

Rapport nr. 193

Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av proteinhydrolysat av laks

Reduksjon av fedme med FPH og komponenter som FPH inneholder mye av

RAPPORTTITTEL

**Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av proteinhydrolysat av laks.
Reduksjon av fedme med FPH og komponenter som FPH inneholder mye av (Docmar peptid III)**

RAPPORTNUMMER	193	PROSJEKTNUMMER	4638
UTGIVER	RUBIN	DATO	Mai 2010

UTFØRENDE INSTITUSJONER

NIFES

P.b. 2029 Nordnes
5817 Bergen

Kontaktperson: Bjørn Liaset (bjorn.liaset@nifes.no)

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

I Docmar-prosjektet, 2002-2006, (kfr. RUBIN-prosjekt 4608) er det vist at rotter som fikk alt diettprotein som hydrolysert lakseprotein (FPH) utviklet mindre fedme enn rotter som fikk kasein eller soyaprotein. Data fra disse studiene tyder på at noe av denne effekten skyldtes at rotter som hadde fått FPH hadde høyere nivå av gallesyrer i lever og blod sammenlignet med rotter som fikk soya- eller melkeprotein. Det er også vist at ved å erstatte 50% av intakt kasein med FPH eller med hydrolysert kasein, så fikk man redusert mengde fettvev. I et oppfølgingsprosjekt i 2007 har en undersøkt effekten av å erstatte 50% av intakt kasein med FPH og hydrolysert kasein (HK) mht. konsentrasjoner av blodlipid og sammensetning av lagringsenergi (TAG (triacylglyserol) og glycogen) i lever i muskel. FPH-rottene hadde spesifikt lavere blodkolesterol mens HK-rottene hadde spesifikt lavere TAG i blodet. TAG-innhold i lever og skjelettmuskel var lavere i begge gruppene som fikk hydrolysert protein. Glykogen var spesifikt økt i lever og muskel i FPH-rotter. Videre har en vist at FPH ser ikke ut til å gi økt stress hos rottene målt som adrenalin i urin.

I perioden 2008-2009 har Nifes undersøkt om lakse FPH øker glutationsnivå i rotter, noe som kan redusere oksidativt stress (oksidativt stress kan medvirke til fedme). Resultatene viser at ved 100% utskifting av kasein med lakse FPH øker glutationsnivå i lever hos rotter, mens det var ingen økning når en byttet ut halvparten av kaseinet med FPH. Effekten er altså konsentrasjonsavhengig.

I motsetning til kasein er FPH rikt på taurin (T) og glysin (G), men også de vannløslige B-vitaminene. Lakse-FPH er spesielt rik på pantotensyre (P), som stimulerer glutationsyntese. Glysin og taurin gjør at gallesyrer lettere kan transporteres fra lever til tarm eller fra lever til blod. Denne transporten blir ytterligere stimulert av glutatation. Hypotesen er at ved å øke konsentrasjon av både gallesyrer og glutatation i lever, så kan dette føre til økt transport av gallesyrer (sammen med glutatation) fra lever til blod og dermed motvirke fedme. En har derfor testet dette ved å tilsette G, T og P til kaseinbaserte høyenergidietter til mus. Konklusjonen er at tilsats av P, T eller kombinasjon av P+T+G øker glutationsnivå i lever hos mus, mens tilsats av T alene eller i kombinasjon med P, G eller P+G ser ut til å øke blodnivå av gallesyrer. Tilsats av T+P+G er nødvendig for å redusere fedme hos mus.

Videre arbeid bør fokusere på FPH sin effekt på glukosetoleranse og dessuten identifisere underliggende mekanismer for hvordan kaseindietter tilsatt T+P+G kan redusere fedme og om dette er positivt for helse.



