og håndteringsmetode som kan bevare kvaliteten på fisken bedre enn den blir i dag (Hauge, 2018).

For å undersøke fettinnhold brukes ofte Folchs metode som er utarbeidet på materiale med 80 % vann. Ettersom denne metoden ikke er tilpasset frysetørket materiale i tillegg til at det har vært utfordringer knyttet til høye standardavvik, ble det vurdert og prøvd ut ulike modifikasjoner av Folchs. En modifikasjon utarbeidet av Svenning et al., optimalisert for *P. glacialis*, ble vurdert til å være den beste for å unngå økt mengde løsemiddel, i tillegg til at det ga lave standardavvik (Svenning et al., 2020). I Folch et al. er det forklart at væsken skal filtreres, for å skille væske og sedimentsfasen. For å optimalisere utbytte i denne oppgaven ble det istedenfor valgt å sentrifugere materialet for å unngå at fettstoffer satt seg fast i filteret (Folch et al., 1957). Fettinnholdet økte i samtlige arter ved bruk av den valgte metoden, sammenlignet med den originale Folchs metoden. Dette kan være en av grunnene til at fettinnholdet i denne oppgaven var høyere enn rapportert i tidligere litteratur. Fettinnholdet var som forventet veldig varierende mellom artene undersøkt i denne oppgaven, men fettsyresammensetningen var god

og alle artene hadde et høyt prosentvist innhold av PUFA der størsteparten var omega-3-fettsyrer. Inntaket av alle artene undersøkt vil kunne være med på å utligne n-6/n-3 ratioen i kostholdet, ettersom ratioen var under 1. Dette vil være gunstig ettersom inntak av langkjedede omega-3-fettsyrer er nødvendig for normal utvikling av foster og kognitiv utvikling. I tillegg er det kjent at, spesielt, EPA er betennelsesdempende ved at det hemmer syntesen av TNF (Olsen, 2017)

I tillegg til at den biokjemiske sammensetningen ble bestemt for de lite utnyttede artene i denne oppgaven, ble det produsert PH. Dette ble utført på en slik måte at det skulle være mulig å oppskalere produksjonen av PH ved eventuelle funn. Valgene som ble gjort ble derfor tatt med hensyn til hva som er realistisk i stor skala. Med bakgrunn i dette ble det brukt alkalase for å hydrolysere materialet, ettersom som enzymet ikke er pH sensitivt og det har en høy temperaturtoleranse. Alkalase kan brukes ved pH 6,5-10, som passer godt til marine organismer ettersom disse ofte har en litt basisk pH, og ved temperaturer mellom 60-75 °C (Novozymes, 2021). Det er kostnadskrevende å justere pH og hvis dette kan unngås vil det være billigere å bruke i stor skala. I tillegg har alkalase blitt brukt over langt tid for å produsere marine bioaktive peptider og det ble derfor ansett som et godt valg (Tacias-Pascacio et al., 2020). I denne oppgaven ble det produsert tre paralleller PH med enzym og en parallell HK uten enzym. Dette var for å undersøke om den biokjemiske sammensetningen og mengden bioaktive peptider i materialet ble påvirket av enzymet eller om det var prosessen med oppvarming som bidro til forskjellene. Proteininnholdet i PH og HK ble undersøkt og i alle artene var proteininnholdet i PH høyere enn i HK. I *C. frondosa* og mesopelagiske organismer var forskjellen veldig liten mellom PH og HK, mens det var store forskjeller i *P. tremulus* og *P. glacialis*. Dette viser at enzymet har hatt ulik effekt i de ulike artene. Artene undersøkt er en del av ulike trofiske nivå med ulik diett. Det er derfor naturlig at de inneholder ulike protein som kan reagere forskjellig på enzymet som ble brukt. Proteinutbytte i *P. glacialis* og mesopelagiske organismer gikk opp etter hydrolysering, mens den gikk ned i *P. tremulus* og *C. frondosa*. Det ble ikke funnet en forklaring på dette. En tidligere studie på *C. frondosa* rapporterte om et tilsvarende proteininnhold i det originale materialet og i hydrolysatet (Mamelona et al., 2010a). Dette ble forklart med at proteinene ble brutt ned til mindre peptider, men at ingen av AA ble ødelagt eller borte og det totale proteininnholdet ble derfor målt til det samme i begge materialene. Det er også tydelig at noen av AA ikke har blitt med videre til hydrolysatet ettersom EAA/NEAA ratioen sank i samtlige PH og HK. Fettinnholdet var <0,5 % i samtlige hydrolysat noe som er viktig for å unngå oksidasjon av lipider som kan påvirke kvaliteten på PH (Petrova et al., 2018).

En av ulempene med PH fra marint råstoff er uønsket lukt og smak. PH av mesopelagiske organismer hadde en karakteristisk fiskelukt og en sterk farge. Dette vil være lite gunstig ved eventuell videre utnyttelse.

