



Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Sukkertare (*Saccharina latissima*) som proteinkilde

Effekt av oppmaling og fraksjonering på proteinfordøyelighet

Synneva Berge Giæver

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap FSK-3960 (60 stp.) – mai 2022



Sukkertare (*Saccharina latissima*) som proteinkilde
Effekt av oppmaling og fraksjonering på proteinfordøyelighet

Synneva Berge Giæver

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 og inspirerende år ved Norges Fiskerihøgskole. Arbeidet med oppgaven har vært krevende, men også en påminnelse om de store mulighetene som er i havet. Nå gleder jeg meg til nye spennende utfordringer i arbeidslivet, men først ønsker jeg å takke de som har hjulpet meg i prosessen med å ferdigstille masteroppgaven, og de som har bidratt til å gjøre studietiden til en fin tid.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Karl-Erik Eilertsen for din tid og svar på mine tusen spørsmål. Jeg setter stor pris på dine konstruktive innspill og gode råd til oppgaven. Jeg vil også takke Mari Johannessen Walquist for tilbakemeldinger på oppgaven.

Jeg hadde ikke klart å gjennomføre labarbeidet uten Guro Kristine Edvinsen og Tone Friis Aune. Jeg vil takke dere for god opplæring og veiledning på laboratoriet. Deres tålmodighet og evne til å finne løsninger har vært svært verdifull for meg, særlig når biomassen jeg benyttet ikke alltid spilte på lag.

Studietiden ville ikke vært det samme uten studentene i kull 2017, og særlig mine to gode venner Marcus og Vilde. Tusen takk for fine morsomme stunder, motivasjon og latter. Gleder meg til å jobbe i sjømatnæringen med en så fin gjeng.

Til slutt vil jeg takke min kjære familie og samboer for kloke og oppmuntrende ord, trygghet og støtte gjennom hele prosessen.

Synneva Berge Giæver

Tromsø, 16. mai 2022

Sammendrag

Verdens befolkning øker stadig og det er estimert at den globale befolkningen når 9,7 milliarder mennesker innen 2050. Som konsekvens av befolkningsveksten vil behovet og etterspørselen for mat øke. Tilstrekkelig produksjon av næringsrik mat til en økende befolkning utført på en bærekraftig måte er en stor global utfordring. Det antas at særlig proteiner vil være et av næringsstoffene det vil være mangel på i fremtiden. Makroalger får stadig mer oppmerksomhet som en bærekraftig kilde til protein, og de siste årene har produksjonen av sukkertare økt betydelig i Norge. Til tross for at det er mye som tyder på at proteinene i sukkertare har svært lav biotilgjengelighet, ønsker næringen at biomassen skal utnyttes som næringsmiddel og proteinkilde.

Fryst og tørket sukkertare ble benyttet som råstoff i denne studien. Hovedmålet var å undersøke biotilgjengelighet til proteinet i sukkertaren, og vurdere om fraksjonering av biomassen i ulike partikkelstørrelser hadde effekt på biotilgjengeligheten. Biotilgjengeligheten og potensiell effekt av fraksjonering ble studert gjennom en *in vitro* gastrointestinal (mage-tarm) fordøyelsesmodell.

Innledningsvis ble sukkertarens biokjemiske sammensetning bestemt. Proteininnholdet varierte mellom den fryste og naturtørkede sukkertaren, med et innhold på henholdsvis 3,7 og 6,5 % av tørrvekten. Sukkertaren ble funnet å være en fullverdig proteinkilde da den inneholdt alle essensielle aminosyrer. Essensielle aminosyrer utgjorde henholdsvis 41,7 og 40,4 % av totale aminosyrer i fryst og tørket sukkertare.

Prøver tatt ut ved ulike fordøyelsestider i den simulerte mage-tarmfordøyelsen ble analysert for proteininnhold og nedbrutt (TCA-løselig) protein. Analyseresultatene viste at den totale mengden løst og nedbrutt protein fra sukkertaren generelt var svært lavt, og derfor at lite sukkertareprotein ble fordøyd gjennom den forenklete fordøyelsesmodellen. Dette indikerer at biotilgjengeligheten til sukkertareproteiner er lav. De ulike forbehandlingene, og fraksjonering av biomassen i ulike partikkelstørrelser, så ikke ut til å påvirke biotilgjengeligheten til sukkertareprotein i stor grad.

Summary

To meet the expected population growth, there will be an increased demand for food in the coming decades. Adequate production of nutritious food for a growing population, carried out in a sustainable way, is a major global challenge. Particularly proteins are one of the important nutrients that will be demanded in the future. Macroalgae is gaining attention as a sustainable source of protein, and in recent years the production of sugar kelp has increased significantly in Norway. Despite the fact that there are many indications that the proteins in sugar kelp have low bioavailability, the industry wants the biomass to be utilized as a food and as a source of protein.

Frozen and dried sugar kelp was used as raw material in this study. The aim of the study was to investigate the bioavailability of the protein in sugar kelp, and to assess whether fractionation of the biomass into different particle sizes had an effect on the bioavailability. The bioavailability and potential effect of fractionation was studied through an *in vitro* gastrointestinal digestion model.

Initially, the biochemical composition of the sugar cane was determined. The protein content varied between the frozen and dried sugar kelp, with a content of 3,7 and 6,5 % of dry weight respectively. The sugar kelp was found to be a complete protein source as it contained all the essential amino acids. The essential amino acids accounted for 41,7 and 40,4 % of total amino acids in frozen and dried sugar kelp, respectively.

Samples taken out at different digestion times in the simulated gastrointestinal digestion were analyzed for soluble protein and hydrolyzed (TCA-soluble) proteins. Generally, the total amount of dissolved and hydrolyzed protein from the sugar kelp was very low, and little sugar kelp protein was digested through the simplified digestion model. This indicates that the bioavailability of sugar kelp proteins is low. The different pre-treatments, and fractionation of the biomass into different particle sizes, did not seem to affect the bioavailability of the sugar kelp protein to a great extent.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Økt satsing på marin produksjon.....	2
1.2	Makroalger	3
1.2.1	Makroalger som ressurs	3
1.2.2	Kultivering av makroalger	4
1.2.3	Kultivering av makroalger i Norge	4
1.3	Makroalger som proteinkilde	6
1.3.1	Proteiner	6
1.3.2	Proteinfordøyelse	7
1.3.3	Proteininnhold i makroalger.....	8
1.4	Hensikt og mål med oppgaven	11
2	Materialer og metoder	12
2.1	Biomasse	12
2.2	Kjemikalier.....	12
2.3	Forsøksdesign.....	13
2.4	Metoder	14
2.4.1	Biokjemisk sammensetning i sukkertare.....	14
2.4.2	Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein.....	16
2.4.3	Proteinløselighet ved ulike pH.....	22
2.4.4	Proteinekstraksjon	23
3	Resultater	26
3.1	Biokjemisk sammensetning og proteinkvalitet i sukkertare	26
3.2	Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein	28
3.2.1	Forsøk 1	28
3.2.2	Forsøk 2	31
3.2.3	Forsøk 3.....	33
3.2.4	Forsøk 4.....	34
3.2.5	Forsøk 5.....	34
3.3	Proteinløselighet.....	36
3.4	Proteinekstraksjon	37
3.4.1	Proteinekstraksjon fra TM.....	37
3.4.2	Proteinekstraksjon fra «pellet».....	38
4	Diskusjon.....	39
4.1	Biokjemisk sammensetning og proteinkvalitet i sukkertare	39

4.2	Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein	41
4.3	Proteinekstraksjon fra sukkertare	43
4.4	Begrensninger i studiet og fremtidig forskning.....	45
5	Konklusjon.....	45
	Referanseliste.....	46

Tabelliste

Tabell 1.	Anbefalt mengde EAA og totalt protein for friske voksne	7
Tabell 2.	Utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) til proteinekstraksjon.....	25
Tabell 3.	Vann-, aske- og proteininnhold i fryst og tørket sukkertare	26
Tabell 4.	Aminosyresammensetning i fryst og tørket sukkertare.....	27
Tabell 5.	Proteinutbytte i tørket sukkertare	38
Tabell 6.	Proteinutbytte i utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning).....	38

Figurliste

Figur 1.	Høsting av makroalger til konsum og fôr i Norge.....	5
Figur 2.	Sukkertaren benyttet i studien	12
Figur 3.	Forsøksdesign for oppgaven.....	14
Figur 4.	Oversikt over fordøyelsesforsøk 1-5	18
Figur 5.	Illustrasjon av praktisk framgangsmåte for simulert gastrointestinal fordøyelse.....	19
Figur 6.	Illustrasjon av fremgangsmåte for proteinekstraksjon fra tørket sukkertare	24
Figur 7.	Mengde EAA i fryst og tørket sukkertare relativt til referanseprotein.....	28
Figur 8.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 1, versjon 1	30
Figur 9.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 1, versjon 2	31
Figur 10.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 2	32
Figur 11.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 3	33
Figur 12.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 4	34
Figur 13.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 5, versjon 1	35
Figur 14.	Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 5, versjon 2	36
Figur 15.	Proteinløselighet (%) i tørket sukkertare ved pH 2-13	37

Forkortelser

AA	Aminosyre
BSA	Bovint serumalbumin
EAA	Essensielle aminosyrer
FAO	FNs organisasjon for ernæring og landbruk
FM	Fryst materiale av sukkertare
FN	De forente nasjoner
ID	Ikke detektert
KUE	Kontrollprøver med sukkertare uten enzym
NEAA	Ikke-essensielle aminosyrer
RCF	Relativ sentrifugalkraft
TAA	Totale aminosyrer
TE	Tyrosinekvivalenter
TM	Tørket materiale av sukkertare
KUP	Kontrollprøver uten sukkertare (bare enzymløsninger)
V1	Versjon 1 av løsninger
V2	Versjon 2 av løsninger
WHO	Verdens helseorganisasjon

1 Introduksjon

Verdens befolkning øker stadig og det er estimert at den globale befolkningen når 9,7 milliarder mennesker innen 2050 (UN, 2019). Samtidig øker velstand og kjøpekraft som fører til høyere forbruk, konsum og etterspørsel av varer som setter et stort press på matproduksjonssystemet (Godfray *et al.*, 2010; Willett *et al.*, 2019). En konsekvens av befolkningsveksten er økt behov og etterspørsel av mat som vil fortsette å øke i fremtiden, og det er estimert at matbehovet vil øke 70 til 100 % til 2050 (Bruinsma, 2009). I 2015 ble medlemslandene i De forente nasjoner (FN) enige om en felles arbeidsplan bestående av 17 bærekraftsmål med 169 delmål som skal nås innen 2030 for å sikre en bærekraftig fremtid. Blant disse målene er matsikkerhet for verdens befolkning samt bevare og utnytte jordas ressurser under bærekraftig utvikling sentralt. For å nå disse målene må verdens ressurser utnyttes best mulig (FN, 2022).

Tilstrekkelig produksjon av næringsrik mat til en økende befolkning utført på en bærekraftig måte er en stor global utfordring. Matsikkerhet er allerede en utfordring i dag, og det er estimert at 1 av 9 personer i verden var underernært i 2018, med særlig forekomst i fattige land (FN, 2020). I tillegg til å produsere nok mat må også maten som produseres sikre et næringsmessig balansert kosthold, da tilstrekkelig konsum av de ulike makro- og mikronæringsstoffene er en forutsetning for god helse (FHI, 2021). Det antas at særlig proteiner vil være et av næringsstoffene det vil være mangel på i fremtiden (Bleakley & Hayes, 2017).

Historisk sett har mangel på mat blitt løst ved å øke og effektivisere produksjonen i landbruket og fisket, som har ført til stor konkurranse om og press på ressurser som landarealer, ferskvann, energi og ville fiskebestander (Godfray *et al.*, 2010). I dag utnytter landbruket ca. 30 % av jordas landområder og 70 % av verdens ferskvannsressurser, og de fleste ville fiskebestandene er fullt utnyttet eller overutnyttet (FAO, 2017; FAO, 2020). Klimaendringene blir stadig tydeligere og bidrar til uforutsigbarhet i produksjonen på land da ferskvannsmangel og hyppigere forekomst av tørke og flom utfordrer produksjonen (Duarte *et al.*, 2009). Samtidig som landbruket påvirkes av klimaendringene er også landbruket en sentral bidragsyter til miljøutfordringene verden står foran (Tilman & Clark, 2014). Den økte produksjonen i landbruket er ofte knyttet til negative miljøpåvirkninger som ødeleggelse av naturlige habitater, avskoging og tap av biodiversitet, forurensing og avrenning av næringsstoffer som kan skade økosystemer og gi et høyt klimagassutslipp (Bleakley & Hayes, 2017). Selv ved økt og mer effektiv produksjon vil ikke vekst utelukkende i landbrukssektoren være tilstrekkelig for å møte fremtidens behov for mat (Mæhre, 2015). I tillegg vil økt produksjon føre til at presset på de

begrensede ressursene og utfordringene knyttet til miljø og klima forsterkes ytterligere. Behovet for å redusere de negative miljøeffektene matproduksjon har, er og blir stadig tydeligere (Godfray *et al.*, 2010; Willett *et al.*, 2019).

Animalske proteinkilder er en betydelig bidragsyter til dagens klimagassutslipp, og derfor er proteinproduksjon og proteinkonsum sentralt for bærekraft (Van Selm *et al.*, 2022). Selv om det å gjøre planteprotein om til animalsk protein for humant konsum er økonomisk og praktisk gjennomførbart, er det samtidig svært ressursineffektivt. Gjennomsnittlig kreves 6 kg planteprotein for å produsere 1 kg animalsk protein. Altså vil bare ca. 15 % av protein eller energi fra plantene bli konsumert indirekte av mennesker gjennom kjøtt, mens det resterende (ca. 85 %) ikke utnyttes. Siden produksjon av animalsk protein er så ressurskrevende, er det i fremtiden nødvendig at vi reduserer inntaket av animalsk protein og øker inntaket av planteprotein (Aiking, 2014). Dette vil kunne bidra til måloppnåelse for flere av bærekraftsmålene, deriblant økt matsikkerhet, miljømessig bærekraft og bedre human helse. Samtidig anbefaler Helsedirektoratet et variert kosthold med begrenset inntak av bearbeidet kjøtt og rødt kjøtt da høyt konsum er en risikofaktor for sykdom og tidlig død (FHI, 2021). Behovet for proteiner vil øke med befolkningsveksten og derfor er det nødvendig å undersøke nye, spesielt plantebaserte, biomasser som alternative proteinkilder (Bleakley & Hayes, 2017).

1.1 Økt satsing på marin produksjon

Det kan produseres mer mat dersom det gjøres på en mer effektiv måte. Havet dekker ca. 70 % av jordas overflateareal, men likevel utnyttes havområdene i svært liten grad til matproduksjon (Aksnes *et al.*, 2017). Beregnet ut fra energiinntak får vi i dag omtrent 2 % av all mat fra havet, og 15 % av proteininntaket er protein fra sjømat (Aksnes *et al.*, 2017), og det er bred enighet om at de store havområdene bør utnyttes bedre for å sikre en bærekraftig matproduksjon (FAO, 2020). Produksjonen i akvakultur har økt årlig med ca. 7,5 % siden 1970 (FAO, 2020), og en videre økning anses som en viktig faktor for å oppnå bærekraftig matsikkerhet (Godfray *et al.*, 2010; Willett *et al.*, 2019).

Det er forventet at akvakulturproduksjonen vil fortsette å øke i årene som kommer (FAO, 2020), og for en mer bærekraftig og effektiv produksjon av marin biomasse har kultivering av lavtrofiske arter et stort potensial (Aksnes *et al.*, 2017). Mellom hvert trofiske nivå i næringskjedene er det et betydelig tap av energi på mellom 80 og 97 % avhengig av økosystem (Bonhommeau *et al.*, 2013). Ved å kultivere og høste arter lavere i næringskjeden vil det være mulig å øke biomasseproduksjonen med et lavere forbruk av ressurser (Aksnes *et al.*, 2017).

Blant lavtrofiske organismer er makroalger ansett å være en biomasse med stort potensiale som kilde til flere viktige næringsstoffer.

1.2 Makroalger

Makroalger, eller «tang og tare», er en fellesbetegnelse på fotosyntetiske marine planter som vokser langs kysten. De deles ofte inn i tre taksonomiske grupper basert på deres fargepigmentering; rødalger (Rhodophyta), brunalger (Phaeophyta) og grønnalger (Chlorophyta). Algene vokser i fjæresonen og ned til 30 meters dyp, men noen arter vokser også dypere. Det er primært lystilgangen som begrenser vekstsonen (Indergaard, 2011). Makroalger skiller seg fra planter på land ved at de ikke har ekte rot, stengel og blad, men i stedet har et festeorgan og en plantekropp. De tar opp næring og vann over hele planten, og har derfor ikke indre kanaler for transport av vann og næringssalter til ulike delene av planten (Indergaard, 2011). Som primærprodusenter nederst i den marine næringskjeden tar de effektivt opp uorganisk materiale som karbon, nitrogen og fosfor (næringssalter) fra omgivelsene og omdanner det til makronæringsstoffer. Makroalger bidrar slik til mesteparten av biomassen i havet og 50 % av primærproduksjonen på jorda (Debbarma *et al.*, 2022).

Makroalger inneholder flere verdifulle næringsstoffer som for eksempel proteiner, karbohydrater, oligosakkarider, kostfiber, lipider og langkjedede flerumettet fettsyrer (PUFA), fenoler, pigmenter, vitaminer og mineraler. Blant disse komponentene er flere essensielle næringsstoffer for oss og flere av molekylene har nyttige bioaktive forbindelser som er knyttet til helsefordeler for mennesker (Demarco *et al.*, 2022; Pliego-Cortés *et al.*, 2020; MacArtain, 2007). Næringsinnholdet i makroalger varierer stort mellom de ulike artene, geografisk lokasjon, sesong og miljøforhold slik som vanntemperatur, salinitet, lysforhold og næringstilgang (Debbarma *et al.*, 2022).

1.2.1 Makroalger som ressurs

Makroalger er en del av det tradisjonelle kostholdet i flere asiatiske land der de blant annet brukes som ingredienser i supper, salater, sushi og snacks (Cai *et al.*, 2021). Ifølge statistikk publisert av FNs organisasjon for ernæring og landbruk (FAO) er det Sør-Korea, Kina og Japan som konsumerer størst andel akvatiske planter som mat, med et omtrentlig daglig inntak på henholdsvis 90, 33 og 3 gram (FAO, 2022). Brunalgene *Saccharina japonica* (kombu) og *Undaria pinnatifida* (wakame) og rødalgen *Porphyra tenera* (nori) er i disse landene og andre asiatiske land vanlige arter til konsum, og de er ansett som en god kilde til fiber, proteiner og mineraler (Demarco *et al.*, 2022).

Historisk sett er makroalger også utnyttet til mat og fôr i kystsamfunn nord i Europa, særlig i perioder med matmangel (Mæhre *et al.*, 2014). I dag er utnyttelsen til direkte konsum derimot begrenset, men oppmerksomheten rundt makroalger som en verdifull matkilde har økt de siste årene (Fleurence *et al.*, 2017). Forekomsten av nye produkter med dyrket tare som ingrediens har økt, for eksempel er makroalger tilsatt som ingrediens i krydderblandinger, ulike snackprodukter og fiskeburgere, men likevel er det fortsatt få som jevnlig konsumerer makroalger (Blikra *et al.*, 2020). I Norge utnyttes makroalger i dag hovedsakelig til industriell produksjon av alginat, agar og karragenan (polysakkarider) som ekstraheres fra ville bestander makroalger. Alginat ekstraheres fra brunalger, mens karragenan og agar ekstraheres fra rødalger. Disse brukes blant annet som tilsetningsstoffer eller funksjonelle ingredienser og har egenskaper som stabiliserende-, geledannende- og tykningsmidler i næringsmiddelindustrien (Mæhre *et al.*, 2014).

