

Sluttrapport FHF 901419

Marine bioaktive fiskepeptider for forebygging av overvekt og mikrobiotarelaterte sykdommer i mennesker og dyr

Forfattere

Rolf Kristian Berge (Klinisk institutt 2, Universitet i Bergen)
Bodil Bjørndal (Klinisk institutt 2, UiB/Høgskulen på Vestlandet)
Grete Hansen Aas (NTNU)
Simon Erling Nitter Dankel (Klinisk institutt 2, Universitet i Bergen)
Jannicke Fugledal Remme (Sintef Ocean AS)
Hallgeir Sterten (Felleskjøpet AS)
Øystein Ahlstrøm (NMBU)
Johannes Espolin Roksund Hov (UiO)
Anne S. Røsvik (NTNU)
Dag Arne Hoff (Ålesund sjukehus, Helse Møre og Romsdal)

Bergen, 1.06.2022



Rapport

Marine bioaktive fiskepeptider for forebygging av overvekt og mikrobiotarelaterte sykdommer i mennesker og dyr

EMNEORD:

VERSJON

1

DATO

2022-01-06

FORFATTER(E)

Rolf K. Berge (UiB)

Bodil Bjørndal (UiB), Grete Hansen (NTNU), Hallgeir Sterten (Felleskjøpet AS), Øystein Alstrøm (NMBU), Johannes E.R. Hov (UiO), Jannicke F. Remme (Sintef Ocean AS), Simon E.N. Dankel (UiB), Anne S Røsvik (NTNU), Dag Arne Hoff (ÅS)

OPPDRAGSGIVER(E)

FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.

Lorena Jornet, 901419

PROSJEKTNR

Prosjektnummer

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

27 sider, 7 vedlegg

SAMMENDRAG:

Fiskerinæringen produserer restråstoff som i stor grad brukes som dyrefôr. Hensikten med dette prosjektet har vært å identifisere produkter fra restråstoff som har et potensiale til å kunne motvirke utviklingen av livsstilsrelaterte sykdommer hos mennesker. Dette vil kunne øke verdiskapingen fra marine råstoffer. Restråstoff fra hvitfisk og pelagiske fiskearter har blitt prosessert via hydrolyse, til et fiskeproteinhydrolysat (FPH) i form av et lyst proteinpulver. I tillegg til å generere nye produkt innen kosttilskuddssegmentet, kan FPH også være verdifullt på kjæledyrfor-markedet. Ulike FPH ble testet i musemodeller for å velge ut de mest lovende råstoff og hydrolysebetingelser og identifisere mulige effekter. Utvalgte FPH fra makrell og torsk ble benyttet i fôringsforsøk med slaktekylling og mink. Avslutningsvis ble det gjennomført en klinisk studie på friske mennesker som inntok 18 gram FPH hver dag i 12 uker. Resultatene i mus og mink indikerte gunstige helseeffekter, der de bioaktive peptidene senket risikoparametere for kardiometabolsk syndrom. Studiene fra både kylling og mink viste at FPH var en god proteinkilde, og det ble i mink påvist endringer i mikrobiota. I den kliniske studien var indikatorer for hjerte- og karsykdommer uendret sammenlignet med et kommersielt myseprodukt. FPH er en god proteinkilde i dyr og mennesker, og det er trygt å innta. Det har effekter på mulige helseparametre i dyr og det kan ha mulige mekanistiske helseeffekter, som bør studeres videre.

Potensielle mekanistiske helseeffekter

1. Studiene fant endringer i tarmflora hos mink og noen endringer i mennesker. Samtidig fant man hos mennesker en forandring av korte fettsyrer i plasma (biomarkører for mikrobiota), og forskerne vil utforske dette videre i publikasjoner.

2. To hjelpefaktorer for å oppnå større mitokondriell funksjon ble funnet økt i plasma hos mennesker. Dette aspektet vil bli undersøkt i mink og musestudier ved vitenskapelige publikasjoner.

UTARBEIDET AV Rolf K. Berge		SIGNATUR	
KONTROLLERT AV Kvalitetssikrer		SIGNATUR	
GODKJENT AV Prosjekteier		SIGNATUR	
RAPPORTNR 2022:00	ISBN ISBN-nummer	GRADERING Åpen	GRADERING DENNE SIDE Åpen

Innhold

1	SAMMENDRAG.....	4
2	INNLEDNING.....	4
	2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	5
	2.2 Prosjektets mål og omfang.....	7
3	MÅL.....	8
4	PREKLINISKE STUDIER	9
	4.1 Råstoff til screeningstudie i mus.....	9
	4.2 Museforsøk 1	10
	4.3 Museforsøk 2	14
	4.4. Dyreforsøk, Mink.....	16
	4.5. Dyreforsøk Kylling	17
5	KLINISK STUDIE.....	18
	5.1 Materiale og metode	18
	5.2 Resultater og diskusjon, klinisk studie	20
6	RESULTATER OG DISKUSJON	24
7	KONKLUSJON.....	25
8	HOVEDFUNN	25
9	Covid-19 epidemien og fordyring av prosjektet.....	26
10	REFERANSER.....	27

1 SAMMENDRAG

Skal gi en kortfattet oppsummering av forankring av prosjektet, formålet med prosjektet, gjennomføring/metode, resultater/konklusjon og nyttevurderinger/anvendelsespotensial med referanser.

Fiskerinæringen produserer restråstoff som i stor grad brukes som dyrefôr. Universitetet i Bergen, ved Lipidgruppen, har i samarbeid med Sintef Ocean AS, NTNU-Ålesund, NMBU, Felleskjøpet AS, Pelagia AS, Biomega AS, Universitetet i Lleida, Spania, Universitetet i Oslo og Fjordlaks AS gjennomført et prosjekt for å identifisere produkter fra restråstoff som har et potensiale til å kunne motvirke utviklingen av livsstilsrelaterte sykdommer hos mennesker. Dette vil kunne øke verdiskapingen fra marine råstoffer. Restråstoff fra hvitfisk og pelagiske fiskearter har blitt prosessert via hydrolyse, til et fiskeproteinhydrolysat (FPH) i form av et lyst proteinpulver. I tillegg til å generere nye produkt innen kosttilskuddssegmentet, kan FPH også være en verdifull diettingrediens på kjæledyrfôr-markedet. Ulike FPH ble testet i musmodeller for å velge ut de mest lovende råstoff og hydrolysebetingelser, og identifisere mulige metabolske effekter. Utvalgte FPH fra makrell og torsk ble videre benyttet i fôringsforsøk med slaktekylling og mink for å se på fordøyelighet, tarmmikrobiota og metabolske dietteffekter i større dyr. Avslutningsvis ble det gjennomført en klinisk studie på friske mennesker som inntok 18 g FPH eller myse i 12 uker. Resultatene i mus indikerte gunstige helseeffekter, der de bioaktive peptidene senket risikoparametere for kardiometabolsk syndrom. Studiene fra både kylling og mink viste at FPH var en god proteinkilde, men det ble ikke påvist endringer i kroppssammensetning, men mikrobiota. I den kliniske studien var indikatorer for hjerte- og karsykdommer uendret sammenlignet med et kommersielt myseprodukt. Data på mikrobiota ble nylig analysert (Mai 2022) og noen endringer ble funnet. Dette vil bli studert videre. FPH er en god proteinkilde i dyr og mennesker og det er trygt å innta.

2 INNLEDNING

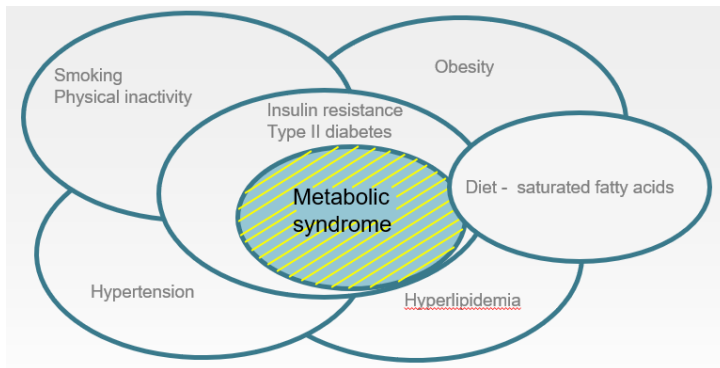
De gunstige helseeffektene av å spise fisk og andre marine matprodukter er velkjente. I senere tid er det kommet ny kunnskap som indikerer at dette ikke bare er knyttet til inntak av omega-3-fettsyrer, men at inntak av fiskeprotein også kan ha betydning for helseeffektene av fiskespising (1). Kvantitet og kvalitet av proteinene i maten er av betydning for deres metabolske effekter. Dette kan være relatert til strukturen og aminosyresammensetningen til proteinene. Ved å spalte proteiner ved enzymatisk hydrolyse kan mer potente metabolske forbindelser bli dannet.

I dette prosjektet er råstoffer fra noen hvitfisk- og pelagiske fiskearter som er relevante for humant konsum prosessert til nye proteinprodukter. Restmateriale fra flere fiskearter som i dag er underutnyttet er brukt for å isolere fiskeproteinhydrolysater (FPH). Disse produktene er testet i musmodeller for å kunne velge ut det mest lovende hydrolysatet som så ble studert i en human diettstudie. Hensikten med prosjektet har vært å identifisere produkter som har et potensiale til å kunne motvirke utviklingen av livsstilsrelaterte sykdommer, og dermed kunne øke verdiskapingen av marine råstoffer.

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

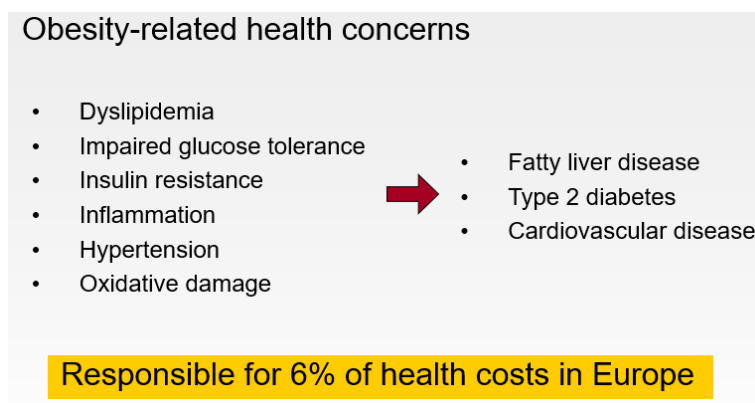
2.1.1 Fedme og kardiometabolsk syndrom

Overvekt og fedme har øket dramatisk i hele verden og World Health Organization (WHO) publiserte i 2016 at ca. 1.9 milliarder menneske var overvektige (2) og en stor andel av disse vil ha metabolsk syndrom (Fig. 1)



Figur 1. Oversikt over risikofaktorer og livsstilssykdommer knyttet til metabolsk syndrom.

