

# Sluttrapport DOCMAR

## Delprosjekt: Peptid

**Bjørn Liaset, delprosjektleder,  
Nasjonalt Institutt for Ernærings- og Sjømatforskning (NIFES)  
Sjømat og Helse**



### **Samarbeidspartnere DOCMAR peptid:**

- NIFES:
  - Dr Marit Espe
  - Master student Gabriel Criales
  - Master student Guro Christensen
- Syddanske universitet, Odense:
  - Prof Karsten Kristiansen
  - Dr Lise Madsen
- Haukeland Universitetssjukehus, Institutt for indremedisin, Universitet i Bergen:
  - Dr Gunnar Mellgren
- Århus Universitetssjukehus, Skejby:
  - Dr Mogens Kruhøffer

### **Takk til industri:**

- Novozymes, Bagsvaerd, Danmark:
  - Enzymatisk hydrolyse av seiryggar
  - Utstyr, enzym og ekspertise
- NutriMarine Life Sciences, Bergen:
  - Levering torske FPH og torske grakse

## Innhald sluttrapport Docmar peptid

<b>1. Målsetnad</b>	<b>3</b>
<b>2. Bakgrunn</b>	<b>3</b>
2.1. Enzymatisk hydrolyse av fiskebiprodukt – prosess, utbyte og funksjonalitet	3
2.2. <i>In vitro</i> testing av eigenskapar til peptid i hydrolysat	3
2.3. <i>In vivo</i> testing av eigenskapar til peptid i hydrolysat	4
2.4. Fedmeutvikling og diettprotein	4
2.5. Strategi DOCMAR peptid	5
<b>3. Resultat</b>	<b>5</b>
<i>3.1. Resultat delmål 1- enzymhydrolyse sei</i>	
3.1.1. Hydrolyse av seiryggar	5
3.1.2. Råprotein og aminosyrer i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar	6
3.1.3. Aske, mineral og sporstoff i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar	7
3.1.4. Fett i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar	8
3.1.5. Sei FPH og sei grakse som diett protein – påverknad av vekst i rotter	10
<i>3.2. Resultat delmål 2- samansetnad FPH, soyaprotein og kasein</i>	
3.2.1. Skilnader framstilling av FPH versus soyaprotein eller natriumkasein	10
3.2.2. Fett, råprotein og aminosyrer	11
3.2.3. Aske, mineral og sporstoff	12
3.2.4. B-vitaminar	13
3.2.5. Biogene aminar	13
3.2.6. Oppumming innhald i FPH, soyaprotein og kasein av potensielt gunstige faktorar ved overvekt	14
<i>3.3. Resultat delmål 3 – FPH og reduksjon av fedme</i>	
3.3.1. Utvikling av fedme i rotter som fekk alt diettprotein som FPH	14
3.3.2. Utvikling av fedme i rotter som fekk halvparten av diettprotein som lakse FPH	15
<b>4. Konklusjonar DOCMAR peptid</b>	<b>18</b>
<b>5. Kommersialiseringspotensiale produkt frå enzymatisk hydrolyse</b>	<b>18</b>
<b>6. Formidling</b>	<b>20</b>
<b>7. Litteratur</b>	<b>20</b>

## 1. MÅLSETNAD

- **Hovudmål:**
  - Å tilrettelegge for ei betre verdiskaping frå heile fisken gjennom auka kunnskap om fiskeprotein hydrolysat (FPH)
- **Delmål:**
  1. **Framstille høgkvalitets** fiskeprotein hydrolysat frå enzymhydrolyse av seiryggar, også med fokus på grakse og beinfraksjon
  2. Analysere FPH frå ulike artar med omsyn til **kjemisk samansetnad**, slik at denne dokumentasjonen kan nyttast i framtidig arbeid
  3. Teste FPH i dyremodellar for å undersøkje om FPH kan **motverke utvikling av fedme**

## 2. BAKGRUNN

### 2.1. Enzymatisk hydrolyse av fiskebiprodukt – prosess, utbytte og funksjonalitet

Enzymatisk hydrolyse av fiskebiprodukt har hatt akademisk og industriell interesse i lang tid (Tarr 1948; Gildberg 1993). I det siste tiåret har det blitt publisert mange vitenskaplege arbeid omkring enzymatisk hydrolyse av biprodukt og mykje av fokuset har vore retta mot sjølve hydrolyse prosessen og dei funksjonelle eigenskapane til fiskeprotein hydrolysat (FPH) (Kristinsson and Rasco 2000a). Biprodukt frå ulike artar er i nytta desse arbeida, mellom anna frå laks (Kristinsson and Rasco 2000b; Liaset et al. 2000; 2002; 2003) og torsk (Liaset et al. 2000; Gildberg et al. 2002; Slizyte et al. 2005a; b; c).

### 2.2. *In vitro* testing av eigenskapar til peptid i hydrolysat

*In vitro* (Latin: i glas) tyder at testing skjer i reagensrør, i cellekulturar, eller ei anna form for testing i eit kontrollert miljø som ikkje omfattar heile levande organismen. Å måle om tilsats av peptid frå hydrolysat kan redusere (= inhibere) ein spesifikk enzymreaksjon i eit reagensrør, vil vere eit typisk *in vitro* studie. Eit slikt enzymesystem som har fått mykje merksemd i forskning er angiotensin 1 converting enzyme (ACE). Høg aktivitet av dette enzymet er i kroppen relatert til høgt blodtrykk, eit helseproblem som er omfattande og som kan vere årsak til hjerte- og karsjuka og slag. Eindel publikasjonar har vist at peptid både frå fiskehydrolysat (Bordenave et al. 2002), og ikkje-marine kjelder som soya (Kuba et al. 2003), planteprotein frå kveite (Matsui et al. 1999) og ulike meieriprodukt (Fitzgerald and Murray 2006) har ACE inhiberande verknad i *in vitro* studium.

Eit anna tema som har fått stor merksemd i forskning er anti-oksidant verknader av peptidfraksjonar. I kroppen blir det heile tida danna komponentar gjennom forbrenning som potensielt kan auke det oksidative stresset. Normalt har kroppen gode anti-oksidant system, men under visse omstende, som til dømes ved feilernæring, ulike typar sjukdom eller alvorleg overvekt, kan det vere gunstig å tilføre kroppen anti-oksidantar. Den mest kjente anti-oksidanten er truleg vitamin C (i kiwi, appelsin, etc). Eit lite peptid kalt glutation (GSH) har også ei svært sentral rolle i antioksidant systemet i kroppen. I *in vitro* forsøk, har mange andre peptid vist seg å ha antioksidant verknad, både i FPH frå lodde (Amarowicz and Shahidi 1997) og makrell (Wu et al. 2003), og i hydrolysat frå griseråstoff (Rudzinska et al. 2007) og eggekviteprotein (Davalos et al. 2004).

Andre *in vitro* verknader som er publiserte er at FPH kan redusere vekst i kreft celler (Picot et al. 2006), at hydrolysat frå mjølk er hevda å vere immunomodulerande (LeBlanc et al. 2002)

og å redusere blodplate aggregering (Manso et al. 2002) og at hydrolysat frå eggekvite protein reduserer bakterievekst (Pellegrini et al. 2004).

Som vist ovanfor, har mykje av dokumentasjon om eigenskapar til peptid frå hydrolysat skjedd i *in vitro* modellar. Truleg er årsaka at *in vitro* studium er rimelege, kan gjennomførast under strengt kontrollerte forhold og gjev hurtige resultat som er relativt greie å tolke. Men dersom målet er å overføre *in vitro* generert kunnskap til kva som skjer *in vivo*, kan det vere klare manglar i modellen. I kroppen blir protein i dietten spalta relativt mykje før opptak i tarmceller. Ein veit at tarmcellene kan ta opp frie aminosyrer og di- og tripeptid (to og tre aminosyrer i kjede). Kvantitativt er det truleg di- og tripeptid som bidreg mest i opptaket av aminosyrer til tarmcellene. I tarmcellene blir så mesteparten av di- og tripeptida vidare spalta til **frie aminosyrer**, som blir frigjeve til portåreblod og deretter transportert til lever. Lever er andre stopp for aminosyrer frå diettprotein, og det viktigaste organet for regulering av mengder aminosyrer som slepp ut i blod og som dermed kan nå vev som muskel, hjerte, nyrer, hjerne, lunger og perifere fettvev. I tilfellet ACE inhibering og potensiell blodtrykksregulering, må peptidet bli teke opp og passere både tarmcelle og truleg levercelle utan å bli spalta til frie aminosyrer. Deretter må peptidet transporterast i blodet til lungene, der ACE finnst og kan inhiberast. Korvidt opptak av intakte protein og peptid skjer over tarmceller, utan spaltning av peptid, slik at bioaktive peptid kan verke på ulike organ i kroppen er usikkert. Dette er viktig å vere klar over ved implementering av resultat frå *in vitro* modellar.

### **2.3. *In vivo* testing av eigenskapar til peptid i hydrolysat**

*In vivo* (Latin: i det levande) tyder at testing skjer i ein fullstendig organisme, som til dømes ein dyreforsøksmodell eller humane studium. Dersom ein ønskjer å teste biologisk effekt av hydrolysat i heile organismen, er ein *in vivo* modell meir reell enn *in vitro* modellar.