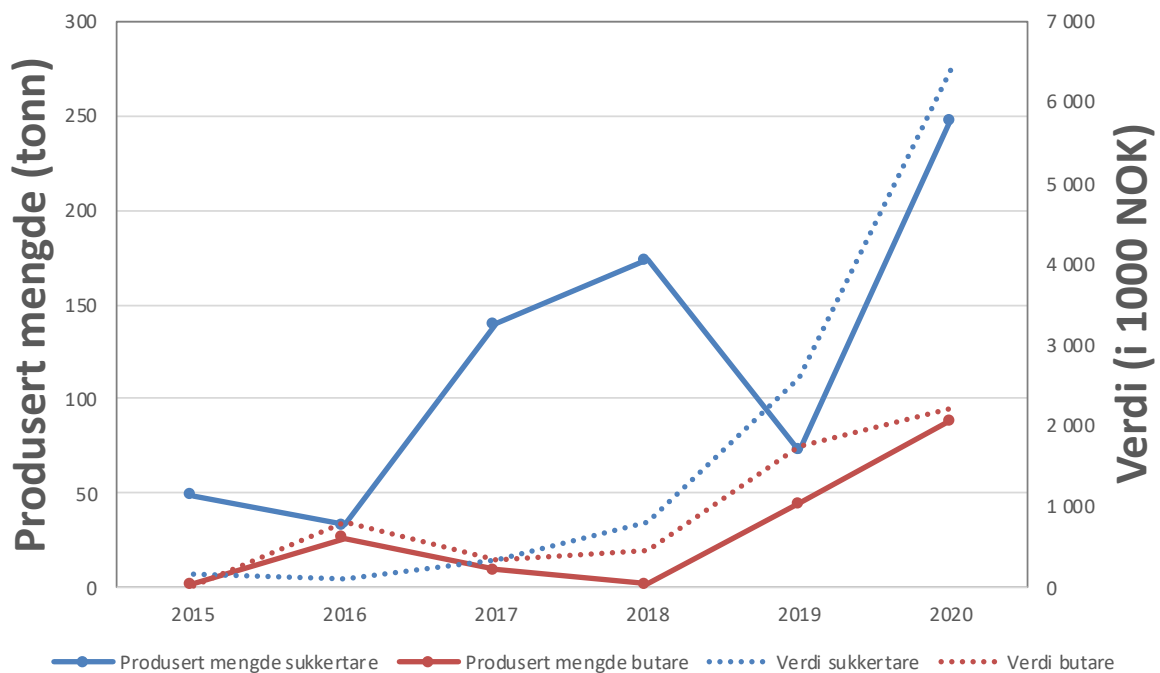
1.2.2 Kultivering av makroalger

Fra 1950 har global produksjon av makroalger økt med 1000 ganger fra 34,7 tusen tonn til 34,7 millioner tonn (våtvekt) i 2019 (Cai, 2021). I 2019 utgjorde den totale produksjonen av makroalger nesten 30 % av verdens totale akvakulturproduksjon, og etter karpefisk var rødalger og brunalger andre og tredje mest produserte artsgruppe. Av den totale produksjonen i 2019 ble hele 98 % produsert i fem asiatiske land (Kina, Indonesia, Sør-Korea, Filippinene og Nord-Korea) (Cai & Galli, 2021). Til tross for stor produksjon nesten utelukkende i Asia er likevel kultiverte makroalger ansett som en av de største uutnyttede globale biomasseressursene for en bærekraftig produksjon av mat og biomasse (Cai *et al.*, 2021; Mouritsen & Schmidt, 2020). I Europa har interessen for å industrialisere kultivering av makroalger økt betydelig de siste årene (Skjeremo *et al.*, 2014). Dette skyldes blant annet at makroalger har stort potensiale innen flere bruksområder slik som direkte til konsum, som ingrediens, bioaktive komponenter i funksjonell mat og fôr, phycocolloider, gjødsel, biodrivstoff og bioremediering (biologisk fjerning av forurensing). For å sikre stabil tilgang på biomasse til nevnte formål er kultivering ansett som nødvendig (Mæhre *et al.*, 2016b).

1.2.3 Kultivering av makroalger i Norge

Norge er et av de europeiske landene der interessen for kultivering av makroalger har økt de siste årene og interessen stadig øker (Norderhaug *et al.*, 2020). De første tillatelsene for produksjon ble tildelt i 2014 og antallet har økt raskt fra 54 tillatelser i 2014 til 520 tillatelser i 2021 (Fiskeridirektoratet, 2022).

Så langt er det hovedsakelig brunalgene sukkertare (*Saccharina latissima*) og butare (*Alaria esculenta*) som produseres i Norge, mye på grunn av at de naturlig vokser langs norskekysten og derfor relativt enkelt lar seg dyrke under miljøforholdene som er her (Norderhaug *et al.*, 2020). Sukkertare er den europeiske arten som vokser raskest, og som produseres i størst volum i Europa. Arten kan sammenlignes med *Saccharina japonica* som kultiveres i store mengder i Asia blant annet til humant konsum (Skjermo *et al.*, 2014). I 2020 ble det totalt produsert og høstet 336 tonn (våtvekt) sukkertare og butare i Norge (til konsum og fôr) til en verdi på 8,6 millioner kroner. Dette var en økning på over 280 % fra 2019. Figur 1 illustrerer produsert mengde og verdi av artene sukkertare og butare høstet i Norge fra 2015-2020 (Fiskeridirektoratet, 2022).



Figur 1. Høsting av makroalger til konsum og fôr i Norge. Produsert mengde i tonn (heltrukken linje) og verdi i 1000 NOK (stiplet linje) av sukkertare (blå linje) og butare (rød linje) høstet i Norge fra 2015-2020 (Fiskeridirektoratet, 2022).

Norge har en lang kystlinje, sjøvann med egnet salinitet og temperatur som ikke er for høy om sommeren eller for lav om vinteren, gode lysforhold og lange perioder med god tilførsel av næringssalter. Disse naturgitte forutsetningene gir et stort potensial for økt produksjon og muliggjør dyrkning av makroalger i industriell skala (Norderhaug *et al.*, 2020; Skjermo *et al.*, 2014). Ved økt produksjon er det hensiktsmessig at det undersøkes hvordan biomassen kan

utnyttes best mulig. Makroalger har et høyt innhold av karbohydrater, derfor var fokuset i næringen opprinnelig å produsere biodrivstoff. I dag derimot er det et ønske om å produsere produkter med høyere markedsverdi. Siden makroalger har et høyt innhold av andre næringsstoffer og bioaktive komponenter er biomassen interessant til en rekke produkter, som for eksempel ingredienser i næringsmidler, fôr og kosmetikk (Blikra *et al.*, 2020; Mæhre 2015).

1.3 Makroalger som proteinkilde

Makroalger er ansett som en lovende kilde til planteprotein som mulig kan bidra til en mer bærekraftig produksjon av mat og samtidig bidra til å dekke fremtidig proteinbehov (Harrysson *et al.*, 2018).

1.3.1 Proteiner

Proteiner er essensielle makronæringsstoffer som har flere viktige funksjoner i kroppen. De er blant annet nødvendig for å opprettholde normal vekst, utvikling og struktur, enzymaktivitet, som hormoner, for transport av næring og andre biokjemiske komponenter over cellemembraner og som næringsstoffer. Proteiner består av aminosyrer (AA) bundet sammen til polypeptider via peptidbindinger. Det er 20 ulike aminosyrer som inngår i proteiner. Ni av disse er essensielle aminosyrer (EAA) for mennesker fordi de ikke syntetiseres i kroppen og derfor må tilføres via kostholdet. De essensielle aminosyrene for friske voksne er fenylalanin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, treonin, tryptofan og valin. For å opprettholde proteinenes funksjoner må kroppen tilføres tilstrekkelig protein med en aminosyresammensetning som dekker behovet for de essensielle aminosyrene (Damodaran & Parkin, 2017). Et referanseprotein med "ideell" aminosyresammensetning som inneholder minimumskravene til EAA er definert av FAO/WHO/UNU til sammenligningsformål. Den anbefalte mengden protein og EAA avhenger av alder, og anbefalt mengde totalt protein og EAA for friske voksne er vist i tabell 1 (FAO/WHO/UNU, 2007).

Tabell 1. Anbefalt mengde essensielle aminosyrer (EAA) i mg/g protein og totalt protein i mg/kg kroppsvekt/dag for friske voksne (modifisert fra FAO/WHO/UNU, 2007).

EAA	mg/g protein
Fenylalanin + tyrosin*	38
Histidin	15
Isoleucin	30
Leucin	59
Lysin	45
Metionin	16
Treonin	23
Tryptofan	6
Valin	39

Totalt protein (mg/kg kroppsvekt/dag) 0,66

* Mengde fenylalanin (EAA) og tyrosin (ikke-essensiell aminosyre) er gitt som anbefalt totalt inntak.

I tillegg til aminosyresammensetning med tilstrekkelig mengde EAA avhenger den ernæringsmessige proteinkvaliteten av proteinenes biotilgjengelighet (Damodaran & Parkin, 2017). Biotilgjengeligheten eller fordøyeligheten omhandler proteinets evne til å bli fordøyd og absorbert i tarmen, altså i hvilken grad aminosyrene brytes ned og tas opp slik at det kan utnyttes der det har sin funksjon i kroppen (Bleakley & Hayes, 2017). Det er flere faktorer som påvirker biotilgjengeligheten til et protein, for eksempel næringsmiddelets eller biomassens biokjemiske egenskaper og sammensetning, proteinkonformasjon og proteinstruktur, tilstedeværelse av antinæringsstoffer og eventuell prosessering av biomassen (Damodaran & Parkin, 2017). Antinæringsstoffer er komponenter som interfererer med absorpsjonen av et næringsstoff og virker ved å redusere næringsopptak, fordøyelse og forbruk (Astley & Finglas, 2016).

1.3.2 Proteinfordøyelse

Mesteparten av maten vi spiser går inn i mage-tarmkanalen som større partikler bestående av makromolekyler som ikke kan tas opp av tarmcellene (Widmaier *et al.*, 2018). For at disse makromolekylene skal kunne absorberes ved at de tas opp over epitelcellene i tarmen må de brytes ned til mindre komponenter. Nedbrytingen av næringsstoffene involverer en rekke fordøyelsesenzymmer og andre kjemiske forbindelser som skilles ut av fordøyelsessystemets eksokrine kjertler ut i tarmlumen. I tillegg er noen fordøyelsesenzymmer lokalisert på

cellemembranen til tarmcellene (Widmaier *et al.*, 2018). Gjennom proteinfordøyelsen hydrolyseres proteiner til mindre peptider og AA som kan absorberes i tarmkanalen. Denne prosessen involverer flere proteolytiske enzymer (Bhutta & Sadiq, 2013). I magesekken hydrolyserer pepsin proteiner til mindre polypeptider og AA. Pepsin har bred spesifisitet, men hydrolyserer hovedsakelig peptidbindinger som involverer fenylalanin, tyrosin og leucin. Pepsin har sitt pH optimum rundt pH 2 som er i magesekken og vil ha liten aktivitet i tynntarmen der det er nøytral pH. Proteasene trypsinogen, chymotrypsinogen, proelastase, procarboxypeptidase A og procarboxypeptidase B skilles ut fra bukspyttkjertelen ut i tynntarmen som proenzymer. Enteropeptidase, som skilles ut fra tarmveggen, aktiverer trypsinogen til trypsin som videre aktiverer de andre proenzymene, i tillegg til å stimulere til autokatalyse av trypsinogen til aktiv form. Proteasene fra bukspyttkjertelen har ulik spesifisitet, og hydrolyserer polypeptidene til mindre polypeptider (to til seks AA) og frie AA. Trypsin, chymotrypsin, elastase er endopeptidaser som hydrolyserer peptidbindinger innad i proteinet, mens carboxypeptidase A og B er exopeptidaser som spalter av AA på karboksylenden av peptidkjeden. Videre er det flere peptidaser i tarmcellene som spalter produktene ytterligere (Bhutta & Sadiq, 2013).

1.3.3 Proteininnhold i makroalger

Proteininnholdet i makroalger varierer stort mellom ulike arter. Det er generelt lavere i brunalger (3 til 15 % av tørrvekt), moderat i grønnalger (9 til 26 % av tørrvekt) og høyere i rødalger (opp til 47 % av tørrvekt). I likhet med biokjemisk sammensetning for øvrig, varierer proteininnholdet etter geografisk lokasjon, sesong og miljøforhold (Debbarma *et al.*, 2022). Til tross for at artene som tilhører gruppene rød- og grønnalger inneholder mest protein, er potensialet for å produsere store kvantum biomasse gjennom kultivering lavere på grunn av at disse algene er små. Selv om sukkertare og andre brunalger generelt har lavt proteininnhold, anses potensialet å være større på grunn av høyere forventet produksjonsvolum (Skjeremo *et al.*, 2014).

I motsetning til animalske proteinkilder anses en rekke planteproteiner som ikke-fullverdige proteiner da de mangler en eller flere av de EAA (Bleakley & Hayes, 2017). Hvilke EAA planteproteiner mangler, eller har et lavt innhold av, varierer mellom arter. Proteiner fra brunalger har blitt beskrevet som en god kilde til aminosyrene treonin, valin, leucin, lysin, glycin og alanin, mens det er mindre av cystein, metionin, histidin, tryptofan og tyrosin (Holdt & Kraan, 2011). Asparginsyre og glutaminsyre er ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og

utgjør generelt en relativ stor andel av totale aminosyrer (TAA) i makroalger. Disse AA finnes særlig mye av i brunalger, og gir opphav til smaken «umami» som ofte assosieres med makroalger (Bleakley & Hayes, 2017; Fleurence *et al.*, 2017). Til tross for at makroalger kan ha et begrenset innhold av enkelte AA anses biomassen som en interessant og lovende proteinkilde til humant konsum og fôr. Aminosyresammensetningen i enkelte arter makroalger sammenlignes ofte med proteiner fra andre proteinkilder som møter FAOs anbefalinger til EAA slik som soyabønner, egg og belgfrukt (Bleakley & Hayes, 2017; Fleurence, 2017).

Biotilgjengeligheten til planteproteiner er generelt lavere sammenlignet med animalske proteiner (Damodaran & Parkin, 2017). En grunn til dette er at planter har et relativt høyt innhold av antinæringsstoffer sammenlignet med animalske proteinkilder (Juul *et al.*, 2022). Makroalger inneholder flere typer antinæringsstoffer som trypsinheimmere, fytinsyre og tanniner, men i brunalger er det hovedsakelig polyfenoler som påvirker biotilgjengeligheten til proteinene (Harrysson *et al.*, 2018). Polyfenoler virker som antinæringsstoff ved å bindes til makromolekyler (proteiner eller polysakkarider) slik at det dannes uløselige komplekser som gjør makromolekylene mindre tilgjengelige. Polyfenoler kan også påvirke næringsstoffenes biotilgjengelighet ved å interagere med fordøyelsesenzymene slik at enzymaktiviteten i tarmkanalen hemmes (Mæhre, 2015).

En annen grunn til at biotilgjengeligheten til planteproteiner generelt er lavere enn for animalske proteiner er at i motsetning til animalske celler har planteceller cellevegg. Celleveggen er rigid og består hovedsakelig av komplekse polysakkarider der cellulose utgjør hovedbestanddelen, men også av noe protein (Mæhre *et al.*, 2016b). Makroalger inneholder ulike typer proteiner som for eksempel lagringsproteiner, enzymer, peptider, glykoproteiner, lektiner og cellevegg-assosierte proteiner (Pliego-Cortés *et al.*, 2020). Mesteparten av disse proteinene er lokalisert intracellulært eller i tilknytning til celleveggenes polysakkarider. For å nytte seg av de intracellulære proteinene, må celleveggen brytes slik at proteinene frigjøres fra cellen, og videre hydrolyseres av fordøyelsesenzymene og absorberes i tarmen. Polysakkaridene i plantecellers cellevegg er ufordøyelig for mennesker fordi fordøyelsessystemet vårt ikke har enzymer som kan hydrolysere bindingene i plantecelleveggen (β -1,4-glykosidbindinger) (Mæhre *et al.*, 2016b).

En stor andel av proteinene lokalisert i celleveggen er glykoproteiner. Glykoproteiner er proteiner som er bundet sammen med en karbohydratdel gjennom glykosylering. Glykosyleringen gjør at det dannes sterke interaksjoner mellom proteinet og de komplekse

polysakkaridene i celleveggen. Man antar at dette kan beskytte glykoproteinene mot de proteolytiske fordøyelsesenzymene og dermed hindre fordøyelse og absorpsjon (Fleurence *et al.*, 2017; Mæhre, 2015). Totalt sett er det celleveggens polysakkarider og et høyt innhold av polyfenoler som reduserer biotilgjengeligheten til proteiner i brunalger (Fleurence *et al.*, 2017; Harrysson *et al.*, 2018). Den lave biotilgjengeligheten til planteproteiner er en utfordring både når det gjelder potensialet biomassen har som proteinkilde når den konsumeres direkte, men også for biomassens potensiale som råstoff for produksjon av proteinkonsentrater da biotilgjengeligheten også påvirker ekstraksjonsprosessen (Harrysson *et al.*, 2018).

Til tross for at det er mye som tyder på at proteinene i sukkertare og andre brunalger har svært lav biotilgjengelighet, får makroalger stadig mer oppmerksomhet som en bærekraftig kilde til protein. Det er derfor nødvendig å karakterisere den ernæringsmessige proteinkvaliteten ytterligere for å kunne vurdere potensialet makroalger har som proteinkilde (Juul *et al.*, 2022). Dette inkluderer biomassens biokjemiske egenskaper, sammensetning og biotilgjengelighet. Biokjemisk sammensetning er allerede beskrevet for mange arter makroalger, men variasjonen er ofte stor mellom ulike arter og studier (sannsynligvis pga. sesongvariasjoner og metodiske forskjeller) (Mæhre, 2015). *In vitro* studier er svært relevant for å gi nyttig kunnskap om interaksjoner mellom komponenter i biomassen, effekten av pH, ulike enzymer og potensialet for ulike næringsstoffer å bli absorbert (Demarco *et al.*, 2022).

1.4 Hensikt og mål med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven er å karakterisere sukkertarens biokjemiske sammensetning og undersøke komponentenes biotilgjengelighet nærmere. Sukkertare ble valgt som biomasse fordi det er denne arten det produseres mest av i Norge per i dag og et viktig mål med satsningen på dyrking av tang og tare er å utnytte biomassen som næringsmiddel og proteinkilde.

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke biotilgjengelighet eller fordøyelighet til proteinet i sukkertare, og vurdere om fraksjonering av denne biomassen i ulike partikkelstørrelser har effekt på biotilgjengeligheten. Biotilgjengeligheten og potensiell effekt av fraksjonering ble studert gjennom en *in vitro* gastrointestinal (mage-tarm) fordøyelse.

Spesifikke delmål:

1. Bestemme biokjemisk sammensetning i fryst og tørket sukkertare, med fokus på proteininnhold og aminosyresammensetning.
2. Undersøke om protein i sukkertare kan fordøyes ved bruk av en forenklet fordøyelsesmodell.
3. Undersøke om oppmaling og fraksjonering av sukkertaren i ulike partikkelstørrelser og forbehandling med Ultra-Turrax gjør algeproteinene lettere tilgjengelig.
4. Undersøke om pepsintyper med ulik spesifikk aktivitet, ulike konsentrasjoner av pancreatin og om ulike buffere som benyttes i slike fordøyelsesassay påvirker fordøyeligheten.
5. Undersøke hvordan pH påvirker proteinløseligheten i intakt tørket sukkertare.
6. Bestemme ekstraksjonsutbyttet ved standard proteinekstraksjon fra intakt tørket sukkertare.

2 Materialer og metoder

2.1 Biomasse

Sukkertare (*Saccharina latissima*) produsert av Lyngen Seaweed AS ble benyttet i dette masterstudiet. Taren er dyrket ved Uløya ytterst i Lyngenfjorden i Nord-Troms (figur 2). Grunnlaget for dyrkingen er lokale stiklinger som ble plukket på lokaliteten og videre podet på et stiklingsanlegg på Nofima i november 2020. Makroalgene ble satt ut igjen på lokaliteten i februar 2021 der de vokste seg store, før de ble høstet sent i mai/tidlig juni. Etter høsting ble makroalgene skylt godt i ferskvann før noe ble direkte fryst, mens noe ble hengt ute til tørking (naturtørket) og lagret tørt.



Figur 2. Sukkertare høstes fra lokalitet ved Uløya (venstre), høstet sukkertare (midten) og naturtørket sukkertare (høyre). Foto: Annbjørg Reiersen.