Sluttrapport Docmar peptid III

Bakgrunn

I Docmar peptid prosjektet (2002-2006) har vi tidlegare vist at rotter som fekk alt diettprotein som FPH (Fiske Protein Hydrolysat) utvikla mindre fedme enn rotter som fekk kasein eller soyaprotein. Data frå desse studia tyder på at noko av denne effekta skuldast at rottene som fekk FPH hadde høgare nivå av gallsyrer i lever og blod, samanlikna med rotter som fekk soyaprotein og kasein. Desse data blei publiserte i ein vitenskapeleg artikkel i 2009 (Liaset et al 2009). Men auken i gallsyrer i lever og blod kunne ikkje forklare heile reduksjonen i fedmeutvikling (Liaset et al, upubliserte data). Vi testa derfor om det var ein spesifikk effekt av å spise hydrolyserte protein med omsyn til redusert fedmeutvikling. Det viste seg at ved å erstatte 50% av intakt kasein med lakse FPH, eller med hydrolysert kasein, fekk vi redusert mengde feittvev (Liaset et al, upubliserte data). I rotter gjev det derfor ein slankande effekt å erstatte intakt kasein med hydrolyserte protein.

I eit oppfølgingsprosjekt i 2007 (Docmar peptid II, Rubin sluttrapport # 155) undersøkte vi effekten av å erstatte 50% av intakt kasein med hydrolysert protein (lakse FPH og hydrolysert kasein) med omsyn konsentrasjonar av blodlipid og samansetnad av lagringsenergi (triacylglycerol (TAG) og glycogen) i lever og skjelettmuskel. I tillegg ville vi måle nivå av stresshormon i urin, sidan FPH generelt er lavt på aminosyra tryptofan, og dette teoretisk kunne auke stressnivå i dyra. Det var ingen auke i urinutskilling av stresshormon i rottene som fekk 50% av proteinet som lakse FPH, noko som indikerer at det litt lavare tryptofan-nivået ikkje stressa rottene. Rottene som fekk 50% av diettproteinet som lakse FPH hadde spesifikt lavare blodkolesterol, medan rottene som fekk halvparten av protein i form av hydrolysert kasein hadde spesifikt lavare TAG i blodet. TAG innhald i lever og skjelettmuskel var lavare i begge gruppene som fekk hydrolysert protein, effekten var kraftigast med hydrolysert kasein. Glykogen var spesifikt auka i lever og muskel i rottene som fekk 50% lakse FPH, medan rottene som fekk hydrolysert kasein hadde lavare glykogenmengd både i lever og i muskel, samanlikna med rottene som fekk intakt kasein.

I perioda 2008-2009 har vi gjennomført prosjektet Docmar peptid III. Hovudmålet med Docmar peptid III var å undersøkje om lakse FPH aukar glutatinnivå i rotter, noko som kan motvirke oksidativt stress i rottene. Vidare ville vi undersøkje om komponentar som FPH generelt er rikt på kan motvirke utvikling av fedme. Prosjektet skulle svare på desse delmåla:

- Aukar FPH i dietten glutatinnivå i lever, noko som kan motvirke oksidativt stress (både samanlikna med kasein og hydrolysert kasein)?
- Kan komponentar som FPH er rikt på auke nivå av glutatinnivå og gallsyrer i dyr og redusere utvikling av fedme?

Delmål 1: Aukar FPH i dietten glutationnivå i lever (både samanlikna med kasein og hydrolysert kasein)?

Proteinkjelda kasein inneheld lite av aminosyrene cystein og glysin. I tillegg inneheld ikkje kasein taurin. I kroppen blir taurin laga frå cystein, dvs at når kasein er proteinkjelde, må organismen bruke cystein til å oppretthalde taurin-nivå. Taurin er den frie aminosyra som fins i høgst konsentrasjon i mange vev (t.d. lever og hjerte). Kroppen sin viktigaste antioksidant er tripeptidet glutation (GSH), som inneheld aminosyrene glutamin-cystein-glysin. GSH blir i stor grad syntetisert i lever. Tilgjengeleg cystein er ein avgjerande faktor for kor mykje GSH som bli laga i lever. Sidan kasein inneheld lite cystein og glysin, som er to av aminosyrene i GSH, og sidan FPH er rikt på glycin og taurin, og inneheld meir cystein enn kasein, ville ein studere om FPH påverka GSH metabolisme og nivå. Vi målte derfor genuttrykk av dei tre enzyma som er involverte i GSH syntese i lever, glutamate-cysteine ligase, catalytic unit (gclc), glutamate-cysteine ligase, modifier unit (gclm) og glutation syntetase (gss). I tillegg kvantifiserte vi mengden av total GSH i lever. Lever genuttrykk og GSH konsentrasjonar er målte både i rottene som fekk 100% lakse FPH som proteinkjelde og i rotter som fekk 50% lakse FPH eller 50% hydrolysert kasein som proteinkjelde. Resultat frå full utbyting av proteinkjelde er viste i tabell 1a, og frå 50% utbyting i tabell 1b. Data er gjeve som % av målte nivå i kasein føra rotter.