5.2 Biologisk aktivitet

Artene i denne oppgaven ble undersøkt for antioksidativ, antiinflammatorisk og antidiabetisk aktivitet. Disse aktivitetene ble valgt ut med bakgrunn i hva som er relevant å se på knyttet til de økende utfordringene med livsstilssykdommer og overvekt.

Det ble funnet antioksidativ kapasitet i alle artene, der PH fra mesopelagiske organismer hadde høyest AOC med 4021 $\mu\text{mol TE/g}$. Aminosyrene med svovelholdige og/eller aromatiske sidekjerder, samt lysin og histidin er antatt å ha AOC, (Sarmadi & Ismail, 2010). PH fra mesopelagiske organismer hadde et høyere innhold av flere av disse AA sammenlignet med de andre artene undersøkt. I tillegg hadde PH av mesopelagiske organismer et høyere innhold av den frie AA taurin. Taurin har som nevnt en høy AOC og har påvist effekt mot oksidativ stress (Piao et al., 2018). Dette PH hadde en rødlig farge som kan tyde på et innhold av astaxanthin, et pigment som gir rødfarge til krepsdyr og laks, samt er en veldig effektiv antioksidant (Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela & Goycoolea, 2006).

I tidligere studier der AOC i *C. frondosa* har blitt undersøkt i ORAC ble det rapportert om verdier mellom 140-800 $\mu\text{mol TE/g}$ (Mamelona et al., 2007; Mamelona et al., 2010a). Verdiene var avhengig av hvilken del av organismen som ble undersøkt og hvordan materialet ble forbehandlet. I Mamelona et al., der innvollene til *C. frondosa* ble undersøkt, ble det frysetørkede materialet tilført iso-propanol før alkalase og enzymprosessen ble utført over 16 timer (Mamelona et al., 2010a), sammenlignet med 1 time som var tilfelle i denne oppgaven. Dette kan ha ført til at en større andel av materialet var brutt ned til mindre peptider som kan ha endret egenskapene og ført til høyere bioaktivitet. I nevnte artikkel ble det rapportert om lav grad av hydrolyse med bruk av alkalase, med 5,6 % (Mamelona et al., 2010a). Dette kan bety at det fortsatt er potensial for å øke bioaktiviteten ved å endre hydrolysebetingelsene som igjen muligens kan øke AOC.

Antioksidativ kapasitet inkluderer en rekke prosesser i kroppen, derfor er det anbefalt å bruke flere antioksidative assayer med ulike prinsipp for å undersøke den totale AOC. Eksempelvis ORAC og ferri-reduserende antioksidantkraft (FRAP) som baserer seg på henholdsvis

hydrogenatomoverføring og singlet elektronoverføring (Huang et al., 2005). Tidsmessig ble det bare utført et antioksidativt assay, og ORAC ble valgt ettersom det er utført på flere av artene tidligere og måler AOC over tid i motsetning til FRAP som måler ved «endpoint».

Det ble ikke funnet antiinflammatorisk aktivitet på LPS-indusert TNF i noen av artene i denne oppgaven, på tross av at *C. frondosa*, ble regnet som aktiv i det første forsøket. Da forsøket ble gjentatt lot ikke resultatet seg replikere. Tidligere studier har funnet antiinflammatorisk aktivitet i polysakkarider i *C. frondosa* (Hu et al., 2016; Stefaniak-Vidarsson et al., 2017). Et studie rapporterte at fucoidan, et polysakkarid fra skinnet til *C. frondosa*, reduserte TNF produksjonen i mus føret på en diett bestående av høyt fett og høyt sukker innhold (Hu et al., 2016). I et annet studie var det usikkerhet rundt effekten. Dette var fordi det ikke kunne utelukke at oksidativt stress hadde påvirket resultatet, men de undersøkte sulfaterte polysakkaridene fra *C. frondosa* hemmet TNF produksjon i THP-1 celler (Stefaniak-Vidarsson et al., 2017). Det har også blitt påvist antiinflammatorisk aktivitet i *P. glacialis* tidligere, men dette var på organiske ekstrakter og effekten kan derfor ikke sammenlignes med et PH (Ingebrigtsen, Hansen, Andersen & Eilertsen, 2016).