I dette studiet er både fryst materiale (FM) og tørket materiale (TM) benyttet som utgangsmateriale. Det tørkede materialet ble videre oppmalt ved hjelp av både kvern (MF 10 basic, IKA-Werke GmbH & Co, Staufen im Breisgau, Tyskland) og kaffekvern (OBH Nordica 2393 Coffee Mill, OBH Nordica, Stockholm, Sverige) for å oppnå tilstrekkelig fraksjonering. Det oppmalte materialet ble så separert i fire ulike partikkelstørrelser (<180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm og >500 μm) på Nofima ved å bruke en sikt (AS 200 Retsch sieve shaker, Retsch GmbH, Tyskland) med ulike maskestørrelser. De ulike prøvene og størrelsesfraksjonene ble oppbevart i tette bokser og zip-lockposer ved ca. -20°C inntil videre analyse.

2.2 Kjemikalier

DL-Norleucine, pepsin fra gris (P7125, P6887), pancreatin fra gris (P1750), kaliumklorid (KCl), dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4), natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3), galleekstrakt fra gris (B8631), kaliumnatriumtartrat-tetrahydrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), natriumhydroksid (NaOH), kobber(II)sulfat-pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), bovint serumalbumin (BSA), Folin &

Ciocalteus fenolreagens, L-tyrosin og aminosyrestandarder (Amino acid standards, physiological – acids and neutrals, A6407 og Amino acid standards, physiological – basics, A6282) var fra Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dinatriumhydrogenfosfat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), kalsiumklorid-dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natriumkarbonat (Na_2CO_3), trikloreddiksyre (trichloroacetic acid; TCA) og trinatriumsitrat-dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) var fra Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland).

Saltsyre (HCl) 37 % var fra VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, Frankrike), natriumklorid (NaCl) var fra VWR International (Leuven, Belgia), magnesiumklorid-heksahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) var fra Avantor Performance Materials B.V. (Deventer, Nederland), nitrogengass var fra Linde gas AS (Oslo, Norge) og litiumloadingbuffer (Lithium loading buffer, pH 2,2) og ninhydrinløsning (Ultra Ninhydrin reagent kit) var fra Biochrom Ltd (Cambridge, Storbritannia).

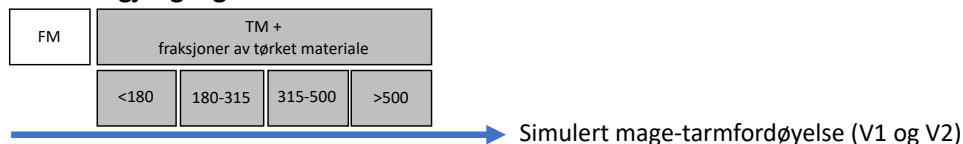
2.3 Forsøksdesign

Innledningsvis ble den biokjemiske sammensetningen i utgangsmaterialet fryst sukkertare (FM) og tørket sukkertare (TM) undersøkt (se figur 3 for oversikt over forsøksdesignet). Dette inkluderte bestemmelse av vann- og askeinnhold, aminosyreanalyse og proteininnhold. Videre ble fordøyeligheten til proteiner i FM, TM og de ulike fraksjonene av tørket materiale (<180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm og >500 μm) studert gjennom en forenklet simulert gastrointestinal fordøyelsesmodell (mage-tarmfordøyelse). Fordøyelsesforsøket ble gjort med to ulike løsninger (versjon 1 og versjon 2) for alle prøver. I tillegg ble det gjennomført fordøyelsesforsøk med ulike enzymtyper, enzymkonsentrasjoner og forbehandling med Ultra-Turrax for noen bestemte prøver. De ulike fordøyelsesforsøkene som ble gjennomført (forsøk 1-5) er beskrevet nærmere i kapittel 2.4.2. Supernatanter fra fordøyelsesforsøkene ble videre analysert for proteininnhold vha. en modifisert variant av Lowrys metode, og nedbrutt (TCA-løselig) protein ble bestemt etter felling med TCA (trikloreddiksyre). Variasjon i pH-avhengig proteinløselighet og mengde ekstraherbart protein fra intakt tørket sukkertare (TM) ble også undersøkt. I tillegg ble proteinekstraksjon gjort på utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) etter endt fordøyelse.

1. Biokjemisk sammensetning i sukkertare



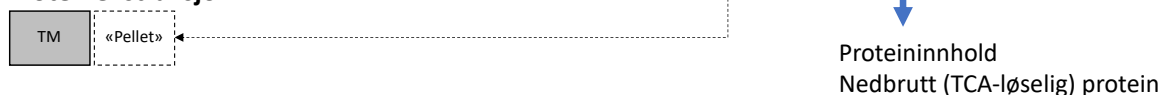
2. Proteintilgjengelighet



3. Proteinløselighet



4. Proteinekstraksjon



Figur 3. Forsøksdesign for oppgaven. Biokjemisk sammensetning i sukkertare ble først bestemt. Deretter ble sukkertaren fraksjonert i ulike størrelsesfraksjoner (<180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm og >500 μm) og alle prøver ble fordøyd ved bruk av en forenklet simulert gastrointestinal fordøyelsesmodell. Totalt proteininnhold i supernatant ble bestemt vha. en modifisert variant av Lowrys metode, og nedbrutt (TCA-løselig) protein ble bestemt etter felling med TCA (trikloreddiksyre). Variasjon i pH-avhengig proteinløselighet og mengde ekstraherbart protein fra intakt tørket sukkertare (TM) ble også undersøkt. I tillegg ble proteinekstraksjon gjort på utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) fra fordøyelsesforsøkene.

2.4 Metoder

2.4.1 Biokjemisk sammensetning i sukkertare

2.4.1.1 Vann- og askeinnhold

Vann- og askeinnholdet i utgangsmaterialet fryst sukkertare (FM) og tørket sukkertare (TM) ble bestemt gravimetrisk med tre analyseparalleller ved å bruke en modifisert versjon av AOAC 950.46b og AOAC 938.08 (Horwitz, 2004).

FM (ca. 10 gram) og TM (ca. 2 gram) ble veid ut i forhåndsveide aluminiumsbeger. Prøvene ble tørket i varmeskap (Heratherm OMS 180, Thermo Scientific, MA, USA) på 105°C i 24 timer til vekta var konstant, og prøvene ble veid på nytt. Det prosentvise vanninnholdet i prøvene ble beregnet ved bruk av formel 1.

Formel 1:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt før tørking (g)} - \text{Vekt etter tørking (g)}}{\text{Vekt før tørking (g)}} \cdot 100 \%$$

De vannfrie prøvene ble videre brukt til å bestemme askeinnholdet. Prøvene ble satt i forbrenningsovn (Program Controller S27, Nabertherm GmbH, Lilienthal, Tyskland) ved 540°C i 16 timer. Etter forbrenning ble prøvene veid, og askeinnholdet ble beregnet i prosent av tørrvekten ved bruk av formel 2.

Formel 2:

$$\text{Askeinnhold (\% av tørrvekt)} = \frac{\text{Vekt etter tørking og forbrenning (g)}}{\text{Vekt etter tørking (g)}} \cdot 100 \%$$

2.4.1.2 Aminosyreanalyse og bestemmelse av proteininnhold

Totale aminosyrer i utgangsmaterialet (FM og TM) ble bestemt med en metode modifisert fra Mæhre *et al.* (2016a) og Moore & Stein (1963). Aminosyreanalysene ble gjort med to analyseparalleller for hver prøve.

En bestemt mengde prøve, internstandard (DL-norleucine, 20 mM) og Milli-Q-vann ble blandet til et totalvolum på ca. 1,2 ml i 4 ml glassrør. For tørket sukkertare (TM) ble dette forholdet 120 mg prøve, 0,5 ml internstandard og 0,6 ml H₂O (Milli-Q). For fryst sukkertare (FM) ble dette 600 mg prøve, 0,5 ml internstandard og 0,1 ml H₂O (Milli-Q). Nøyaktig innveid vekt ble notert. For å bryte peptidbindingene i proteinene ble prøvene syrehydrolysert. Prøveglassene ble tilsatt 1,2 ml konsentrert saltsyre (37 %) og flushet med N₂-gass i 10-15 sekunder før lokk ble satt på for å hindre oksidasjon. Videre ble prøvene satt i varmeskap (Heratherm OMS 180, Thermo Scientific, MA, USA) på 105°C i 22-24 timer.

Etter syrehydrolyse ble prøvene tatt ut av varmeskapet og avkjølt, før 1000 µl prøve ble overført i sentrifugerør (eppendorffrør) og sentrifugert (Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) på 18400 g (RCF) i 5 minutter for å fjerne eventuelle partikler. 100 µl supernatant ble så overført til analyserør og dampet inn til tørrhet med N₂-gass. Prøvene ble så løst ut i 1 ml litiumloadingbuffer og oppbevart i kjøleskap (2°C) inntil analyse.

Prøvene ble analysert ved bruk av en Biochrom 30⁺ aminosyreanalysator med en litiumcitrat-ekvilibrert kolonne og postkolonne-derivatisering med ninhydrin (Ultra Ninhydrin reagent kit). Signalene ble analysert med Chromeleon Software og identifikasjonen av aminosyrene ble gjort ved sammenligning med standardkurve med to fysiologiske aminosyrestandarder (A6407 og A6282).

Totalt proteininnhold i prøvene ble bestemt som summen av AA som inngår i protein, men hvor ett vannmolekyl ble fratrukket molekylvekten til de enkelte aminosyrene og summert til slutt, se formel 3.

Formel 3:

$$\text{Totalt protein (\%)} = \frac{\text{mg AA}}{\text{g prøve}} \cdot \frac{\text{molekylvekt AA} - \text{molekylvekt vann}}{\text{molekylvekt AA}} \cdot 100 \%$$

2.4.2 Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein

Fordøyeligheten av protein i de ulike sukkertareprøvene (FM, TM, <180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm og >500 µm) ble undersøkt gjennom en simulert, forenklet gastrointestinal fordøyelse modifisert fra Jensen *et al.* (2009) og Ageeva (2014). Kommersielle enzymer fra gris ble brukt for å simulere mage-tarmfordøyelsen i mennesker, først pepsin ved sur pH (magefase, pH 2) så pancreatin (enzymene i bukspyttkjertelen) ved nøytral pH (tarmfase, pH 7) i en total 100 minutters inkubasjon. Det ble benyttet to ulike løsninger i fordøyelsesforsøket, versjon 1 (V1) og versjon 2 (V2). Løsningene for V1 og V2 var henholdsvis fra Ageeva (2014) og Jensen *et al.* (2009).

Løsninger V1:

- Pepsinløsning 0,5 L: 2,31 g pepsin* ble løst i 0,5 L 0,01 M HCl.
- Pancreatinløsning 1,0 L: 0,4 g pancreatin ble løst i 1,0 L 0,2 M natriumfosfatbuffer.

Løsninger V2:

- Pepsinløsning 0,5 L: 2,31 g pepsin* + 1,432 g NaCl + 0,448 g KCl + 0,555 g CaCl₂ + 0,115 g MgCl₂ + 0,305 g K₂HPO₄ ble løst i 0,5 L dH₂O.
- Pancreatinløsning 0,05 L: 0,42 g NaHCO₃ + 1,25 g galleekstrakt + 0,02 g pancreatin ble løst i 50 ml dH₂O.

*Pepsin- og pancreatinkonsentrasjonen i begge versjoner av løsningene var henholdsvis 0,00462 g/ml og 0,0004 g/ml løsning. Det ble brukt to ulike typer pepsin fra gris (P7125, P6887)

med forskjellig enzymaktivitet. Pepsin P7125 hadde ≥ 400 enzymenheter/mg protein og P6887 hadde ≥ 3200 enzymenheter/mg protein i henhold til produsentens definisjon¹.

Det ble totalt gjort fem ulike fordøyelsesforsøk (forsøk 1-5) der prøver, løsninger (V1 eller V2), eventuell forbehandling av prøver, enzymtype og enzymkonsentrasjoner benyttet varierte noe (se figur 4 for oversikt over forsøk 1-5).

Forsøk 1: Først ble det gjennomført et fordøyelsesforsøk med alle prøver (FM, TM, $<180 \mu\text{m}$, $180-315 \mu\text{m}$, $315-500 \mu\text{m}$ og $>500 \mu\text{m}$) med både V1 og V2 av løsningene som beskrevet over (pepsin- og pancreatinkonsentrasjon på henholdsvis $0,00462 \text{ g/ml}$ og $0,0004 \text{ g/ml}$) og pepsintype P7125.

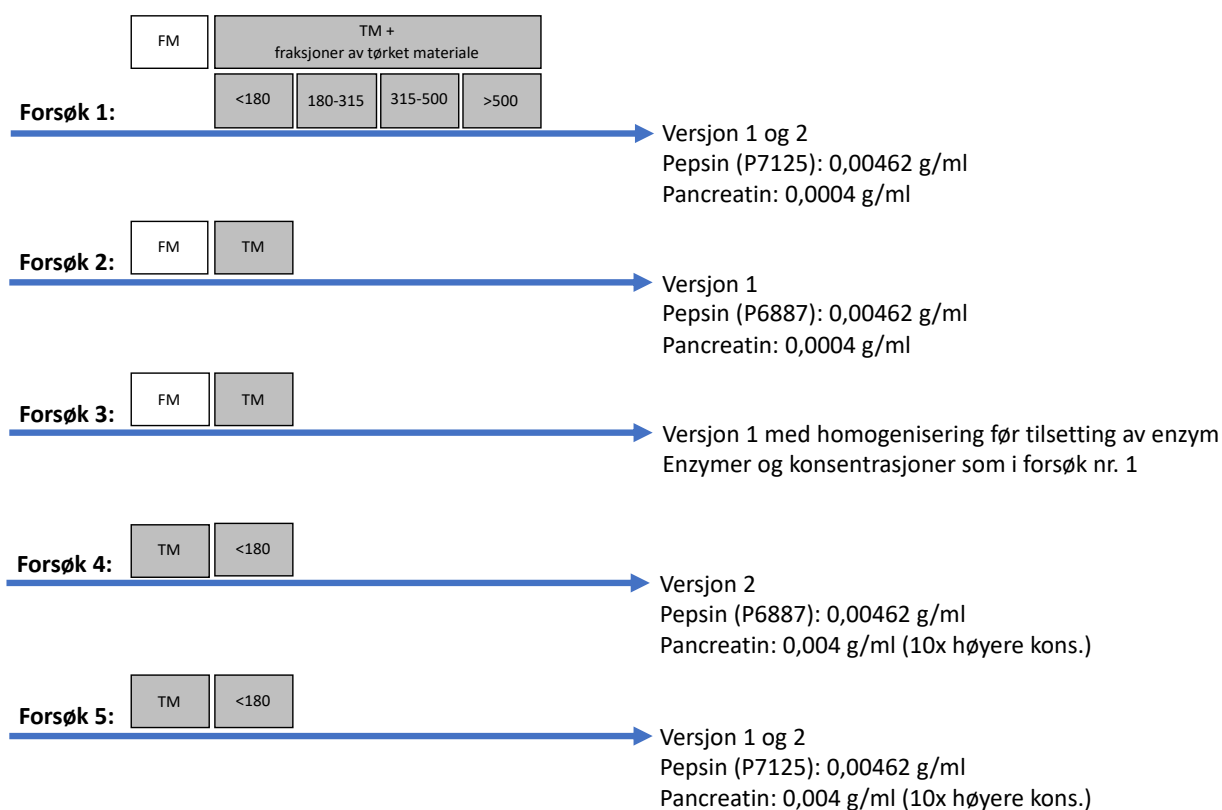
Forsøk 2: Videre ble FM og TM undersøkt med V1 av løsningene, med pepsintype P6887 og samme enzymkonsentrasjoner som i forsøk 1.

Forsøk 3: I forsøk 3 ble FM og TM undersøkt med V1 av løsningene og samme enzymtype og enzymkonsentrasjoner som i forsøk 1, men prøvene ble homogenisert vha. Ultra-Turrax (T25 BASIC, IKA-Werke GmbH & Co, Staufen im Breisgau, Tyskland) før tilsetning av enzymer.

Forsøk 4: I forsøk 4 ble TM og $<180 \mu\text{m}$ undersøkt med V2 av løsningene, med pepsintype P6887 og 10x høyere pancreatinkonsentrasjon ($0,004 \text{ g/ml}$).

Forsøk 5: I forsøk 5 ble TM og $<180 \mu\text{m}$ undersøkt med begge løsninger (V1 og V2), med pepsintype P7125 og 10x høyere pancreatinkonsentrasjon ($0,004 \text{ g/ml}$).

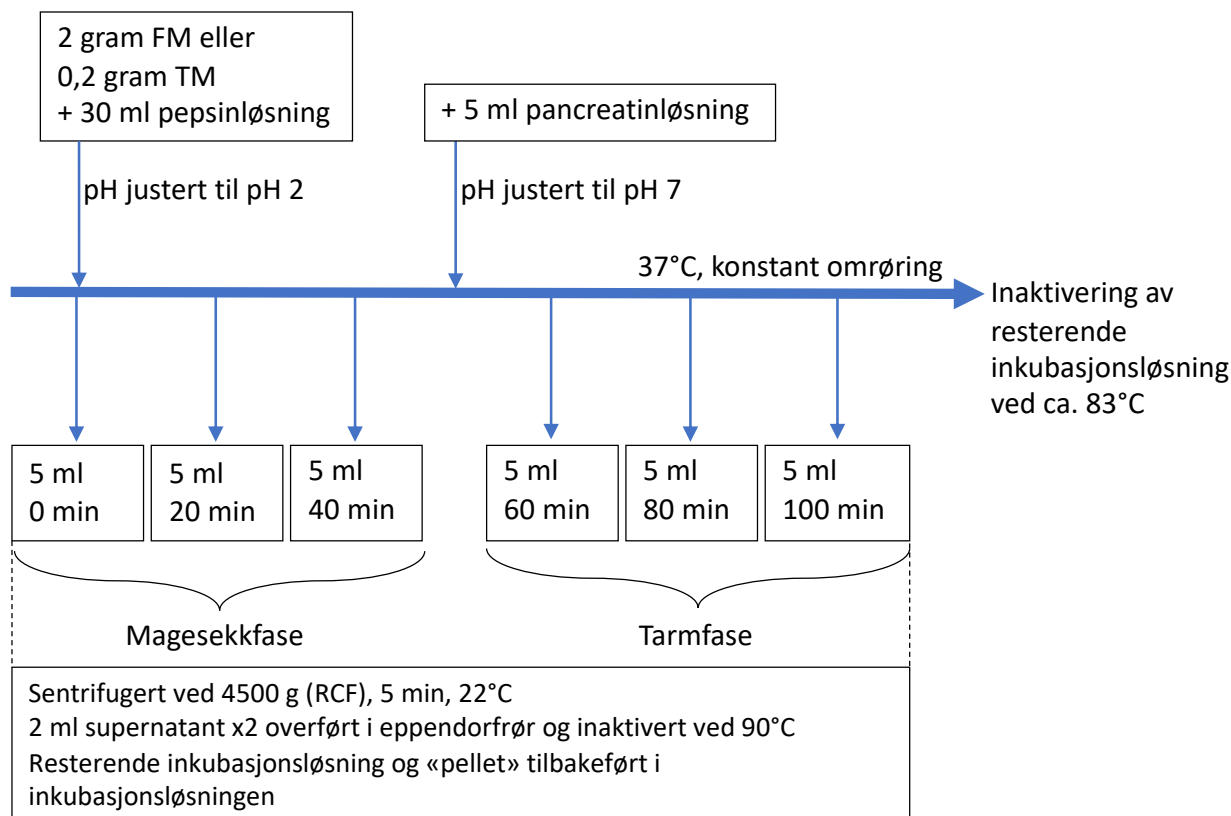
¹ En enhet gir en ΔA_{280} på 0,001 per minutt ved pH 2,0 ved 37°C, målt som TCA-løselig produkt med hemoglobin som substrat (<https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p7125>; <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p6887>).



Figur 4. Oversikt over fordøyelsesforsøk 1-5.

Beskrivelse av praktisk framgangsmåte for simulert gastrointestinal (mage-tarm) fordøyelse (illustrert i figur 5):

1. Prøve (ca. 2 gram fryst sukkertare og 0,2 gram tørket sukkertare) ble veid ut i glassrør og nøyaktig prøvevekt notert.
2. 30 ml pepsinløsning (forhåndsvarmet til 37°C) ble tilsatt glassrørene, og pH i løsningen justert til pH 2 med 1 M HCl.
3. 5 ml prøve/«nullprøve/tid 0» ble tatt ut og overført i 15 ml sentrifugerør, og glassrørene (inkubasjonsløsningen) ble satt til inkubasjon i varmeskap (Inkubator type B8133, Termaks AS, Bergen, Norge) ved 37°C under konstant omrøring (RO 15 P, IKA-Werke GmbH & Co, Staufen im Breisgau, Tyskland).
4. Det ble totalt tatt ut 5 ml prøve fra inkubasjonsløsningen ved 6 tidspunkt; etter 0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter fordøyelsestid.
5. Etter prøveuttak 40 minutter ble 5 ml pancreatinløsning (forhåndsvarmet til 37°C) tilsatt inkubasjonsløsningen, og pH justert til pH 7 med 1 M NaOH.



