



University of Oslo

FAGLIG SLUTTRAPPORT FOR PROSJEKT 901420; EXPLORING THE HEALTH EFFECTS OF SALMON FISHMEAL: A COMBINED DIETARY INTERVENTION, ANIMAL STUDY, CELL EXPERIMENT AND OMICS APPROACH

RAPPORTDATO

28. januar 2022

FHF-PROSJEKTNUMMER

[901420]

Kirsten B Holven, Universitetet i Oslo
Stine M Ulven, Universitetet i Oslo
Thomas Sæther, Universitetet i Oslo
Knut Tomas Dalen, Universitetet i Oslo
Ola Ween, Møreforskning, Ålesund

1.0 SAMMENDRAG

Norsk:

Mat og helse er et tema med høy prioritet i verden i dag. Hjerte- og karsykdommer er den største årsaken til død globalt, og i 2015 døde ca. 31 % av verdens befolkning av hjerte- og kar relatert sykdom (1). Det er derfor av stor betydning å forstå hvordan kosten kan påvirke utvikling av kardiovaskulære sykdom. Denne studien har som mål å bringe frem ny kunnskap om hvordan restråstoffer fra fisk (fiskeprotein og andre komponenter i fisk) påvirker risikomarkører for hjerte- og karsykdom som f.eks. lipider, blodtrykk, og inflammasjon. I tillegg vil vi bruke ny teknologi for å forstå de underliggende virkningsmekanismer av komponenter fra fisk.

Prosjektet har bestått av 4 separate arbeidspakker hvor formålet i de fire arbeidspakker har vært å 1) produsere og karakterisere fiskemel fra laks som grunnlag for videre uttesting i human-, muse- og cellostudier. I tillegg kjemisk og biokjemisk karakterisering (WP1); 2) gjennomføre en human intervensjonsstudie (WP2); 3)

gjennomføre en musestudie (WP3), og 4) utføre *in vitro* cellestudier (WP4) for å studere effekten av fiskemel fra laks på markører relatert til glukose toleranse, serum lipider og andre kardiovaskulære risikomarkører.

Hovedresultatene fra prosjektet var at fiskemel fra laks ble godt tolerert i både human- og dyrestudien. Vi fant ikke effekt av inntak av fiskemel fra laks på markører relatert til glukose toleranse, serum lipider, vekt eller blodtrykk sammenlignet med placebo i humanstudien. Derimot fant vi at gruppen som inntok fiskemel fra laks fikk økte blodnivåer av vitamin B12 og selen sammenlignet med placebo gruppen. Vi fant også at inntak av fiskemel ga en signifikant postprandial økning av de fleste aminosyrer, i likhet med inntak av tilsvarende mengde myse. Vi fant at postprandiale blodprøver (tatt etter inntak av små doser fiskemel) ikke påvirket genreguleringen i leverceller *in vitro*.

I dyrestudien fant vi heller ikke at det var forskjell i glukoseopptak, markører for leverskade eller toksisitet i lever etter inntak av fiskemel fra laks sammenlignet med laksefilet og biff. Fiskemel inneholder mer kolesterol enn laksefilet og biff slik at dyrestudien viste at fiskemel førte til økt akkumulering av kolesterol i lever.

Prosjektet viste at fiskemel fra laks responderer på nedbrytning ved hjelp av ulike industrielle enzymer og på fordøyelsesenzym og at peptidprofilen i fiskemel fra laks ligner fiskemel fra produsert fra restråstoff av hvitfisk (torsk) og rødfisk (uer). Hydrolysat av fiskemel fra laks så, i *in vitro* studier, ut til å ha en hemmende effekt på ACE-1 som regulerer blodtrykk.

Konklusjonen fra prosjektet er at fiskemel fra laks ble godt tolerert men så ikke ut til å ha effekt på markører for glukose og lipid profil hos mennesker. Men tilskudd av fiskemel med høy konsentrasjon av mikronæringsstoffer og lav konsentrasjon av fremmedstoffer og kolesterol kan muligens utvikles til kosttilskudd eller mat ingrediens for grupper av personer som har et sub-optimalt inntak av vitamin B 12, selen og protein.

English:

Cardiovascular disease is one of the main causes of the global disease burden and in 2015 approximately 31% of the world's population died of cardiovascular related causes (1). It is therefore of importance to understand how diet can influence development of these diseases.

This study focus on getting new knowledge about how by-products from fish (fishmeal, protein and other components) influences risk markers for cardiovascular disease such as glucose, lipid profile and other cardiovascular risk markers. In addition, we aim to use to technology to understand the underlying mechanisms of action by which the fish-derived components mediate their effects.

The project has consisted of four work packages (WPs), where the aim in the WPs was 1) production and characterization of fishmeal from salmon for use in human intervention (WP2), animal studies (WP3) and in vitro cell studies (WP4). In addition, chemical and biochemical characterization (WP1) 2) carry out a human randomized controlled intervention study (WP2), 3) carry out a mice study (WP#) and in vitro cell studies (WP4) to study the effect of fishmeal from salmon on markers related to glucose tolerance, serum lipids and other cardiovascular risk markers.

The main finding from this project was that fishmeal from salmon was well tolerated both in the human study and in the animal study. We found no effect of intake of fishmeal from salmon on markers related to glucose tolerance, serum lipids, weight or blood pressure compared to placebo. However, we found that the group consuming fishmeal increased their blood vitamin B 12 and selenium levels compared to placebo. Intake of fishmeal was also associated with a postprandial increase in blood levels of amino acids and amino acid derivatives similar to that of whey. Postprandial blood (taken after intake of fishmeal) did not influence gene regulation of liver cells *in vitro*. The results from the animal study was in line with the results from the human study, with no effect on glucose tolerance or markers for liver toxicity compared to that of salmon filet and beef. Fishmeal contain more

cholesterol than salmon filet and beef and the animal study showed that intake of fishmeal led to an increased accumulation of cholesterol in the liver.