Metabolsk syndrom/kardiometabolsk syndrom er karakterisert som følger (3): Hyperlipidemi hvor plasma triglyserider og plasma totale fettsyrer er for høye og det gode kolesterol-formen (HDL-kolesterol) er redusert samtidig som den dårlige kolesterol-formen (LDL-kolesterol) er for høy. Videre har disse pasienter for høyt blodtrykk, de har insulinresistens og diabetes II symptomer og overvektige med kraftig økt magefett. Pasienter med forstyrret metabolsk syndrom vil over år utvikle fettlever, diabetes II og få kardiovaskulære sykdommer (Fig. 2).



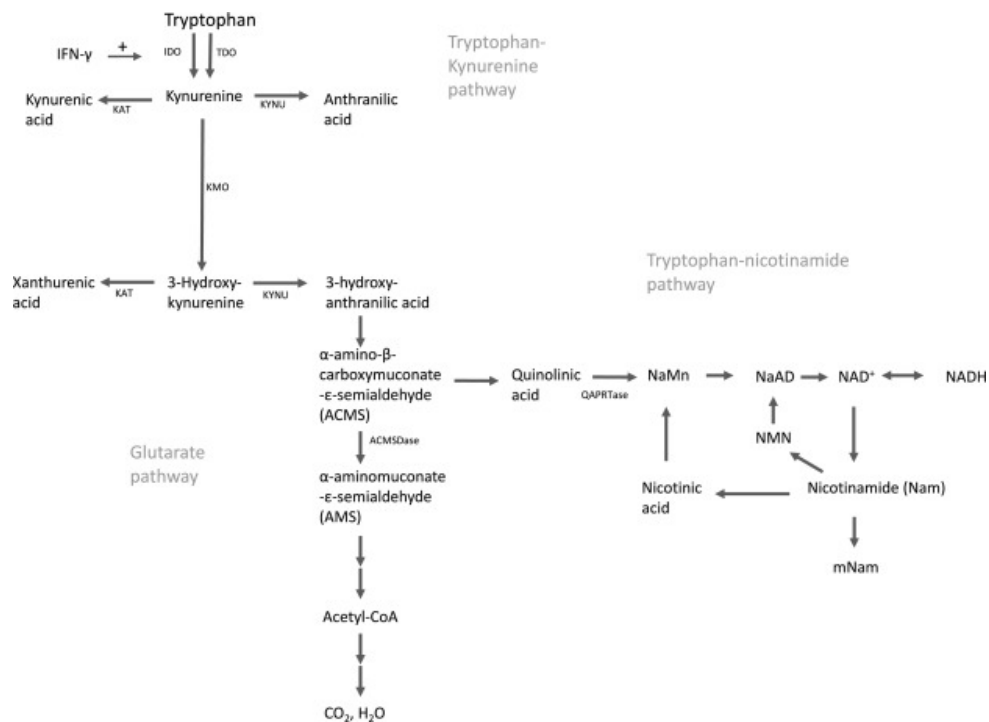
Figur 2. Overvektrelaterte helseutfordringer

2.1.2 Mulig mekanisme – Mitokondrier

En mulig mekanisme for fedme og metabolsk syndrom kan være energi-ubalanse. Kombinasjon av for stort inntak av usunn mat (Western diet) kombinert med lite aktivitet kan være bidragsyttere til

utvikling av livsstilsykdommer. Mitokondrier er den organellen som gir energi etter inntak av fett, protein og karbohydrater.

For å oppnå en maksimal mitokondriell funksjon så trenger mitokondriene hjelpemotorer eller cofaktorer som en sier, og noen av disse cofaktorene er nikotinamider (NAM) og NADH. Dannelse av NAM kommer fra aminosyren tryptophan (Trp), som det er rikelig av i fisk (Fig. 3).



Figur 3. Tryptofanmetabolismen i kroppen

I 2005 fikk Lipidgruppen ved UIB via RKB et Center of Excellence within Nutrition fra Nordisk Råd. Formålet var å finne naturlige komponenter fra marine ressurser som var mitokondrie-målrettede. Vi har funnet at EPA fra fiskeoljer og krilloljer var substrat for lever mitokondrier (4), og undersøkte også effekten av FPH fra laks i dette prosjektet.

2.1.4 Kunne fiskeproteinhydrolysat være helsefremmende?

Lipidgruppen ved UiB var en av de første gruppene som rapporterte at protein med lavt innhold av methionine-glycine ratio og FPH fra laks hadde kolesterol reduserende effekter både i rotte og mus (5, 6). Denne beskyttende effekten var assosiert med redusert fettlever og økt anti-inflammasjonsstatus i plasma (7, 8). Videre fant en at også FPH reduserte plakkdannelse i gnagere (9). Før vi startet på dette prosjektet oppsummerer figur 4 hva en tidligere hadde oppnådd med FPH.

Marine proteins/peptides

- Lipid lowering effect (TG, Chol)
- Fatty liver
- Antioxidant and anti-inflammatory effects
- Inhibition of atherosclerosis
- Anti-inflammatory properties in models of inflammatory bowel disease

Figur 4. Oppsummerte hovedfunn fra pre-kliniske studier

2.2 Prosjektets mål og omfang

2.2.1 Protein hydrolysater fra torsk, sild og makrell

Søknad om støtte til dette prosjektet ble sendt inn til Norsk forskningsråd i 2017, og ble utvalgt til videre støtte og prosjektadministrasjon fra FHF. I dette prosjektet ville vi fokusere på FPH fra hvit fisk, torsk, og feit fisk, som sild og makrell, og dokumentere bruk og mekanisme samt studere om disse bioaktive peptider kunne fungerer som gode proteinkilder hos mennesker og dyr, og potensielt forhindre utvikling av kardiometabolske symptomer i mennesker. For å teste disse hypotesene ville prosjektet gjennomføre fire relaterte arbeidsoppgaver

1. Fremstille mange proteiner og proteinhydrolysater fra ulike fiskearter.
2. Prøve ut disse produktene for deres metabolske effekter i en musemodell.
3. Evaluere dyrefôr i mink og kylling.
4. Diett-intervensjonsstudie i mennesker

2.2.2 Involverte prosjektdeltakere og deres rolle i prosjektet

Tabell 1. Partneres roller i prosjektet

Selskap/Institusjon	Rolle i prosjektet
Universitetet i Bergen, Klinisk institutt 2, Lipidgruppen	Screening i musemodeller, analyser og klinisk studie-senter 1 (rekruttering og gjennomføring)
Universitetet i Bergen, Forskningsenhet for Helseundersøkelser (FHU)	Logistikk ved klinisk studie
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Ålesund	Klinisk studie-senter 2 (studiepreparat, rekruttering og gjennomføring)
SINTEF Ocean AS	Optimalisering av hydrolyseprosesser og isolering av bioaktive hydrolysat
Universitetet i Oslo, Institutt for Klinisk Medisin, Norsk senter for PSC	Tarmmikrobiota-analyse
Felleskjøpet Fôrutvikling AS	Organisere produksjon av eksperimentelle dietter sammen med Fôrtek, og foringsstudie i broilerkylling
Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU)	Gjennomføre forsøk i mink

Pelagia AS	Etablere potensiale for restråstoff fra makrell og sild til bruk i dyre- og menneskekosthold. Hydrolyse av makrell i storproduksjon til dyreforsøk.
Fjordlaks AS	Etablere potensiale for restråstoff fra torsk
Biomega AS	Optimalisere hydrolyse og utføre storskala produksjon (ikke gjennomført)
Universitat de Lleida (UdL). NUTREN Nutrigenomics	Analyser av oksidativt stress i museforsøk

Referansegruppe: I referansegruppen inngår FHF (Berit H Hansen, Lorena Gallart Jornet), Sjømat Norge (Gunn H Knudsen) Universitetet i Bergen (Rolf K Berge, Bodil Bjørndal, Julie Stavnes), SINTEF FISKERI OG HAVBRUK AS (Marit Aursund, Ana Carjaval), FELLESKJØPET FORUTVIKLING AS (Hallgeir Sterten), PELAGIA AS (Jørgen Seliussen), Fjordlaks AS (Andreas Austnes), NMBU (Øystein Ahlstrøm).

2.2.3 Verdiskapingspotensial

Omega 3 fettsyre markedet er det mest nærliggende å sammenligne med for dette prosjektet. Vi har derfor foretatt en analyse av Omega-3 markedet for å belyse potensialet til FPH-produkt. Det globale markedet til omega 3 ble verdsatt til 2,49 milliarder USD i 2019 og forventes å ekspandere med en CAGR på 7,7 % fram til 2027. Økende produktforbruk, spesielt i form av kosttilskudd, på grunn av den voksende aldrende befolkningen i utviklede økonomier, som Tyskland, Frankrike, Nederland og Storbritannia, vil sannsynligvis drive markedet. Et annet viktig marked er det europeiske markedet for kosttilskudd som har blitt verdsatt til USD 33,68 Bn i 2017 og forventes å være vitne til en CAGR på 6,48% ifølge nylige markedsrapporter⁹. Et økende antall europeere bruker kosttilskudd som en forebyggende tilnærming til helseproblemer, noe som øker markedets vekst. Markedsførings- og distribusjonsskjedene til næringsliv i Asia og Amerika gir ytterligere muligheter for de nye produktene. Dette prosjektet hadde som mål å sørge for å produsere nye vitenskapelige bevis på sikkerhet og helsemessige fordeler fra matingrediensene.