Samstundes er *in vivo* forsøk meir komplekse, meir ressurskrevjande, resultata kan vere mindre eintydige og derfor vanskelegare å tolke. Ernæringsstudium er ein typisk *in vivo* modell. Vi har tidlegare publisert data om lakse FPH og påverknad av fettomsetnad i rotter (Wergedahl et al. 2004). Andre har publisert om fiskepeptid si effekt på reduksjon av blodtrykk i rotter (Jung et al. 2006) og på immunforsvar i mus (Duarte et al. 2006). FPH har også vore uttesta i fôr til regnboge aure (Aksnes et al. 2006a), torsk (Aksnes et al. 2006b) og hund (Folador et al. 2006). Torske FPH har også med lukke blitt nytta i vekstmedia til dyrking av mikroorganismar (Aspmo et al. 2005). Det er færre *in vivo* publikasjonar på verknad av hydrolysat enn *in vitro* publikasjonar, om ein ser vekk frå ensilasjestudium.

### **2.4. Fedmeutvikling og diettprotein**

Overvekt er eit alvorleg globalt problem av aukande omfang, og det er gjort estimat som viser at overvekt og andre livsstilsrelaterte sjukdomar sto for 46% av total sjukdomsbelastning globalt i 2001. Dette er predikert til å stige til 57 % i 2020 (WHO 2003). I Noreg er over halvparten av 40-45 åringar overvektige (kroppsmasseindeks > 25), kvar femte unge i Oslo overvektig og i Sverige er kostnadane rundt overvekt og fedme estimert til 0,7% av bruttonasjonalprodukt (Sosial- og helsedirektoratet 2007).

Utviklinga av diett-indusert fedme skuldast ein positiv energibalanse, med eit høgre inntak enn forbruk av energi. Overskotsenergi blir i kroppen effektivt lagra som fett i ulike fettlager. Det eksisterer mange ulike tilnærmingar for å oppnå vektreduksjon. Diettar med eit høgt proteininntak er vist å redusere fedme, både humant (Layman et al. 2003; Yancy et al. 2004; Layman et al. 2005) og i dyrestudier (Lacroix et al. 2004; Klaus 2005). Ein veit at eit høgt inntak av protein reduserer appetitt og aukar metthetskjensla (Batterham et al. 2006; Cota et

al. 2006) og at ein del av proteineffekt på vektreduksjon derfor truleg skuldast eit lavare energiinntak ved eit høgt proteininntak (Blouet et al. 2006; Pichon et al. 2006).

## 2.5. Strategi DOCMAR peptid

Trass i mange publikasjonar med tema enzymatisk hydrolyse av ulike råstoff og ein del omkring biologisk uttesting, både i *in vitro* modellar og i dyremodellar, er det **lite systematisk dokumentasjon** av verknad av hydrolysat i eit ernæringsperspektiv. Sams for ein del av dokumentasjonen om ulike biologiske verknader er at det er mange prosessstrinn for isolering av spesifikke fraksjonar og/eller peptid. Slike prosessstrinn vil auke kostnad i industrialiseringsprosessen, både gjennom investering i utstyr og i drifting av avansert utstyr. Dernest fins det store biproduktvolum i Noreg, og dersom målet er å isolere ein liten del av FPH med spesifikke eigenskapar, vil bulkvolumet framsleis vere tilstades etter ekstraksjon. I DOCMAR peptid prosjektet vart det derfor lagt vekt på færrest moglege prosessstrinn, med tanke på å halde investerings- og produksjonskostnad så lav som mogleg. Vidare var tanken at om ein kan dokumentere effekt på heile FPH fraksjonen, og at denne dokumentasjonen kan opne for bruk i nye marknader med litt høgare betalingsvilje, vil sjølv ein liten prisoppgang kunne auke verdiskaping på grunn av dei store voluma.

Fedme er eit stort, uløyst problem med store samfunnsøkonomiske konsekvensar og som har klar samheng med ernæring. Vi har funne nokre få publikasjon som studerer effekt av hydrolyserte protein i eit fedmeperspektiv. Aoyama *et al.* (2000) har publisert at soya protein isolat (SPI) og SPI hydrolysat reduserte fedme i rotter betre enn myse og hydrolysert myse. Broccali *et al.* (2005) publiserte at hydrolysert myseprotein reduserte fedme i rotter relativt til kasein. Med bakgrunn i den store fedme epidemien på verdsbasis, dei store økonomiske konsekvensane relatert til fedme, at diettprotein er vist å vere gunstig i vektreduksjon, samt at det er lite publisert rundt hydrolysat og fedme, ønska vi å fokusere på dette i DOCMAR peptid prosjektet.

## 3. RESULTAT

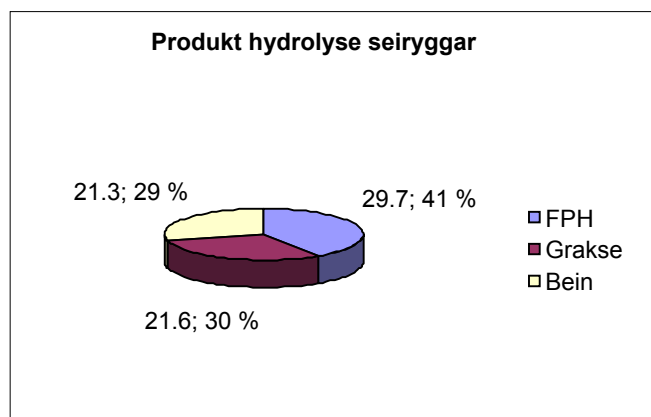
Brorparten av biprodukt frå norsk fiskeindustri endar i dag som syrekonservert ensilasje. Fokus i Docmar peptid prosjektet har vore å lage høgkvalitets produkt frå høgkvalitets råstoff. Gjennom enzymatisk hydrolyse vart det ikkje tilsett anna enn vatn og enzym gjennom heile prosessen, og fraksjonane etter hydrolysa bør danne eit godt utgangspunkt for produkt med høgare marknadsvardi enn ensilasje. Sidan Noreg har store biproduktvolum har målet vore å arbeide med heile fraksjonar, og ikkje å leite etter spesifikke peptid med spesielle eigenskapar (dette er omhandla i delprosjektet DOCMAR Taurin og ACE hemmarar).

**3.1. Resultat delmål 1: *Framstille høgkvalitets* fiskeprotein hydrolysat frå enzymhydrolyse av seiryggar, også med fokus på grakse og beinfraksjon**

### 3.1.1. Hydrolyse av seiryggar

Ved oppstart av DOCMAR prosjektet hadde vi tilgang til FPH frå torsk (NutriMarine Life Science, Bergen) og laks. I tillegg ville vi gjerne framstille og teste FPH frå sei og vi hydrolyserte derfor seiryggar ved Novozyme sitt pilotanlegg i Bagsvaerd, Danmark. 400 kg seiryggar (våtvekt) vart tilsett 350 kg vatn og forvarma til 55°C, tilsett 400 g Protamex™ (1.5 Anson units/g). Etter 50 min hydrolyse vart temperaturauke i tanken starta og etter 1t og 45 min var temperatur i hydrolysetanken 96°C. pH ved start hydrolyse var 6.6 og etter 1t og 45 min 6.2 (målt ved romtemperatur). Hydrolysevæska (FPH og grakse) vart deretter separert i ein to-fase separator til FPH og grakse, og FPH, grakse og bein vart deretter tørka. For detaljar om

utstyr nytta i hydrolyse, sjå Liaset et al 2003. Produktfordeling frå hydrolyse av seiryggar er vist i figur 1.



Figur 1. 400 kg seiryggar (våtvekt) ga totalt 72,6 kg tørre fraksjonar etter hydrolyse.

### 3.1.2. Råprotein og aminosyrer i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar.

Det er i eit tidlegare prosjekt gjennomført pilot skala enzymhydrolyse av 200 kg lakseryggar ved Novozymes sitt anlegg i Bagsvaerd, Danmark (Liaset et al 2003). Frå pilot skala hydrolyse av både laks og sei, som vart gjennomførte under tilnærma same forhold, fekk vi isolert rundt 50% av total nitrogen i FPH fraksjonen. I DOCMAR peptid prosjektet, resulterte dette i 29.7 kg tørt FPH, resten av nitrogenet var fordelt i graksefasa (21.6 kg tørr grakse) og i beinfraksjonen (21.3 kg tørt bein). Aminosyresamansetnaden i sei FPH, sei grakse og i sei beinfraksjonen er vist i tabell 1.

Tabell 1. Råprotein (N\*6.25) og total aminosyreinnhald i tre fraksjonar frå hydrolyse av seiryggar.

	Sei FPH	Sei grakse	Sei bein
Råprotein, N*6.25 (g/ 100g prøve)	83.7	86.2	28.9
<b>Aminosyre (g/ kg prøve)</b>			
Arg	54,0	54,1	21,6
His	18,8	17,5	4,3
Ile	28,2	41,6	5,3
Leu	55,1	71,0	9,7
Lys	67,6	66,0	10,8
Met	17,7	23,6	5,7
Phe	25,2	39,9	8,6
Thr	34,7	41,8	10,5
Trp	3,8	11,6	0,5
Val	33,3	45,5	8,3
<b>Sum essensielle</b>	<b>338,4</b>	<b>412,6</b>	<b>85,3</b>
Ala	55,9	46,3	23,2
Asn + Asp	74,9	82,9	16,6
Cysteine (total)	12,9	18,0	16,0
Gln + Glu	117,6	106,7	29,1
Gly	70,5	43,2	60,4
OH-Pro	13,6	3,6	19,5
Pro	39,3	33,2	28,2
Ser	40,0	39,1	17,1
Tyr	19,0	34,3	4,1

<b>Sum ikkje-essensielle</b>	<b>443,7</b>	<b>407,3</b>	<b>214,2</b>
Forhold essensiell/ ikkje-essensielle	0,8	1,0	0,4
Tau	14,0	3,1	n.d.