Figur 5. Illustrasjon av praktisk framgangsmåte for simulert gastrointestinal (mage-tarm) fordøyelse.

Ved hvert prøveuttak (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter) ble tatt prøver sentrifugert ved 4500 g (RCF) (Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Electron Corporation, Osterode, Tyskland) i 5 min ved 22°C før 2 ml supernatant ble overført i to 2 ml eppendorfrør (med hull i lokket). Resterende supernatant og bunnfall/pellet ble tilbakeført til inkubasjonsløsningen i glassrørene. Supernatant i eppendorfrørene ble inaktivert i varmeblokk (Type BTA, Grant Instruments, Cambridge, England) ved 90°C i 5 min og deretter avkjølt på is frem til siste prøve var klar. Eppendorfrørene ble sentrifugert på 20000 g (RCF) (Centrifuge 5424 R) i 10 min ved 22°C og supernatant ble overført i nye 2 ml eppendorfrør. Prøvene ble så fryst ned på -20°C inntil videre analyse.

Resterende inkubasjonsløsning i glassrørene ble til slutt inaktivert i vannbad på ca. 83°C i 10 minutter og overført i 50 ml sentrifugerør vha. 2 ml 0,9 % NaCl-løsning. Også disse prøvene ble fryst ned på -20°C inntil videre analyse.

Det ble også satt opp parallelle kontrollforsøk, både prøver med sukkertare uten enzym (KUE) og enzymløsninger uten sukkertare (KUP). KUP ble brukt til å justere prøver for proteinbidraget fra enzymene og KUE til å vurdere eventuell effekt av enzymene.

2.4.2.1 Bestemmelse av proteininnhold etter fordøyelse

Totalt proteininnhold i supernatanter fra fordøyelsesforsøkene ble bestemt ved en modifisert metode basert på Lowry *et al.* (1951). Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å bruke BSA som standard.

Løsninger:

- Løsning A: 10 g Na_2CO_3 , 0,25 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ og 2 g NaOH ble løst i Milli-Q-vann til et totalvolum på 500 ml.
- Løsning B: 0,2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ble løst i Milli-Q-vann til et totalvolum på 200 ml.
- Løsning C (ble laget ny hver dag): 5 ml løsning B ble blandet med 45 ml løsning A.

Prosedyre:

1. En standardkurve med BSA ble tillaget. BSA ble først fortynnet til en konsentrasjon på 2 mg/ml og deretter ble standarden seriefortynnet i 2 ml sentrifugerør med Milli-Q-vann til konsentrasjonene 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 og 0,03 mg/ml. Mellom hver fortytning ble løsningen blandet godt ved å pipettere løsningen opp og ned flere ganger.
2. 200 μl prøve/standard ble overført til 2 ml sentrifugerør og tilsatt 1 ml løsning C, blandet godt med vortexrister (Reax top, VWR, Tyskland) og inkubert i 10 minutter ved romtemperatur.
3. 100 μl 1 N Folin & Ciocalteus fenolreagens ble så tilsatt prøvene og blandet med vortexrister. Prøvene ble videre inkubert i 30 minutter ved romtemperatur.
4. Etter inkubasjon ble 1 ml prøve overført til 1,5 ml kyvetter og målt spektrofotometrisk (Genesys 20, Thermo Scientific, MA, USA) ved OD 750.
5. Etter målingene ble det laget en standardkurve basert på OD-verdiene og konsentrasjonen av BSA, og denne ble benyttet til å beregne proteininnholdet i supernatantene (mg BSA-ekv./ml prøve). Noen supernatanter måtte på forhånd fortynnes grunnet for høye OD-verdier, og da ble fortynningsfaktor inkludert i beregningen.

2.4.2.2 Bestemmelse av TCA-løselig protein

En modifisert variant av Lowry *et al.* (1951) ble brukt for å bestemme nedbrutte (TCA-løselige) proteiner i supernatanter fra fordøyelsesforsøkene. Som standard ble 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ tyrosin brukt.

Løsninger:

- 20 % TCA-løsning: 20 g TCA ble løst i Milli-Q-vann til totalvolum på 100 ml.
- Løsning A: 1 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ og 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ble løst i Milli-Q-vann til totalvolum på 100 ml.
- Løsning B: 16 g NaOH og 50 g Na_2CO_3 ble løst i Milli-Q-vann til totalvolum på 500 ml.
- Løsning C (M.A.C.R.; Modifisert alkalisk koppperreagens) (ble laget ny hver dag): 79 ml Milli-Q-vann ble tilsatt 1 ml løsning A og 20 ml løsning B.

Prosedyre:

1. 0,5 ml prøve/standard ble tilsatt 0,5 ml 20 % TCA-løsning og blandet godt med vortexrister.
2. Reaksjonsløsningene/prøvene ble satt på is i 30 minutter, før de ble sentrifugert (Centrifuge 5424 R) på 20000 g (RCF) i 10 minutter ved 4°C, for å fjerne de utfelte proteinene (proteiner og store peptider denatureres, aggregeres og havner i pelleten).
3. Etter sentrifugering ble 0,2 ml supernatant overført i nye sentrifugerør og tilsatt 0,8 ml løsning C/M.A.C.R. Dette ble blandet godt med vortexrister og satt til inkubasjon i 30 minutter ved romtemperatur.
4. 50 µl 1 N Folin & Ciocalteus fenolreagens ble tilsatt prøvene, og de ble blandet godt med vortexrister og ytterligere inkubert i 30 min ved romtemperatur.
5. Etter inkubasjon ble 1 ml prøve overført til 1,5 ml kyvetter og lest av spektrofotometrisk (Genesys 20) ved OD 700.

Konsentrasjon TCA-løselig protein ble beregnet i tyrosinekvivalenter (TE) i µmol/ml supernatant ved bruk av formel 4. Noen supernatanter måtte fortynnes før analyse grunnet for høye OD-verdier, og da ble fortynningsfaktor (FF) inkludert i beregningen.

Formel 4:

$$TE \text{ } \mu\text{mol}/\text{ml} \text{ supernatant} = \frac{OD_{700} \text{ supernatant} \cdot 0,1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \cdot FF}{OD_{700} \text{ tyr}}$$

«OD₇₀₀ supernatant» er lysabsorpsjon av prøver ved 700 nm, «FF» er fortynningsfaktor av prøver, «OD₇₀₀ tyr» er lysabsorpsjon av 0,1 mM (0,1 µmol/ml) tyrosin ved 700 nm.

2.4.3 Proteinløselighet ved ulike pH

Proteinløselighet i TM ble bestemt ved bruk av en modifisert versjon av metoden opprinnelig beskrevet av Morr *et al.* (1985). Proteinløseligheten ble bestemt ved 12 ulike pH (pH 2 til pH 13 i 1,0-intervaller) med to paralleller for hver prøve.

Prosedyre:

1. Ca. 1 gram TM ble veid ut i totalt 12 100 ml erlenmeyerkolber, og nøyaktig vekt ble notert. Kolbene ble tilsatt magnet, satt på vekt og nullstilt, og videre tilsatt 40 ml 0,1 M NaCl.
2. pH i de ulike kolbene ble justert til ønsket pH-verdi (pH 2 til pH 13) ved bruk av 0,1 og 1 M HCl og 0,1 og 1 M NaOH.
3. Kolbene ble igjen satt på vekten, og totalvolumet ble økt til ca. 50 ml ved å tilsette nødvendig mengde 0,1 M NaCl (ved å veie at det var 50 g innhold i kolben).
4. Løsningene sto under konstant omrøring i 60 min ved romtemperatur. Underveis ble pH målt for å sikre den holdt seg på ønsket verdi, og justert om nødvendig.
5. Etter 60 minutter ble 2 x 1,5 ml løsning tatt ut fra hver kolbe i 1,5 ml eppendorfrør. Prøvene ble videre sentrifugert i 10 min ved 15000 g (RCF) (Centrifuge 5424 R) ved romtemperatur.
6. Proteininnholdet i supernatantene ble deretter bestemt ved metoden beskrevet i kapittel 2.4.2.1.

Proteinløseligheten i prøvene med ulike pH ble bestemt ved bruk av formel 5.

Formel 5:

$$\text{Proteinløselighet (\%)} = \frac{\text{BSA-ekvivalenter i supernatant} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \cdot 50 \text{ ml}}{\text{Prøvevekt (mg)} \cdot (\text{Proteininnhold i prøven}(\%)/100)} \cdot 100$$

BSA-ekvivalenter i supernatant (mg/ml) er resultater for proteininnhold bestemt ved metoden i kap. 2.4.2.1, prøvevekt er innveid mengde prøve (mg) og proteininnhold i prøven (%) er beregnet ut fra aminosyreanalysen.

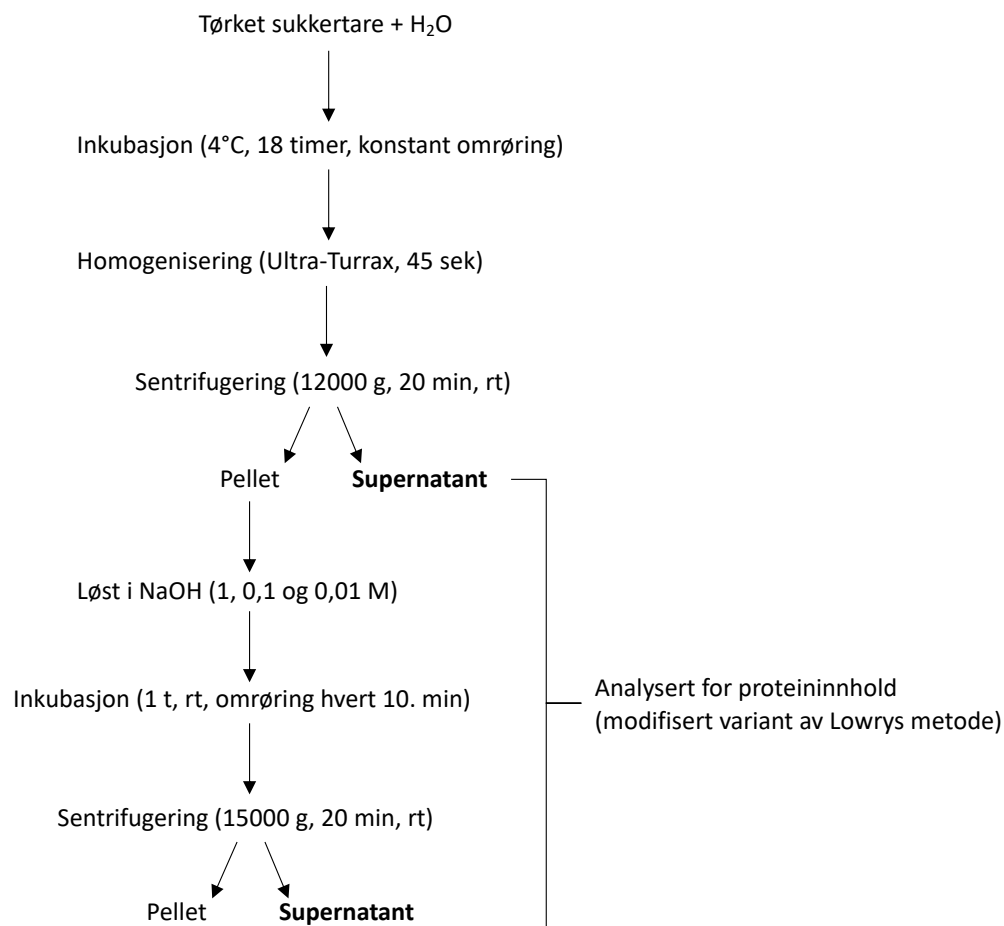
2.4.4 Proteinekstraksjon

2.4.4.1 Proteinekstraksjon fra TM

Proteinekstraksjon ble gjort på TM ved å bruke en standard ekstraksjonsmetode modifisert fra Mæhre *et al.* (2016b). Ekstraksjonen ble gjort ved tre ulike konsentrasjoner av NaOH (1 M, 0,1 M og 0,01 M) med tre paralleller for hver prøve.

Prosedyre (se figur 6 for illustrasjon):

1. Ca. 100 mg TM ble veid ut i totalt 9 15 ml sentrifugerør og tilsatt 8 ml Milli-Q-vann. Prøvene ble inkubert i 18 timer under konstant omrøring (30 rpm) (Labinco type LD-79, Nederland) ved 4°C.
2. Etter inkubasjon ble prøvene homogenisert ved bruk av Ultra-Turrax (T25 BASIC) i ca. 45 sekunder og videre sentrifugert ved 12000 g i 20 min ved romtemperatur (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland).
3. Supernatant ble overført i nye rør, mens pellet ble løst opp i 2 ml NaOH (1 M, 0,1 M eller 0,01 M) og inkubert i 1 time ved romtemperatur. Prøvene ble blandet godt med vortexrister hvert 10. min under inkubasjonen.
4. Prøvene ble så sentrifugert ved 15000 g (RCF) (Centrifuge 5424 R) i 20 min ved romtemperatur, og supernatant ble pipettert over i nye rør.
5. Proteininnholdet i supernatantene ble deretter bestemt ved metoden beskrevet i kapittel 2.4.2.1. Proteininnholdet ble bestemt i den vannløselige og basiske supernatanten hver for seg, og totalt ekstraksjonsutbytte ble beregnet ved å summere resultatene.



Figur 6. Illustrasjon av fremgangsmåte for proteinekstraksjon fra tørket sukkertare. Supernatant før tilsetting av NaOH, og etter tilsetting av NaOH ble analysert ved bruk av en modifisert variant av Lowrys metode (metodebeskrivelse i kap. 2.4.2.1). Rt= romtemperatur.

2.4.4.2 Proteinekstraksjon fra «pellet»

Protein ble også ekstrahert fra utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) fra fordøyelsesforsøkene med 1 M NaOH (se tabell 2 for utvalgte forsøk og pelletprøver). For hver prøve var det to paralleller og en kontroll uten enzym, så totalt ble det ekstrahert protein fra 21 prøver.

Tabell 2. Proteinekstraksjon ble gjort på utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) fra forsøk 1 (FM, TM og <180 µm), forsøk 3 (FM og TM) og forsøk 5 (TM og <180 µm). FM=fryst sukkertare, TM=tørket sukkertare og <180 µm=fraksjon av TM <180 µm.

Prøver	
Forsøk 1*	FM, TM og <180 µm
Forsøk 3	FM og TM
Forsøk 5*	TM og <180 µm

** Prøver der versjon 1 av løsninger ble benyttet.*

Prosedyre:

1. Inkubasjonsløsningene ble tint opp og filtrert gjennom et filterpapir for å separere materialet/pellet fra den vandige løsningen.
2. Pellet ble overført i sentrifugerør (FM i 50 ml, TM og <180 µm i 15 ml) og løst ut i 1 M NaOH (FM ble tilsatt 40 ml NaOH mens TM og <180 µm ble tilsatt 8 ml).
3. Prøvene ble homogenisert i Ultra-Turrax (T25 BASIC), og videre inkubert i 1 time ved romtemperatur. Prøverørene ble blandet godt hvert 10. min under inkubasjonen.
4. Prøvene ble så sentrifugert ved 15000 g (RCF) (Centrifuge 5424 R) i 20 min ved romtemperatur, og supernatant overført over i nye rør.
5. Proteininnholdet i supernatantene (ekstraksjonsutbyttet fra prøvene) ble deretter bestemt ved metoden beskrevet i kapittel 2.4.2.1.

3 Resultater

3.1 Biokjemisk sammensetning og proteinkvalitet i sukkertare

Den biokjemiske sammensetningen ble bestemt i FM og TM (tabell 3). Vanninnholdet i prøvene FM og TM var henholdsvis $88,6 \pm 0,60$ og $8,68 \pm 0,05$ %. Askeinnholdet i FM og TM beregnet som prosent av tørrvekten var henholdsvis $34,7 \pm 1,05$ og $33,7 \pm 0,51$ %. Proteininnholdet i prøvene FM og TM var henholdsvis $36,6 \pm 2,62$ og $65,0 \pm 5,66$ mg protein/gram sukkertare (tørrvekt), eller $3,66 \pm 0,26$ og $6,50 \pm 0,57$ % av tørrvekt.

Tabell 3. Vann-, aske- og proteininnhold i fryst sukkertare (FM) og tørket sukkertare (TM). Vanninnhold er presentert i prosent av våtvekt og askeinnhold er presentert i prosent av tørrvekt som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=3$). Proteininnhold er beregnet fra aminosyreanalysene og presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$) i mg protein/g sukkertare (tørrvekt) og i prosent av tørrvekt.

	FM	TM
Vanninnhold (%)	$88,6 \pm 0,60$	$8,68 \pm 0,05$
Askeinnhold (%)	$34,7 \pm 1,05$	$33,7 \pm 0,51$
Proteininnhold (mg protein/g)	$36,6 \pm 2,62$	$65,0 \pm 5,66$
Proteininnhold (%)	$3,66 \pm 0,26$	$6,50 \pm 0,57$

Aminosyresammensetningen i FM og TM ble bestemt ved aminosyreanalyse (tabell 4). Tryptofan og cystein ble ikke identifisert i noen av prøvene. Det var høyest innhold av aminosyrene glutamin/glutaminsyre og asparagin/asparginsyre i begge prøver, etterfulgt av alanin, leucin og glysin. Summen av TAA i FM og TM var henholdsvis $4,88 \pm 0,35$ og $69,8 \pm 6,11$ mg AA/g prøve. Både FM og TM inneholdt alle EAA bortsett fra tryptofan. EAA utgjorde $2,04 \pm 0,11$ og $28,2 \pm 2,18$ mg AA/g prøve i FM og TM, og den relative mengden EAA av TAA var henholdsvis 41,7 og 40,4 %. For begge prøver var innholdet EAA høyere enn i referanseproteinet satt av WHO/FAO/UNU (2007), bortsett fra mengden histidin i TM som utgjorde 87 % av anbefalt mengde (figur 7).

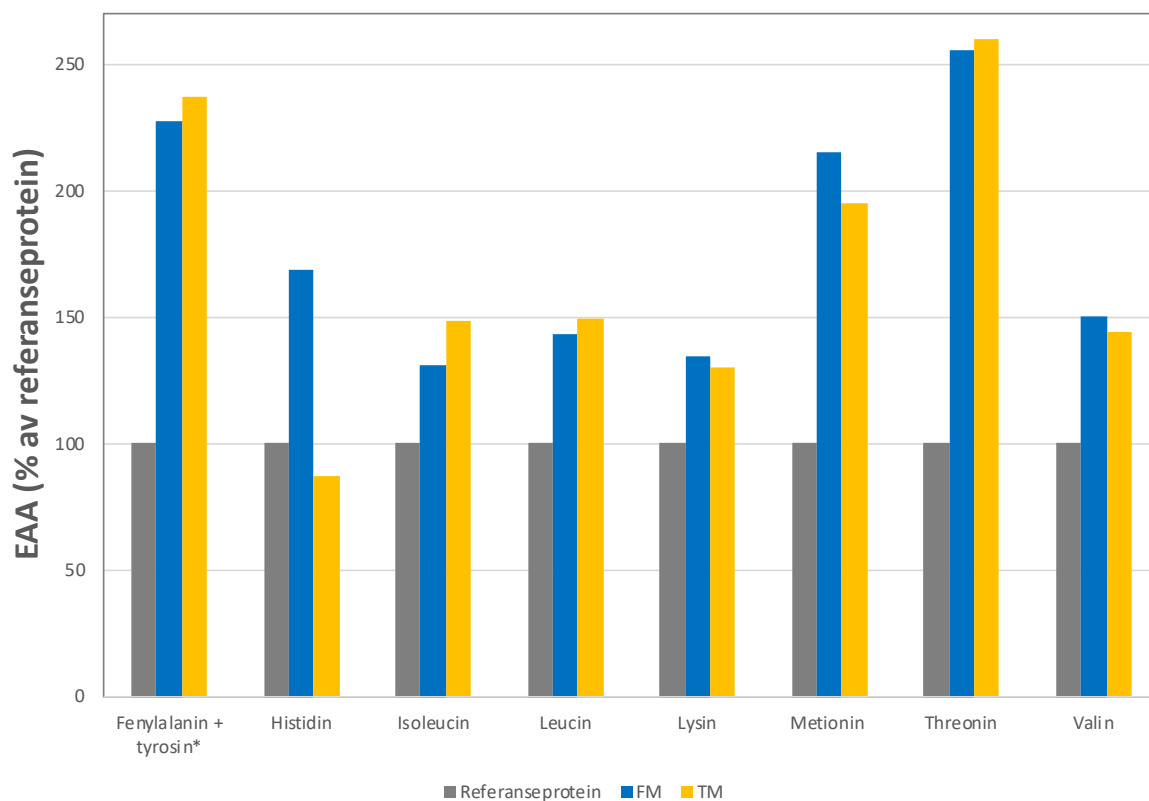
Tabell 4. Aminosyresammensetning fryst sukkertare (FM) og tørket sukkertare (TM). Mengde av de ulike aminosyrer (AA), totale aminosyrer (TAA), essensielle aminosyrer (EAA) og ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$) i mg/g prøve. Relativ mengde EAA er presentert i prosent (%) av TAA. ID: ikke detektert.