3 MÅL

Å kunne dokumentere bruken av hydrolysat fra fiskeprotein som nye funksjonelle ingredienser som kan fungere som en god proteinkilde hos dyr og menneske, og potensielt redusere risiko for overvektrelaterte sykdommer hos mennesker og dyr. Dette prosjektet hadde således som mål å lede til innovasjon og **Verdiskapingspotensial for næringslivet**, og å produsere nye vitenskapelige bevis på sikkerhet og helsemessige fordeler fra matingrediensene.

Delmål:

- Å etablere metoder for enzymatisk hydrolyse av bioaktive peptider fra ulike restråstoff av fisk, karakterisere produktene og optimalisere prosesseringsmetodene i relasjon til funksjonelle egenskaper.
- Å prøve ut flere ulike FPH i en musemodell for effekter på risikofaktorer for kardiovaskulære sykdommer og diabetes, og identifisere de mest lovende produktene
- Å prøve ut utvalgte FPH i forsøk beregnet på kjæledyrfor-industrien, og undersøke om tarmhelse og energiomsetning blir påvirket
- Å studere hvordan FPH vil påvirke mikrobiota i tarmen på dyr og mennesker

- Å gjennomføre en human intervensjonsstudie med et utvalgt produkt for å dokumentere metabolsk effekt

4 PREKLINISKE STUDIER

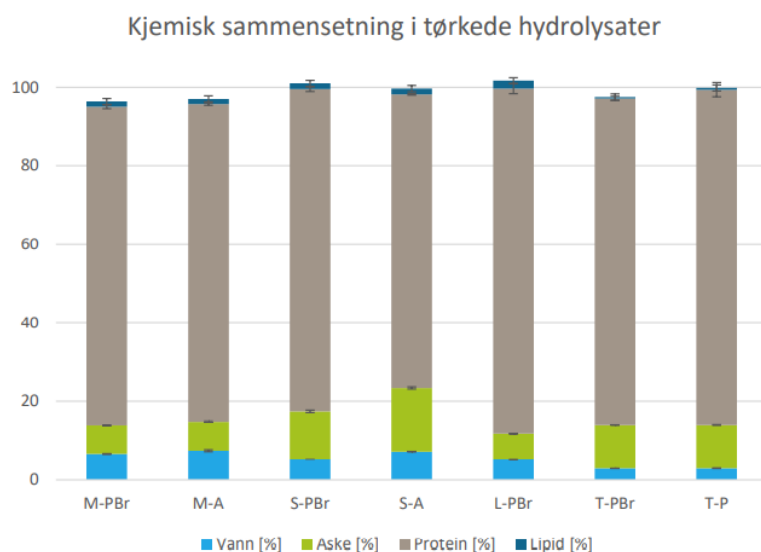
4.1 Råstofftil screeningstudie i mus

Det ble produsert 8 ulike hydrolysater basert på makrell, sild, laks og torsk med bruk av ulike enzymer som papain og bromelain, alcalase samt protamex og 3PE (Tabell 2).

Tabell 2. Råmateriale og enzym brukt i hydrolyseprosess

Navn	Råstoff	Enzym	Del
M-PBr	Makrell	Papain og Bromelain	Samfengt
M-A	Makrell	Alcalase	Samfengt
S-PBr	Sild	Papain og Bromelain	Samfengt
S-A	Sild	Alcalase	Samfengt
L-PBr	Laks	Papain og Bromelain	Hoder og rygger
T-PBr	Torsk	Papain og Bromelain	Hoder
T-P	Torsk	Protamex	Hoder
T-3PE	Torsk	3PE	Hoder

Det var generelt lavt vanninnhold i de tørkede hydrolysaterne, med lavest vanninnhold i hydrolysater fra torsk (Fig. 5). Askeinnholdet var høyest i sild hydrolysert med alkalase. Lavest lipidinnhold ble funnet i hydrolysaterne fra torsk. Høyest proteininnhold ble funnet i laks hydrolysert med papain og bromelain. Aminosyresammensetning er beskrevet (Vedlegg 1)



Figur 5. Kjemisk sammensetning (% fordeling) av tørkede fiskeproteinhydrolysat til screeningsstudie i mus.

4.2 Museforsøk 1

For videre studier i større dyr og i mennesker var det nødvendig å undersøke de metabolske effektene av en rekke FPH-varianter, siden både materiale og hydrolysemetode kan ha innvirkning på kvalitet og virkemåte. Mus er en velegnet art å benytte til screening siden det ikke krever store mengder fôringredienser, og forsøksbetingelsene i stor grad kan standardiseres for å unngå uønsket variasjon. Studier i mus gjør det også mulig å undersøke mekanismene bak metabolske effekter ved å analysere vevsprøver.

4.2.1 Materialer og metoder, museforsøk 1

Dyr og dietter

Dyrestudien ble utført etter de Etiske retningslinjene for bruk av dyr i forskning (10), og protokollen ble godkjent av Mattilsynet 16.03.2018 (FOTS ID 15458). 7-8 uker gamle C57BL/6 hannmus (Janvier, Danmark), ble plassert 4 pr bur og akklimatisert i en uke før oppstart. Musene ble holdt på rom med 12 timers lys/mørke syklus ved konstant temperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) og luftfuktighet på 55% ($\pm 5\%$). Burene ble blokk-randomisert til 10 ulike dietter, 8 mus per diett (Tabell 3). Musene ble fôret *ad libitum*, og fôret ble fornyet hver 2-3 dag i 12 uker. Bestod av 1 høyfett (HF) kontroll diett, 8 høyfett-dietter med FPH (48 E % fra fett og 20 E % fra protein), og en lavfett (LF)-diett (16 E % fra fett og 20 E % fra protein).

Tabell 3. Fôrsammensetning i høyfett (HF) og lavfett (LF) dietter med og uten fiskeproteinhydrolysat (FPH, 36 % av proteinkilden)^a

Diett nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteinkilde	Kasein HF	Torsk 1 HF	Torsk 2 HF	Torsk 3 HF	Makrell 1 HF	Makrell 2 HF	Sild 1 HF	Sild 2 HF	Laks HF	Kasein LF
	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>	<i>g i diett</i>
Kasein	275,9	176,9	176,9	176,9	176,9	176,9	176,9	176,9	176,9	229,9
FPH	0	103,7	101,1	102,4	106,3	106,6	104,9	115,4	98,2	0
Soyaolje	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	20,0
Svinefett	225,0	226,1	226,1	226,1	226,1	226,1	226,1	226,1	226,1	50,0
Stivelse	108,0	108,0	108,0	108,0	108,0	108,0	108,0	108,0	108,0	397,0
Maltodextrin /dextrose	158,6	158,6	158,6	158,6	158,6	158,6	158,6	158,6	158,6	132
Sukrose	120	120	120	120	120	120	120	120	120	100
Fiber	60	60	60	60	60	60	60	60	60	50
AIN-93G-MX mineral miks	42,8	42,8	42,8	42,8	42,8	42,8	42,8	42,8	42,8	35
AIN-93-VX vitamin miks	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	10
L-Cystein	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3
Koline bitartrat	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2,5
tert-Butyl-hydroquinon	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,0171	0,014

^aVekt inkludert vann i diettingrediensene er oppgitt. Sammensetningen av de energibalanserte HF diettene 1-9 var (pr 1000 g tørrvekt): protein 240 g, fett 252 g, karbohydrat 447g, mikronæringsstoff 62 g. Sammensetningen av LF-diett nr 10 var (pr

1000 g tørrvekt): protein 200g, fett 73 g, karbohydrat 73 g, mikronæringsstoff 51 g, og energiinnholdet var . 36 % av totalt protein er erstattet med FPH i de aktuelle diettene. Diettingredienser var fra Dyets inc. (USA).

Etter 12 uker ble musene fastet i 4 timer, og bedøvet ved hjelp av 2 % isoflurane (Schering-Plough, Kent, UK) og blod ble tappet fra hjertet før avliving ved fjerning av hjertet. Plasma ble isolert ved 15 min sentrifugering ved 2000 x G. Fettdepot ble veid. Lever- og fettprøver ble fryst på flytende nitrogen, og alle prøver ble oppbevart ved -80°C for videre analyser.

Analyser

Plasmalipider ble analysert på Cobas c 111 system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland) ved hjelp av følgende kit fra Roche; triglycerid (TRIGL) og kolesterol kit (CHOD-PAP), og DiaSys (Diagnostics Systems GmbH, Holzheim, Germany): non-esterified fatty acid (NEFA) FS og Phospholipids FS kit. Leverenzymaktivitet ble analysert som tidligere beskrevet.

Statistikk

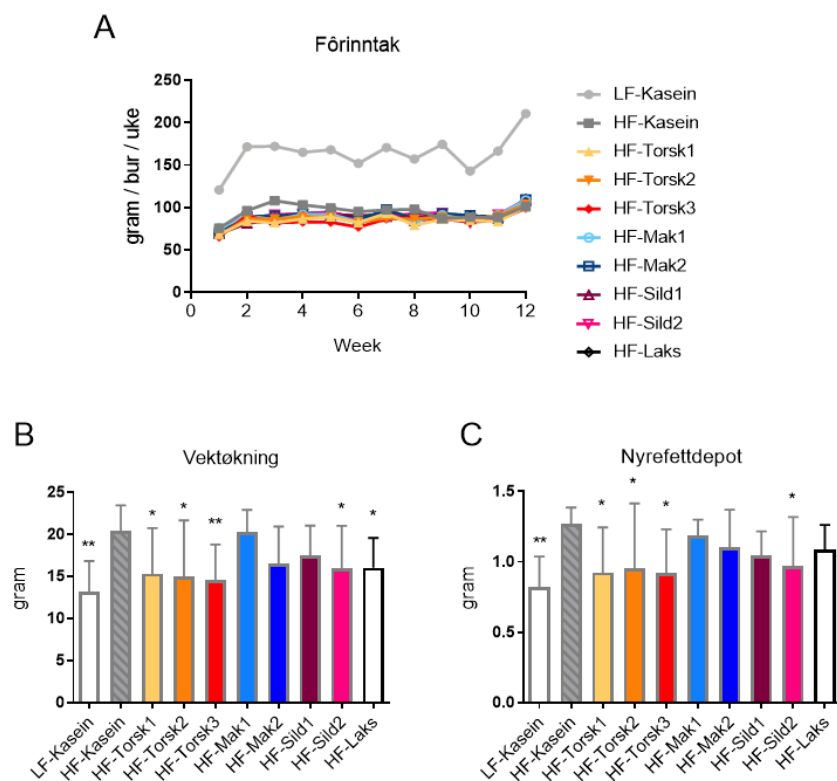
Data ble analysert ved hjelp av Prism Software 8.0 (Graphpad Software, San Diego, CA). Resultatene er basert på gjennomsnitt av 8 dyr pr gruppe med standardavvik. Enveis variansanalyse (one-way ANOVA) ble utført, og ved p-verdi < 0.05, ble Dunnett's multiple comparisons test benyttet for å vurdere statistisk signifikant forskjell mellom HF-kontroll- og behandlingsgrupper. P-verdier < 0.05 i *post hoc*-testene ble sett på som signifikante funn.