Frå Tabell 1 ser vi at råprotein er høgt både i sei FPH og grakse fasa, og at det er høgare mengder essensielle aminosyrer i sei graksefase enn i sei FPH fase. Forholdet mellom essensielle og ikkje-essensielle aminosyrer er også høgare i sei grakse enn i sei FPH (Tabell 1), og dette gjeld også ved enzymatisk hydrolyse av laks (Liaset et al 2003) og torsk (upubliserde data). Dette skuldast delvis at 5 av 10 essensielle aminosyrer er hydrofobe, og derfor slik plasserte i fiskeprotein (og andre protein) at dei i mindre grad kjem i kontakt med enzymet gjennom hydrolyseprosessen. Dette fører til at dei hydrofobe aminosyrene i større grad finnast i lengre peptidkjeder med høgare masse, som blir utfelt ved sentrifugering etter hydrolysa og dermed hamnar i grakse fraksjonen. Sei FPH inneheld mest taurin, og dette er som venta, då taurin ikkje inngår i proteinsyntese, men forelegg fritt i biologiske vev. Taurin er vannløseleg, og vil derfor følge hydrolysevæska, og hamnar derfor i hovudsak i FPH fraksjonen.

Beinfraksjonen frå hydrolysa av seiryggar er lavare på råprotein enn FPH og grakse (Tabell 1), noko som gjenspeilar at mesteparten av fiskemuskel som var på ryggane ved start av prosessen er frigjort frå ryggbeinet gjennom enzymhydrolysa. Aminosyresamansetnaden i beinfraksjonen er svært rik på glycin, prolin og hydroksyprolin (36% av total aminosyrer), og dette gjenspeilar at proteinet i beinfraksjonen i hovudsak er bindevevsprotein kollagen, som er svært rikt på desse tre aminosyrene.

### **3.1.3. Aske, mineral og sporstoff i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar**

Sei beinfraksjon var som venta høgst i askeinnhald (nær 66%, Tabell 2). Dei høge verdiane av beinminerala kalsium (24%) og fosfor (13%), gjenspeilar beininnhaldet i seiryggane. Sei FPH var også relativt høgt i askeinnhald, og inneheld mykje av dei vannløselege minerala natrium og kalium. Eit høgt natriuminnhald er ikkje gunstig med omsyn til helse, og eventuelle negative konsekvensar med omsyn til blodtrykk bør evaluerast. Både sei grakse, og spesielt sei FPH hadde høgt jod innhald (Tabell 2). Jod er eit viktig sporstoff som inngår i thyroidhormon, som er viktig for regulering av energiomsetnad i kroppen. Vidare har både sei FPH og sei grakse høge konsentrasjonar av selen, som er svært viktig i antioksidantsystemet i kroppen.

**Tabell 2. Total aske og mengde mineral og sporstoff i fraksjonar frå enzymatisk hydrolyse av seiryggar**

Komponent	Sei FPH	Sei grakse	Sei bein
Aske (g/ 100g prøve)	13,9	5,6	66,0
Mineral (g/kg prøve)			
Ca	0,8	6,9	239,2
K	25,7	6,2	0,8
Mg	1,9	1,3	6,6
Na	30,3	7,9	3,9
P	6,3	9,3	130,0
Sporstoff (mg/ kg prøve)			
<i>Essensielle</i>			
Cu	1,9	3	0,4
Fe	3,1	67,0	24,0
I	17,2	4,5	1,2
Mn	<0.6	2,1	41,6
Se	2,1	3,0	0,5
Zn	5,0	107,0	98,9
<i>Ikkje-essensielle</i>			
As	4,3	4,1	0,5
Cd	<0.003	0,008	<0.003
Hg	<0.005	0,1	<0.005
Pb	<0.09	<0.09	<0.09

### 3.1.4. Fett i fraksjonar frå enzymhydrolyse av seiryggar

Det er viktig å vere klar over at grakse fraksjonane inneheld meir fett enn FPH, uavhengig av om råstoffet er mager (torsk, sei) eller feit fisk (laks). Sei grakse inneheldt 12.4% totalfett, medan sei FPH inneheldt 0.7% totalfett (Tabell 3). Dette skuldast truleg at membranane som fins i og rundt alle celletypar (til dømes celler i fiskemuskel), er relativt rike på fosfolipid og kolesterol. Desse membranane blir truleg lite påverka av enzyma som blir tilsett i hydrolysa, og vil danne aggregat med molekylvekt av ein slik storleik at dei blir utfelt ved sentrifugering, og dermed hamnar i graksefraksjonen. Som Tabell 3 viser, utgjer summen av fosfolipid og kolesterol 52.5% av totalfett i sei grakse. I sei FPH er den relative mengda av fosfolipid og kolesterol nesten like høg, 49.4%, men den absolutte mengda er mykje lavare på grunn av det lave fettinnhaldet i sei FPH. Det er svært lite fett i sei beinfraksjon, 0.1%.

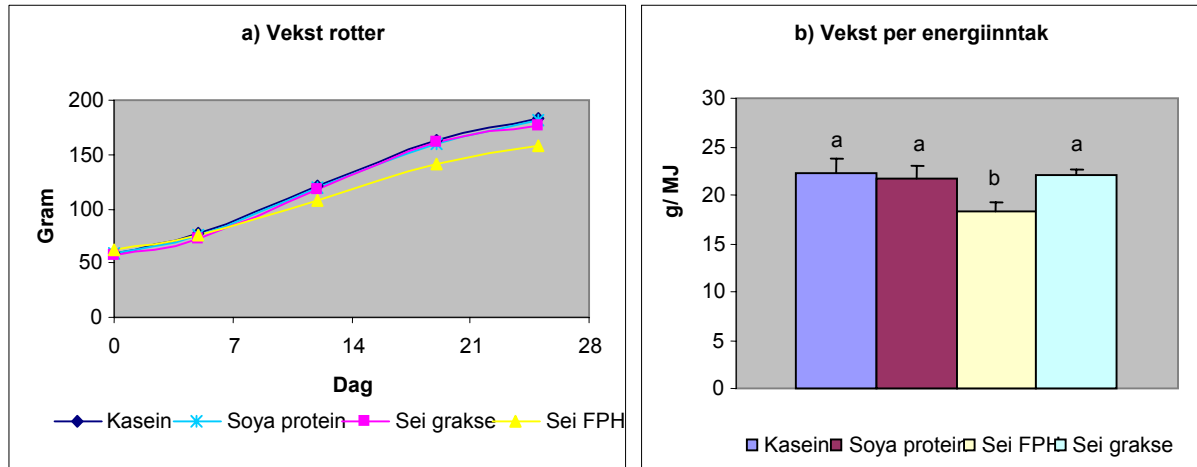


**Tabell 3. Totalfett, fettklasser og relativ fettsyresamansetnad i fraksjonar frå enzymatisk hydrolyse av seiryggar**

Komponent	Sei FPH	Sei grakse	Sei bein
Total fett (g/100g prøve)	0,7	12,4	0,1
<b>Fettklasse (g/ 100g fett)</b>			
Sphingomyelin (SM)	2,3	3,5	4,9
Fosfatidylkolin (PC)	16,0	19,8	14,6
Fosfatidylserine (PS)	2,8	-	-
Fosfatidylinositol (PI)	2,8	1,0	-
Fosfatidin syre/ cardiolipin	2,1	-	-
Fosfatidyletanolamin (PE)	8,3	-	0,9
<b>Sum fosfolipid</b>	<b>34,3</b>	<b>24,3</b>	<b>20,4</b>
Ceramide	1,1	-	-
Pigment	6,7	19,3	15,9
Kolesterol	15,0	28,2	23,4
Frie fettsyrer	12,4	12,4	13,5
Triacylglycerol	15,4	4,1	7,9
Sterol ester	10,1	7,2	18,0
Andre lipider	5,0	4,4	0,9
<b>Relativ mengd fettsyre (g/ 100g fett)</b>			
14:0	1,2	2,4	2,6
15:0	0,4	0,5	1,5
16:0	14,0	28,4	20,0
17:0	0,3	0,6	0,9
18:0	5,0	9,1	4,6
<b>% metta</b>	<b>20,9</b>	<b>41,0</b>	<b>29,6</b>
18:1n-11	0,8	1,1	0,7
20:1n-11	0,4	0,6	0,4
22:1n-11	1,4	2,0	2,5
16:1n-9	0,5	0,7	1,0
18:1n-9	13,0	19,9	10,7
20:1n-9	2,8	4,1	2,7
22:1n-9	0,4	0,5	0,5
24:1n-9	1,8	2,6	1,0
16:1n-7	1,3	1,8	1,4
18:1n-7	2,7	4,0	2,0
<b>% monoumetta</b>	<b>25,1</b>	<b>37,2</b>	<b>22,9</b>
18:2n-6	0,9	1,1	1,7
20:2n-6	0,2	0,2	0,2
20:4n-6	1,4	0,8	1,0
<b>% omega 6</b>	<b>2,5</b>	<b>2,1</b>	<b>2,9</b>
18:3n-3	0,8	0,5	0,6
18:4n-3	1,1	0,4	0,9
20:4n-3	0,6	0,3	0,4
20:5n-3	10,0	3,6	7,2
22:5n-3	0,8	0,3	0,7
22:6n-3	20,0	5,8	11,0
<b>% omega 3</b>	<b>33,3</b>	<b>10,8</b>	<b>20,8</b>

### 3.1.5. Sei FPH og sei grakse som diett protein – påverknad av vekst i rotter

Med bakgrunn i skilnader i aminosyresamansetnad mellom sei FPH og grakse, var det interessant å teste kor godt forsøksdyr vaks med dei to peptidfraksjonane som proteinkjelde, samanlikna med soyaprotein og natriumkasein. Som vist i figur 2, var tilveksten med sei grakse like god som kasein og soyaprotein, medan sei FPH fôra rotter vaks signifikant dårlegare. Dette forsøket viser at sei grakse er godt egna som proteinkjelde med omsyn til aminosyresamansetnad i vekstdiettar.