Aminosyrer (AA)	FM	TM
	(mg/g prøve)	
Essensielle AA (EAA)		
Phe Fenylalanin	0,29 \pm 0,01	3,96 \pm 0,26
His Histidin***	0,12 \pm 0,01	0,88 \pm 0,05
Ile Isoleucin	0,19 \pm 0,01	3,05 \pm 0,17
Leu Leucin	0,41 \pm 0,02	6,07 \pm 0,38
Lys Lysin	0,29 \pm 0,01	3,99 \pm 0,49
Met Metionin	0,17 \pm 0,04	2,10 \pm 0,07
Thr Treonin	0,29 \pm 0,03	4,19 \pm 0,38
Trp Tryptofan**	ID	ID
Val Valin	0,29 \pm 0,03	3,96 \pm 0,38
Ikke-essensielle AA (NEAA)		
Arg Arginin	0,22 \pm 0,02	1,49 \pm 0,17
Ala Alanin	0,48 \pm 0,07	6,90 \pm 0,96
Asx Asparagin* + Asparginsyre	0,51 \pm 0,04	7,12 \pm 0,75
Cys Cystein	ID	ID
Gly Glysin	0,36 \pm 0,04	5,22 \pm 0,37
Glx Glutamin* + Glutaminsyre	0,62 \pm 0,07	10,4 \pm 0,74
Pro Prolin	0,26 \pm 0,03	4,38 \pm 0,56
Ser Serin	0,29 \pm 0,02	4,12 \pm 0,40
Tyr Tyrosin	0,11 \pm 0,00	1,98 \pm 0,03
Σ TAA	4,88 \pm 0,35	69,8 \pm 6,11
Σ EAA	2,04 \pm 0,11	28,2 \pm 2,18
Σ NEAA	2,85 \pm 0,24	41,6 \pm 3,93
Relativ mengde EAA (%)	41,7	40,4

* Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamin- og asparginsyretoppene. «Asx» er totalt asparagin og asparginsyre og «glx» er totalt glutamin og glutaminsyre.

** Tryptofan blir fullstendig nedbrutt under syrehydrolyse og er derfor ikke detektert.

*** Usikre resultater da det har vært utfordringer med aminosyreanalysatoren.



Figur 7. Sammensetning av essensielle aminosyrer (EAA) (mg EAA/g protein) i og fryst sukkertare (FM) og tørket sukkertare (TM) relativt til referanseprotein (100 %) bestemt av WHO/FAO/UNU (2007). Verdiene for EAA er gitt som gjennomsnitt ($n=2$) og i prosent av referanseproteinet. Tryptofan er ikke presentert fordi den ødelegges under syrehydrolyse. Mengden histidin er usikker da det har vært utfordringer med aminosyreanalysatoren. * Fenylalanin og tyrosin er summert da WHO/FAO/UNU (2007) anbefaler et totalt inntak av begge AA.

3.2 Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein

Fordøyeligheten av protein i de ulike sukkertareprøvene ble studert gjennom en simulert gastrointestinal fordøyelse. Supernatantene fra fordøyelsesforsøkene (forsøk 1-5) ble analysert for å undersøke mengde protein løst/frigjort fra sukkertaren samt mengde nedbrutt (TCA-løselig) protein.

3.2.1 Forsøk 1

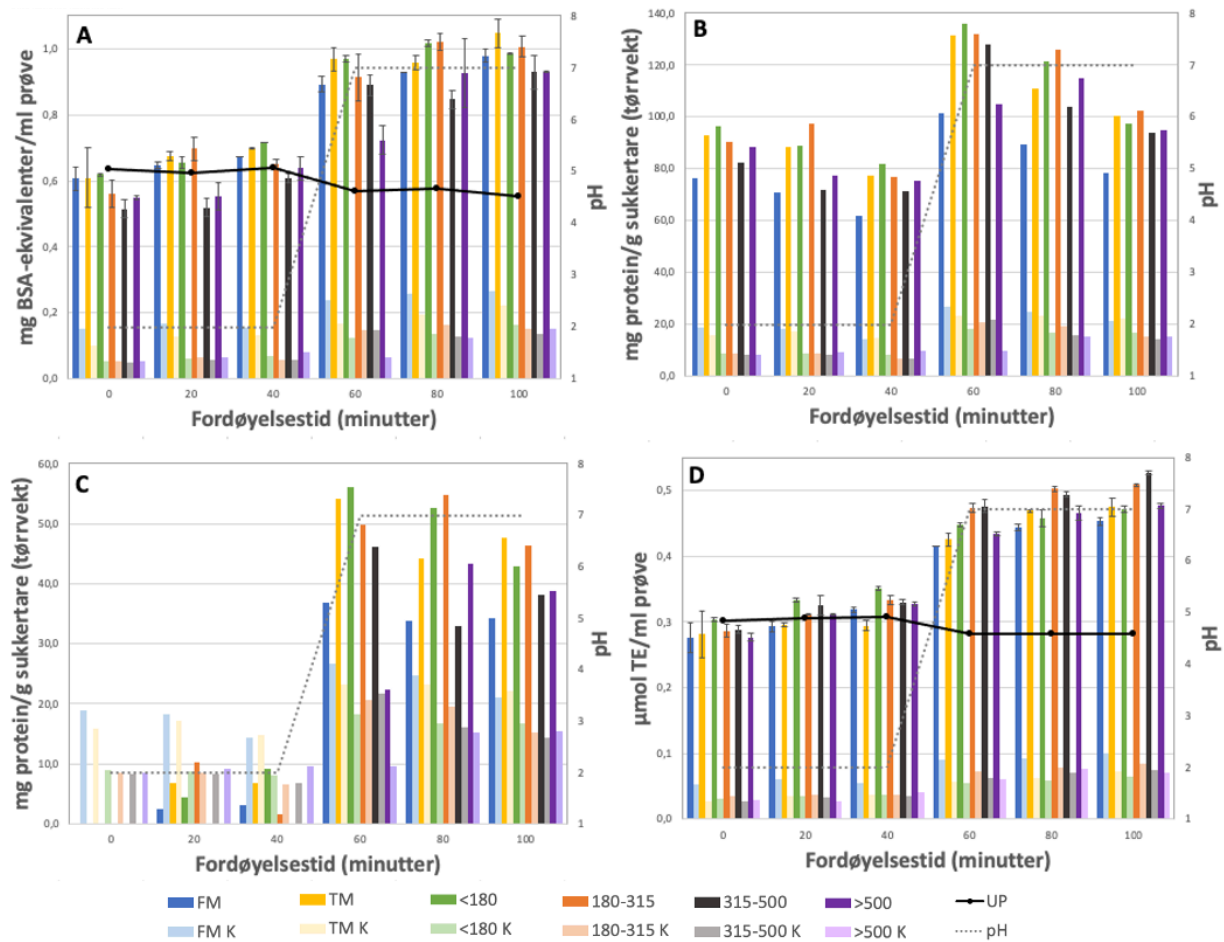
I forsøk 1 ble alle prøver (FM, TM, <180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm og >500 μm) undersøkt med og uten alle buffere (V1 og V2), med pepsintype P7125 som har lav spesifikk aktivitet (≥ 400 enzymenheter/mg protein) og pepsin- og pancreatinkonsentrasjon på henholdsvis 0,00462 g/ml og 0,0004 g/ml.

Versjon 1

Versjon 1 hadde et forenklet oppsett der pepsin ble løst i 0,01 M HCl og pancreatin ble brukt uten tilsatt galleekstrakt. Ved starten av inkubasjonen (fordøyelsestid 0) hadde alle prøver med enzym, inkludert KUP, en konsentrasjon løselig protein mellom 0,5 og 0,6 mg BSA-ekv./ml prøve (figur 8A). Etter tilsetning av tarmenzymene og økning av pH til 7, var det mer frigjort protein i alle sukkertareprøver med et proteinnivå på 0,8 mg BSA-ekv./ml prøve, unntatt fraksjonen >500 som var noe lavere. KUP holdt seg relativt stabil gjennom hele inkubasjonen på rundt 0,6 mg BSA-ekv./ml prøve. KUE hadde et betydelig lavere proteininnhold gjennom hele fordøyelsen, med en liten økning fra og med tid 60 minutter.

Proteininnholdet omregnet til mg protein/g sukkertare (tørrvekt) er presentert i figur 8B. Ved å justere resultatene for bidraget fra enzymene som var tilsatt løsningene (resultatene for KUP ble trukket fra sukkertareprøvene med enzym) fikk alle prøver negative verdier ved tid 0, og er derfor vist som 0 mg protein/g sukkertare (tørrvekt) i figur 8C. KUE fikk her en høyere konsentrasjon løst protein enn sukkertareprøvene med enzym (men som var justert for bidraget av enzymene) til og med fordøyelsestidspunkt 40 minutter. Etter 60 minutter økte konsentrasjonen i alle sukkertareprøvene med enzym sammenlignet med KUE (selv etter justering for bidraget fra enzymene).

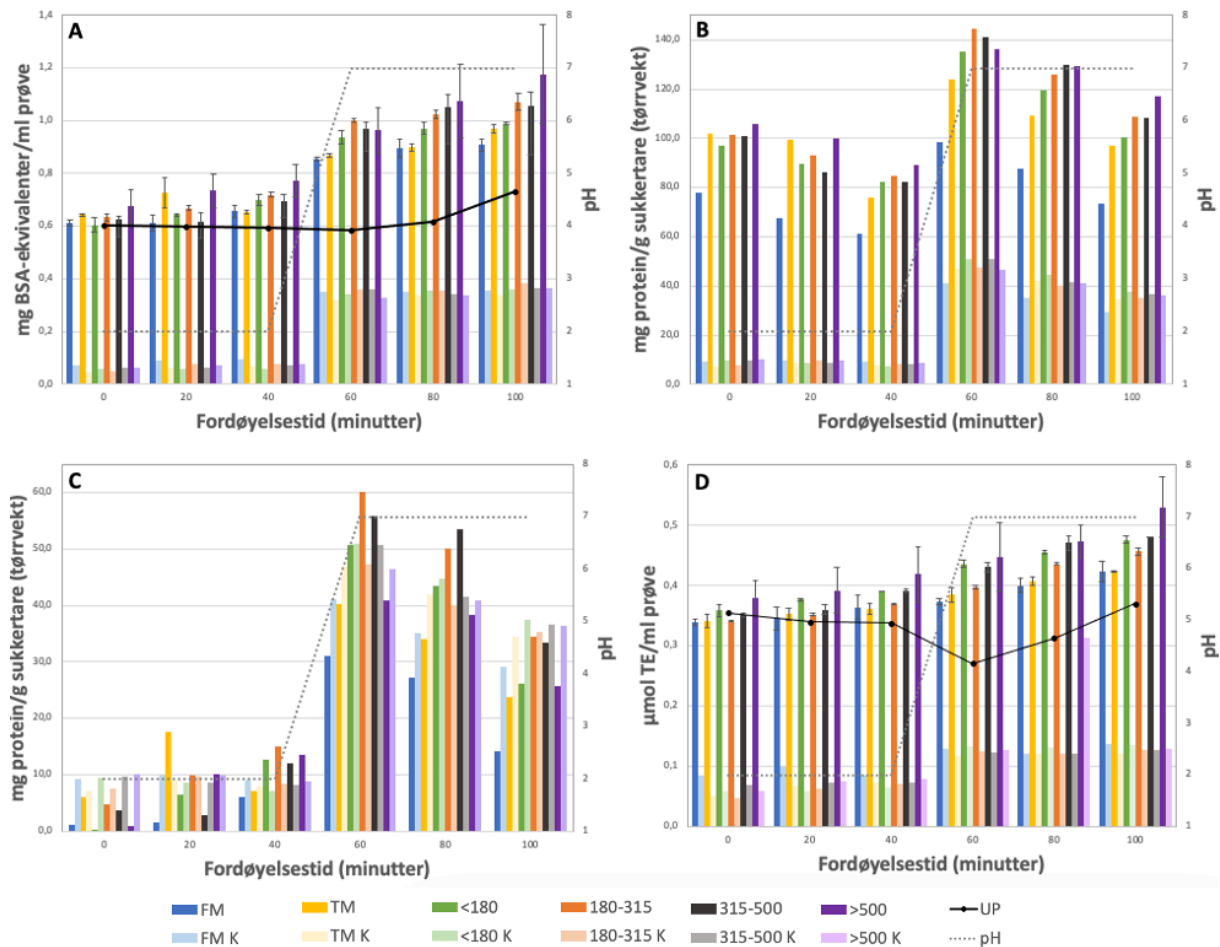
Mengden nedbrutt (TCA-løselig) protein var omtrent likt i alle prøver med enzym, inkludert KUP, ved fordøyelsesstart (0 minutter) med proteininnhold på ca. 0,3 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve (figur 8D). Videre fulgte denne analysen samme mønster som for proteinkonsentrasjonen. Sukkertareprøvene med enzym holdt seg relativt stabil på denne konsentrasjonen til og med fordøyelsestid 40 minutter, men etter tilsetning av tarmenzymene og økning av pH til 7 økte mengden nedbrutt protein til 0,4-0,5 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve. Fra tid 60 til tid 80 og 100 var det en liten økning i alle prøver. KUP var stabil på omtrent 0,3 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve gjennom hele fordøyelsestiden. KUE hadde lite nedbrutt protein sammenlignet med prøvene med enzym, med en liten økning i tarmfasen.



Figur 8. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 1, versjon 1. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukertare (tørrvekt), **C**) mg protein/g sukertare (tørrvekt) når korrigert for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i FM (frost sukertare), TM (tørket sukertare) og ulike fraksjoner av TM (<180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm , >500 μm) ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukertare uten enzym, UP=kontroll uten sukertare med enzym (bare enzymløsninger versjon 1). Resultater for prøver med sukertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA=bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

Versjon 2

I versjon 2 ble forsøket satt opp med buffere som har vært brukt i litteraturen; både for pepsin og pancreatin. Tarmfasen ble i tillegg supplert med galleekstrakt. Resultatene er illustrert i figur 9A-D, og var mer eller mindre identisk med resultatene beskrevet for versjon 1, med unntak av at KUE hadde et høyere nivå løst protein i tarmfasen. Når resultatene ble korrigert for bidraget fra enzymene (figur 9C) fikk ingen prøver negative verdier ved fordøyelsestid 0, og det ble mindre forskjell i proteinnivået mellom sukertareprøvene med enzym og KUE i tarmfasen sammenlignet med V1. Figur 9C illustrerer at enkelte prøver hadde høyere, andre lik, mens noen prøver hadde lavere proteinnivå enn KUE. Figur 9D viser at prøve >500 K ved fordøyelsestid 80 minutter skiller seg ut ved å ha nesten 3 ganger mengden nedbrutt protein, sammenlignet med de andre kontrollene.



Figur 9. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 1, versjon 2. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukertare (tørrvekt), **C**) mg protein/g sukertare (tørrvekt) når korrigeret for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i FM (frost sukertare), TM (tørket sukertare) og ulike fraksjoner av TM (<180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm , >500 μm) ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukertare uten enzym, UP=kontroll uten sukertare med enzym (bare enzymløsninger versjon 2). Resultater for prøver med sukertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA=bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

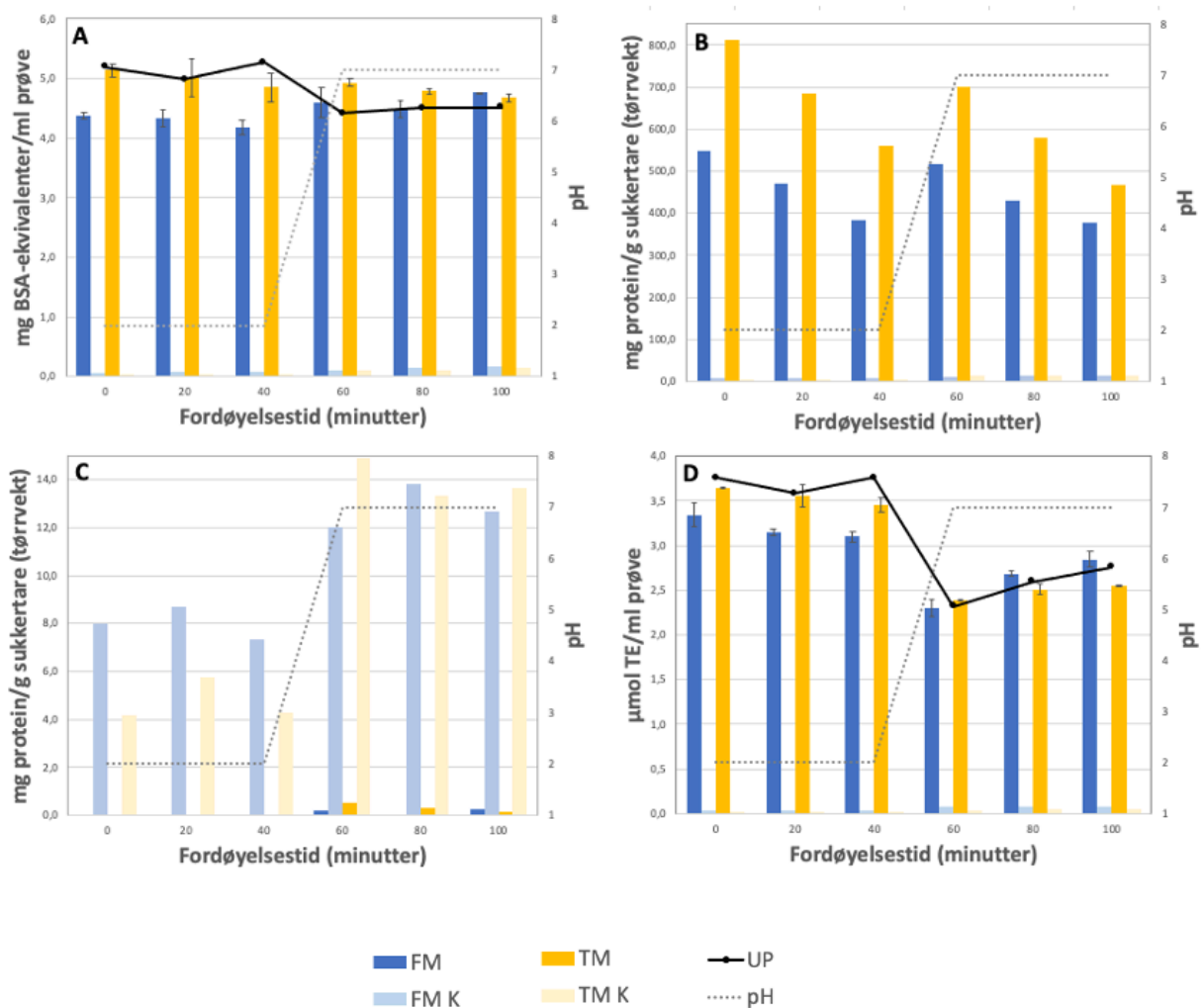
3.2.2 Forsøk 2

I forsøk 2, ble forsøkene fra versjon 1 gjentatt med de intakte prøvene, FM og TM, men denne gangen med pepsintype P6887 som har betraktelig høyere spesifikk aktivitet (≥ 3200 enzymenheter/mg protein), men samme pancreatin og enzymkonsentrasjoner som i forsøk 1.