4.2.2 Resultater og diskusjon, museforsøk 1

Vektutvikling

HF-dietter med tre ulike FPH fra torskehode, to FPH fra samfengt makrell og to FPH fra samfengt sild ble sammenlignet med HF-kasein diett. I tillegg var et tidligere kjent FPH fra laks og LF-diett med som ekstra kontroller. Det var forventet at mus føret med en HF-diett ville ha en mer uheldig utvikling av kroppsvekt og plasmalipider sammenlignet med en LF-diett, og vi ville undersøke om ulike FPH kunne motvirke denne effekten.

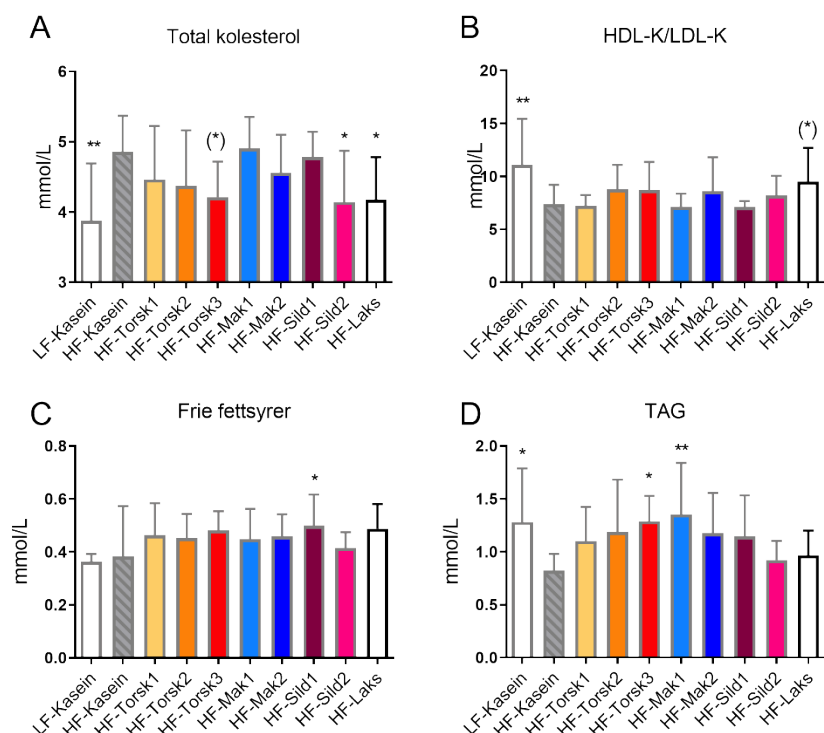
På grunn av det lavere energiinnholdet i LF-dietten var fôrinntaket høyere i denne gruppen mus, mens fôrinntaket i mus gitt HF-dietter var tilnærmet likt mellom alle grupper (Fig. 6A). Vektøkningen i mus føret med HF-diett var 30 % høyere enn i mus føret med LF-diett (Fig. 6B). FPH fra torsk 1, 2 og 3, sild 2 og fra laks reduserte denne HF-induserte vektøkningen sammenlignet med kasein, til tross for et likt fôrinntak. Dette viste seg også i en signifikant lavere vekt av nyrefettdepotet i mus føret med FPH fra torsk 1-3 eller sild 2 (Fig. 6C). Nyrefettdepotet er et av de viscerele fettdepotene, og disse blir raskest påvirket av metabolske endringer. Det var ingen endringer i fettdepotet rundt testis eller i levervekt eller forholdet mellom lever/kroppsvekt (ikke vist).



Figur 6. Fôrinntak i løpet av 12 uker (A), endring i kroppsvekt (B) og vekt av fettdepot rundt nyre (C) etter 12 uker diettintervensjon i mus. Gjennomsnitt og standardavvik er vist. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Plasmalipider

FPH er tidligere vist å påvirke plasmalipider i musemodeller, og at denne endringen kan være avhengig av hydrolysemetode (6). Denne screening-studien viste at FPH torsk 3, sild 2 og laks reduserte total kolesterolnivå sammenlignet med kasein (Fig. 7A). Endringen var i retning av LF-kontroll, og ingen av hydrolysaten hadde effekt i uheldig retning. Nesten all kolesterol i sirkulasjon i mus befinner seg i HDL-partikler, og mus er derfor lite utsatt for hjerte- og karsykdom. Både LDL-K og HDL-K gikk i samme retning som total kolesterol. Det var en tydelig reduksjon av den potensielt fordelaktige HDL-K/LDL-K ratio i HF-kontroll vs LF-kontroll, og noen av FPH-gruppene viste en liten tendens til å motvirke denne nedgangen (Fig. 7B). Det var små variasjoner i frie fettsyrer (Fig. 7C), som viser fett som er frigitt fra fettvev ved energibehov, mens triglycerid (TAG) nivået var mer påvirket, der mange av FPH-gruppene var mer lik LF-kasein-kontroll enn HF-kasein-kontroll (Fig. 7D). Lave TAG-nivå er observert ved HF-dietter, og det er usikkert hvorfor dette ikke er tilfelle i noen av FPH-gruppene.



Figur 7. Plasmalipider etter 12 uker diett med kasein (kontroll) eller ulike fiskeproteinhydrolysat i høyfett-diett (HF), eller kasein i lavfett-diett (LF). Gjennomsnitt med standardavvik er vist. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (*) grensesignifikant.

Andre parametere og oppsummering

Andre analyser som ble gjennomført var leverenzymaktivitet og antioksidant-effekt målt i leverprøver. Hovedendringene i alle parametere målt er oppsummert i Tabell 4. Siden dette er en screeningstudie er også noen grensesignifikante funn tatt med. Ved testing for multiple analyser er det ikke statistisk styrke i de enkeltvis funnene, men i denne screeningstudien er det viktig å se parameterne i sammenheng, og alle potensielt relevante funn er derfor inkludert. Funnene viser at i flere av FPH-gruppene er nivåene på parameterne mer lik den normale LF-gruppen enn HF-kontrollgruppen (Tabell 4). Tre FPH-grupper skiller seg ut, torsk 3, sild 2 og laks. FPH fra laks var inkludert som en positiv kontroll, og gir lignende resultater som i tidligere studier i gnagere (ref), og. Både torsk 3 og sild 2 hadde like tydelige metabolske effekter som laks, og ville være lovende å gå videre med i studier beregnet på fôrindustrien og i humane studier. Makrell hadde ikke like gode resultat, men dette kan skyldes en for høy hydrolysegrad på grunn av et høyere nivå av endogene enzymer. Det ble derfor besluttet å repetere screeningforsøket med nye FPH fra makrell (se 4.3).

Tabell 4. Endringer i ulike analyserte parametere i FPH-dietter i forhold til høyfett kontroll kasein-diett^a

Parameter	Intervensjonsgrupper								
	Torsk 1	Torsk 2	Torsk 3	Makrell 1	Makrell 2	Sild 1	Sild 2	Laks	Lav-fett
Vektdata									
Vektøkning	↓	↓	↓	=	(↓)	(↓)	↓	↓	↓↓
Fôrinntak	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
Fôreffektivitet	=	=	=	=	=	=	=	=	↓↓
Nyrefett	↓	↓	↓	=	=	=	↓	=	↓↓
Testikkelfett	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Leverindeks (g lever/g kroppsvekt*100)	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Plasma lipids									
Total kolesterol	=	=	(↓)	=	=	=	↓	↓	↓↓
HDL-kolesterol	=	=	(↓)	=	=	=	↓	(↓)	↓↓
LDL-kolesterol	=	=	(↓)	=	=	=	(↓)	(↓)	↓↓
ikke-HDL-kolesterol	=	=	(↓)	=	=	=	↓	(↓)	↓↓
HDL-K/LDL-K	=	=	=	=	=	=	=	(↑)	↑↑
TAG	(↑)	(↑)	↑	↑	(↑)	(↑)	=	=	↑
Frie fettsyrer	=	=	=	=	=	↑	=	=	=
Fosfolipid	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Leverenzym-aktivitet									
<i>In vitro</i> β-oksidering (mitokondrie)	=	=	↓	=	=	=	=	=	↓↓
<i>In vitro</i> β-oksidering (peroxisom)	(↓)	↓	↓↓	=	=	↓	↓	=	↓↓
Antioxidant-effekt									
Oxidativ skade på GSA	=	=	↓			↓↓	↓↓	↓↓	↓↓

^aRetning på pil angir oppgang (↑) eller nedgang (↓) relativt til HF-kontroll. Parentes angir lavere forskjeller, mens to piler angir høyere forskjeller relativt til HF-kontroll. Grønne piler i lavfett-kolonnen er entydig positiv retning, mens svarte piler har usikker metabolsk effekt eller er ikke relevant for helseeffekt.

4.3 Museforsøk 2

Hydrolyse av makrell ble repetert, og en 5 ukers screeningstudie i mus ble gjennomført, på grunn av for stor hydrolysegrad i produktene som ble brukt i første screeningrunde.

4.3.1 Materialer og metoder, museforsøk 2

Hydrolyse ble utført ved Sintef Ocean AS, og de følgende produktene ble produsert:

- Makrell 1 samfengt makrell, endogene enzym? – termisk tid 0
- Makrell 2 samfengt makrell, endogene enzym? – termisk tid 15
- Makrell 3 samfengt makrell, PE + endogene enzym? – termisk tid 15

Museforsøk ble gjennomført som beskrevet i 4.2, men med 5 ukers fôring av 4 grupper à 8 mus. Gruppene bestod av en HF-kasein kontrollgruppe og 3 HF-makrell grupper. Vektdata og plasmalipider ble målt som beskrevet i 4.2.