Figur 2. Vekstkurver a) og vekst per energiinntak b) i unge Wistar rotter fôra 20% protein enten som kasein, soya protein, sei FPH eller sei grakse ( $n = 5$ ). b) Gjennomsnitt  $\pm$  SD, ulike bokstavar viser signifikante skilnader ( $P < 0.05$ ). Fett frå sei grakse var redusert frå opprinneleg 12.4% til 2.4% ved bruk av løysemiddel

**3.2. Resultat delmål 2:** Analysere FPH frå ulike artar med omsyn til *kjemisk samansetnad*, slik at denne dokumentasjonen kan nyttast i framtidig arbeid

#### 3.2.1. Skilnader framstilling av FPH versus soyaprotein eller natriumkasein

Industrielt blir det nytta mykje kasein og soya protein i næringsmiddel. I dette prosjektet blei derfor FPH frå sei, torsk (NutriMarin Life Science) og laks, samanlikna med soyaprotein isolat (Supro 500, Protein Technologies International) og natrium kasein (Sigma). Det er viktig å forstå dei prinsipielle skilnadane mellom å isolere peptid ved hjelp av enzymatisk hydrolyse og tradisjonelle isolasjonsmetodar som utsalting av mjølkeprotein i meieriindustrien (natriumkasein) eller vasking av proteinfraksjonar for å fjerne uønska komponentar ved framstilling av soya protein isolat. Ved utfelling av kasein, fjernar ein proteinet frå eit vandig miljø, og innhaldet av komponentar som er vannløselege vil derfor vere lavt i det utfelte natriumkaseinet. Ved vasking av soya protein vil truleg også ein del av dei vannløselege komponentane forsvinne. Ved framstilling av FPH, er prosessen motsett, ein startar med eit lite løyseleg råmateriale, som blir gjort meir løyseleg gjennom prosessen. Deretter er det den vannløselege delen som blir oppkonsentrert og tørka til FPH, det vil seie at ein skulle forvente eit høgare innhald av vannløselege komponentar i FPH enn i soya eller natrium kasein. I DOCMAR peptid prosjektet analyserte vi derfor FPH frå sei, torsk og laks saman med eit soyaprotein isolat og natrium kasein for fett, råprotein, og aminosyre innhald (Tabell 4), aske, mineral og sporstoff (Tabell 5), b-vitaminer (vannløselege) (Tabell 6) og polyaminar (Tabell 7).

### 3.2.2. Fett, råprotein og aminosyrer

FPH og kasein er alle lave i fett, medan soya protein isolat hadde overraskande høgt fettinnhald (Tabell 4). Alle proteinkjeldene hadde høgt råprotein, men sei FPH var litt lavare i råprotein, og litt høgre i mineral og sporstoffinnhald (Tabell 5). Sei og torsk FPH har tilsvarande mengder totale essensielle aminosyrer som soya, medan laks FPH har lavare del essensielle aminosyrer. Kasein har høgst del essensielle aminosyrer. Soya protein har lavt innhald av svovel aminosyra metionin, men er rikt på svovelaminosyra cystein. Kasein inneheld mykje metionin, men svært lite cystein. Verken soyaprotein eller kasein inneheld svovelaminosyra taurin, som FPH er rik på. Cystein kan i kroppen lagast frå metionin, og taurin kan i kroppen lagast frå cystein. Alle FPH er svært lave i den essensielle aminosyra tryptofan. Grunnen til dette er usikker, men det kan ha med produksjonsmetoden, eventuelt tørkettrinnet å gjere.

**Tabell 4. Total fett, råprotein og aminosyrer i FPH frå sei, torsk og laks, samanlikna med soyaprotein og kasein. Fett ekstrahert med syrehydrolysemetode..**

Komponent	Sei FPH	Torsk FPH	Laks FPH	Soya	Kasein
<i>(g/ kg prøve)</i>					
Fett	7	<1	7	37	5
Råprotein (N*6.25)	837	924	946	871	902
Sum aminosyrer	799	831	857	823	942
Sum frie aminosyrer	111	47	99	-	-
<i>Aminosyrer (g/ kg protein)</i>					
Arg	65	60	62	73	39
His	26	25	37	20	25
Ile	34	36	24	43	50
Leu	66	75	50	78	95
Lys	81	88	59	58	78
Met	21	24	21	12	27
Phe	30	27	27	48	51
Thr	41	37	33	38	46
Trp	5	6	4	12	11
Val	40	41	32	45	66
<b>Sum essensielle</b>	<b>408</b>	<b>419</b>	<b>348</b>	<b>427</b>	<b>488</b>
Ala	67	61	73	40	30
Asn + Asp	89	94	76	106	68
Cysteine (total)	15	12	7	15	2
Gln + Glu	141	160	119	178	218
Gly	84	43	121	38	18
OH-Pro	16	5	32	-	-
Pro	47	30	62	48	107
Ser	48	40	40	50	58
Tyr	23	25	17	33	55
<b>Sum ikkje-essensielle</b>	<b>530</b>	<b>469</b>	<b>548</b>	<b>508</b>	<b>556</b>
Ratio IAA:DAA	0,8	0,9	0,6	0,8	0,9
Tau	17	12	10	-	-

### 3.2.3. Aske, mineral og sporstoff

Fisk er rik på sporstoffa jod og selen, og vi var interesserte om vi fann igjen desse sporstoffa i FPH. Totalt askeinnhald er høgt i FPH, samanlikna med soyaprotein og kasein (Tabell 5). Det er stor skilnad mellom dei ulike typane FPH, og sei FPH har nesten dobbel mengde aske samanlikna med lakse FPH. Dette kan skuldast skilnader i råstoff, prosesssteknisk (ulikt utstyr og hydrolyseforhold), eller mineral i vatn nytta i hydrolysa (sei og torsk produsert i Danmark, lakse FPH produsert i Noreg). Sei FPH, som hadde høgast total askeinnhald, hadde også mest natrium. I ernæringsperspektiv, er det ønskeleg med eit redusert natriuminntak, då høgt natriuminntak kan auke blodtrykket. Torsk og lakse FPH hadde ikkje høgare natrium innhald enn soya- og kasein. Alle tre typane FPH hadde markant høgare kaliuminnhald enn soya og kasein. I kroppen er natrium/ kalium balansen svært viktig, og som vist i tabell 5 er forholdet mellom natrium og kalium mykje høgare i soyaprotein og kasein enn i FPH. Alle FPH er høge i sporstoffa jod og selen, samanlikna med soyaprotein og kasein. Soyaprotein har mykje av kopar og jern, som kan virke som pro-oksidantar i kroppen, medan FPH og kasein inneheld mykje mindre jern. Alle tre FPH inneheld relativt høge arsen-nivå, og det er kjent at fisk inneheld relativt mykje arsen, men då hovudsakleg som organisk bunde arsen (til dømes arsenobetain), som ein reknar for ikkje toksisk. I graksefasa frå sei, torsk og laks var totalt askeinnhald mellom 31-56 g/kg prøve, altså relativt like nivå som i soyaprotein og kasein.

**Tabell 5. Aske, mineral og sporstoff i FPH frå sei, torsk og laks, samanlikna med soyaprotein og kasein.**

Komponent	Sei FPH	Torsk FPH	Laks FPH	Soya	Kasein
<b>Aske (g/ kg prøve)</b>	139	102	76	35	32
<b>Mineral (g/ kg prøve)</b>					
Ca	0.8	1.3	0.9	0.7	0.3
K	25.7	27.1	18.7	0.5	<0.1
Mg	1.9	1.7	0.8	0.4	<0.1
Na	30.3	9.3	10.5	10.2	11.0
P	6.3	12.5	9.7	7.9	8.8
Forhold Na/K	1.2	0.3	0.6	20.4	>110
<b>Sporstoff (mg/ kg prøve)</b>					
<i>Essensielle</i>					
Cu	1.9	1.2	2.3	13.3	1.0
Fe	3.1	5.1	5.0	141	5.5
I	17.2	4.9	3.3	<0.1	0.1
Mn	<0.6	<0.6	<0.6	9.0	<0.6
Se	2.1	0.9	0.9	<0.1	0.3
Zn	4.9	6.1	27.1	35.0	42.2
<i>Ikkje-essential</i>					
As	4.3	37.6	14.1	<0.03	<0.03
Cd	<0.01	<0.01	0.03	0.04	<0.01
Hg	<0.03	0.08	0.07	<0.03	<0.03
Pb	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04

### 3.2.4. B-vitaminer

Fisk er rik på dei vannløselege b-vitaminane, og som vist i Tabell 6, var alle FPH svært rike på b-vitaminer samanlikna med soyaprotein og kasein. Laks FPH er særskild rik på niacin og pantotensyre, men også sei FPH og torsk FPH hadde høge mengder. I kroppen er B-vitaminer viktige for ei rekke prosessar, både oppbygging og nedbryting av ulike molekyl. Samanlikna med soyaprotein og kasein, var FPH rik på vitamin B12. Ein indikasjon på at mesteparten av b-vitaminane i råstoffet hamna i FPH fraksjonane, er at summen av b-vitaminer i grakse var lavare, i sei grakse 61 og i torsk grakse 51 mg/kg.