Tabell 1a. Resultat frå lever til rotter som blei føra diettar med enten lakse FPH eller kasein som proteinkjelde. Signifikante ($P < 0,05$) skilnader, *

	FPH vs kasein
Genutrykk gclc	+32%
Genutrukk gclm	-17%
Genutrykk gss	+40% *
Total GSH	+26% *

Tabell 1b. Resultat frå lever til rotter som blei føra diettar med enten halvparten av proteinkjelde som lakse FPH eller hydrolysert kasein

	FPH vs kasein	Hydr kasein vs kasein	FPH vs hydr kasein
Genutrykk gclc	-3%	+16%	-17%
Genutrukk gclm	-35%	-32%	-5%
Genutrykk gss	-25%	-33%	+12%
Total GSH	-2%	-6%	+4%

Lakse FPH aukar både gen-utrykk for glutation syntase (gss), og konsentrasjon av GSH i lever hjå rotter som hadde full utbyting av kasein med FPH i dietten (Tabell 1a). Begge desse skilnadane var signifikante endringar, medan genutrykk av gclc og gclm ikkje var signifikante. Ved utbyting av halvparten av kaseinet med lakse FPH, var det ingen signifikante skilnader i genutrykk eller GSH nivå i lever, verken mellom FPH og kasein, hydrolysert kasein og kasein eller FPH og hydrolysert kasein (Tabell 1b).

• Konklusjon delmål 1:

- Full utbyting av kasein med lakse FPH, aukar genutrykk av glutation syntase og konsentrasjon av GSH i lever. Dette kan vere med å beskytte mot oksidativt stress
- Det var ingen auke i lever GSH konsentrasjon ved utbyting av halvparten av kaseinet med lakse FPH, noko som kan tyde på ein konsentrasjonseffekt av komponentar som fins i lakse FPH

Delmål 2: Kan komponentar som FPH er rikt på auke nivå av glutatation og gallesyrer i dyr og redusere utvikling av fedme?

Frå rottestudia i DOCMAR prosjektet veit vi at FPH aukar konsentrasjonen av gallesyrer i blod, og motverkar utvikling av fedme i rotter. Den reduserte utviklinga av fedme kan delvis forklarast med at rottene får hydrolyserte protein, sidan også hydrolysert kasein gjev ein tilsvarande reduksjon i bukfettsmasse. Men lakse FPH gjev i tillegg ein spesifikk reduksjon i underhudsfett (subcutant), og dette trur vi skuldast at rottene som får FPH har auka konsentrasjon av gallesyrer.

FPH er som tidlegare nemnt rikt på taurin og glysin, men FPH er også rikt på dei vannløselege b-vitaminane, og lakse FPH er spesielt rikt på pantotensyre (Liaset et al 2008). Pantotensyre er vist å stimulerere syntese av GSH. Glysin og taurin blir brukt til konjugering av gallesyrer, og dette gjer at gallesyrene lettare kan transporterast, til dømes frå lever til tarm eller frå lever til blod. Denne transporten blir ytterlegare stimulert av GSH. Vår hypotese var derfor at ved å auke konsentrasjon av både gallesyrer og glutatation i lever, så kan dette føre til auka transport av gallesyrer (saman med glutatation) frå lever til blod og dermed motverke fedme.

Kasein inneheld lite glysin og pantotensyre, og ingen taurin. Vi har derfor testa betydninga av å tilsette glysin (G), taurin (T) og pantotensyre (P), enkeltvis og i ulike kombinasjonar til kaseinbaserte høgenergi diettar. Diettane blei gjevne til mus i 7 veker. Deretter målte vi konsentrasjon av GSH i lever, konsentrasjon av gallesyrer i serum, vekst per energi-inntak, mengde buk fett og mengde underhudsfett. Resultat frå musestudia er viste i Tabell 2.