4.3.2 Resultat og diskusjon av museforsøk 2

Alle FPH fra makrell reduserte vektøkning, men ikke signifikant, og påvirket i liten grad fôreffektivitet (Tabell 5 og vedlegg 2). Makrell 2 og til dels makrell 3 reduserte også vekten på nyrefett- og testikkelfett-depot. I tillegg hadde Makrell 2 en tydelig reduserende effekt på LDL-kolesterol, som førte til en signifikant økning i ratioen mellom god og dårlig kolesterol (HDL-K / LDL-K). Av de tre hydrolysemetodene var FPH fra metode 2 (Makrell 2) det mest lovende, og kan være verdt å gå videre med.

Tabell 5. Endringer i ulike analyserte parametere i FPH-dietter i forhold til høyfett kontroll kasein-diett^a

	Intervensjonsgrupper		
Parameter	Makrell 1	Makrell 2	Makrell 3
Vektdata			
Vektøkning	(↓)	(↓)	(↓)
Fôrintak	=	=	=
Fôreffektivitet	=	=	=
Nyrefett	=	↓	(↓)
Testikkelfett	=	↓	(↓)
Leverindeks (g lever/g kroppsvekt*100)	=	=	=
Plasmalipider			
Total kolesterol	=	(↓)	=
HDL-kolesterol	=	(↓)	=
LDL-kolesterol	=	↓	=
HDL-K/LDL-K	=	↑↑	=
TAG	=	=	=

^aRetning på pil angir oppgang (↑) eller nedgang (↓) relativt til HF-kontroll. Parentes angir lavere forskjeller, mens to piler angir høyere forskjeller relativt til HF-kontroll.

4.4. Dyreforsøk, Mink

FPH som ble undersøkt i dette forsøket er laget av biprodukter fra makrell (*Scomber scombrus*) og ble levert av Pelagia A/S. I forsøket ble hydrolysatet sammenlignet med fiskemel (uten limvann) og erteproteinmel som begge er helprotein råvarer med lavt innhold av peptider. Minkvalper (*Neovison vison*) ble brukt for å undersøke forskjeller i tilvekst, fôropptak, tarmmikrobiota og effekter på blodlipider. Forsøket ble utført ved Senter for husdyrforsøk ved NMBU.

Mink er kjent som et velegnet modelldyr for tynntarmsfordøyelighet hos andre enmagede dyr. Det er også en god indikator på smakelighet av proteiningredienser da det er regnet som en strengt karnivor art med preferanse for animalsk baserte fôrtyper. Hydrolysater kan ha dårligere smakelighet enn proteinråvarene da innhold av frie aminosyrer og peptider endrer smaksbilde og konsistens. Som rovdyr vil mink også være en god modell for hund og katt. Hvis det skulle vise seg at hydrolysatet har positive helseeffekter, f.eks. i forhold til lipidomsetning eller tarmmikrobiota hos mink, kan det være overførbart til hund og katt.

4.4.1 Materiale og metode, forsøk i mink

Dyremateriale

Minkvalpene (50 hanner) ble skaffet fra en lokal, kommersiell pelsdyroppdretter. Valpene var av samme genotype (Scanblack) og omtrent like gamle og født i slutten av mai 2019. Alle dyrene ble kontrollert av veterinær før de kom til forsøksgården og oppstallet enkeltvis i standard klatrebur (77 cm lengde, 39 cm bredde, 46 cm høyde). Dyrene ble fordelt i de tre forsøksgruppene, 16 dyr i hver gruppe. Kullsøsken ble fordelt på gruppene og slik at hver gruppe hadde samme gjennomsnittlig kroppsvekt.

Fiskemel, hydrolysat og erteproteinmel

Kjemisk innhold i proteinmelene viste like proteinnivåer for fiskemel og FPH, mens erteproteinmelet som forventet hadde lavere proteininnhold (Tabell 6). FPH ble produsert i et pilotanlegg hos Pelagia A/S, fiskemelet (uten limvann) ble skaffet av Felleskjøpet Fôrutvikling A/S, Trondheim, mens erteproteinmelet ble levert av AM Nutrition, Stavanger.

Tabell 6. Kjemisk innhold i hydrolysat, fiskemel og erteproteinmel (g/kg)

	Fiskemel	FPH	Erteproteinmel
Tørrstoff	937	929	888
Aske	210	136	53
Råprotein	643	599	463
Fett	61	175	35

Forsøksfôrene ble satt sammen slik at protein fra de tre råvarene utgjorde 40% av proteinet i blandingene. Blandingene er vist i Tabell 6. Kjemisk sammensetning ble ganske lik, men FPH viste seg å ha høyere fettinnhold enn beregnet, og dermed høyere energiinnhold og ulik energifordeling i forhold til de andre blandingene (Tabell 6).

4.4.2 Resultat og diskusjon av forsøk i mink

Forsøk med FPH fra makrellbiprodukter som proteinkilde til minkvalper sent i vekstperioden (2. oktober-19. desember) viste samme fôropptak og kroppsvektutvikling som valper som fikk fiskemel (uten limvann) og erteproteinmel som proteinkilde. Det var ingen forskjell i mengde nyrefett hos

dyrene ved avslutning av forsøket. Serum total kolesterol og LDL kolesterol, som ble analysert ved Haukeland Universitetssykehus var lavere i gruppene som fikk FPH og erteprotein sammenlignet med fiskemel. Mikrobiotaanalyse fra tykktarm viste at proteinmeltypene påvirket sammensetning av mikroorganismer selv om kjente stammer av tarmbakterier var mest dominerende i alle gruppene.

Se vedlegg 3 for en fullstendig rapport

4.5. Dyreforsøk Kylling

Noen utvalgte FPH ble også evaluert i et fôringsforsøk i kylling. Tradisjonelt er ofte LT fiskemel (Prima Protein, Norge) brukt i startfôr til kylling da innholdet av lettfordøyelig protein med velbalansert aminosyre-sammensetning er høyt. I tillegg inneholder LT Fiskemel en viss mengde med «limvann» – det vil si hydrolysert protein. Generelt mener en at marine FPH bestående av frie aminosyrer og korte peptider, kan gi bedre tarmfunksjon og tarmhelse som igjen er viktig for en høy utnyttelsesgrad av fôret, økt tilvekst og generell motstandskraft mot sykdom. Derfor ble det gjennomført et fôringsforsøk med slaktekylling ved Scandinavian Poultry Research Center, Våler. I forsøket ble 20% av det fordøyelige råproteinet fra vegetabiliske kilder erstattet med marine proteinråvarer med varierende innhold av FPH i startfôret til slaktekylling for å kartlegge effekter på tradisjonelle produksjons- og helseparametere.

4.5.1 Materialer og metoder, forsøk i kylling

Forsøket omfattet 5 ulike forsøksledd, der kyllingene fikk ulike typer forsøksfôr i startfôrperioden (klekking til dag 10) og likt fôr i vekstfôrperioden (fra dag 11 til slakting – dvs. 30 dagers alder). Hvert forsøksledd bestod av 5 gjentak (5 binger a 77 kyllinger=385 kyllinger per ledd). Forsøksleddene er fremstilt i tabell 7. Vekt, fôropptak, dødelighet og strøkkvalitet ble registrert. I tillegg ble tarmprøver tatt for senere analyse. FPH fra makrell ble levert av Pelagia AS, mens FPH av torskehode ble laget i en storskala prøveproduksjon fra Sintef Ocean AS (Vedlegg 4).

Tabell 7. Forsøksdesign med ulike proteinkilder i startfôret

Forsøksfôr	Ledd 1	Ledd 2	Ledd 3	Ledd 4	Ledd 5
Startfôr, dag 0 - 10	Vegetabiliske proteinråvarer	20 % av ford. råprotein fra LT Fiskemel	20% av ford. råprotein fra hydrolysert makrell	20% av ford. råprotein fra hydrolyserte torskehoder	20% av ford. råprotein fra kvitfiskmel u/limvann
Vekstfôr, dag 11 - slakting	Likt fôr i alle leddene – standard kommersielt vekstfôr				

4.5.2 Resultater og diskusjon av forsøk i kylling

Fôropptak, tilvekst og fôrutnyttelse

Vi fant ingen forskjeller i fôropptak mellom forsøksleddene i startperioden (0 – 9 dager). I vekstfôrperioden var fôropptaket hos kyllingene som hadde fått FPH fra makrell signifikant høyere enn hos kyllinger som hadde fått FPH fra torskehode eller hvitfiskmel. Ser en på hele forsøksperioden

var det en tendens til høyere fôropptak hos kyllinger som fikk fôr med FPH fra makrell. Om dette kan knyttes til egenskaper i FPH fra makrell som f.eks. lett tilgjengelig protein og fett gjenstår å avklares.

Når det gjelder tilvekst, fant vi ingen sikre forskjeller mellom forsøksleddene. Imidlertid var det en svak tendens til høyere tilvekst hos kyllingene som fikk FPH fra makrell i første del av startfôrperioden og i perioden 15 til 21 dager etter forsøksstart. Ellers fant vi at vekt ved innsett var nesten signifikant forskjellig og da med en tendens til høyere vekt i ledd 1. Dette kan forklares med at kyllinger som ble levert fra rugeriet var av ujevn i størrelse selv om forsøket ble gjennomført med bare haner. Fôrutnyttelse målt i perioden dag 0 til 27 dager etter innsett var ikke påvirket av de ulike forsøksfôrene (levende vekt/fôropptak).

For om mulig å avdekke effekter av marint protein generelt og FPH spesielt på dyrehelse – valgte vi å ikke vaksinere kyllingene og videre komponere forsøksfôr uten tilsatt koksidiostatika. Dette sammen med påvist *E.coli* – infeksjon, kan ha påvirket både dyrehelse og produksjonsresultater. Det vil si at dette kan ha kamuflert eventuelle effekter av de ulike forsøksfôrtypene. En ubalanse i innsettelsesvekt og videre noen avvik eller variasjon i kjemisk innhold i forsøksfôret – kan også ha påvirket resultatene.