**Tabell 6. B-vitaminer i FPH frå sei, torsk og laks, samanlikna med soyaprotein og kasein.**

B-vitamin	Sei FPH	Torsk FPH	Laks FPH	Soya	Kasein
<i>(mg/ kg prøve)</i>					
Tiamin	6.9	5.2	4.6	<0.1	0.2
Riboflavine	16.6	4.2	12.4	0.5	1.0
Niacin	190	113	287	13	10
Pyridoxin (vit B6)	13.1	13.5	18	1.2	6.1
Folate	1.1	0.4	1.0	1.0	0.01
Pantoten acid	13.7	5.6	58	0.4	<0.33
Biotin	0.12	0.09	0.10	0.21	<0.013
Vitamin B12	0.24	0.11	0.22	<0.001	0.01
<b>Sum mg/kg prøve</b>	<b>242</b>	<b>142</b>	<b>381</b>	<b>16</b>	<b>17</b>

### 3.2.5. Biogene aminer

Biogene aminer fins i alle celler, og kan lagast i kroppen frå aminosyrer. Nokre aminer lagast ved å fjerne karboksylsyrer frå visse aminosyrer, slik som cadaverin (lysin), histamin (histidin), fenylethylamin (fenylalanin), putrescine (urea syklus aminosyra ornitin), tyramin (tyrosin). Andre blir laga ved å sette på ekstra grupper slik som serotonin (tryptofan), spermidine og spermine (putrescine). Funksjonen til alle aminane er ikkje heilt klarlagt, men ein trur at nokre av dei (cadaverine, putrescine, spermidine og spermine) er med på å stabilisere cellemembranar og arvematerialet (DNA). Histamin er involvert i immunforsvaret, og ein ønskjer ikkje høge nivå av histamin i FPH, då dette kan ha negative følgjer. Frå tabell 7 ser vi at lakse FPH hadde høge amin verdiar, og at dette skuldast hovudsakleg høgt innhald av cadaverin og putrescine. Sei og torske FPH hadde relativt like nivå som soyaprotein, medan kasein hadde lavare innhald. Histamin var lavt i alle proteinkjeldene, men litt høgre i torsk og lakse FPH.

**Tabell 7. Biogene aminer i FPH frå sei, torsk og laks, samanlikna med soyaprotein og kasein.**

Amin	Sei FPH	Torsk FPH	Laks FPH	Soya	Kasein
<i>(mg kg<sup>-1</sup> prøve)</i>					
Cadaverin	<5	5.9 ± 0.1	231.0 ± 1.6	5.8 ± 0.6	6.9 ± 1.6
Histamin	<5	6.0 ± 0.8	14.7 ± 0.1	<5	<5
Phenylethylamin	<5	11.4 ± 0.2	<5	<5	<5
Putrescine	47.4 ± 0.2	20.1 ± 2.8	94.8 ± 0.1	10.1 ± 0.2	7.7 ± 0.1
Serotonine	6.6 ± 0.2	<5	5.9 ± 0.3	<5	<5
Spermidine	14.4 ± 0.1	11.4 ± 1.4	27.3 ± 0.4	22.6 ± 0.1	<5
Spermine	<5	<5	<5	15.5 ± 0.1	<5
Tyramine	<5	<5	5.1 ± 0.4	<5	<5
<b>Sum</b>	<b>68</b>	<b>55</b>	<b>379</b>	<b>54</b>	<b>15</b>

### 3.2.6. Oppsummering innhald i FPH, soyaprotein og kasein av potensielt gunstige faktorar ved overvekt

Tabell 8 oppsummerer innhald av vannløselege faktorar med høgre konsentrasjonar i FPH enn i soya og kasein, og som kan vere gunstige med omsyn til fedme relaterte problem. Jodinnhaldet er høgre i alle FPH samanlikna med kasein, og i soya er det ikkje-detekterbare nivå. Jod blir brukt i syntese av thyroïd hormon som styrer energiomsetnaden i kroppen. Sporstoffet selen, er viktig både i syntese av thyroïd hormon, og i det selenavhengige enzym systemet glutathione-peroxidase, som er svært viktig i antioksidant apparatet i kroppen. B-vitaminet niacin blir i kroppen omdanne til nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) som er ein viktig faktor i fettforbrenning. B-vitaminet pantotensyre blir i kroppen omdanna til koenzym A, som også er ein viktig faktor i fettforbrenning. Taurin er hevda å ha ein antioksidant effekt i kroppen, og er også viktig i gallesyresyntese, som kan hjelpe til å redusere blodkolesterol. Biogene aminer som cadaverin, putrescin, spermidine og spermine, blir alle laga frå aminosyrer, og kroppen kan lage desse sjølv. Det kan kanskje likevel vere gunstig å tilføre desse gjennom kosten i enkelte situasjonar. Dei biogene aminane trur ein er med på å stabilisere membranstrukturar i celler og arvematerialet vårt. Dette kan vere gunstig i situasjonar med auka oksidativt stress, som ein til dømes ser ved fedme.

**Tabell 8. Oppsummering potensielt gunstige skilnader med omsyn til fedme i samansetnad FPH frå sei, torsk og laks, samanlikna med soya protein isolat og natrium kasein.**

Faktor	Komponent	Spesifikk verknad	Sei FPH	Torsk FPH	Laks FPH	Soya	Kasein
Metabolisme	Jod	Thyroid	17	5	3	<0.1	0.1
	Selen	"	2	1	1	<0.1	0.3
	Niacin	Fettforbrenning	190	113	287	13	10
	Pantoten	"	14	6	58	<1	<1
Antioksidant	Taurin	Antioksidant	17	10	10	-	-
	Cadaverine	Membran, DNA stab	<5	6	231	6	7
	Putrescine	"	47	20	95	10	8
	Spermidine	"	14	11	27	23	<5
	Spermine	"	<5	<5	<5	16	<5
	Selen	GSH-px	2	1	1	<0.1	0.3

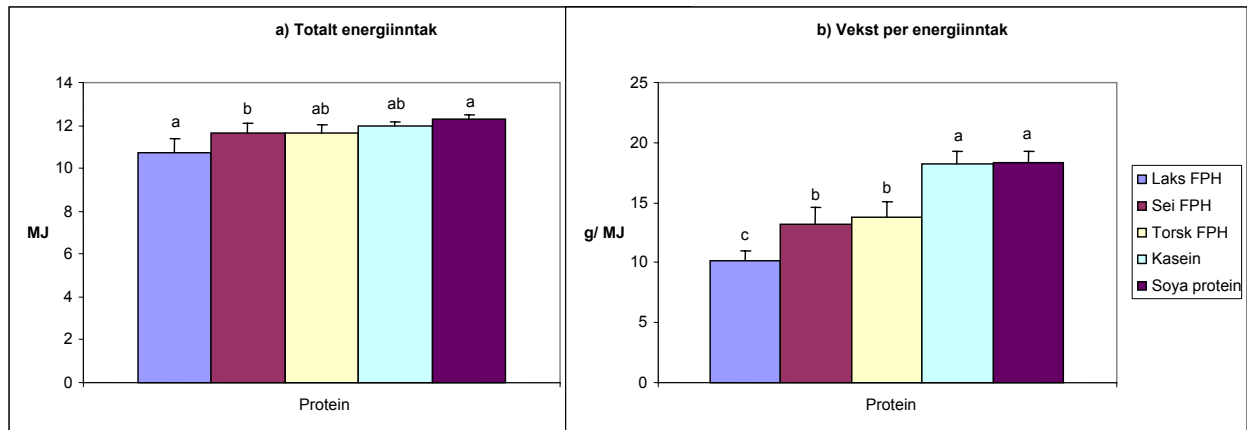
GSH-px: Glutathione peroxidase, viktig antioksidant enzym

### 3.3. Resultat delmål 3: Teste FPH i dyremodellar for å undersøkje om FPH kan *motverke utvikling av fedme*

#### 3.3.1. Utvikling av fedme i rotter som fekk alt diettprotein som FPH

I denne delen av prosjektet ønska vi å teste om utviklinga av fedme vart påverka i rotter som fekk ein høgenergi diett (mykje fett), og som fekk diettprotein i form av FPH frå sei, torsk eller laks, eller som soyaprotein eller natriumkasein. Vi brukte eit "pair-feeding" oppsett, det vil seie at dei dyra som åt minst, begrensa tilgangen av fôr til dei andre. Dette fordi ein veit at utvikling av fedme er sterkt avhengig av energiinntaket, og vi ønskte derfor å ha kontroll med dette. Av figur 3a) ser vi at trass "pair-feeding" regime, var der signifikante skilnader i

energiinntaket. Likevel ser vi at det var kraftige skilnader i vekst når vi korrigerer for ulike energiinntak (Figur 3b). Rottene fôra lakse FPH vaks signifikant minst, medan rottene fôra sei og torske FPH vaks signifikant mindre enn rotter fôra kasein og soyaprotein.