For alle prøvene i forsøk 2 var proteinnivået mye høyere enn i forsøk 1 (figur 10A-D), og den generelle trenden var at det ikke ble observert noen frislipp av proteiner underveis i fordøyelsen 2 og det ble heller ikke observert nedbrytning av proteiner (figur 10D). Ved alle prøvetidspunkt hadde alle prøver med enzym, også KUP, en konsentrasjon løst protein på ca. 4-5 mg BSA-ekv./ml prøve (figur 10A). Proteinnivået var generelt høyere i TM sammenlignet med FM gjennom hele forsøket. Proteinnivået i KUE var veldig lavt (<0,2 mg BSA-ekv./ml prøve) sammenlignet med prøvene med enzym og vises derfor nesten ikke i figur 10A. Omregnet til

mg protein/g tørr sukkertare (figur 10B) var trenden lik som i forsøk 1. Figur 10C illustrerer resultatene når prøvene var korrigeret for proteinbidraget av enzymene, og proteinnivået i prøvene ble da svært lavt (på det meste 0,5 g protein/g tørr sukkertare) og mye lavere sammenlignet med KUE.

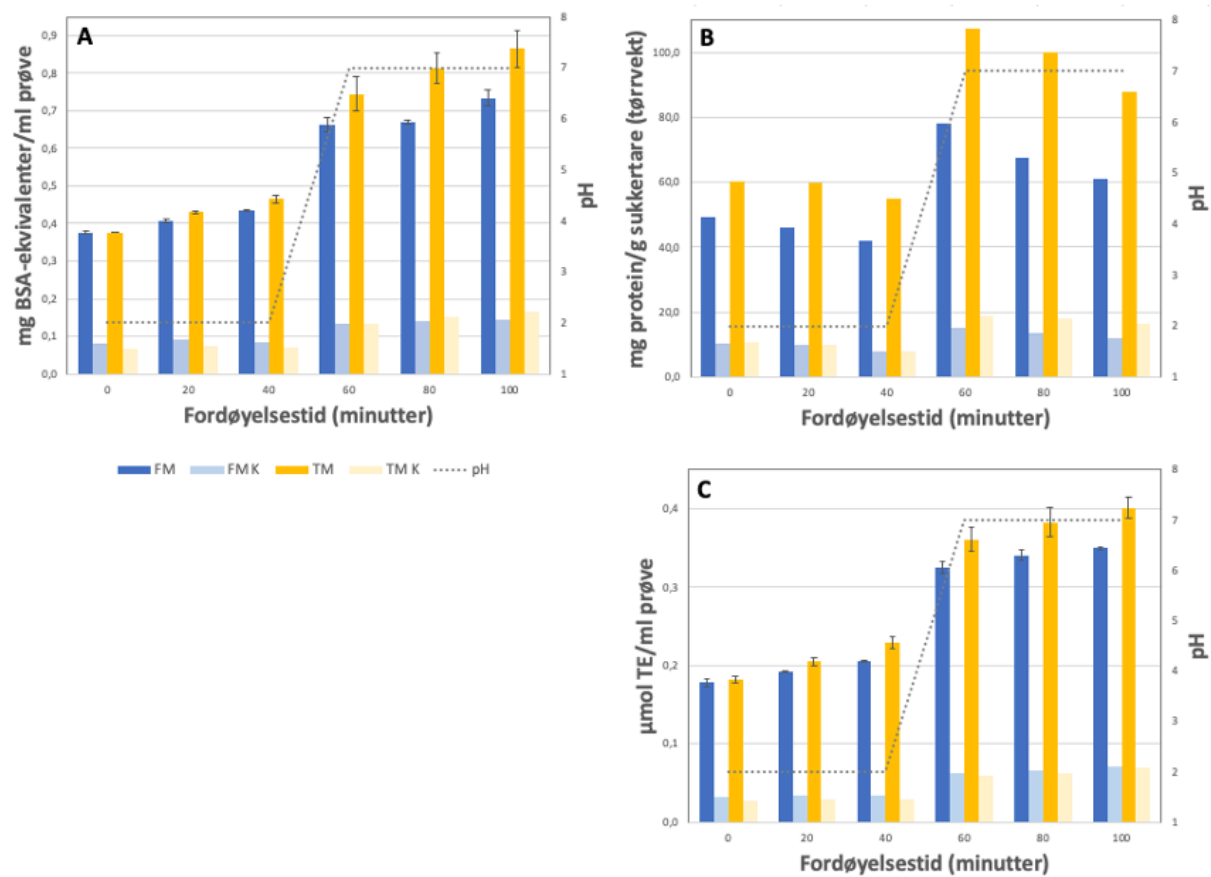
Mengden nedbrutt protein i prøvene var likt som KUP gjennom hele forsøket, og KUE var svært lave (figur 10D). Mengden nedbrutt protein i prøvene med enzym var ca. 3,1-3,6 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve ved prøvetid 0, 20 og 40 minutter. Etter tilsetning av pancreatinløsning og justering av pH ble nivået lavere, og var på ca. 2,3-2,8 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve ut forsøket.



Figur 10. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 2, versjon 1. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukkertare (tørrvekt), **C**) mg protein/g sukkertare (tørrvekt) når korrigeret for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i FM (frost sukkertare) og TM (tørket sukkertare) ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukkertare uten enzym, UP=kontroll uten sukkertare med enzym (bare enzymløsninger versjon 1). Resultatene for prøver med sukkertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA=bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

3.2.3 Forsøk 3

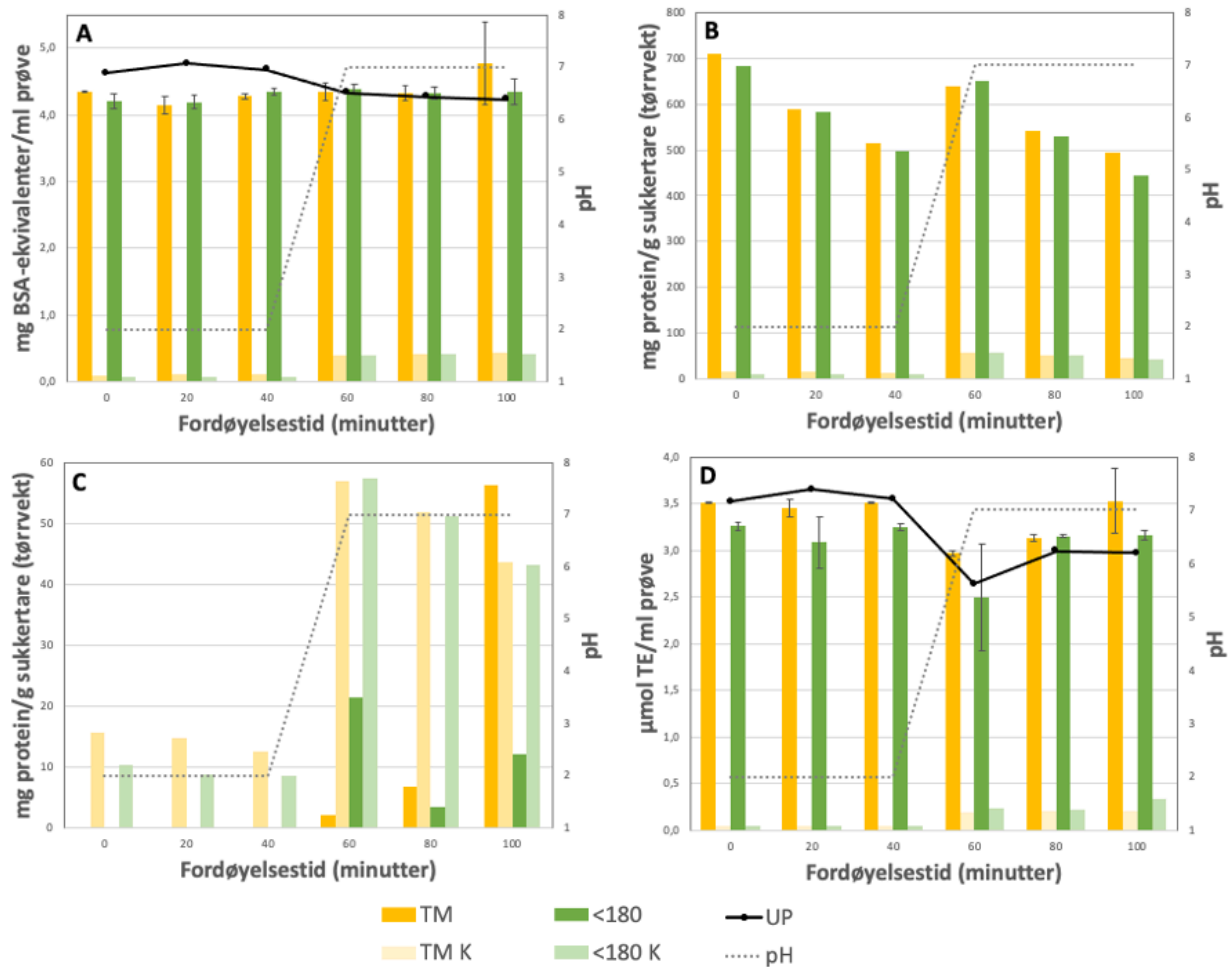
I forsøk 3 ble prøvene FM og TM homogenisert med Ultra-Turrax før tilsetning av enzymer for å se om dette kan frigjøre protein og gjøre proteinet tilgjengelig for fordøyelse. Forsøket ble for øvrig gjennomført som forsøk 1 versjon 1 (men uten KUP). Resultatene er illustrert i figur 11A-C, og viser generelt den samme trenden som i forsøk 1. Konsentrasjonen løst protein i prøvene med enzym økte fra rett under 0,4 til rett under 0,5 mg BSA-ekv./ml prøve fra tid 0 til tid 40 (figur 11A). Ved prøvetid 60 økte proteinnivået i alle prøvene til over 0,6 mg BSA-ekvivalenter/ml prøve. TM hadde generelt høyere verdier enn FM ved alle prøvetidspunkt, bortsett fra tid 0, der prøvegruppene var like. Figur 11C illustrerer at nedbrutt (TCA-løselig) protein økte fra rett under til rett over 0,2 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve fra prøvetid 0 til 40 minutter. Etter tilsetning av pancreatinløsning og økning av pH, økte konsentrasjonen av nedbrutt protein fram til neste tidspunkt (60 min) til over 0,3 $\mu\text{mol TE/ml}$ prøve, og det var en liten økning i begge prøver til tid 60 og 100 minutter.



Figur 11. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 3, versjon 1. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukkertare (tørrvekt) og **C**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i FM (frost sukkertare) og TM (tørket sukkertare) ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukkertare uten enzym. Resultatene for prøver med sukkertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik (n=2). BSA= bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

3.2.4 Forsøk 4

I forsøk 4 ble prøvene TM og <180 μm undersøkt med V2 av løsningene med pepsintype P6887 (≥ 3200 enzymenheter/mg protein), men denne gang med 10x høyere pancreatinkonsentrasjon (0,004 g/ml). Som vist i figur 12A-D, var alle resultatene fra dette forsøket mer eller mindre identisk som for forsøk 2. Et unntak er TM ved siste fordøyelsestid (100 min) som skiller seg ut ved å ha et høyere proteinnivå enn de andre prøvene.



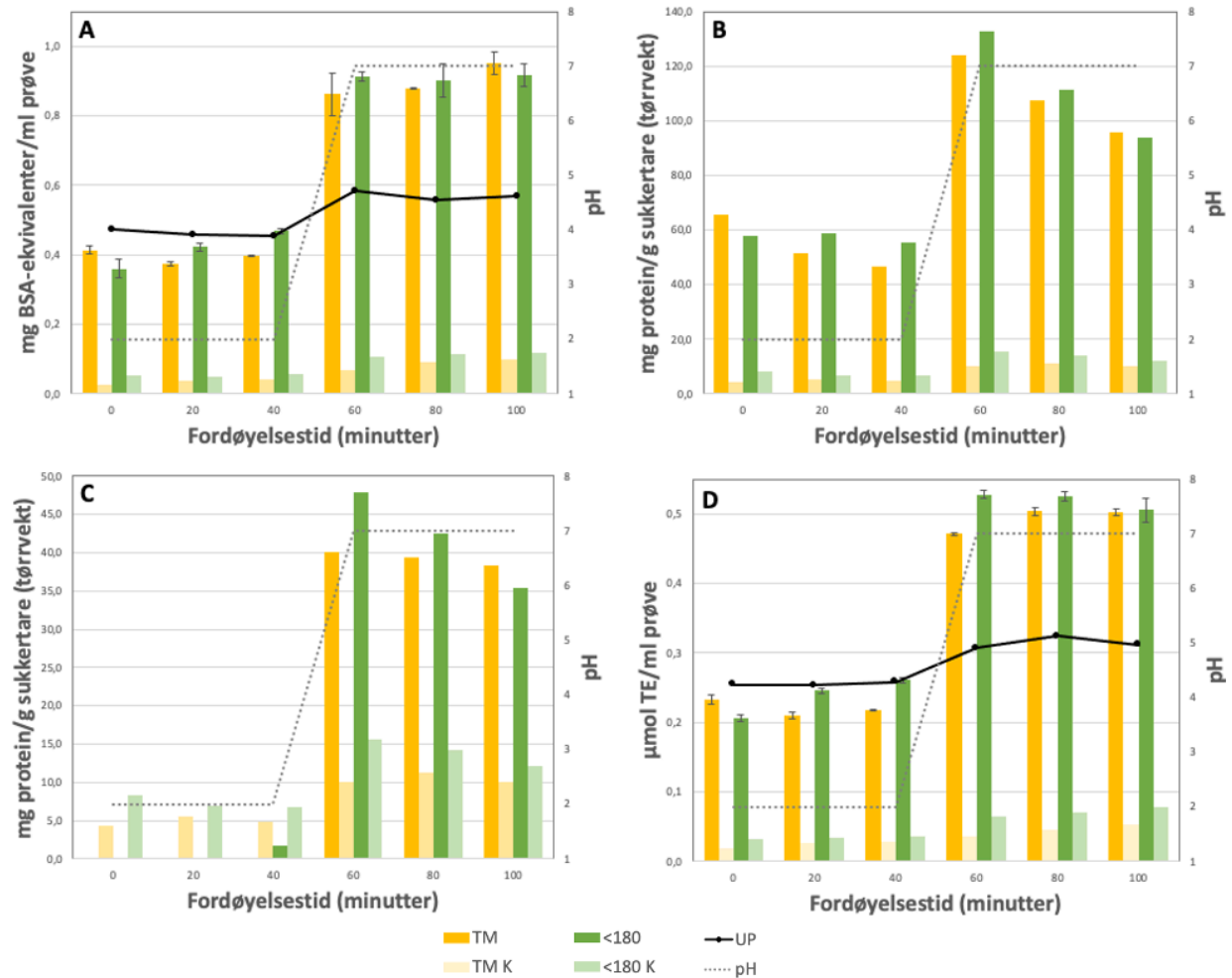
Figur 12. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 4, versjon 2. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukertare (tørvekt), **C**) mg protein/g sukertare (tørvekt) når korrigert for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i TM (tørket sukertare) og fraksjon <180 μm av TM ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukertare uten enzym, UP=kontroll utensukertare med enzym (bare enzymløsninger versjon 2). Resultatene for prøver med sukertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA=bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

3.2.5 Forsøk 5

I forsøk 5 ble prøvene TM og <180 μm undersøkt med begge løsningene (V1 og V2), men med pepsintype P7125 (≥ 400 enzymenheter/mg protein) og 10x høyere pancreatinkonsentrasjon (0,004 g/ml).

Versjon 1

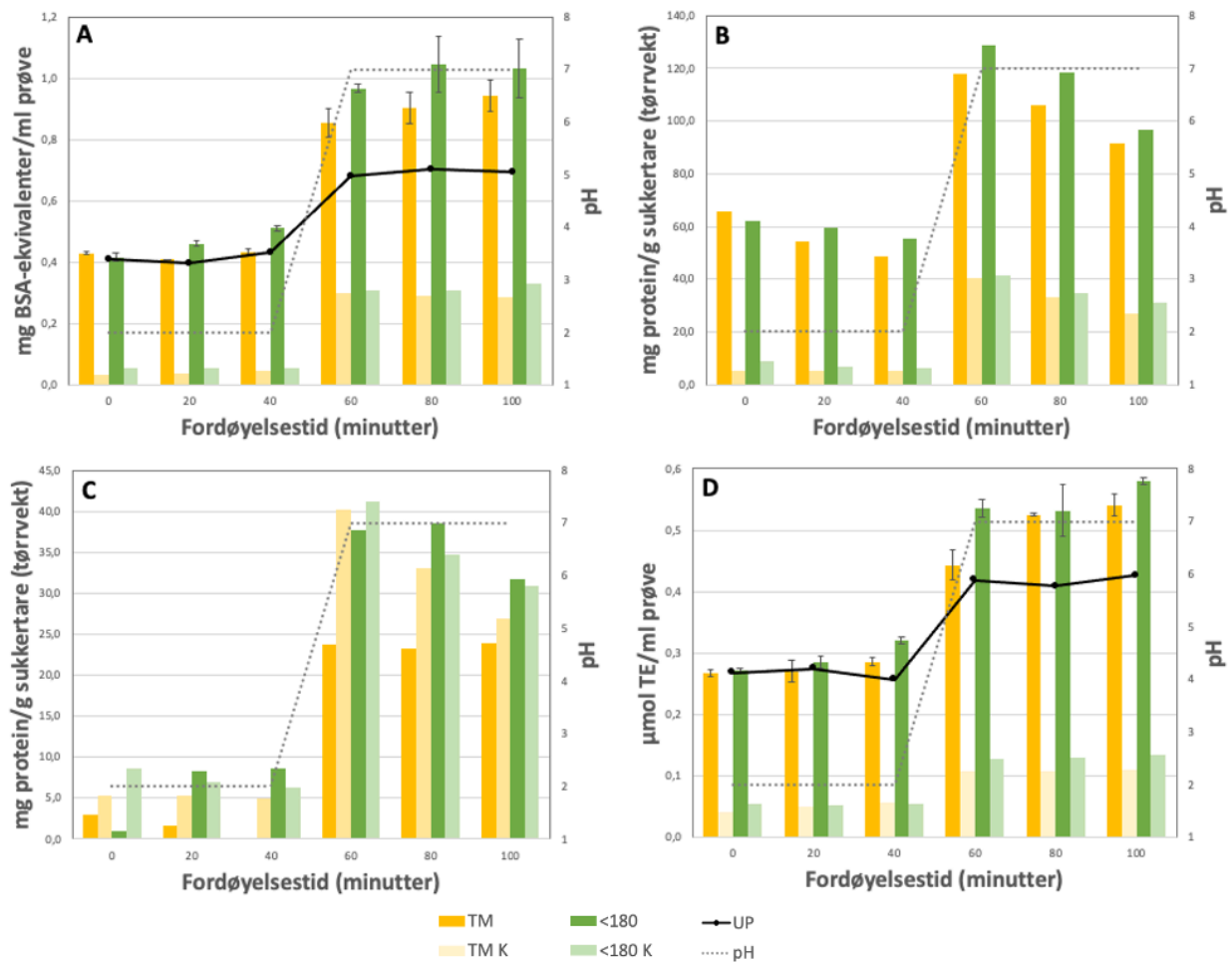
Resultatene presentert i figur 13A-D er identisk med resultatene fra forsøk 1, versjon 1. Proteinnivået var generelt noe lavere i magefasen sammenlignet med forsøk 1 (figur 13A og figur 8A), men trenden er den samme som i forsøk 1, versjon 1.