Konklusjon

Resultatene viste at vi ikke kunne avdekke noen klare effekter av ulike typer marint protein sammenlignet med vegetabilsk protein på verken helseparametere eller produksjonsresultater.

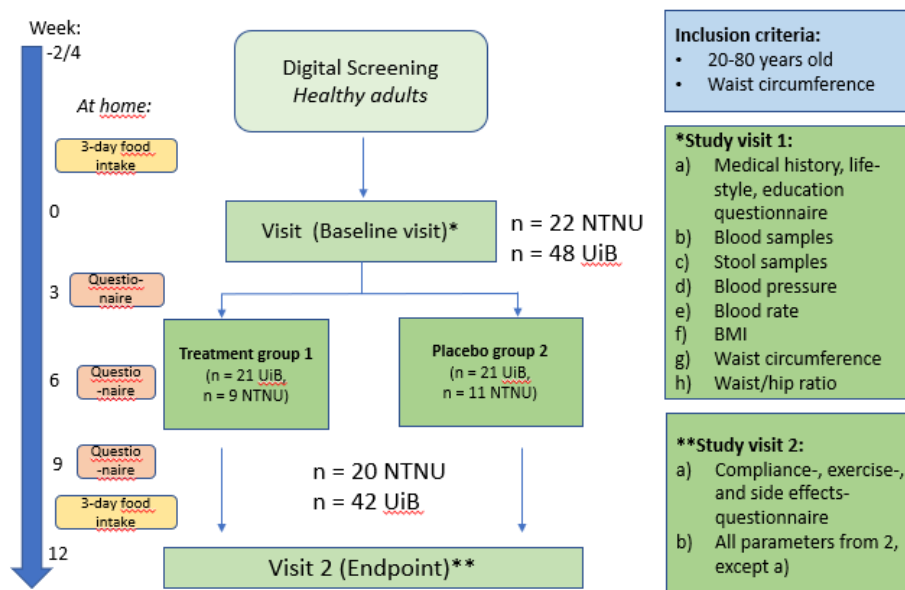
Se Vedlegg 5 for en fullstendig rapport.

5 KLINISK STUDIE

5.1 Materiale og metode

5.1.1. Deltagere og rekruttering

Friske kvinner og menn mellom 20 og 80 år, med normal midjeomkrets (menn <102 cm, kvinner < 88 cm), ble rekruttert via Facebook og plakatoппslag, og informert om studien ved hjelp av digitalt (Ålesund) eller fysisk (Bergen) informasjonsmøte, og innsamlingsutstyr til feces og urin ble utlevert. Før første visitt sendte deltagerne inn signert bekreftelse på deltagelse. Deltagerne ble vurdert for inkludering gjennom intervju eller på visitt 1, der de fikk utlevert FPH. De ble instruert om å ikke gjøre endringer i aktivitetsnivå og kosthold. En lege stod bak intervjuene og visittene og vurderte helsetilstand til deltagerne. Visittene i Bergen (UiB) fant sted på Forskningsenhet for helseundersøkelser (FHU), Overlege Danielsens Hus, og i Ålesund (NTNU) var visittene på Forskningsposten på Ålesund sykehus.



Figur 8. Flytdiagram for gjennomføring av studiet.

5.1.2 Studiedesign og vitesser

Søknad om godkjenning av klinisk forsøk ble sendt til Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) 11.02 2019. Søknad med referanse 29323, godkjent 25.09.19, og revidert 12.06 2020.

Forsøket ble gjennomført som randomisert, dobbelt-blindet to-senter studie i perioden januar 2021 til juni 2021, der hver deltager gjennomførte 12 ukers inntak av 18 g fiskeproteinhydrolysat (FPH) isolert fra torskehoder eller myse (Fig. 8). Studien ble gjennomført ved FHU, Bergen og ved Forskningsposten, Ålesund sykehus. Fordeling av bioaktivt og placebo proteinpulver ble randomisert ved hjelp av programmet WebCRF NTNU ved forskningsposten, Ålesund sykehus, og kvinner og menn ble likt fordelt på de to gruppene.

Før vitsett 1 og vitsett 2 fastet deltagerne minimum 12 timer. På vitsettene ble det levert avføringsprøve og urinprøve, og det ble tatt blodprøver ved å bruke serum, EDTA, og PAX rør. Blodtrykk og hjerterate ble målt. Vekt, høyde, midjemål og midje/hofteratio ble målt, samt bioimpedans. Skjema for bivirkninger ble også fylt ut. En forskningsbiobank (FHF Biobank -2020) ble etablert for urin, avføring, serum, plasma og fullblodsprøver og lagret i -80 °C fryser på Forskningsenhet for helseundersøkelser (Bergen) og Avdeling for kliniske forsøk (Ålesund).

Kostregistreringer ble gjennomført ved å bruke MYFOOD24 der deltagerne selv registrerte sitt kosthold tre dager sammenhengende, inkludert en helgedag, før oppstart og på slutten av forsøket. Gjennomsnittlig daglig inntak av energi og makronæringsstoff ble analysert ved hjelp av Excel.

5.1.3. Intervensjonsmaterialer

Det ble brukt et FPH fra torskehoder (food grade, Fjordlaks AS). Hydrolysatet inneholdt >90% protein, og var lett vannløselig med nøytral lukt og smak (Remme f.fl. 2021), og er nærmere beskrevet i Sintef- rapport nr 00454. Myseprotein (varenummer102242) og smakstilsetninger (varenummer 107029 ble levert av ALIMENTA A/S. FPH-pulver ble sendt til Ålesund, og smak ble maskert med smakstilsetning som var ulik fra den en brukte i myse. Dette ble blandet ved NTNU i Ålesund, slik at

inntatt dose ble 20 g (derav 18 g proteinpulver). Pulveret ble fordelt i plastbokser, der 1 boks per deltager ville vare i 4 uker, altså totalt 3 bokser per deltager. Det ble fordelt og enten sendt til UiB eller lagret hos NTNU i påvente av videre distribusjon på visitt 1. Det ble delt ut måleskje og pulver samt informasjonsskriv om daglig dose og illustrasjon av mengde.

5.1.4 Analyser

Kroppssammensetning ble målt ved bioelektrisk impedans måling (InBody 720, Biospace, Seoul, Sør Korea). Høyde ble målt ved veggmontert stadiometer, midje og hofteomkrets ble målt med antropometrisk tape over lett bekledning. Lipidprofiler og sikkerhetsmarkører i blodet ble analysert av rutinelaboratorier (Haukeland Universitetssykehus). Fettsyresammensetning i serum ble analysert med GC/MS hos Mitomega AS. Inflammatoriske markører, antioksidant kapasitet, aminosyrer, korte fettsyrer, cofaktorer for den mitokondrielle funksjonen og biomarkører for mikrobiota ble målt hos Bevitall AS med LC-MS

Fecesprøver fra start- og slutt-visitt ble analysert ved Norwegian PCS Research Center (Oslo Universitetssykehus) ved hjelp av DNA-ekstraksjon, 16s rRNA PCR og sekvensering. Bioinformatisk analyse ga en oversikt over bakteriesammensetning.

5.2 Resultater og diskusjon, klinisk studie

5.2.1 Deltagere

I Bergen deltok potensielle deltagere på infomøte der de ble informert om inklusjonskriteriene. 48 personer møtte på visitt 1. Tre deltagere trakk seg i løpet av studien, og 3 ble ekskludert på grunn av at de ikke hadde inntatt produktene siste måned. I Ålesund ble 34 rekruttert og screenet via telefon, 25 møtte på første visitt og av disse ble 22 inkludert og 20 fullførte hele studien. Totalt fullførte 62 deltagere hele studien, 30 i FPH-gruppen og 32 i myse-gruppen (Tabell 8). For å kunne evaluere at proteintilskuddet er trygt i en normalbefolkning skulle rekrutterte deltagere være friske og normalvektige, og dette kravet ble oppfylt. Noen flere kvinner enn menn i myse-gruppen gjennomførte studien, og det er derfor en viss skeivfordeling av menn og kvinner. Gjennomsnittlig aldersfordeling, kroppsmasseindeks (KMI) og midjeomkrets på deltagere var likt i de to gruppene.

Tabell 8. Beskrivelse av de inkluderte deltagerne

Karakteristikk	Start - alle (n = 62) ^b	Start FPH (n = 30)	Start Myse (n = 32)
Menn / kvinner (antall)	27 / 35	15 / 15	12 / 20
Senter 1 (Bergen)	17 / 25	11 / 10	6 / 15
Senter 2 (Ålesund)	10 / 10	4 / 5	6 / 5
Alder^a, år	41 (21-81)	41,5 (22-77)	40,5 (21-81)
KMI^a, kg/m²	23 (3)	24 (3)	23 (3)
Midjeomkrets^a, cm	82 (10)	83 (10)	81 (9)

^aVerdier er gjennomsnitt (standardavvik eller ytterpunkt)

5.2.2 Effekt på sikkerhetsparametere og risikofaktorer for metabolsk sykdom

Kroppsmasseindeks (KMI), midjeomkrets, midje/hofteratio og relativ fettmasseindeks ble målt ved start og slutt av studien (Tabell 9). Verken myse eller FPH førte til signifikante endringer i disse parameterne. Vi undersøkte plasmalipider, som er relatert til risiko for hjerte- og karsykdom. Total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol eller triglyserid ble ikke endret av de to protein-intervensjonene (Tabell 9). Det samme var tilfelle med frie fettsyrer (data ikke vist), som tidligere er påvist redusert ved inntak av et fiskeproteinpulver (11). Glukosemetabolismen ble studert ved å måle en markør for langtids-glukosenivå i blodet, HbA1c, og denne var helt stabil før og etter intervensjonsperioden i både myse- og FPH-gruppen. Det var heller ikke endringer i glukose- og insulinnivå i blodet (ikke vist).

Viktige sikkerhetsparametere ble også analysert, og markørene for leverhelse, ALAT og LD, ble ikke påvirket av myse eller FPH. Dette tyder på at det ikke er noen tydelige endringer i risikomarkører eller sikkerhetsmarkører etter intervensjonene, og det er ingenting som tyder på at disse tilskuddene har uheldige metabolske effekter.