Figur 3. a) Totalt energiinntak (MJ) og b) vekst per energiinntak (g/ MJ) i unge rotter fôra 20% protein som FPH, kasein eller soyaprotein i høgenergi diettar i 7 veker. Ulike bokstavar indikerer signifikante skilnader ( $P < 0.05$ ). Data er viste som gjennomsnitt  $\pm$  SD ( $n=6$ ).

Det var ønskeleg å redusere fettvekst, uten å redusere muskelvekst, men frå figur 4 ser vi at vi fekk reduksjon både i fettvev a) og b) og i muskelvev c) og d). Men medan reduksjonen i fettvev var på 56% i lakse FPH fôra rotter samanlikna med kasein og soyaprotein fôra rotter (figur 4a), var reduksjonen i muskelvev kun 22% (figur 4c). Og når vi korrigerer for dei ulike kroppsvektene, var relative fettvekter framleis signifikant lavare i lakse FPH fôra rotter enn i soya og kasein fôra rotter (figur 4b) medan relativ muskelmasse var auka (figur 4d).

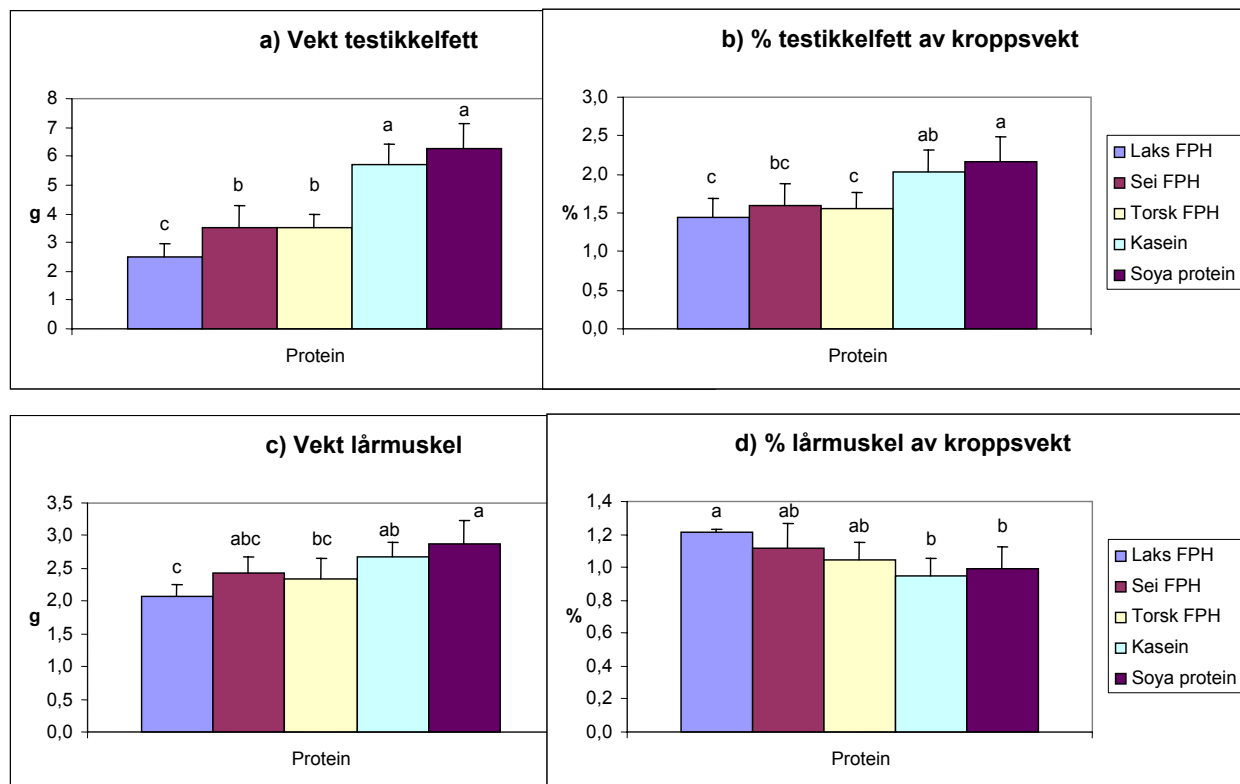
Den reduserte muskelveksten i FPH fôra rotter kan truleg forklarast med det lave innhaldet av tryptofan i FPH generelt, medan lakse FPH også var lav på fleire essensielle aminosyrer (Tabell 4). Det medførte at når vi kun nytta FPH som proteinkjelde, var det sub-optimale nivå av tryptofan i alle FPH diettane og i tillegg sub-optimale nivå av fleire essensielle aminosyrer i laks FPH dietten (Tabell 9).

### 3.3.2. Utvikling av fedme i rotter som fekk halvparten av diettprotein som lakse FPH

Den reduserte muskelveksten var uønska, og vi gjennomførte derfor eit nytt rottestudie, der vi erstatta halvparten av kaseinet med laks FPH. I tillegg hadde vi med ei gruppe der halvparten av kaseinet av erstatta med enzym hydrolysert kasein, for å sjå om det var ei spesifikk effekt av FPH, eller om det var ei generell effekt av hydrolysert protein. Som vist i figur 5 var det ingen skilnadar i energiinntak eller total vekst.

Figur 6 viser at både hydrolysert kasein og lakse FPH spesifikt reduserte fettvev a) og b), utan å redusere muskelveksten c) og d). Med dette meiner vi å ha dokumentert at FPH reduserer utvikling av fedme i rotter fôra høg-energi diettar.

Fleire data og detaljar frå dyrestudia vil bli publiserte i internasjonale vitenskaplege journalar.

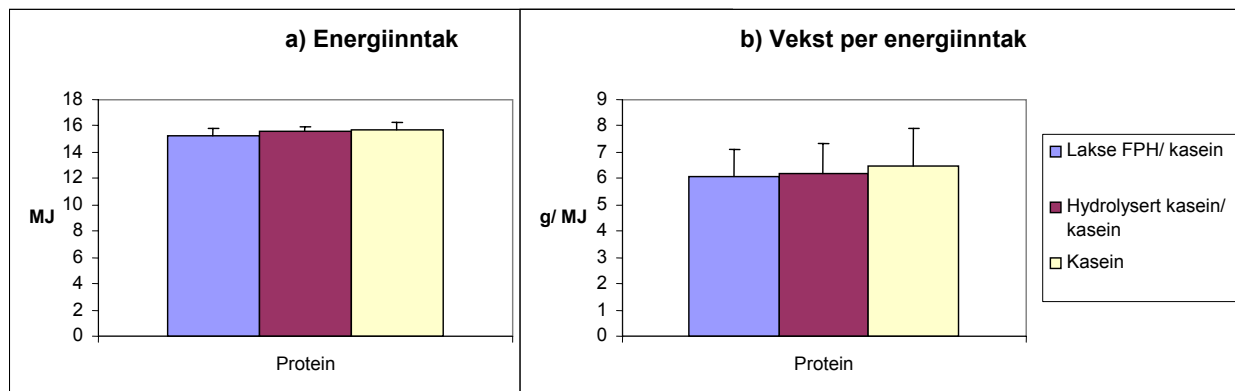


Figur 4. Absolutte og relative vevsvekter: a) fettvekt (g), b) % fettvekt av kroppsvekt, c) muskelvekt (g) og d) % muskel av kroppsvekt i unge rotter fôra 20% protein som FPH, kasein eller soyaprotein i høgenergi diettar i 7 veker. Ulike bokstavar indikerer signifikante skilnader ( $P < 0.05$ ). Data er viste som gjennomsnitt  $\pm$  SD ( $n=6$ ).

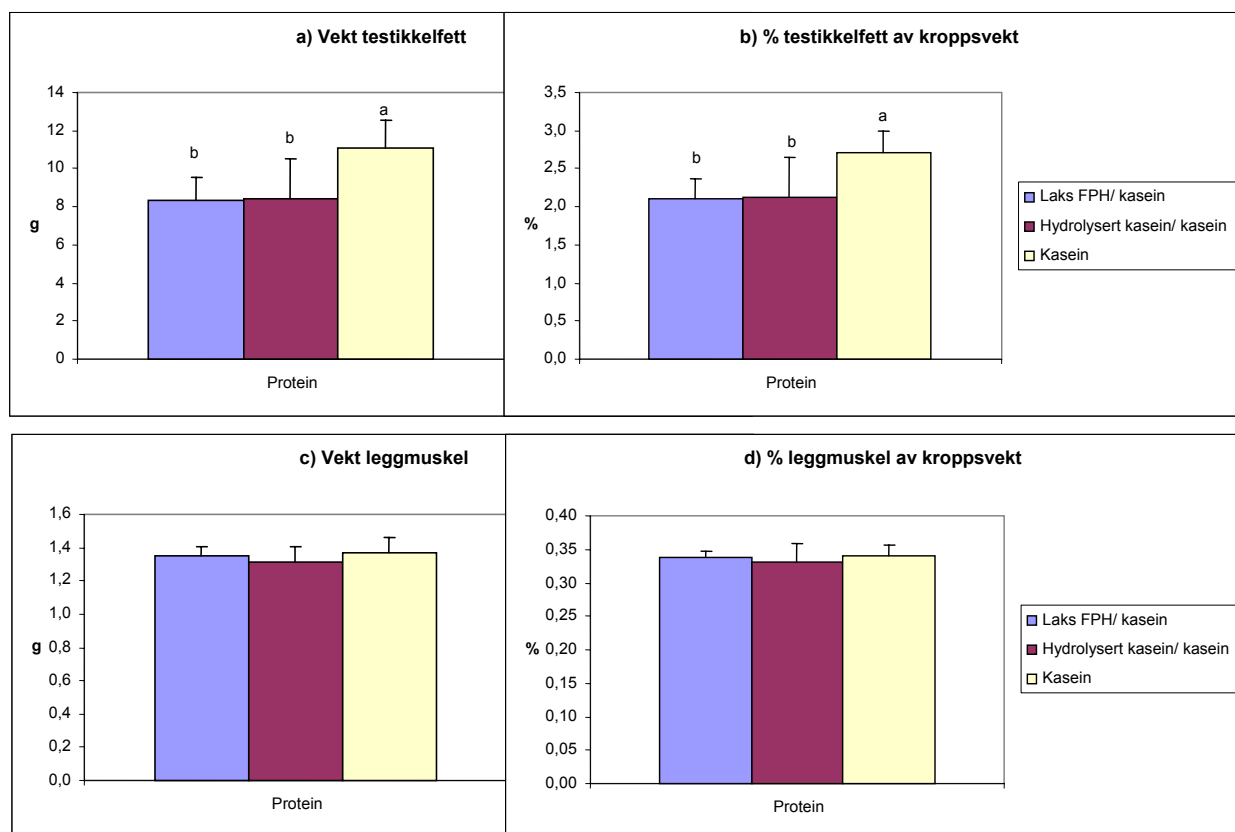
Tabell 9. Aminosyre innhald i diettar til unge rotter som fekk 20% protein enten som FPH, kasein eller soyaprotein, og estimert behov for rottene. *Italic* indikerer sub-optimale nivå