Figur 13. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 5, versjon 1. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukkertare (tørrvekt), **C**) mg protein/g sukkertare (tørrvekt) når korrigeret for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i TM (tørket sukkertare) og fraksjon $<180 \mu\text{m}$ av TM ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukkertare uten enzym, UP=kontroll uten sukkertare med enzym (bare enzymløsninger versjon 1). Resultatene for prøver med sukkertare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA= bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

Versjon 2

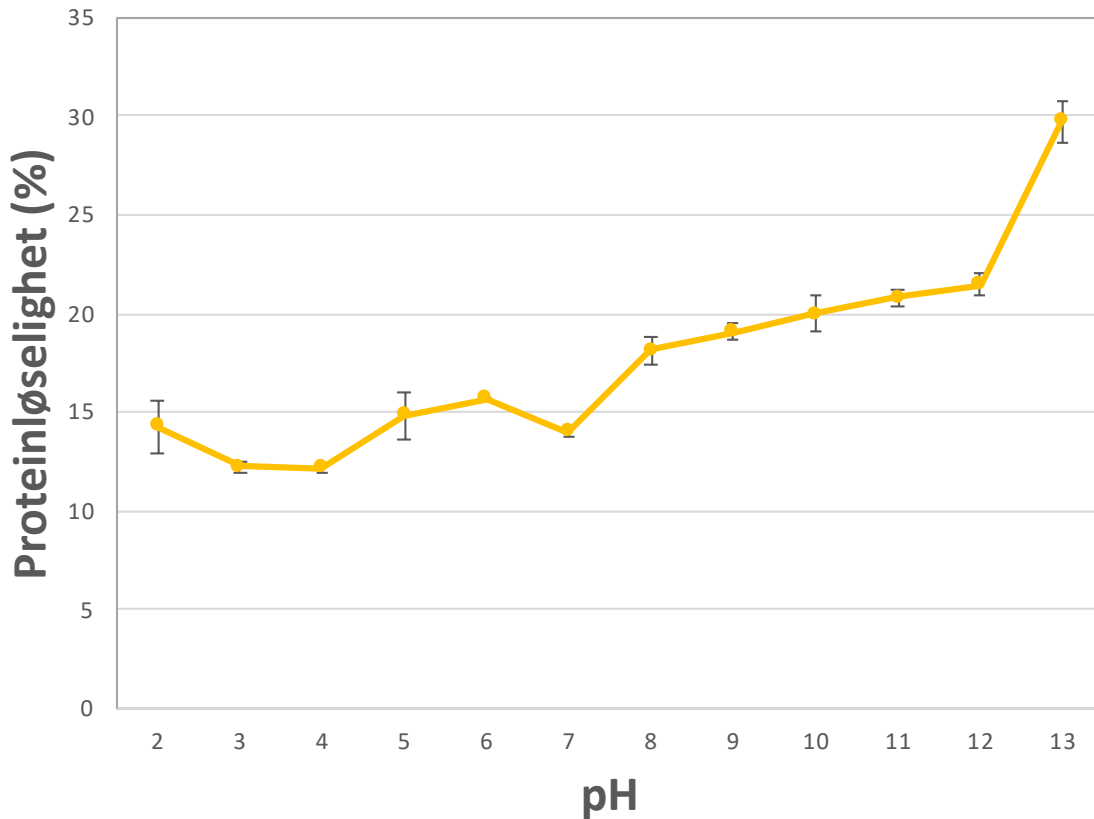
Resultatene presentert i figur 14A-D er identisk med resultatene fra forsøk 1, versjon 2 (figur 9). Unntaket var her også at proteinnivået generelt var noe lavere i magefasen sammenlignet med forsøk 1. Figur 14D viser også at mengden nedbrutt (TCA-løselig) protein i TM økte med $0,1 \mu\text{mol TE/ml}$ prøve fra tid 60 til 80 for TM.



Figur 14. Analyseresultater av supernatanter fra simulert fordøyelse forsøk 5, versjon 2. Proteininnhold i **A**) mg BSA-ekv./ml prøve, **B**) mg protein/g sukktare (tørrvekt), **C**) mg protein/g sukktare (tørrvekt) når korrigert for UP og **D**) nedbrutt (TCA-løselig) protein ($\mu\text{mol TE/ml}$ prøve) i TM (tørket sukktare) og fraksjon $<180 \mu\text{m}$ av TM ved ulike fordøyelsestider (0, 20, 40, 60, 80 og 100 minutter). K=kontroll med sukktare uten enzym, UP=kontroll uten sukktare med enzym (bare enzymløsninger versjon 2). Resultatene for prøver med sukktare og enzym er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$). BSA= bovint serumalbumin, TE=tyrosinekvivalenter.

3.3 Proteinløselighet

Proteinløselighet (%) for TM ble undersøkt ved 12 ulike pH (pH 2 til 13). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$) og viser at proteinløseligheten generelt øker med økt pH (figur 15), og at det er ved basisk pH løseligheten til proteiner i tørket sukktare er høyest. Ved pH 2 er proteinløseligheten ca. 14 %, og med økende pH synker først løseligheten noe (ved pH 3-4 er løseligheten ca. 12 %) før den igjen øker til ca. 15 % ved pH 5 og 6. Ved nøytral pH (pH 7) er proteinløseligheten igjen noe lavere (14 %). Fra pH 7 til pH 13 øker proteinløseligheten. Fra pH 8 til pH 12 øker løseligheten jevnt med ca. 1 % per pH-verdi, fra omtrent 18 til 22 %. Fra pH 12 til pH 13 øker løseligheten mye (omtrent 1,4 ganger) fra ca. 22 til 30 %.



Figur 15. Proteinløselighet (%) i tørket sukkertare ved pH 2-13. Hvert punkt er gjennomsnitt \pm standardavvik ($n=2$) og presentert som prosent løst protein av totalt protein tørket sukkertare.

3.4 Proteinekstraksjon

For å undersøke hvor mye protein som kunne ekstraheres ved svært enkle proteinekstraksjonsmetoder og hvor mye protein som ikke er tilgjengelig til fordøyelse, ble protein ekstrahert fra utgangsmaterialet TM og fra utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) fra fordøyelsesforsøkene.

3.4.1 Proteinekstraksjon fra TM

Resultater fra proteinekstraksjon fra TM er presentert i tabell 5 som mg protein/g sukkertare basert på tørrvekten til de innveide prøvene. Proteinutbyttet i de vannløselige supernatantene (før tilsetning av NaOH) var relativt like, der utbyttet lå på ca. 11-12 mg protein/g sukkertare (tørrvekt). Etter tilsetning av NaOH var det større forskjeller i proteinutbyttet mellom prøvene med ulik konsentrasjon. Den høyeste konsentrasjonen (1 M NaOH) hadde 2x så mye løst protein i den basiske supernatanten sammenlignet med den laveste konsentrasjonen (0,01 M NaOH). Totalt proteinutbytte var høyest ved 1 M NaOH med et utbytte på $24,8 \pm 3,58$

mg protein/g sukkertare (tørrvekt). Totalt proteinutbytte var lavest ved 0,01 M NaOH på $17,8 \pm 2,02$ mg protein/g sukkertare (tørrvekt).

Tabell 5. Proteinutbytte i TM (tørket sukkertare) før (vannløselig), etter tilsetning av NaOH (basisk) og summert til totalt proteinutbytte ved tre ulike konsentrasjoner NaOH (1 M, 0,1 M og 0,01 M). Presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik (n=3) i mg protein/g sukkertare (tørrvekt).

Proteinutbytte (mg protein/g sukkertare)			
Kons. NaOH (M)	Vannløselig	Basisk	Total
1	12,1 \pm 1,30	12,7 \pm 1,76	24,8 \pm 3,58
0,1	12,6 \pm 1,63	9,06 \pm 2,26	21,7 \pm 4,47
0,01	11,5 \pm 0,49	6,38 \pm 1,18	17,8 \pm 2,02

Proteinutbyttet er beregnet fra mg BSA-ekvivalenter/ml prøve.

3.4.2 Proteinekstraksjon fra «pellet»

Det ble ekstrahert protein fra utvalgte «pelletprøver», det vil si resterende inkubasjonsløsning etter endt fordøyelse. Proteinutbyttet var nokså likt for de ulike forsøkene og prøvene (tabell 6), med unntak av FM fra forsøk 1 som hadde omtrent dobbelt så høyt restinnhold av protein sammenlignet med FM K. Lavest restprotein var det i prøvene $<180 \mu\text{m}$, der utbyttet varierte fra 9,0 til 12,7 mg protein/g sukkertare.

Tabell 6. Proteinutbytte (mg protein/g sukkertare (tørrvekt)) i utvalgte «pelletprøver» (resterende inkubasjonsløsning) fra fordøyelsesforsøk 1 (FM, TM og $<180 \mu\text{m}$), 3 (FM og TM) og 5 (TM og $<180 \mu\text{m}$). Det var to paralleller for hver prøve (1 og 2) og en kontroll uten enzym (K). FM=fryst sukkertare, TM=tørket sukkertare og $<180 \mu\text{m}$ =fraksjon av TM $<180 \mu\text{m}$.

Forsøksnr.	Prøve	1	2	K
1*	FM	30,5	32,7	14,8
	TM	13,3	13,3	12,8
	$<180 \mu\text{m}$	9,0	12,7	10,0
3	FM	13,6	14,3	8,3
	TM	15,3	14,1	13,2
5*	TM	11,1	13,2	12,5
	$<180 \mu\text{m}$	9,5	10,2	12,2

Proteinutbyttet er beregnet fra mg BSA-ekvivalenter/ml prøve.

* Prøver der versjon 1 av løsninger ble benyttet i fordøyelsen.

4 Diskusjon

4.1 Biokjemisk sammensetning og proteinkvalitet i sukkertare

Innledningsvis ble den biokjemiske sammensetningen (vann- og askeinnhold, proteininnhold og aminosyresammensetning) i sukkertare bestemt. Vanninnholdet i fryst intakt sukkertare (FM) og naturtørket sukkertare (TM) var henholdsvis på 88 % og 8 %. Det høye vanninnholdet i FM var forventet siden vanninnholdet i makroalger generelt er høyt. Vanninnholdet i brunalger er tidligere funnet til å være opp mot 94 %, men det er også vist stor variasjon mellom ulike brunalger (Mæhre *et al.*, 2014; Holdt & Kraan, 2011). Askeinnholdet i prøvene FM og TM var tilnærmet likt (henholdsvis 33,7 og 34,7 % av tørrvekten), og dette er noe lavere enn tidligere rapportert i kultivert sukkertare (50 % av tørrvekt) (Harrysson *et al.*, 2018). En annen nylig studie estimerte askeinnholdet i sukkertare dyrket i Nordland til å være 44 % av tørrvekt (Aasen *et al.*, 2022). Askeinnholdet gir et estimat på det totale mineralinnholdet i biomassen (Mæhre *et al.*, 2014). Siden makroalger lever i det marine miljø er diversiteten av mineraler de absorberer stor, og viktige mineraler som kalsium og jod akkumulerer i mye høyere konsentrasjoner sammenlignet med mat som produseres på land (MacArtain, 2007; Blikra *et al.*, 2020).

Proteininnholdet varierte betydelig mellom FM og TM med et prosentvist proteininnhold på henholdsvis 3,7 og 6,5 % av tørrvekten. Disse verdiene stemmer relativt godt overens med proteininnholdet bestemt i sukkertare høstet fra vestkysten av Sverige som ble funnet å være 6,9 % av tørrvekt (Olsson *et al.*, 2020), mens det for sukkertare dyrket langs norskekysten har vært publisert om proteininnhold med svært stor variasjon, helt fra 2,2 til 13 % i tørket sukkertare (Aasen *et al.*, 2022; Forbord *et al.*, 2021; Krogdahl *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2021). Til tross for et relativt lavt proteininnhold, anses sukkertare som en fullverdig proteinkilde da alle mulige EAA ble detektert. I FM og TM utgjorde EAA henholdsvis 41,7 og 40,4 % av TAA, og dette samsvarer med tidligere studier gjort på sukkertare der EAA utgjorde 40 % og 42 % av TAA (Harrysson *et al.*, 2018; Krogdahl *et al.*, 2021). Innholdet av EAA var over referansenivået anbefalt av WHO/FAO/UNU (2007), bortsett fra histidin i TM som var noe lavere enn anbefalt. Sjømatlaben har hatt utfordringer med aminosyreanalysatoren det siste året, og det er observert at særlig mengden histidin ofte er lavt. Dersom det hadde vært anledning (tid og økonomi) burde analysene vært gjentatt for sikrere resultater.

Det er flere metoder for kvantifisering av proteininnhold og i dette studiet ble proteininnholdet og aminosyresammensetningen i sukkertaren bestemt ved aminosyreanalyse. I denne metoden

bestemmes proteininnholdet direkte basert på analyse av hver enkelt AA i prøvene, der interfererende komponenter ikke påvirker resultatene. Likevel kan metoden underestimere proteininnholdet, da den effektive syrehydrolysen kan redusere eller fullstendig bryte ned enkelte aminosyrer (Mæhre *et al.*, 2018). Den essensielle AA tryptofan er ikke detektert i dette studiet fordi den brytes fullstendig ned under syrehydrolysen. I tillegg er tyrosin, samt metionin og cystein, sensitive aminosyrer som kan reduseres eller brytes ned under syrehydrolysen (Mæhre, 2015). I dette studiet er tyrosin og metionin til stede i små mengder, mens cystein ikke ble detektert. Det er tidligere rapportert om et tryptofaninnhold i sukkertare på ca. 2 % av TAA (Krogdahl *et al.*, 2021) og cysteininnhold på 1,7 og 3,3 % av TAA (Krogdahl *et al.*, 2021; Harrysson *et al.*, 2018). Til tross for at metoden benyttet kan underestimere det totale proteininnholdet er det den anbefalte metoden for proteinbestemmelse av FAO (FAO, 2003).

Det er høye kostnader knyttet til investering i utstyr og selve aminosyreanalysen og dette gjør metoden utilgjengelig for mange (Mæhre *et al.*, 2018). Kjeldahls metode er en alternativ metode for proteinbestemmelse som ofte benyttes i industrien og forskning da den er mindre kostbar og anvendbar på alle typer næringsmidler (Chang & Zhang, 2017). Ved Kjeldahls metode bestemmes totalt nitrogeninnhold, og en omregningsfaktor benyttes for å beregne proteininnholdet i prøvene (Kjeldahl, 1883). Omregningsfaktoren, som vanligvis er 6,25, er basert på antakelsen om at nitrogeninnholdet i matproteiner er 16 % og at alt nitrogen i mat er proteinbundet. I realiteten er det ikke slik da den relative mengden nitrogen varierer mellom ulike AA og aminosyresammensetningen i ulike proteiner varierer, og derfor overestimerer denne metoden ofte proteininnholdet (Sosulski & Imafidon, 1990). Dette vil man forvente ved bruk av Kjeldahls metode på makroalger da de inneholder nitrogenholdige komponenter som ikke er proteinbundet, slik som klorofyll, nukleinsyrer, frie AA og uorganisk nitrogen (Angell *et al.*, 2015). En metaanalyse har tidligere funnet at en nitrogen-til-protein-omregningsfaktor på 6,25 overestimer proteininnholdet med 43 % i makroalger, og basert på dette ble en omregningsfaktor på 5 anbefalt for makroalger når aminosyreanalyse ikke er tilgjengelig (Angell *et al.*, 2015). Når det kommer til sukkertare er omregningsfaktoren på 5 i tillegg funnet å bidra til overestimering av proteininnhold, og det er foreslått en artsspesifikk omregningsfaktor på 3,8 i en studie som har analysert sukkertare høstet fra ulike lokasjoner og dybder langs norskekysten (Forbord *et al.*, 2020). Metodevalg for proteinbestemmelse, og hvilken omregningsfaktor som eventuelt benyttes, har altså stor betydning for resultatene. Dette kan delvis forklare de store variasjonene i proteininnholdet rapportert for sukkertare. I studien av Forbord *et al.* (2021) ble det også vist at proteininnholdet i sukkertare varierer fra hele 2,2

til 11 % avhengig av sesong, vekstedybde og geografisk lokasjon langs norskekysten (Forbord *et al.*, 2020).

Den biokjemiske sammensetningen i makroalger kan også variere fra blad til stilk, og det er vist at yngre deler av planten har et betydelig høyere proteininnhold sammenlignet med eldre deler av planten (Blikra *et al.*, 2020; Holdt & Kraan, 2011). Variasjon i sammensetningen til de ulike plantedelene kan ha påvirket resultatene i studien da ofte små mengder tare er benyttet i analysene som kan gi resultater som ikke er representative for hele planten. Variasjonen i aminosyresammensetning og proteininnhold mellom FM og TM kan kanskje forklares ved at det er innveid for lite prøvemateriale i aminosyreanalysen for FM-prøvene, og dermed blir mengden AA her veldig usikker og små variasjoner gir stort utslag.

4.2 Proteinfordøyelighet av sukkertareprotein

Selv om sukkertare inneholder protein med høyt prosentvist innhold av EAA må også proteinene være fordøyelige for at vi skal kunne nyttiggjøre oss disse, og for at sukkertareproteiner skal ha ernæringsmessig god kvalitet. Analyseresultatene av supernatantene fra fordøyelsesforsøkene viser at den totale mengden løst og nedbrutt protein fra sukkertare generelt er svært lavt, og derfor at lite sukkertareprotein fordøyes gjennom den forenklete fordøyelsesmodellen.

Det var liten forskjell i proteininnhold mellom prøvene med sukkertare med enzym og KUP ved de tre første prøvetakningene i magefasen. Dette indikerer at protein påvist i magefasen opprinnelig var fra tilsatt enzym og ikke frigjort protein fra sukkertaren. Pepsinet ser derfor ikke ut til å løse og bryte ned sukkertareproteinene i magefasen i noen stor grad. På den andre siden ble mer sukkertareprotein frigjort og brutt ned i tarmfasen sammenlignet med magefasen. Her så man en betydelig økning i frigjort og nedbrutt protein i prøvene med sukkertare med enzym fra fordøyelsestid 40 til 60 minutter, sammenlignet med KUP. Dette var første prøvetakning etter pancreatinløsningen ble tilsatt og pH ble økt, og dette indikerer at pancreatinet har effekt på frigjøring og nedbryting av sukkertareprotein. Likevel ser det ut til at kun en begrenset mengde sukkertareprotein lar seg fordøye da mengden frigjort og nedbrutt protein videre i tarmfasen generelt var svært lavt. Oppmaling og fraksjonering, og forbehandling med Ultra-Turrax, så ikke ut til å påvirke mengden frigjort og nedbrutt protein i stor grad. Selv om det er noe variasjon mellom prøver behandlet på ulike måter er det ikke en tydelig trend som eksempelvis tilsier at proteinet i de minste fraksjonene er mer tilgjengelig og fordøyelig enn de større fraksjonene. Mengdene frigjort og nedbrutt protein fra sukkertaren var

også tilnærmet likt uavhengig av hvilke løsninger som ble benyttet (V1 eller V2). Dette indikerer at bufferne og galleekstraktet ikke påvirket fordøyelsen av sukkertareprotein i dette fordøyelsesoppsettet.

Svært lite protein ble frigjort fra sukkertaren i forsøkene der pepsinet med høyest spesifikk aktivitet ble benyttet. Dette illustreres godt i resultatene for forsøk 2 og 4, der proteinnivået i sukkertareprøvene var tilnærmet likt proteinnivået i KUP gjennom hele fordøyelsestiden. Det var altså ingen økning i proteininnhold til tarmfasen slik som det var når pepsintypen med lavere spesifikk aktivitet ble benyttet. Økt pancreatinkonsentrasjon ser heller ikke ut til å påvirke fordøyeligheten, da mengden frigjort og nedbrutt protein i forsøk 1 og 5 var tilnærmet likt. I en annen studie der det ble gjennomført en simulert mage-tarmfordøyelse på algemateriale ble det antatt at det å bruke en lavere enzymkonsentrasjon enn opprinnelig beskrevet, i tillegg til å inkludere enzymer involvert i fett- og karbohydratfordøyelse, ville være hensiktsmessig når proteininnholdet i biomassen er lavt og siden algematriksen er så kompleks (Mæhre *et al.*, 2016a). Mine resultater kan bekrefte dette, da proteininnholdet i sukkertaren er relativt lavt og enzymaktiviteten så ut til å være høyest ved lavere enzymkonsentrasjoner.

Det er kjent at fordøyeligheten til proteiner i makroalger generelt er lav, både på grunn av fiberstrukturen til polysakkaridene i celleveggen som hindrer fordøyelse enzymene tilgang til de intracellulære proteinene, og et at de har et høyt innhold av antinæringsstoffer slik som polyfenoler (Mæhre *et al.*, 2016a). Som nevnt innledningsvis er en stor andel protein lokalisert intracellulært og i tilknytning til de komplekse polysakkaridene i plantecelleveggen. Da enzymerne benyttet i fordøyelsen ikke bryter bindingene i celleveggen antas det at proteinene fra sukkertaren som fordøyes og videre påvises gjennom analysene trolig er proteiner lokalisert mellom cellene i sukkertarematriksen, og at de intracellulære proteinene ikke ble frigjort.