Tabell 9. Kropssammensetning, serum lipidnivå og sikkerhetsparametere før og etter 12 ukers intervensjon med fiskeproteinhydrolysat (FPH) eller myse^a.

Variabel og behandling	Start (Visit 1, n = 62) ^b	Slutt (Visit 2, n = 62) ^b	p-verdi (start vs slutt) ^c	P-verdi (FPH vs Myse) ^d
KMI, kg/m²				
FPH	24 (3)	24 (3)	0,476	0,525
Myse	23 (3)	23 (3)	0,906	
Midjeomkrets, cm				
FPH	83 (10)	82 (10)	0,476	0,331
Myse	81 (9)	81 (9)	0,508	
Midje/hofte ratio, cm/cm				
FPH	0,83 (0,07)	0,83 (0,08)	0,173	0,490
Myse	0,81 (0,07)	0,81 (0,07)	0,896	
Rel. fettmasseindeks (%),				
FPH	25,7 (7,6)	25,4 (7,0)	0,340	0,310
Myse	25,1 (7,2)	25,2 (7,0)	0,694	
Triglyserid, mmol/L				
FPH	0,93 (0,39)	0,91 (0,41)	0,662	0,389
Myse	0,77 (0,19)	0,81 (0,27)	0,421	
Total kolesterol, mmol/l				
FPH	4,80 (0,89)	4,74 (0,84)	0,501	0,700
Myse	4,89 (0,85)	4,79 (0,86)	0,200	
LDL-K, mmol/L				
FPH	2,82 (0,85)	2,76 (0,78)	0,433	0,945
Myse	2,93 (0,74)	2,88 (0,75)	0,404	

HDL-K, mmol/L				
FPH	1,66 (0,46)	1,70 (0,42)	0,259	0,084
Myse	1,74 (0,38)	1,69 (0,40)	0,191	
HbA1c (%)				
FPH	4,97 (0,51)	4,97 (0,37)	0,615	0,991
Myse	4,97 (0,37)	4,96 (0,39)	0,968	
ALAT (U/L)				
FPH	24,5 (9,7)	22,8 (6,7)	0,085	0,562
Myse	26,8 (11,9)	26,2 (7,1)	0,731	
LD (U/L)				
FPH	152,8 (22,5)	157,2 (24,6)	0,696	0,886
Myse	161,0 (34,0)	159,2 (35,4)	0,944	

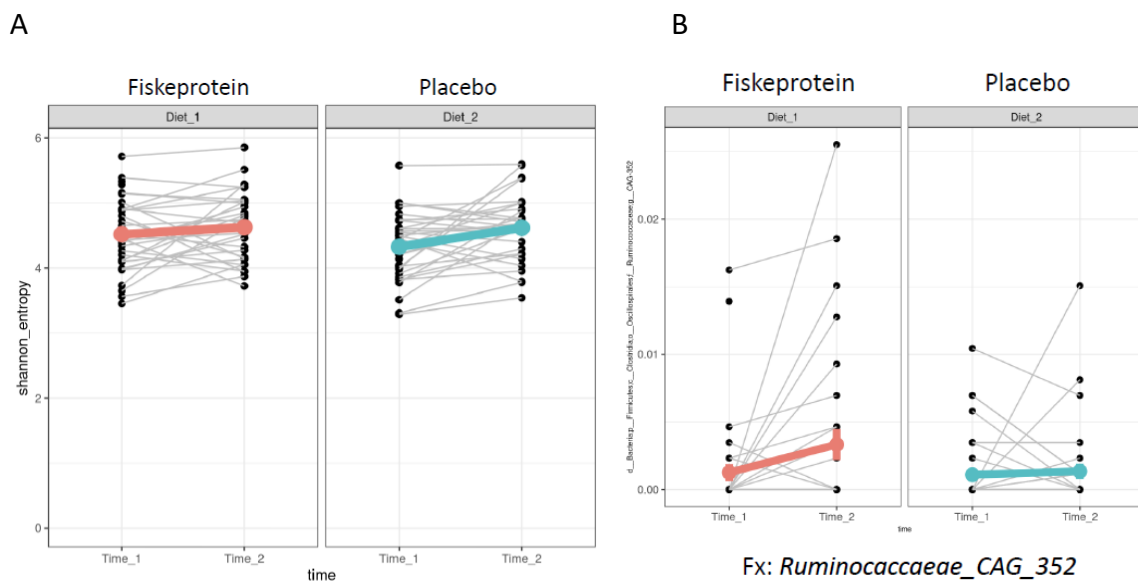
^aVerdier er gjennomsnitt (standardavvik) ved start (visitt 1), og slutt (visitt 2). ^bFPH-gruppe(n = 30), Mysegruppe (n = 32) ^cParvis students t-test. ^d Students t-test mellom delta-verdier for FPH og Myse? ^eTriglycerid/HDL kolesterol x midje/hofte-ratio

5.2.3 Kosthold

Kostholdet ble registret ved tre dagers kostdagbok like før studien og ved slutten av studien. Inntak av energi, protein, fett og karbohydrat var ikke signifikant endret fra start til slutt av studien (Se vedlegg 5). Deltagerne ble instruert til å innta proteintilskuddet før et måltid (fortrinnsvis frokost), og det var forventet at de ville tilpasse sitt totale energiinntak i forhold til ekstra inntak av protein. Proteintilskudd kan fungere som måltidserstatte og sikre at proteininntaket er tilstrekkelig i perioder med lavere energiinntak. Videre studier kan vise effekten av FPH i en energireduert situasjon, men våre funn ved normalt kosthold tydet på at FPH ikke økte energiinntaket, og hadde samme effekt på kosthold som et kjent proteintilskudd, myse.

5.2.4 Mikrobiota

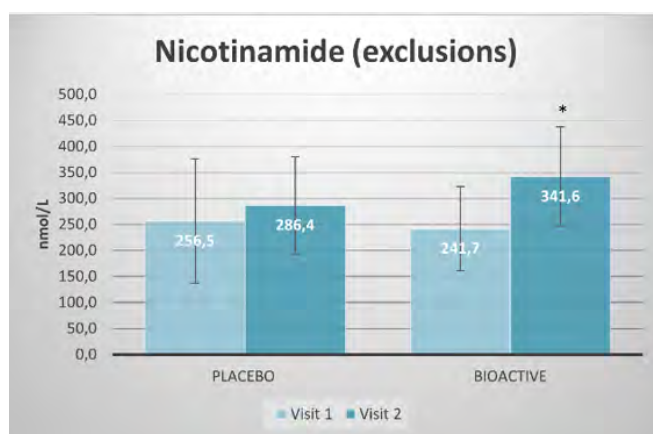
Tarmfloraens sammensetning var ikke signifikant endret før og etter inntak av FPH eller myse (Fig. 9A). Det var 7 bakteriestammer som var signifikant ulike i FPH og myse (Fig. 9B), men ingen bestod korreksjon for multiple sammenligninger. FPH eller myse førte ikke til tydelige endringer i tarmfloraen, men sirkulerende markører på mikrobiota-aktivitet, som korte fettsyrer, viste noen mindre endringer (se også vedlegg 5). Videre analyser av tarmflora vil bli gjennomført. Da dette er et nytt felt vil utviklinger i metode kunne gi mer klare funn.



Figur 9. Endring i bakteriesammensetning i faeces før og etter inntak av fiskeproteinhydrolysat eller placebo (myse) i 12 uker. A) Diversitet i bakteriestammer. B) Eksempel på enkelt-bakteriestamme.

5.2.5 Andre parametere

Markører på mitokondrieaktivitet, inkludert fettsyresammensetning, karnitin, acylkarnitiner og enkarbon-metabolitter, ble analysert i blodet (se vedlegg 6). Ingen signifikante forskjeller mellom FPH og myse ble observert, med unntak av nicotinamide som var signifikant økt av FPH men ikke myse (Fig. 10). Dette tyder på at ingen store endringer skjer i mitokondrieaktivitet, fettsyre- og aminosyremetabolisme ved tilskudd av protein i form av FPH eller myse. Dette er på linje med andre humane studier på fiskeprotein (12).



Figur 10. Serumnivå av nicotinamide etter 12 uker med fiskeproteinhydrolysat fra torsk (bioaktive) eller myse (placebo), n = 62. * p = 0.0004.

5.2.6 Vurdering av metabolske effekter

Siden denne studien er utført på en normalpopulasjon uten forhøyede risikofaktorer kan det potensielt være vanskeligere å påvise metabolske effekter. Det er fortsatt få studier på dette området og videre forskning kan gi mer kunnskap. Studier i ulike befolkningsgrupper, inkludert grupper med overvekt/fedme og forhøyede nivå av metabolske risikofaktorer kan gi mer aktuell

kunnskap. Det er også viktig for studiekvaliteten at produksjonsmetodene kan reproduseres og at benyttet FPH er av høy kvalitet. Det at metabolske effekter er tydelige i gnagerstudier, men ikke kliniske studier, kan skyldes de svært homogene bakgrunnsfaktorene i dyreforsøk, som genetikk, oppstalling og dietter. Det er også viktig å vurdere om FPH produsert i storskala er av like høy kvalitet som småskala-produksjon.

6 RESULTATER OG DISKUSJON

Hovedresultatene fra prosjektet er at FPH fra forskjellige fiskearter ble godt tolerert i både pre-kliniske dyrestudier og kliniske studier. I dyrestudier fra mus og mink finner vi at FPH har en positiv helseeffekt ved at de bioaktive peptidene senker risikoparametere for kardiometabolsk syndrom ved å redusere plasma kolesterol og øke forholdet mellom den gode formen for kolesterol (HDL-kolesterol) sammenlignet med det dårlige kolesterolet (LDL-kolesterol). Virkningsmekanismen for dette kan skyldes økning i den mitokondrielle fettsyreforbrenningen. Antallet mitokondrier, som er cellens kraftverk og gir energi fra fett og proteiner, reduseres med alderen og mitokondriell dysfunksjon er relatert til mange sykdommer – ikke minst i relasjon til nevrodegenerering.

FPH brukt i mink viste ingen effekt på kroppsammensetning og plasmalipider, men siden produktene brukt var fra en tidlig prøveproduksjon fra makrell, som inneholdt mer rester av fett og lavere proteinkvalitet enn ønskelig, er det vanskelig å konkludere fra dette forsøket. Det samme gjelder studien i kylling, der i tillegg høy dødelighet var en forstyrrende faktor.