En av de økende problemene knyttet til overvekt er økningen av insulinresistens og DM2. Det ble derfor testet for antidiabetisk aktivitet ved å undersøke om hydrolysatet hemmet enzymaktiviteten til PTP1B og DPP-IV. Ingen av artene i oppgaven hemmet enzymaktiviteten i PTP1B selv om *P. tremulus* først ble ansett som aktiv. Assayet ble gjentatt noe som førte til mindre standardavvik og større likhet mellom parallellene. Resultatet ble derfor ansett som mer pålitelig. Akkurat *P. tremulus* var spesielt vanskelig å løse ut i løsemiddelet og det er sannsynlig at dette bidro til aktivitet i to paralleller i første forsøk. Hydrolysatene ble også undersøkt for DPP-IV inhibering, men ingen av artene ble vurdert som aktive. *P. glacialis* var den arten som hemmet DPP-IV mest og hadde størst forskjell mellom PH og HK. Dette kan tyde på at hydrolyseringen har økt bioaktiviteten for denne inhiberingsaktiviteten. Tidligere har det blitt rapportert om antidiabetisk effekt i marine proteiner fra kolmule *in vitro* og *in vivo* i dyrestudier ved bruk av alkalase. Kolmulen ble enzymatisk hydrolysert med alkalase og flavourzyyme, ved 50 °C og en pH på 7,0 (Harnedy et al., 2018). Dette førte til en grad av hydrolyse på 30 %, noe som er betydelig høyere enn graden av hydrolyse registret med kun alkalase i en studie gjort på *C. frondosa*, 5 % (Mamelona et al., 2010a). Dette støttes av at det å kombinere alkalase med andre enzymer har vist seg å være en god metode for å øke aktiviteten i bioaktive peptider (Tacias-Pascacio et al., 2020).

For å øke bioaktivitet er enzymatisk hydrolyse den tryggeste og mest effektive metoden for å produsere PH (Gao et al., 2021; Khan et al., 2020; Petrova et al., 2018). Denne metoden gjør det er mulig å ha bedre kontroll på peptidene som blir produsert og det er mulig å oppskalere hvis det blir funnet aktivitet i materialet. Bioaktiviteten vil variere etter valg av enzym, kombinasjoner av enzym, forbehandling eller forhold under hydrolysen (pH, temperatur, enzym ratio, vanninnhold og tid) (Gao et al., 2021). Enzymene som blir brukt har ulike egenskaper og kan få frem ulike biologiske aktiviteter. For å undersøke bioaktiviteten i peptider burde ulike enzymkombinasjoner tilpasses den spesifikke arten og den biologiske aktiviteten det letes etter. Alkalase har blitt brukt i flere av artiklene nevnt i denne oppgaven (Mamelona et al., 2010a; Stefaniak-Vidarsson et al., 2017; Tacias-Pascacio et al., 2020), men ut fra resultatet presentert ser det ikke ut som det ga høyere bioaktivitet i materialet. Dette er basert på at det ikke ble sett store forskjeller mellom PH og HK i de fleste assayene. Unntaket var *P. glacialis* i DPP-IV og *P. glacialis* og *P. tremulus* i ORAC assayet. Som nevnt over har det blitt rapportert gode resultater med å kombinere alkalase med andre enzymer for å øke bioaktiviteten (Tacias-Pascacio et al., 2020). Dette vil produsere mindre peptider med andre egenskaper. Det kan derfor ikke utelukkes at det er bioaktive peptider i artene som ble undersøkt, men det ble ikke detektert i denne oppgaven med de metodene som ble brukt.

5.3 Fremtidig forskning på feltet

Den enzymatiske hydrolysen i denne oppgaven var ikke optimal ettersom det ikke ble produsert tilstrekkelig mengder bioaktive peptider til at det ble noen forskjell mellom PH og HK i de biologiske aktivitetsassayene. Flere studier har observert en økt produksjon av bioaktive peptider ved å kombinere enzymer (García et al., 2019; Zhao et al., 2009). Derfor hadde det vært interessant å undersøke ulike enzymkombinasjoner for å teste om det ville gjort en forskjell i bioaktiviteten. Artene i denne oppgaven er lite utnyttet, men også lite undersøkt og det er derfor store muligheter for at de inneholder bioaktive peptider som kan bidra til økt verdiskapning og god helseeffekt.

Siden det ble funnet antioksidativ aktivitet i hydrolysatene vil det være interessant å undersøke dette videre med flere antioksidative assays, spesielt for de mesopelagiske organismene. På grunn av covid-19 pandemien var det mangel på utstyr, slik at ikke alle assay som var planlagt kunne utføres i denne oppgaven.

Med tanke på den biokjemiske sammensetningen og bioaktiviteten kan mesopelagiske organismer ha et potensial for produksjon av PH. Det er en fordel at PH ikke har mye smak, lukt og farge, noe hydrolysatet fra mesopelagiske organismer hadde. Derimot gjør proteininnholdet og den antioksidative aktiviteten denne artsgruppen interessant å undersøke videre, for å produsere et hydrolysat som kanskje til slutt kan brukes til humant konsum.