Aminosyre	Laks FPH	Sei FPH	Torsk FPH	Kasein	Soya protein	Estimert behov
(g kg <sup>-1</sup> diet)						
Arg	11,6	11,8	10,9	7,8	14,7	<b>4,3</b>
His	8,2	4,5	4,6	1,3	3,2	<b>2,8</b>
Ile	<i>5,2</i>	6,8	6,6	11,4	9,5	<b>6,2</b>
Leu	<i>9,8</i>	12,7	15,5	19,8	16,6	<b>10,7</b>
Lys	11,5	14,5	17	16,0	11,5	<b>9,2</b>
Met + Cys	12,3	11,7	13,1	12,8	12,3	<b>11,4</b>
Phe + Tyr	<i>8,6</i>	10,2	10,5	21,9	17,5	<b>10,2</b>
Thr	<i>5,5</i>	<i>6,1</i>	<i>6,1</i>	8,1	6,4	<b>6,2</b>
Trp	<i>0,7</i>	<i>0,9</i>	<i>1,0</i>	2,2	2,3	<b>2,0</b>
Val	<i>6,4</i>	7,9	8,0	13,8	9,7	<b>7,4</b>





Figur 5. a) Totalt energiinntak (MJ) og b) vekst per energiinntak (g/ MJ) i vaksne rotter fôra 10% kasein og 10% laks FPH, 10% kasein og 10% enzym hydrolysert kasein eller 20% kasein i høgenergi diettar i 7 veker. Data er viste som gjennomsnitt  $\pm$  SD (n=8).



Figur 6. Absolutte og relative vevsvekter: a) fettvekt (g), b) % fettvekt av kroppsvekt, c) muskelvekt (g) og d) % muskel av kroppsvekt i vaksne rotter fôra 10% kasein og 10% laks FPH, 10% kasein og 10% enzym hydrolysert kasein eller 20% kasein i høgenergi diettar i 7 veker. Ulike bokstavar indikerer signifikante skilnader ( $P < 0.05$ ). Data er viste som gjennomsnitt  $\pm$  SD (n=8).

#### 4. Konklusjonar DOCMAR peptid

- Enzymatisk hydrolyse gjev to fraksjonar med høgt aminosyreinnhald, FPH og grakse, begge med særskilde kvalitetar
- Samansetnad av aminosyrer i grakse er god med omsyn til vekst
- Aminosyreprofil i FPH varierer, men FPH har eit generelt lavt innhald av den essensielle aminosyra tryptofan
- FPH er rik på vannløselege komponentar som b-vitaminer, mineral og sporstoff
- Større mengder av sporstoffa jod og selen i FPH enn i kasein og soyaprotein
- Hydrolyserte protein, også FPH, reduserer spesifikt fedme-utvikling i rotter, uten å redusere muskelvekst

#### 5. Kommersialiseringspotensiale produkt frå enzymatisk hydrolyse

Noreg som oppdretts- og fiskerinasjon har store unnytta ressursar i biprodukt, oppdrettsindustrien skapte 156 000 tonn biprodukt i 2005, og 73% av dette vart konservert som ensilasje (Rubin 2007). Ensilasje er, per i dag, lite eigna til anna enn som føringrediens. Ensilasjeproduksjon vil truleg i framtida også ha ein viktig funksjon i norsk fiskeri- og oppdrettsnæring, både ved handsaming av død fisk og av råstoff som ikkje held kvalitetskrava for produksjon av produkt til høgt betalte marknadssegment. Men at fyrsteklasses råstoff, med tilsvarande kvalitet som fileten skal nyttast i ensilasjeproduksjon, gjev lite mening.

Tendensen i norsk oppdretts- og fiskerinæring går mot færre, men større aktørar (t.d. Aker seafood, Marine Harvest/ Pan Fish, Norway Pelagic). Dette vil truleg tilrettelegge for samkøyring av prosessar som handsaming/ slaktning av fisk i større anlegg. Store anlegg, med stor gjennomstrøyming av råstoff gjev også råstoffgrunnlag for ei betre utnytting av biprodukt. Eit anna viktig moment med store anlegg er at kvaliteten på biprodukta kan ivaretaast frå fyrste prosesstrinn. Dette er avgjerande for ei betre utnytting av biprodukta, spesielt om ein ønskjer etterkvart å rette seg mot humane marknader, der god hygiene og sporing av råstoff er heilt essensielt. Vidare vil større anlegg gje mogleikar for dei naudsynte investeringane som trengs av produksjonsutstyr. Spesielt på tørkesida (spraytørke eller liknande) kan investeringane bli tunge og krevje eit stort produksjonsvolum for å svare seg. Enzymatisk hydrolyse med tørking er ein energikrevjande prosess, så det vil truleg vere gunstig med ein relativt kontinuerlig prosess.

Ved oppstart av DOCMAR prosjektet, var dokumentasjon av biologisk verknad av fraksjonar frå enzymatisk hydrolyse av biprodukt relativt fråverande, med unntak av omega-3 forskning, som har vore intensiv dei siste 10-20 åra. Dersom ein gjennom gode dokumentasjonsprogram kan vise spesifikke verknader av ulike fraksjonar frå enzymatisk hydrolyse, vil dette over tid kunne gje grunnlag for ei betre utnytting av heile fiskeressursen, og også for ei betre inntening. Dersom ein skal konkurrere på ingrediens marknaden mot etablerte, store industrier som soya- og meieriindustrien, vil dette **krevje langsiktig tenking og vilje til målretta grunnforskning** som over tid vil danne den naudsynte kunnskapsbase og dokumentasjon.

Enzymatisk hydrolyse av fiskebiprodukt gjer at ein på ein effektiv måte kan ekstrahere høgkvalitets proteinfraksjonar frå komplekse matriksar som fiskehovud og ryggbein. I praksis vil hydrolysa gje 3 eller 4 store fraksjonar; FPH, grakse og bein, samt olje dersom råstoffet er feitrikt. Desse fraksjonane har ulike potensielle bruksområde som må identifiserast.

- Beinfraksjon er kanskje den fraksjonen som per i dag har det minst definerte potensialet. Fiskebeina har sjølvsagt høgt innhald av beinminerala kalsium og fosfat. I tillegg inneheld fiskebeinet ein del bindevevsprotein (kollagen) rikt på aminosyrene glysin, prolin og hydroksyprolin. Eit eige DOCMAR delprosjekt har omhandla uttesting av tilgjenge av kalsium frå fiskebein.
- Grakse som diettprotein i vekstfôr: Graksefase frå sei, torsk og laks er alle rike på dei essensielle aminosyrene og sei grakse har som proteinkjelde i rotter like god nitrogenfordøying som soya protein isolat (begge 86%), men lavare enn sei FPH (90%) og kasein (92%). Tilveksten per energiinntak var med sei grakse like god som både soyaprotein og kasein. Grakse kan dermed ha eit potensiale som erstatning for soyaprotein og kasein som diettprotein, der vekst er nøkkelfaktor.
- Marine fosfolipid frå grakse: I DOCMAR peptid prosjektet fann vi at frå 400 kg seiryggar (våtvekt), fekk vi 21.6 kg tørr grakse med total feittinnhald på 12.4% altså ~2.7 kg totalfett. Av dette var ~0.7 kg marine fosfolipid. Kanskje kan grakse i framtida bli utgangspunkt for ekstraksjon av marine fosfolipid? Det er truleg knytt ein del utfordringar rundt dette, til dømes inneheldt sei grakse også ~0.8 kg kolesterol. Vidare må graksefase, på grunn av eit høgare innhald av totalfett også undersøkjast for feittløselege uønska komponentar som dioxin og dioxin-liknande PCB.
- FPH som funksjonell anti-fedme ingrediens: FPH har på mange måtar ein skreddarsydd profil for bruk i fedmeproblematikken. Sjukeleg overvekt er ofte assosiert med redusert metabolisme og auka oksidativt stress. FPH generelt er rik på jod som er viktig i thyroïd hormon syntese (stimulerer metabolisme) og b-vitaminar som er viktige faktorar for ein auka metabolisme. FPH generelt er også rik på selen, taurin og polyaminar, som alle er viktige for eit effektivt i antioksidant system. Sjølv om vi ikkje kunne vise betre effekt av FPH versus hydrolysert kasein, dette kan vere fordi diettane vi nytta i dyrestudia hadde tilstrekkeleg mengder vitaminar. Dette er ikkje nødvendigvis tilfellet i human ernæring, og det kan derfor vere gunstig med høgare nivå av desse komponentane til humant konsum, då ernæringsstatus i visse folkegrupper er dårlegare enn i dyrestudier med optimaliserte vitaminblandingar. FPH fraksjonen er vannløseleg, noko som gjer at denne burde kunne nyttast til dømes i drikker, sausar, supper og liknande. Det mest nærliggande kommersialiseringspotensiale for FPH er kanskje som ingrediens i funksjonelt fôr og pet food. For å tilrettelegge for bruk av FPH humant, gjenstår ein del dokumentasjon. Til dømes må funn frå rotter verifiserast i gris eller menneskjer, samt at det må dokumenterast om fiske-allergikarar også vil reagere på FPH. I eit lengre tidsperspektiv, med vidare dokumentasjon kan kanskje helsekost, funksjonell mat og klinisk ernæring vere interessante marknader for FPH.