Den kliniske studien ble designet som en sikkerhets-studie (safety studie), der friske mennesker inntok FPH lenge nok til å kunne bestemme om produktet ble godt tolerert og ikke gav bieffekter. Det var også av interesse å undersøke om man kunne finne noen av resultatene fra mus også i en human studie. Med 18 g FPH fra torskehoder sammenlignet med placebo myse, var toleransen for begge produktene god, ingen tydelige bivirkninger ble registrert, og det var ingen endring i de målte sikkerhetsparameterene i blodet. Studien viste heller ingen effekter på plasmamarkører som serumlipider, glukosetoleranse, fettsyreklasser og enkeltfettsyrer, kroppsvekt, fedme, KMI, og blodtrykk. En økning av nikotinamide, som er en cofaktor eller en hjelpefaktor for full mitokondriell funksjon, ble observert. Dette kan tyde på at den mitokondrielle funksjonen er delvis påvirket, men ikke tilstrekkelig til å forandre fettsyresammensetning eller lipider i plasma.

Carnitiner og korte fettsyrer er biomarkører i plasma for microbiota-aktivitet. I den humane studien fant en økning av isovalerate, men det var ingen forskjell på FPH og myse-gruppen. Dette kan tyde på at proteintilskudd kan motvirke forstyrrelser i absorpsjonen av næringsstoffer. Innledende analyse av microbiota i feces har ikke vist signifikante funn, men UiO vil utføre videre analyser.

I den humane studien ble omfattende kostholdsdata samlet inn gjennom 3-dagers kostregistreringer utfylt av deltakerne via appen MyFood24, både før og etter 3 måneder på intervensjon. Ingen signifikante forskjeller ble observert i kostholdet mellom gruppene, verken for total energi, karbohydrater, sukker, fett eller proteiner. Proteininntaket tenderte til å være svakt redusert etter 3 måneder på intervensjon sammenlignet med før kostholdet, på tross av peptidtilskuddet, men det var også stor individuell variasjon i næringsinntaket og stort sett var kostholdet for de fleste uendret over tid. Individuelle forskjeller i næringsinntak kunne ikke forklare effekter av proteintilskuddene, som støtter at studien var godt gjennomført i henhold til designet hvor FPH eller myse utgjorde endringen i kosten.

Planlagte publikasjoner fra prosjektet:

- November 2022: Proteinhydrolysat fra torsk, sild og makrell har ulike metabolske effekter i mus
- Desember 2022: Proteinhydrolysat fra torsk som proteintilskudd sammenlignet med myse i 12 uker i friske individ – en randomisert to-senter klinisk studie
- Mars 2023: Effekt på tarmmikrobiota av proteinhydrolysat fra torsk sammenlignet med myse i 12 uker i friske individ – en randomisert to-senter klinisk studie

7 KONKLUSJON

Konklusjon fra prosjektet er at tilskudd med FPH indikerer mulige helsefremmende effekter basert på prekliniske studier i dyr, men at funnene er mindre tydelige i kliniske studier. Mangel på signifikante data på lipidmetabolisme i mennesker kan skyldes at den høyere dosen FPH kombinert med en standardiserte diett i dyreforsøk gjør det lettere å påvise metabolske effekter. I alle forsøk er FPH sammenlignet med fullverdige proteinkilder, og FPH viste ingen uheldige egenskaper sammenlignet med myse i menneske og uhydrolysert kasein og fiskeprotein i dyr.

8 HOVEDFUNN

- Det kan produseres FPH som potensielt gir helseeffekter basert på forsøk i gnagere.
- FPH fra sild, makrell og torsk har vist en positiv effekt i prekliniske studier (gnagere) ved å forhindre utvikling av overvekt og redusere risikofaktorer for overvekt-relatert sykdom.
 - Vektøkning og fettlager rundt indre organ ble redusert. Plasmaverdier av kolesterol ble redusert i mus mens HDL-/LDL-kolesterol ratio økte. Diettinduserte endringer i fettsyresammensetning gav reduksjon av fettsyrebaserte indikatorer på inflammasjon.
 - I et minkvalpeforsøk med FPH fra makrell, hvor en så på tilvekst, smakelighet og tarmmikrobiota, ble plasmakolesterol og LDL-kolesterol redusert sammenlignet med uhydrolysert fiskeprotein, mens HDL-/LDL-kolesterol ratio økte. Mikrobiotafunn fra innhold i tykktarm viste noen forskjeller mellom fiskemel og FPH fra makrell, men ingen signifikante funn.
 - I et fôringsforsøk med slaktekylling, hvor en erstattet vegetabilsk proteinkilde med FPH (20 %) kunne en ikke avdekke effekter av ulike FPH på verken helseparametere eller produksjonsresultater.
- 12 ukers daglig inntak av 18 g FPH fra reststoff av torskehoder i friske 20-80 åringer gav ingen effekt på plasma markører relatert til fedme, BMI, glukosetoleranse, serumlipider, fettsyreklasser (n-3, n-6, metta eller umetta fettsyrer), enkeltfettsyrer, ketoner, blodtrykk eller sikkerhetsparametere, sammenlignet med placebo som var 18 g myse.
- Det ble observert noen endringer i tarmfloraens sammensetning etter inntak av FPH.
- Analyser av kostholdet (basert på repeterte 3-dagers kostregistreringer) viste ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i inntaket av total energi karbohydrater, fett eller proteiner.
- Videre studier:
 - En har funnet noen endringer i tarmflora hos mink og i mennesker. Samtidig fant en forandringer av korte fettsyrer og carnitiner i plasma hos mennesker. Da dette er

biomarkører for mikrobiota vil dette bli studert videre. Publikasjoner vil bli lagt til dette prosjekt alt etter når de blir publisert.

- To hjelpefaktorer for å oppnå full mitokondriell funksjon, det vil si mest mulig energi-generering, er øket i plasma hos mennesker. Dette aspektet vil bli undersøkt både i mink og gangerer forsøket i relasjon til publisering.

-

9 Covid-19 epidemien og fordyring av prosjektet

1. Covid-19 har forlenget prosjektet og det har vært stor utskifting av personer og forskere både i prosjektgruppen og referansegruppen.

2. Forlengelse har påført prosjektet ekstra kostnader. Det gjelder i form av egeninsats for UiB som var budsjetert til kr 1 424 000 kr, Fjordlaks (kr 30 000), Felleskjøpet (kr 100 000) og Pelagia (kr 50 000). Likeså måtte en få inn hjelp på timelønninger for å fullføre prosjektet. Det gjelder Simon Nitter Dankel, Grete Hansen Aas, Bodil Bjørndal, FHU ved Trine Leikanger, Thomas Aquinas Aloysius. Rolf Kristian Berge, Jannicke F Remme. Mari Anna Holmefjord

3. Pasientene vil gjerne ha svar på sine plasmaprøver og feces prøver. Prosjektleder arbeider for å få sendt brev til hver enkelt. FHU hjelper til.

4. Utlegg ved publisering.

5. Analyser: Vi har ferdigstilt mange resultater, men har ikke hatt midler til å få analysert Krebs cyklus intermediater, noen flere kynureniner og B-vitaminer som B1, B2, B6 og B12. Vil søke om coronapenger for dette.

10 REFERANSER

1. Shukla A, Bettzieche A, Hirche F, Brandsch C, Stangl GI, Eder K. Dietary fish protein alters blood lipid concentrations and hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in the rat model. *Br J Nutr*. 2006;96(4):674-82.
2. Organization WH. Obesity https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1: WHO; 2016
3. National Heart L, and Blood Institute (NIH). Metabolic syndrome <https://www.nhlbi.nih.gov/health/metabolic-syndrome>: NIH; [
4. Tillander V, Bjorndal B, Burri L, Bohov P, Skorve J, Berge RK, et al. Fish oil and krill oil supplementations differentially regulate lipid catabolic and synthetic pathways in mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2014;11:20.
5. Wergedahl H, Liaset B, Gudbrandsen OA, Lied E, Espe M, Muna Z, et al. 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. *J Nutr*. 2004;134(6):1320-7.
6. Vik R, Tillander V, Skorve J, Vihervaara T, Ekroos K, Alexson SEH, et al. Three differently generated salmon protein hydrolysates reveal opposite effects on hepatic lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *Food Chemistry*. 2015;183:101-10.
7. Bjorndal B, Berge C, Ramsvik MS, Svardal A, Bohov P, Skorve J, et al. A fish protein hydrolysate alters fatty acid composition in liver and adipose tissue and increases plasma carnitine levels in a mouse model of chronic inflammation. *Lipids Health Dis*. 2013;12:143.
8. Aloysius TA, Carvajal AK, Slizyte R, Skorve J, Berge RK, Bjorndal B. Chicken Protein Hydrolysates Have Anti-Inflammatory Effects on High-Fat Diet Induced Obesity in Mice. *Medicines*. 2018.
9. Bjorndal B, Aloysius TA, Lund A, Slizyte R, Bohov P, Carvajal AK, et al. A chicken protein hydrolysate exerts anti-atherosclerotic effect beyond plasma cholesterol-lowering activity in Apoe(-/-) mice. *Food Sci Nutr*. 2020;8(7):3052-60.
10. (NENT) Dnrfknott. Etiske retningslinjer for bruk av dyr i forskning. <https://www.forskningsetikk.no/globalassets/dokumenter/4-publikasjoner-som-pdf/etiske-retningslinjer-for-bruk-av-dyr-i-forskning.pdf>: De Nasjonale Forskningsetiske Komitèene 2021.
11. Vildmyren I, Cao HJV, Haug LB, Valand IU, Eng O, Oterhals A, et al. Daily Intake of Protein from Cod Residual Material Lowers Serum Concentrations of Nonesterified Fatty Acids in Overweight Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Pilot Study. *Mar Drugs*. 2018;16(6).
12. Holven KB, Ulven SM, Sæther T, Dalen KT, Ween O. Final report: Exploring the Health Effects of Salmon Fishmeal: A Combined Dietary Intervention, Animal Study, Cell Experiment and Omics Approach. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901420/>: University of Oslo; 2022.