6 Konklusjon

De lite utnyttede artene i denne oppgaven var alle fullverdige og gode proteinkilder. Fettinnholdet varierte stort, men alle artene hadde en gunstig fettsyresammensetning med en høy andel omega-3-fettsyrer. Enzymatisk hydrolyse økte proteinutbytte i *P. glacialis* og mesopelagiske organismer, men ikke i *P. tremulus* og *C. frondosa*. Antioksidativ aktivitet ble målt med ORAC, der PH hadde en høyere aktivitet enn HK i alle artene, og mesopelagiske organismer hadde den høyeste aktiviteten. Ingen av hydrolysatene viste antidiabetisk eller antiinflammatorisk aktivitet i de konsentrasjonene som ble testet i denne oppgaven.

Referanseliste

- Abdelhamid, A. S., Brown, T. J., Brainard, J. S., Biswas, P., Thorpe, G. C., Moore, H. J., . . . Hooper, L. (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 7(7), Cd003177. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003177.pub3>
- Aksnes, D. L., Holm, P., Bavinck, M., Biermann, F., Donovaro, R., P, H., . . . Kaushik, S. (2017). Food from the ocean - How can more food and biomasse be obtained from te oceans in a way that does not deprive future generations of their benefits? Hentet fra <https://www.sapea.info/wp-content/uploads/FFOFINALREPORT.pdf>
- Alvheim, A. R., Kjellevold, M., Strand, E., Sanden, M. & Wiech, M. (2020). Mesopelagic Species and Their Potential Contribution to Food and Feed Security—A Case Study from Norway. *Foods*, 9(3), 344. <https://doi.org/10.3390/foods9030344>
- Artamonova, E. Y., Vasskog, T. & Eilertsen, H. C. (2017). Lipid content and fatty acid composition of *Porosira glacialis* and *Attheya longicornis* in response to carbon dioxide (CO₂) aeration. *PLOS ONE*, 12(5), e0177703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177703>
- Association of Official Analysis Chemists International. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- Aung, T., Halsey, J., Kromhout, D., Gerstein, H. C., Marchioli, R., Tavazzi, L., . . . Clarke, R. (2018). Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA Cardiol*, 3(3), 225-234. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.5205>
- Bang, H. O., Dyerberg, J. & Nielsen, A. B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west-coast eskimos. *The Lancet*, 297(7710), 1143-1146. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91658-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91658-8)
- Bjordal, Å. & Thorvaldsen, K. G. (2020). Forsøksfiske etter mesopelagiske arter 2019. *Rapport fra Havforskningen 2020-5*.
- Bruckner, A. W. (2006). Proceedings of the CITES Workshop on the Conservation of Sea Cucumbers in the Families Holothuriidae and Stichopodidae. Hentet fra <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/509>
- Bruckner, A. W., Johnson, K. & Field, J. (2003). Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. *SPC Bêche-de-mer information Bulletin*, 18(1), 24-33.

- 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*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/17451000.2020.1781188>
- Cleland, L. G., James, M. J. & Proudman, S. M. (2005). Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis Research & Therapy*, 8(1), 202. <https://doi.org/10.1186/ar1876>
- Comerford, K. B. & Pasin, G. (2016). Emerging Evidence for the Importance of Dietary Protein Source on Glucoregulatory Markers and Type 2 Diabetes: Different Effects of Dairy, Meat, Fish, Egg, and Plant Protein Foods. *Nutrients*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080446>
- Damodaran, S. & Parkin, K. L. (2017). Amino acids, peptides, and proteins. I *Fennema's food chemistry* (s. 235-356): CRC Press.
- Dar, K. B., Bhat, A. H., Amin, S., Masood, A., Zargar, M. A. & Ganie, S. A. (2016). Inflammation: A Multidimensional Insight on Natural Anti-Inflammatory Therapeutic Compounds. *Curr Med Chem*, 23(33), 3775-3800. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160817163531>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem*, 52(1), 48-54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- De forente nasjoner. (2021, 19.04.2021). FNs bærekraftsmål. Hentet 12.03.2021 fra <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal>
- Diabetesforbundet. (2020, 19.10.2020). Slik kan du forebygge diabete type 2. Hentet 05.01.2021 fra <https://www.diabetes.no/diabetes-type-2/forebygge-diabetes-type-2/>
- Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48(5), 430-441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Faglig forum for norske havområder. (2019). *Næringsaktivitet og påvirkning: Faggrunnlag for revisjon av forvaltningsplanen for Barentshavet og havområdene utenfor Lofoten* (M-1245).
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(11), 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.06.009>