Hvilke proteiner som lot seg fordøye fra sukkertaren, og aminosyresammensetningen til disse proteinene, har betydning for analyseresultatene siden en modifisert variant av Lowrys metode ble benyttet for proteinbestemmelse. Dette er en indirekte metode som baseres på reaksjonen til protein i løsning der det dannes fargede komplekser som måles spektrofotometrisk. Fargeintensiteten avhenger av antallet peptidbindinger og særlig mengden av de aromatiske AA tyrosin og tryptofan, men også i mindre grad cystin, cystein og histidin (Mæhre *et al.*, 2018). Ulike proteiner har ulik aminosyresammensetning og derfor vil resultatene være unøyaktige når BSA brukes som standard (Chang & Zhang, 2017). I tillegg er spektrofotometriske metoder svært sensitive for tilstedeværelsen av forstyrrende komponenter, enten fra sukkertaren i seg

selv eller eventuelle kjemikalier som ble benyttet i fordøyelsen, som kan bidra til at proteininnholdet i supernatantene overestimeres (Mæhre *et al.*, 2018). For eksempel inneholder galleekstraktet, som var tilsatt i V2 av løsningene, aminosyrer og andre komponenter som antakelig ga utslag i analysene. Dette illustreres i KUE, der prøver for V2 generelt hadde høyere proteininnhold i tarmfasen sammenlignet med V1. I studien av Harrysson *et al.* (2018) ble det vist at Lowrys metode generelt overestimerte proteininnholdet i proteinekstrakter fra makroalger, inkludert sukkertare, med 34,3 % sammenlignet med når proteininnholdet var basert på analyse av totale aminosyrer. Her ble det diskutert at et høyt innhold av pigmenter og bestemte aminosyrer bidro til å overestimere proteinresultatene (Harrysson *et al.*, 2018).

Sukkertaren benyttet i denne studien inneholdt sannsynligvis flere komponenter, slik som pigmenter, som bidro til falskt positivt utslag i analysemålingene (Harrysson *et al.*, 2018). Mengden protein bestemt i supernatantene er derfor svært usikre og resultatene er trolig kraftig overestimert. Derfor kan ikke analyseresultatene fra fordøyelsen direkte sammenlignes med resultatene fra aminosyreanalysen. For eksempel ble det etter omregninger på det meste fordøyd 60 mg protein/g tørr sukkertare (figur 9C) gjennom fordøyelsen, og dette tilsvarer 6 % protein. Proteininnholdet bestemt ved aminosyreanalyse var 6,5 % i tørr sukkertare som betyr at dersom kvantifiseringsmetoden var nøyaktig er tilnærmet alt protein løst gjennom fordøyelsen. Dette stemmer altså ikke. Andre faktorer slik som fortyninger og omregninger bidrar også til usikre resultater. I tillegg var det mer restprotein i «pelletprøvene» som lot seg ekstrahere etter endt fordøyelse, som også viser at mengden protein i supernatanter bestemt spektrofotometrisk er overestimert. Selv om metoden benyttet overestimerer proteinkonsentrasjonen er dette en enkel og billig metode for å raskt få et estimat av proteinkonsentrasjonen i prøver (Chang & Zhang, 2017). Dette viser at denne metoden er et godt screeningalternativ før prøvene kjøres på den mer kostbare aminosyreanalysatoren for mer nøyaktige resultater.

Fordøyeligheten til sukkertareproteinene var lav gjennom den simulerte fordøyelsesmodellen, og dette indikerer at sukkertare ikke er en god kilde til protein når det konsumeres som sådan. Likevel kan konsum av sukkertare være gunstig for oss mennesker da det som nevnt innledningsvis inneholder flere nyttige komponenter.

4.3 Proteinekstraksjon fra sukkertare

Gjennom løselighetsforsøket ble det vist at løseligheten til protein i tørket sukkertare økte ved økt pH. Dette kan forklare at mer protein lot seg løse fra «pellet» (resterende inkubasjonsløsning) etter endt fordøyelse da pH under ekstraksjonen var høyere enn under

fordøyelsen. Samtidig ble funnet at løseligheten er likt ved pH 2 og pH 7 (ca. 14%), som betyr at det ikke er den økte pH i tarmfasen under fordøyelsen som førte til frigjørelse av protein fra sukkertaren. Proteinløseligheten var høyest ved pH 13 på ca. 30 %, men siden Lowrys metode også her er benyttet for proteinbestemmelse er dette trolig overestimert. En tidligere studie har også funnet at løseligheten til sukkertareproteiner øker ved økt pH, og at den var høyest ved pH 11 på 23 % (Aasen *et al.*, 2022). Økt løselighet til sukkertareproteiner ved høy pH kan forklares av at sure og nøytrale aminosyrer ioniseres ved høy pH (Kumar *et al.*, 2021).

Selv om biotilgjengeligheten til proteinene i sukkertare er lav når biomassen konsumeres som sådan, kan likevel sukkertare være en god proteinkilde dersom proteinene på forhånd ekstraheres fra biomassen. I dette studiet ble det vist at totalt proteinutbytte fra tørket sukkertare ved standard ekstraksjon generelt er lavt, men at det økte ved økt pH. Det høyeste ekstraksjonsutbyttet var på ca. 2,5 %, men dette er overestimert da Lowrys metode også her ble benyttet. Ved denne ekstraksjonen ble omtrent halvparten av proteinet løst i vann og resten i 1 M NaOH, og dette viser at ulike typer proteiner lar seg løse under ulike forhold. Et annet studie har funnet at det å først løse biomassen i vann før base tilsettes øker det totale utbyttet, og at tiden lengden på inkubasjonen i vann ikke må ikke være lang for å ha betydelig effekt (Vilg & Undeland, 2017). Også forholdet mellom prøve og ekstraksjonsløsning vil påvirke ekstraksjonsutbyttet, flere studier på sukkertare har funnet at utbyttet generelt øker når den relative mengden vann økes (Aasen *et al.*, 2022; Vilg & Undeland, 2017). Varmebehandling er en annen enkel metode som har vist seg å øke biotilgjengeligheten til proteiner i andre makroalger (Mæhre *et al.*, 2016a), men som er funnet å ikke påvirke biotilgjengeligheten til proteiner i sukkertare i stor grad (Aasen *et al.*, 2022; Vilg & Undeland).

I litteraturen er det foreslått flere ulike metoder for å gjøre planteproteiner mer tilgjengelig for ekstraksjon, blant annet er det benyttet forbehandlinger med enzymer som degraderer celleveggen (bryter de komplekse karbohydratene/fiberstrukturen) og slik øker utbyttet (Mæhre *et al.*, 2016b; Aasen *et al.*, 2022). Hvilke enzymer som er best egnet avhenger av hvilken art proteinet skal ekstraheres fra, da ulike arter har ulik oppbygning av celleveggen. Det er funnet at sukkertare behandlet med enzymene alginat lyase og cellulase økte utbyttet med 30-35% (Aasen *et al.*, 2022).

4.4 Begrensninger i studiet og fremtidig forskning

I denne studien ble proteininnholdet i supernatantene fra fordøyelsen bestemt ved en modifisert variant av Lowrys metode. Ideelt sett burde både frie og totale AA vært målt ved aminosyreanalyse, siden da får man kunnskap om både mengde protein og hvor mye som brytes ned representert ved økning i frie aminosyrer. Da ville man også fått informasjon om hvilke AA som potensielt er tilgjengelig for absorpsjon i tarmen. Dette var ikke en mulighet i denne studien da det krever store volum og store mengder prøve til aminosyreanalysen, og det er høye kostnader knyttet til analysen.

Siden det er funnet at proteinet i sukkertare har en god aminosyresammensetning, bør det undersøkes nærmere hvilke metoder som er best egnet for å øke ekstraksjonsutbyttet av protein for denne arten. Enzymbehandling har gitt økt utbytte, og det vil være hensiktsmessig å finne ut hvilke enzymer som er best egnet på sukkertare. I tillegg finnes det også flere fysiske ekstraksjonsmetoder som degraderer celleveggen i plantecellene som kan være relevant å undersøke effekten av, slik som ultralyd-, mikrobølge- og høytrykk-assistert ekstraksjon (Kumar *et al.*, 2021).

Ekstraksjonsmetodene må uansett optimaliseres slik at de er effektive og kan benyttes i industriell skala. I tillegg vil det være en nødvendig at metodene ikke går på bekostning av mattrykgheten, da det ønskes at sukkertare skal utnyttes som næringsmiddel og proteinkilde.

5 Konklusjon

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke biotilgjengelighet eller fordøyelighet til proteinet i sukkertare og vurdere om fraksjonering av denne biomassen i ulike partikkelstørrelser, og forbehandling med Ultra-Turrax, gjør algeproteinene lettere tilgjengelig.

Sukkertaren benyttet i studien ble funnet å inneholde mellom 3,7 og 6,5 % protein med god aminosyresammensetning. Resultatene fra den simulerte fordøyelsen viste at lite protein ble frigjort og brutt ned under fordøyelsen. Dette indikerer at lite av sukkertareproteinene er tilgjengelig for fordøyelsesenzymer i menneskers mage-tarmkanal, og derfor at de ikke utnyttes når sukkertare konsumeres som sådan. Fraksjonering i ulike partikkelstørrelser og forbehandling med Ultra-Turrax så ikke ut til å ha effekt på biotilgjengeligheten til sukkertareproteinene.

Referanseliste

Aasen, I.M., Sandbakken, I.S., Toldnes, B., Roleda, M.Y., & Slizyte, R. (2022). Enrichment of the protein content of the macroalgae *Saccharina latissima* and *Palmaria palmata*. *Algal Research*, 65, 102727. Doi: 10.1016/j.algal.2022.102727

Ageeva, T.N. (2014). Sammenlignende *in vitro* fordøyelse av fiskemuskel og kjøtt. Masteroppgave. Tromsø: UiT – Norges arktiske universitet. Tilgjengelig fra: <https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/7110/thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Hentet 03.02.22)

Aiking, H. (2014). Protein production: planet, profit, plus people? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 483S–489S. Doi: 10.3945/ajcn.113.071209

Aksnes, D. L., Holm, P., Bavinck, M., Biermann, F., Donovaro, R., Harvey, P., ... & St John, M. (2017). *Food from the Oceans - How can more food and biomass be obtained from the oceans in a way that does not deprive future generations of their benefits?* SAPEA Evidence Review Report No. 1. Berlin: SAPEA. Doi:10.26356/foodfromtheoceans

Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., & Paul, N.A. (2015). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28, 511-524. Doi: 10.1007/s10811-015-0650-1

Astley, S., & Finglas, P. (2016). *Nutrition and health*. Reference Module in Food Science. Doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03425-9

Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 6, 33. Doi: 10.3390/foods6050033

Blikra, M.J., Skipnes, D., Fernández, E.N., & Skåra, T. (2020). *Utfordringer knyttet til prosessering og analyse av norsk tare, med fokus på sukkertare og butare*. Nofima rapportserie 34/2020. Tilgjengelig fra: <https://nofima.no/publikasjon/1824877/> (Hentet 09.03.22)

Bonhommeau S., Dubroca L., Le Pape O., Barde J., Kaplan D.M., Chassot E., & Nieblas, A.-L. (2013). Eating up the world's food web and the human trophic level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 20617–20620. Doi: 10.1073/pnas.1305827110

Bruinsma, J. (2009). *The resource outlook to 2050: By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050?* Expert Meeting on How to Feed the World in 2050. Rome: FAO. Tilgjengelig fra: <https://www.fao.org/3/ak971e/ak971e.pdf> (Hentet 28.03.22)

Cai, J. (2021). *Global status of seaweed production, trade and utilization*. Seaweed Innovation Forum Belize. FAO. Tilgjengelig fra: <https://www.competecaribbean.org/wp-content/uploads/2021/05/Global-status-of-seaweed-production-trade-and-utilization-Junning-Cai-FAO.pdf> (Hentet 10.04.22)

Cai, J. & Galli, G. (2021). *Top 10 species groups in global aquaculture 2019*. World Aquaculture Performance Indicators (WAPI) factsheet. Rome: FAO. Tilgjengelig fra: www.fao.org/3/cb5186en/cb5186en.pdf (Hentet 07.04.22)

Cai, J., Lovatelli, A., Aguilar-Manjarrez, J., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., ... & Yuan, X. (2021). *Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1229. Rome: FAO. Doi: 10.4060/cb5670en

Chang, S.K.C., & Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. In: Nielsen, S.S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_18

Damodaran, S., & Parkin, K. (2017). *Fennema's Food Chemistry* (5th ed.). London: CRC Press.

Debbarma, J., Viji, P., Rao, M., & C.N. Ravishankar (2022). Seaweeds: Potential Applications of the Aquatic Vegetables to Augment Nutritional Composition, Texture, and Health Benefits of Food and Food Products. Ranga Rao, A., Ravishankar, G.A. (eds) *Sustainable Global Resources of Seaweeds* Volume 2. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-030-92174-3_1

Duarte, C.M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marbà, N., Guiu, J., Black, K., & Karakassis, I. (2009). Will the Oceans Help Feed Humanity? *BioScience*, 59(11), 967-976. Doi: 10.1525/bio.2009.59.11.8

FAO (2003). *Food energy – methods of analysis and conversion factors*. FAO: Rome. Tilgjengelig fra: https://www.fao.org/uploads/media/FAO_2003_Food_Energy_02.pdf. (Hentet 07.04.22)

FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. Doi:10.4060/ca9229en

FAO (2022). FAOSTAT. FAO Food Balance (2010-). Tilgjengelig fra: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (Hentet 07.04.22)

FHI (2021). *Kosthold i Norge*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/levemaner/kosthald/> (Hentet 10.04.22)

Fiskeridirektoratet (2022). Akvakulturstatistikk: alger. Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Alger> (Hentet 27.02.22)

Fleurence, J., Morançais, M., & Dumay, J. (2017). Seaweed proteins. *Proteins in Food Processing*, 245-262. Doi: 10.1016/B978-0-08-100722-8.00010-3

FN (2020). *Utrydde sult*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal/utrydde-sult> (Hentet. 03.05.22)

FN (2022). *FNs bærekraftsmål*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal> (Hentet 10.04.22)

Food and Agriculture Organization (FAO); World Health Organization (WHO); United Nations University (UNU) (2007). *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*. World Health Organization: Geneva, Switzerland, p. 265

Forbord, S., Matsson, S., Brodahl, G.E., Bluhm, B.A, Broch, O.J., Handå, A., ... & Olsen, Y. (2020). Latitudinal, seasonal and depth-dependent variation in growth, chemical composition and biofouling of cultivated *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) along the Norwegian coast. *J Appl Phycol*, 32, 2215–2232. Doi: 10.1007/s10811-020-02038-y

Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 billion People. *Science*, 327(5967), 812-818. Doi: 10.1126/science.1185383

Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N.-G., Toth, G.B., & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra*

umbilicalis Kützing, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3565–3580. Doi: 10.1007/s10811-018-1481-7

Horwitz, W. (2004). Official methods of analysis of the AOAC international. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Indergaard, M. (2011). *Tang og tare - i hovedsak norske brunalger: Forekomster, forskning og anvendelse*. Trondheim: NTNU. Tilgjengelig fra: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/228180> (Hentet 09.03.22)

Jensen, I.-J., Abrahamsen, H., Mæhre, H.K., & Elvevoll, E.O. (2009). Changes in Antioxidative Capacity of Saithe (*Pollachius virens*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) during *in Vitro* Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (22), 10928-10932. Doi: 10.1021/jf9023849

Juul, L., Stødkilde, L., Ingerslev, A.K., Bruhn, A., Jensen, S.K., & Dalsgaard, T.K. (2022). Digestibility of seaweed protein from *Ulva* sp. and *Saccharina latissima* in rats. *Algal Research*, 63,102644-102644. Doi: 10.1016/j.algal.2022.102644

Kjeldahl, J. (1883). Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.

Krogdahl, Å., Jaramillo-Torres, A., Ahlstrøm, Ø., Chikwati, E., Aasen, I.-M., & Kortner, T.M. (2021) Protein value and health aspects of the seaweeds *Saccharina latissima* and *Palmaria palmata* evaluated with mink as model for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 276,114902. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114902

Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., ... & Kennedy J.F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106595

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6

MacArtain, P, Gill, C.I.R, Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I.R. (2007). Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65(12). Doi: 10.1301/nr.2007.dec.535-543

Monteiro, J.P., Melo, T., Skjermo, J., Forbord, S., Broch, O.J., Domingues, P., Calado, R., & Domingues, M.R (2021). Effect of harvesting month and proximity to fish farm sea cages on the lipid profile of cultivated *Saccharina latissima*. *Algal Research*, 54. Doi: 10.1016/j.algal.2021.102201

Moore, S., & Stein, W.H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Method Enzymol*, 6, 819–831. Doi: 10.1385/1-59259-047-0:001

Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.E., Regenstein, J.M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A., & Mangino, M.E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6), 1715-1718. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x

Mouritsen, O.G., & Schmidt, C.V. (2020). A role for macroalgae and cephalopods in sustainable eating. *Frontiers in Psychology*, 11, 1402. Doi: 10.3389/fpsyg.2020.01402

Mæhre, H.K., Malde, M.K., Eilertsen, K.-E., & Elvevoll, E.O. (2014). Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3281-3290. doi:10.1002/jsfa.6681

Mæhre, H.K. (2015). *Seaweed proteins – how to get to them? Effects of processing on nutritional value, bioaccessibility and extractability*. Doktoravhandling. Tromsø: UiT – Norges arktiske universitet.

Mæhre, H.K., Edvinsen, G.K., Eilertsen, K.-E., & Elvevoll, E.O. (2016a) 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. Doi: 10.1007/s10811-015-0587-4

Mæhre, H.K., Jensen, I.-J. & Eilertsen K.-E. (2016b). Enzymatic Pre-Treatment Increases the Protein Bioaccessibility and Extractability in Dulse (*Palmaria palmata*). *Marine Drugs*, 14(11), 196. Doi: 10.3390/md14110196

- Mæhre, H.K., Dalheim, L., Edvinsen, G.K., Elvevoll, E.O., & Jensen, I.-J. (2018). Protein determination – Method Matter. *Foods*, 7(1), 5. Doi: 10.3390/foods7010005
- Norderhaug, K.M., Skjermo, J., Kolstad, K., Broch O.J., Ergon, Å., Handå, A., Horn, S.J., Lock, E.-J. & Øverland, M. (2020). *Mot en ny havnæring for tare?: Muligheter og utfordringer for dyrking av alger i Norge*. Fisker og havet 2020-5. Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/fisken-og-havet-2020-5> (Hentet 09.02.22)
- Olsson, J., Toth, G.B., & Albers, E. (2020). Biochemical composition of red, green and brown seaweeds on the Swedish west coast. *J Appl Phycol*, 32, 3305–3317. Doi: 10.1007/s10811-020-02145-w
- Pliego-Cortés, H., Wijesekara, I., Lang, M., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2020). Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. *Advances in botanical research*, 95, 289-326.
- Skjermo, J., Aasen, I.M., Arff, J., Broch, O.J., Carvajal, A., Christie, H., ... & Handå, A. (2014). *A new Norwegian bioeconomy based on cultivation and processing of seaweeds: Opportunities and R&D needs*. Rapportnr. A25981. Trondheim, Sintef. Tilgjengelig fra: <https://sintef.brage.unit.no/sintef-xmlui/handle/11250/2448125> (Hentet 07.04.22).
- Sosulski, F.W. & Imafidon, G.I (1990). Amino Acid Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods. *J. Agric. Food Chem*, 38, 1351-1356. Doi: 10.1021/jf00096a011
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518-522. Doi: 10.1038/nature13959
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423)*. Tilgjengelig fra: https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf (Hentet 07.02.22)
- Van Selm, B., Frehner, A., De Boer, I. J., Van Hal, O., Hijbeek, R., Van Ittersum, M.K., ... & Van Zanten, H.H. (2022). Circularity in animal production requires a change in the EAT-Lancet diet in Europe. *Nature Food*, 1-8. Doi: 10.1038/s43016-021-00425-3

Widmaier, E.P., Raff, H., Strang, K.T. (2018). *Vander's Human Physiology*. New York: McGraw-Hill Education

Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., ... & Murray, C. J. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393(10170), 447-492. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4