## 6. Formidling:

- Nasjonale foredrag: Maring Fagdag; Gardermoen 31. januar 2006  
'Fiskeprotein hydrolysat (FPH) i kampen mot overvekt'
- Rubin konferanse 2007, Stjørdal 08. februar 2007  
'Proteinhydrolysater mot fedme og fedmerelaterte sykdommer'
- Vitskaplege publikasjonar: 'Nutritional composition of two main peptide fractions obtained in the enzymatic hydrolysis of fish raw-materials' (Submitted)
- To manuscript under skriving om ernæring og uttesting av fiskeproteinhydrolysat i rotter – kva skjer i eit femeperspektiv og kvifor?  
(Planlagde submitted haust 2007).

## 7. Litteratur

- Aksnes, A., Hope, B., Jonsson, E., Bjornsson, B. T. and Albrektsen, S. (2006a). "Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization." *Aquaculture* **261**(1): 305-317.
- Aksnes, A., Hope, B., Hostmark, O. and Albrektsen, S. (2006b). "Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*." *Aquaculture* **261**(3): 1102-1110.
- Amarowicz, R. and Shahidi, F. (1997). "Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates." *Food Chemistry* **58**(4): 355-359.
- Aoyama, T., Fukui, K., Nakamori, T., Hashimoto, Y., Yamamoto, T., Takamatsu, K. and Sugano, M. (2000). "Effect of soy and milk whey protein isolates and their hydrolysates on weight reduction in genetically obese mice." *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY* **64**(12): 2594-2600.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J. and Eijsink, V. G. H. (2005). "Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media." *Process Biochemistry* **40**(12): 3714-3722.
- Batterham, R. L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J. E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C. W., Thomas, E. L., Bell, J. D. and Withers, D. J. (2006). "Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation." *Cell Metabolism* **4**(3): 223-233.
- Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Mathe, V., Tome, D. and Huneau, J.-F. (2006). "The Reduced Energy Intake of Rats Fed a High-Protein Low-Carbohydrate Diet Explains the Lower Fat Deposition, but Macronutrient Substitution Accounts for the Improved Glycemic Control." *J. Nutr.* **136**(7): 1849-1854.
- Bordenave, S., Fruitier, I., Ballandier, I., Sannier, F., Gildberg, A., Batista, F. and Piot, J. M. (2002). "HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ace activity." *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **32**(1): 65-77.
- Broccali, G., Berti, M., Pistolesi, E. and Cestaro, B. (2005). "Hydrolyzed milk-serum peptides reduce body weight and fat content of dietary obese rats ameliorating their antioxidant status and liver functions." *Panminerva Medica* **47**(2): 123-129.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A. B., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. and Seeley, R. J. (2006). "Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake." *Science* **312**(5775): 927-930.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B. and Lopez-Fandino, R. (2004). "Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Protection* **67**(9): 1939-1944.

- Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdigon, G. and Matar, C. (2006). "Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation." Immunobiology **211**(5): 341-350.
- Fitzgerald, R. J. and Murray, B. A. (2006). "Bioactive peptides and lactic fermentations." International Journal of Dairy Technology **59**(2): 118-125.
- Folador, J. F., Karr-Lilienthal, L. K., Parsons, C. M., Bauer, L. L., Utterback, P. L., Schasteen, C. S., Bechtel, P. J. and Fahey, G. C. (2006). "Fish meals, fish components, and fish protein hydrolysates as potential ingredients in pet foods." Journal of Animal Science **84**(10): 2752-2765.
- Gildberg, A. (1993). "Review: Enzymic processing of marine raw materials." Process biochemistry **28**: 1-15.
- Gildberg, A., Arnesen, J. A. and Carlehog, M. (2002). "Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation." Process Biochemistry **38**(4): 475-480.
- Jung, W.-K., Mendis, E., Je, J.-Y., Park, P.-J., Son, B. W., Kim, H. C., Choi, Y. K. and Kim, S.-K. (2006). "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats." Food Chemistry **94**(1): 26-32.
- Klaus, S. (2005). "Increasing the Protein:Carbohydrate Ratio in a High-Fat Diet Delays the Development of Adiposity and Improves Glucose Homeostasis in Mice." J. Nutr. **135**(8): 1854-1858.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000a). "Fish protein hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **40**(1): 43-81.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000b). "Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(3): 657-666.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y. and Yasuda, M. (2003). "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **67**(6): 1278-1283.
- Lacroix, M., Gaudichon, C., Martin, A., Morens, C., Mathe, V., Tome, D. and Huneau, J.-F. (2004). "A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(4): R934-942.
- Layman, D. K., Boileau, R. A., Erickson, D. J., Painter, J. E., Shiue, H., Sather, C. and Christou, D. D. (2003). "A Reduced Ratio of Dietary Carbohydrate to Protein Improves Body Composition and Blood Lipid Profiles during Weight Loss in Adult Women." J. Nutr. **133**(2): 411-417.
- Layman, D. K., Evans, E., Baum, J. I., Seyler, J., Erickson, D. J. and Boileau, R. A. (2005). "Dietary Protein and Exercise Have Additive Effects on Body Composition during Weight Loss in Adult Women." J. Nutr. **135**(8): 1903-1910.
- LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdez, J. C., LeBlanc, J. and Perdigon, G. (2002). "Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*." Journal of Dairy Science **85**(11): 2733-2742.
- Liaset, B., Lied, E. and Espe, M. (2000). "Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(5): 581-589.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. and Espe, M. (2002). "Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex (TM) protease." Process Biochemistry **37**(11): 1263-1269.
- Liaset, B., Julshamn, K. and Espe, M. (2003). "Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex (TM)." Process Biochemistry **38**(12): 1747-1759.

- Manso, M. A., Escudero, C., Alijo, M. and Lopez-Fandino, R. (2002). "Platelet aggregation inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine kappa-Casein macropolypeptides and their tryptic hydrolysates." Journal of Food Protection **65**(12): 1992-1996.
- Matsui, T., Li, C. H. and Osajima, Y. (1999). "Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ." Journal of Peptide Science **5**(7): 289-297.
- Pellegrini, A., Hulsmeier, A. J., Hunziker, P. and Thomas, U. (2004). "Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1672**(2): 76-85.
- Pichon, L., Huneau, J.-F., Fromentin, G. and Tome, D. (2006). "A High-Protein, High-Fat, Carbohydrate-Free Diet Reduces Energy Intake, Hepatic Lipogenesis, and Adiposity in Rats." J. Nutr. **136**(5): 1256-1260.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Berge, J. P., Guerard, F., Chabeaud, A. and Piot, J. M. (2006). "Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines." Process Biochemistry **41**(5): 1217-1222.
- Rubin (2007) Marine biprodukter: Råvarer med muligheter
- Rudzinska, M., Flaczyk, E., Amarowicz, R., Wasowicz, E. and Korczak, J. (2007). "Antioxidative effect of crackling hydrolysates during frozen storage of cooked pork meatballs." European Food Research and Technology **224**(3): 293-299.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I. and Rustad, T. (2005a). "Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products." Process Biochemistry **40**(6): 2021-2033.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I. and Rustad, T. (2005b). "Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products." Process Biochemistry **40**(3-4): 1415-1424.
- Slizyte, R., Rustad, T. and Storro, I. (2005c). "Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions." Process Biochemistry **40**(12): 3680-3692.
- Sosial- og helsedirektoratet (2007). "Overvekt og fedme - en tung utfordring." Kronikk Dagbladet 20.02.07.
- Tarr, H. L. A. (1948). "Possibilities in developing fisheries by-products." Food Technology **2**: 268-277.
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O. A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mork, S. and Berge, R. K. (2004). "Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats." Journal of Nutrition **134**(6): 1320-1327.
- WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: 1-149.
- Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. (2003). "Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)." Food Research International **36**(9-10): 949-957.
- Yancy, W. S., Jr., Olsen, M. K., Guyton, J. R., Bakst, R. P. and Westman, E. C. (2004). "A Low-Carbohydrate, Ketogenic Diet versus a Low-Fat Diet To Treat Obesity and Hyperlipidemia: A Randomized, Controlled Trial." Ann Intern Med **140**(10): 769-777.