- Fiskeri- og kystdepartementet. (2013). *Verdens fremste sjømatnasjon* (Meld. st. nr 22 (2012-2013)). Hentet fra www.regjeringen.no
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Food and agriculture organization. (2020). *The state of world fisheries and aquaculture 2020* (Sustainability of action). Rome, Italy.
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., . . . Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687-699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
- García, J., Méndez, D., Álvarez, M., Sanmartin, B., Vázquez, R., Regueiro, L. & Atanassova, M. (2019). Design of novel functional food products enriched with bioactive extracts from holothurians for meeting the nutritional needs of the elderly. *LWT*, 109, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.097>
- García, J. L., de Vicente, M. & Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1017-1024. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12800>
- Giæver, I. (2020). *Diatom Protein and amino acids*. Norges fiskerihøgskole. Tromsø: UiT-Norges arktiske universitet.
- Gjøsaeter, J. & Kawaguchi, K. (1980). *A Review of the World Resources of Mesopelagic Fish*: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gosner, K. (1999). *A field guide to the Atlantic seashore: from the Bay of Fundy to Cape Hatteras* (bd. 24): Houghton Mifflin Harcourt.
- Gramlich, L., Ireton-Jones, C., Miles, J. M., Morrison, M. & Pontes-Arruda, A. (2019). Essential Fatty Acid Requirements and Intravenous Lipid Emulsions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 43(6), 697-707. <https://doi.org/10.1002/jpen.1537>
- Green, B., Flatt, P. & Bailey, C. (2006). Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 3(3), 159-165. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2006.024>
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford Univeristy Press Inc.

- 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
- Hamel, J. & Mercier, A. (1995). Spawning of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* in the St Lawrence Estuary, eastern Canada. *SPC Bêche-de-mer information Bulletin*, 7.
- Hamel, J. & Mercier, A. (1996). Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(2), 253-271.
- Harnedy, P. A., Parthasarathy, V., McLaughlin, C. M., O'Keeffe, M. B., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., . . . FitzGerald, R. J. (2018). Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties. *Journal of Functional Foods*, 40, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.045>
- Hauge, M. (2018, 07.03.2018). Mesopelagisk fiskeri: Muligheter og begrensninger. Hentet 14.09.2020 fra <https://www.hi.no/hi/nyheter/2018/mars/mesopelagisk-fiskeri-muligheter-og-begrensninger>
- Havforskningsinstituttet. (2019, 06.09.2019). Sjøpølse. Hentet 11.03.2021 fra <https://www.hi.no/hi/temasider/hav-og-kyst/nye-marine-ressurser-til-mat-og-for/sjopolse>
- Havforskningsinstituttet. (2020, 30.01.2020). Tema: Planteplankton. Hentet 20.10.2020 fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/planteplankton>
- Helsedirektoratet. (2018, 20.11.2018). Kostråd om fisk og sjømat. Hentet 13.05.2021 fra <https://www.helsenorge.no/kosthold-og-ernaring/kostrad/spis-fisk-oftere/>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hossain, A., Dave, D. & Shahidi, F. (2020). Northern Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*): A Potential Candidate for Functional Food, Nutraceutical, and Pharmaceutical Sector. *Marine drugs*, 18(5), 274. <https://doi.org/10.3390/md18050274>
- Hu, S., Li, S., Song, W., Ji, L., Cai, L., Wang, Y. & Jiang, W. (2016). Fucoidan from *Cucumaria frondosa* Inhibits Pancreatic Islets Apoptosis Through Mitochondrial Signaling Pathway in Insulin Resistant Mice. *Food Science and Technology Research*, 22, 507-517. <https://doi.org/10.3136/fstr.22.507>
- Hu, Y., Hu, F. B. & Manson, J. E. (2019). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled

- Trials Involving 127 477 Participants. *J Am Heart Assoc*, 8(19), e013543. <https://doi.org/10.1161/jaha.119.013543>
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Ingebrigtsen, R. A., Hansen, E., Andersen, J. H. & Eilertsen, H. C. (2016). Light and temperature effects on bioactivity in diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 939-950. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0631-4>
- Irigoiien, X., Klevjer, T. A., Rostad, A., Martinez, U., Boyra, G., Acuna, J. L., . . .Kaartvedt, S. (2014). Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean. *Nat Commun*, 5, 3271. <https://doi.org/10.1038/ncomms4271>
- Jamshidi, A., Shabanpour, B., Pourashouri, P. & Raeisi, M. (2018). Using WPC-inulin-fucoidan complexes for encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 emulsion: Characterization and nutritional quality. *Food Research International*, 114, 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.066>
- Jensen, I. J. & Elvevoll, E. (2016). *Sluttrapport: Human helseeffekt av marine proteiner: Norges fiskerihøgskole.* Hentet fra <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901229/>
- Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P. & Singh, P. (2018). Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 152, 436-488. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.061>
- Khan, S., Rehman, A., Shah, H., Aadil, R. M., Ali, A., Shehzad, Q., . . .Xia, W. (2020). Fish Protein and Its Derivatives: The Novel Applications, Bioactivities, and Their Functional Significance in Food Products. *Food Reviews International*, 1-28. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1828452>
- Khotimchenko, Y. (2018). Pharmacological Potential of Sea Cucumbers. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1342. <https://doi.org/10.3390/ijms19051342>
- Kjerstad, M., Bjørkevoll, I. & Christophersen, G. (2020). *Sesongmessig variasjon i kvalitet hos rødpølse.* Møreforskning AS.
- Kjerstad, M., Ringvold, H., Sjøvik, G., Knott, K. & Thangstad, T. (2015). Preliminary study on the utilisation of Norwegian red sea cucumber, *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) (Holothuroidea, Echinodermata), from Norwegian waters: resource, biology and market. *Orkana Akademisk*, 109-132.