*Tabell 2. Resultat frå studia med mus som har fått modifiserte høgenergi fôr i 7 veker.. Data er relative til kasein-basert kontrollfôr. Mus fôra kontroll diettar tilsett ulike kombinasjonar av: Glysin (G), pantotensyre (P), taurin (T). Andre forkortingar: glutatation (GSH), gallesyrer (GS), % fett er gjevne som % av kroppsvekt. Auka samanlikna med kontroll ↑, lavare enn kontroll ↓, lik kontroll -, svak endring (. Signifikante ($P < 0,05$) skilnader, **

	G	P	G+P	T	T+G	T+P	T+G+P
Lever GSH	-	↑	-	↑	-	-	↑
Serum GS	(↓)	-	-	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)
Vekst/ energi	↑	-	(↓)	(↓)	(↑)	-	↓*
% buk fett	↑	(↑)	-	-	-	-	↓
% underhudsfett	-	(↑)	-	(↓)	(↑)	-	↓*

Våre data viser at mus som får kasein-diettar som er tilsett pantotensyre, taurine eller kombinasjonen av T+P+G alle har auka lever GSH nivå. Vidare har musene som har fått taurine i ein eller anna kombinasjon auka nivå av gallesyrer i blod. Men det er kun mus som har fått kasein-diett tilsett både T+P+G som har signifikant redusert tilvekst per spist energi, og som har signifikant redusert mengd underhudsfett. Desse musene tenderte også til å ha redusert buk fett ($P < 0.1$). Ingen av dei andre diettgruppene hadde signifikante endringar i mengde fettvev.

- **Konklusjon delmål 2:**

- Tilsats av pantotensyre, taurin eller kombinasjonen av P+T+G til kasein-baserte høgenergi diettar aukar nivå av GSH i lever til mus
- Tilsats av taurin åleine eller i ein kombinasjon med P, G eller P+G ser ut til å auke blodnivå av gallesyrer
- Tilsats av både T+P+G til kasein-baserte høgenergi diettar er naudsynt for å redusere fedme i mus
- Dette viser at komponentar som kasein er lav på/ manglar, og som FPH generelt er rik på, er viktige for å forhindre utvikling av fedme

STATUS VED UTGANG 2009

Vi har gjennom DOCMAR-prosjekta vist i gnagarar:

- at FPH aukar energi-omsetnaden i rotter, samanlikna med kasein
- at FPH kan motverke utvikling av fedme i gnagarar, samanlikna med kasein og soyaprotein
- at FPH kan senke blodlipid (triacylglycerol), samanlikna med casein og soyaprotein
- at FPH aukar konsentrasjonen av gallesyrer i lever og blod i rotter, samanlikna med kasein og soyaprotein, og at denne auken er gunstig med omsyn til auka energi-omsetnad og reduksjon av fedme
- at FPH aukar konsentrasjonene av glutation i lever, men at effekten er avhengig av mengde FPH i dietten
- at nokre komponentar som FPH er rik på (taurin, glysin og pantotensyre) er viktige for å redusere utviklinga av fedme

Vitskapelege publikasjonar i prosjektperioda:

Liaset B and Espe M (2008) 'Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish raw-materials' *Process Biochemistry* 43: 42-48

Liaset B et al (2009) 'Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats' *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791: 254-262

FORSLAG TIL VIDAREFØRING AV DOKUMENTASJONSARBEIDET

Vi veit at FPH påverkar glukosemetabolisme, gjennom å redusere blodglukose og å auke glykogenkonsentrasjonar (lagringsform av glukose) i vev, samanlikna med kasein. Denne effekten har ikkje hydrolysert kasein. Evne til å ta opp glukose frå blod til vev, og å lagre glukose som glykogen er viktig for å unngå glukose-intoleranse, som vidare kan føre til diabetes type II. FPH si effekt på glukose toleranse er eit aspekt vi ønskjer å følgje opp.

Vidare er det ønskeleg å identifisere underliggende mekanismer til korleis kasein-diettar tilsett T+P+G kan redusere fedme, og om dette har helsemessige gunstige konsekvensar, som til dømes betra glukosetoleranse og blodlipidmønster.