- Klima- og miljødepartementet. (2020). *Helhetlige forvaltningsplaner for de norske havområdene — Barentshavet og havområdene utenfor Lofoten, Norskehavet, og Nordsjøen og Skagerrak* (Meld. St. 20 (2019-2020)). Hentet fra www.regjeringen.no
- Lacroix, I. M. E. & Li-Chan, E. C. Y. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>
- Larsen, R., Steinholt, M., Dahl, O., Luten, J. & Lauritzsen, K. (2008). *Hav og helse - Sjømat - positive helseeffekter og næringsinnhold*. Orkanger: Grytting AS.
- Latimer, G. W. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MD, USA: AOAC international.
- Lee, M.-H., Kim, Y.-K., Moon, H. S., Kim, K.-D., Kim, G.-G., Cho, H.-A., . . . Han, S.-K. (2012). Comparison on proximate composition and nutritional profile of red and black sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) from Ulleungdo(Island) and Dokdo(Island), Korea. *Food Science and Biotechnology*, 21(5), 1285-1291. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0169-z>
- Li, R., Jia, Z. & Trush, M. A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)*, 1(1), 9-21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Liu, Y., Dave, D., Trenholm, S., Ramakrishnan, V. V. & Murphy, W. (2021). Effect of Drying on Nutritional Composition of Atlantic Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Viscera Derived from Newfoundland Fisheries. *Processes*, 9(4), 703. <https://doi.org/10.3390/pr9040703>
- Lopez, M. J. & Mohiuddin, S. S. (2020). Biochemistry, Essential Amino Acids. I *StatPearls*. Treasure Island (FL). Hentet fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32496725>
- Lorentzen, E. (2020, 09.06.2020). Har for første gong berekna kor mykje laksesild det er i Norskerenna. Hentet 23.09.2020 fra <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/juni/har-for-forste-gong-berekna-kor-mykje-laksesild-det-er-i-norskerenna>
- Lynum, L. & Rustad, T. (1997). *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring*. Trondheim: Tapir.
- Mæhre, H. K., Edvinsen, G. K., Eilertsen, K.-E. & Elvevoll, E. O. (2016). Heat treatment increases the protein bioaccessibility in the red seaweed dulse (*Palmaria palmata*), but not in the brown seaweed winged kelp (*Alaria esculenta*). *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 581-590. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0587-4>
- Mamelona, J., Pelletier, É., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S. & Kermasha, S. (2007). Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea

- cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104(3), 1040-1047.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.016>
- Mamelona, J., Saint-Louis, R. & Pelletier, É. (2010a). Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(1), 147-154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02114.x>
- Mamelona, J., Saint-Louis, R. & Pelletier, É. (2010b). Proximate composition and nutritional profile of by-products from green urchin and Atlantic sea cucumber processing plants. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(10), 2119-2126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02381.x>
- Marcinkiewicz, J. & Kontny, E. (2014). Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*, 46(1), 7-20. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1361-4>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mierke-Klemeyer, S., Larsen, R., Oehlenschläger, J., Maehre, H., Elvevoll, E. O., Bandarra, N. M., . . . Luten, J. (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. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0793-7>
- Minor, L. K. (2006). *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*: CRC Press.
- Moore, S. & Stein, W. H. (1963). [117] Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. I *Methods in Enzymology* (bd. 6, s. 819-831): Academic Press.
- Myhre, M., Richardsen, R., Nystøyl, R. & Strandheim, G. (2020). *Analyse marint restråstoff 2019 Tilgjengelighet og anvendelse av marint restråstoff i fra norsk fiskeri - og havbruksnæring* (2020:00904). www.sintef.no: Sintef Ocean AS.
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.-J. (2018). Protein Determination—Method Matters. *Foods*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Orskov, C., Holst, J. J., Ebert, R. & Creutzfeldt, W. (1993). Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 91(1), 301-307. <https://doi.org/10.1172/jci116186>
- Novozymes. (2021). Alcalase. Hentet 11.05.2021 fra <https://biosolutions.novozymes.com/en/plant-protein/products/alcalase>

- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y. & Skjermo, J. (2012). Verdiskapning basert på produktive hav i 2015. På oppdrag fra NTVA og DKNVS. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/fkd/vedlegg/rapporter/2012/verdiskapning-rapport-010812.pdf?id=2322968>
- Olsen, R. L. (2017). *Lipidkjemi - med vekt på fisk* (Kompendium utgave 4).
- Patel, P. S., Sharp, S. J., Luben, R. N., Khaw, K. T., Bingham, S. A., Wareham, N. J. & Forouhi, N. G. (2009). Association between type of dietary fish and seafood intake and the risk of incident type 2 diabetes: the European prospective investigation of cancer (EPIC)-Norfolk cohort study. *Diabetes Care*, 32(10), 1857-1863. <https://doi.org/10.2337/dc09-0116>
- Pedersen, B. (2019, 30.09.2019). Oksidasjon. Hentet 15.02.2021 fra <https://snl.no/oksidasjon>
- Petrova, I., Tolstorebrov, I. & Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*, 10(3), 223-241. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>
- Piao, F., Aadil, R. M., Suleman, R., Li, K., Zhang, M., Wu, P., . . . Ahmed, Z. (2018). Ameliorative effects of taurine against diabetes: a review. *Amino Acids*, 50(5), 487-502. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2544-4>
- Purcell, S., Lovatelli, A., Vasconcellos, M. & Ye, Y. (2010). Managing Sea Cucumber Fisheries With an Ecosystem Approach.
- Purcell, S., Williamson, D. & Ngaluafe, P. (2018). Chinese market prices of beche-de-mer: Implications for fisheries and aquaculture. *Marine Policy*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.02.005>
- Rehman, K. & Akash, M. S. H. (2016). Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0303-y>
- Ringvold, H. & Kjerstad, M. (2018). Norwegian red sea cucumber, *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) (Holothuroidea, Echinodermata): chemical and nutritional analysis. I.
- Ripps, H. & Shen, W. (2012). Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Molecular vision*, 18, 2673-2686. Hentet fra <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23170060>
- Rubin. (2007). *Marine biprodukter: Råvarer med muligheter*. Trondheim: Wennbergs Trykkeri.

- Rønneberg, J. E. & Kjerstad, M. (2007). *Registrering av bifangst av rødspølse i reke- og krepsfiske i kystnære områder på Vestlandet*. Ålesund: Møreforskning Ålesund.
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K. & Barford, D. (2000). Molecular Basis for the Dephosphorylation of the Activation Segment of the Insulin Receptor by Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Molecular Cell*, 6(6), 1401-1412. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00137-4)
- Sarmadi, B. H. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Schaich, K. M., Tian, X. & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Shearer, K., Åsgård, T., Andorsdóttir, G. & Aas, G. (1994). Whole body elemental and proximate composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the life cycle. *Journal of Fish Biology*, 44(5), 785-797. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01255.x>
- Stefaniak-Vidarsson, M. M., Kale, V. A., Gudjónsdóttir, M., Marteinsdóttir, G., Fridjonsson, O., Hreggvidsson, G. O., . . . Kristbergsson, K. (2017). Bioactive effect of sulphated polysaccharides derived from orange-footed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) toward THP-1 macrophages. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 12, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.09.002>
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H. (1959). Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 31(2), 307-308. <https://doi.org/10.1021/ac60146a047>
- Svenning, J. B., Dalheim, L., Eilertsen, H. C. & Vasskog, T. (2019). Temperature dependent growth rate, lipid content and fatty acid composition of the marine cold-water diatom *Porosira glacialis*. *Algal Research*, 37, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.009>
- Svenning, J. B., Dalheim, L., Vasskog, T., Matricon, L., Vang, B. & Olsen, R. (2020). Lipid yield from the diatom *Porosira glacialis* is determined by solvent choice and number of extractions, independent of cell disruption. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79269-z>
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á. & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143-2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>

- Tan, M., Lin, Z., Zu, Y., Zhu, B. & Cheng, S. (2018). Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of instant sea cucumber: Emphatically on water status of by LF-NMR and MRI. *Food Res Int*, 109, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.029>
- Tejano, L. A., Peralta, J. P., Yap, E. E. S., Panjaitan, F. C. A. & Chang, Y.-W. (2019). Prediction of Bioactive Peptides from *Chlorella sorokiniana* Proteins Using Proteomic Techniques in Combination with Bioinformatics Analyses. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1786. <https://doi.org/10.3390/ijms20071786>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Tørris, C., Molin, M. & Småstuen, M. C. (2017). Lean Fish Consumption Is Associated with Beneficial Changes in the Metabolic Syndrome Components: A 13-Year Follow-Up Study from the Norwegian Tromsø Study. *Nutrients*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/nu9030247>
- Van Amerongen, A., Beelen-Thomissen, M. J. C., Van Zeeland-Wolbers, L. A. M, Van Gilst W. H., Buikema, J. H., & Nelissen. J. W. P. M. (2009). Egg protein hydrolysates. *Int. Pat. No. WO 2009/128713 A1*.
- Vitenskapskomiteen for mat og miljø. (2014). *Benefit-risk assessment of fish and fish products in the Norwegian diet - an update*. (bd. 15). Oslo, Norway.
- Wen, J., Hu, C. & Fan, S. (2010). Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2469-2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4108>
- Wien, M., Rajaram, S., Oda, K. & Sabaté, J. (2010). Decreasing the linoleic acid to alpha-linolenic acid diet ratio increases eicosapentaenoic acid in erythrocytes in adults. *Lipids*, 45(8), 683-692. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3430-3>
- World Health Organization. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition* (bd. 935): World Health Organization.
- World Health Organization. (2020, 01.04.2020). Obesity and overweight. Hentet 07.12.2020 fra who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
- Yao, S., Lyu, S., An, Y., Lu, J., Gjermansen, C. & Schramm, A. (2019). Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *J Appl Microbiol*, 126(2), 359-368. <https://doi.org/10.1111/jam.14095>

- Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J. & Zeng, M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 1028-1033. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.002>
- Zhong, Y., Khan, M. A. & Shahidi, F. (2007). Compositional Characteristics and Antioxidant Properties of Fresh and Processed Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1188-1192. <https://doi.org/10.1021/jf063085h>

Vedlegg 1

Fettsyrer gram per 100 gram prøve

Tabell 8: Mengde fettsyrer, gram fettsyrer per 100 g prøve, i frysetørket materiale *P. tremulus*, *C. frondosa*, *P. glacialis* og mesopelagiske organismer. Kategorisert i uidentifiserbare, mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. Forholdet mellom omega 3 og omega 6 er inkludert og resultatet er presentert i gjennomsnitt \pm standardavvik. ID = Ikke detektert.

Fettsyrer	Gram fettsyrer per 100 g prøve			
	<i>Parastichopus tremulus</i>	<i>Cucumaria frondosa</i>	<i>Porosira glacialis</i>	Mesopelagiske organismer
Uidentifiserbare fettsyrer	0,93 \pm 0,05	5,90 \pm 1,05	0,73 \pm 0,83	3,63 \pm 0,03
C14:0	0,13 \pm 0,01	0,30 \pm 0,08	0,27 \pm 0,11	2,38 \pm 0,17
C16:0	0,29 \pm 0,03	0,44 \pm 0,08	0,13 \pm 0,12	5,10 \pm 0,44
C18:0	0,25 \pm 0,03	0,57 \pm 0,11	ID	0,56 \pm 0,05
C20:0	0,06 \pm 0,01	ID	ID	ID
Σ mettede fettsyrer	0,74\pm0,08	1,31\pm0,26	0,41\pm0,23	8,04\pm0,66
C12:1	ID	ID	0,06 \pm 0,02	ID
C14:1	0,17 \pm 0,02	ID	ID	ID
C16:1 n-7	0,29 \pm 0,02	2,49 \pm 0,66	0,27 \pm 0,22	0,88 \pm 0,28
C18:1 n-7	0,28 \pm 0,03	0,40 \pm 0,10	ID	0,37 \pm 0,9
C18:1 n-9	0,1 \pm 0,01	0,27 \pm 0,06	0,61 \pm 0,36	1,72 \pm 0,47
C20:1 n-9	0,06 \pm 0,01	ID	ID	3,91 \pm 1,08
C24:1 n-9	0,13 \pm 0,01	0,21 \pm 0,04	ID	0,27 \pm 0,09
Σ enumettede fettsyrer	1,02\pm0,09	3,37\pm0,86	0,94\pm0,60	6,78\pm1,93
C16:2 n-4	ID	0,14 \pm 0,04	0,31 \pm 0,27	ID
C16:3 n-4	ID	ID	0,30 \pm 0,17	ID
C18:2 n-6 LA	0,05 \pm 0,01	ID	ID	0,49 \pm 0,18
C18:3 n-3 ALA	ID	ID	ID	0,43 \pm 0,16
C18:4 n-3	0,11 \pm 0,01	0,49 \pm 0,14	0,19 \pm 0,12	1,22 \pm 0,32
C20:4 n-3	ID	0,12 \pm 0,01	ID	8,39 \pm 2,03
C20:4 n-6 ARA	0,38 \pm 0,04	ID	ID	ID
C20:5 n-3 EPA	0,60 \pm 0,07	3,13 \pm 1,25	1,16 \pm 0,77	0,93 \pm 0,35
C22:5 n-3	ID	ID	ID	ID
C22:6 n-3 DHA	0,35 \pm 0,04	ID	0,17 \pm 0,12	1,80 \pm 0,68
Σ flerumettede fettsyrer	1,57\pm0,17	3,89\pm1,43	2,14\pm1,45	13,27\pm3,72
n-3	1,14 \pm 0,13	3,74 \pm 1,40	1,53 \pm 1,00	12,78 \pm 3,54
n-6	0,43 \pm 0,04	0	0	0,49 \pm 0,18
n-6/n-3	0,37	0	0	0,04 \pm 0,05