Fishmeal from Salmon responded to degradation by enzymes using industrial enzymes in a way similar to fishmeal isolated from by-products from white fish (cod) and redfish. Hydrolysates from fishmeal from salmon had an inhibitory effect on ACE-1 which regulated blood pressure.

The conclusion from the project is that fishmeal from salmon was well tolerated but did not appear to have any effect on markers for glucose tolerance or lipid profile in humans. However intake of fishmeal with high concentration of micronutrients and low concentration of foreign substances and cholesterol may be utilized as a dietary supplement or an ingredient aimed for sub-groups in the population with a suboptimal intake of vitamin B 12, selenium or protein.

2.0. INNLEDNING

Faglig bakgrunn: Inntak av fisk er vist å ha gunstig betydning for helsen og et regelmessig inntak av omega-3 fettsyrer fra fisk eller fiskeolje er assosiert med lavere forekomst av hjerte- og karsykdom (2-3). Både mager og fet fisk er vist å ha gunstige effekter. Dette kan tyde på at det ikke kun er de marine fettsyrene som kan mediere denne helseeffekten (4-6). Fisk inneholder mange komponenter utover omega-3 fettsyrer som f.eks. vitamin D, jod, selen, taurin og andre bioaktive peptider. Forskningen på betydning av fiskeprotein på human helse er helt i startfasen, men nyere forskning tyder på at proteiner og peptider av marint opphav kan ha effekter på helse utover de som er mediert av marine omega-3 fettsyrer.

Norge er en av verdens største fiskerinasjoner og har et stort ansvar for å utnytte biomarine ressurser med hensyn på bærekraftighet, miljø og verdiskapning. I dag kastes mer enn 60 % av biprodukter fra «hvit fisk- industrien» (7). Biprodukter fra oppdrettsfisk har en høyere grad av utnyttelse men er mest omdannet til lavkost produkter som dyrefor. Med den forventede vekst i akvakultursektoren vil mer proteinrike biprodukter bli tilgjengelige. Ved å kunne omdanne disse biprodukter til humant bruk vil man kunne øke utnyttelsen og verdiskapningen betydelig. For å få dette til er det essensielt at man får en solid vitenskapelig dokumentasjon av effekter av fiskemel fra biprodukter på human helse.

Omfang: Prosjektet var inndelt i 4 arbeidspakker og prosjektstart var 15.12.2017 og avslutningsdato er 31.12.21.

Finansiering: Prosjektet ble finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF)

Prosjektgruppe: Kirsten B Holven (prosjektleder og WP 2 leder), Stine M. Ulven (WP2 leder), Knut Tomas Dalen (WP4 leder), Thomas Sæther (WP3 leder), alle ved Universitetet i Oslo, Ola Ween (WP 1 leder), Møreforskning Ålesund AS. Eivind Sætre, og Bjørn Erik Flem, Marine Harvest (Leverandør av fiskemel).

Referansegruppe: Helle M. Meltzer, Forskningsdirektør/FHI, Anne Brunborg, Orkla, Erik Arnesen, LHL/UIO, Gunn Harriet Knutsen, Sjømat Norge

3.0. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Hovedformålet med prosjektet er å utføre «state-of-the art» studier i dyr og mennesker ved å bruke restråstoffer fra oppdrettslaks.

1. Undersøke helseeffekter av fiskemel fra laks i studier på mennesker og dyr med hensyn til effekter på markører for glukose, lipider og andre kardiometabolske risikomarkører.
2. Å undersøke de underliggende virkningsmekanismer av fiskemel fra laks ved å bruke nutrigenomics som verktøy i humane studier, dyremodeller samt ex vivo celledsystemer.
3. Å forstå de molekylære mekanismer ved å teste fiskemel fra laks og hydrolysater i ulike ex vivo systemer.

Nytteverdi: Mat og helse er et tema med høy prioritet i verden i dag. Hjerte- og karsykdommer er den største årsaken til død globalt, og i 2015 døde ca. 31 % av verdens befolkning av hjerte- og karrelatert sykdom (1). Det er derfor av stor betydning å forstå hvordan kosten kan påvirke utvikling av kardiovaskulære sykdom. Denne studien har som mål å bringe frem ny kunnskap om hvordan restråstoffer fra fisk (fiskeprotein og andre komponenter i fisk) påvirker risikomarkører for hjerte- og karsykdom som f.eks. glukose og lipider. I tillegg vil vi bruke ny teknologi for å forstå de underliggende virkningsmekanismer av komponenter fra fisk.

Prosjektets resultatmål

WP1: I arbeidspakke 1 har hovedmålet vært å produsere og karakterisere fiskemel fra laks som grunnlag for videre uttesting i humane diettintervensjoner (Arbeidspakke 2), i en musemodell (Arbeidspakke 3) og celledstudier (Arbeidspakke 4). Det har vært fokusert på kjemiske og biokjemiske karakterisering av fiskemel fra laks ved ulike analyser for å forstå næringssammensetning, peptidinnhold og bioaktivitet. For å undersøke biologisk effekt av protein i fiskemel fra laks ble det benyttet proteolytiske enzym før undersøkelse av peptidprofil og biologisk aktivitet. Et viktig mål har vært å teste ut en *in vitro* modell som simulerer vår egen fordøyelse (kalt INFOGEST) for å se på nedbrytning av protein og frigjøring av mulige bioaktive peptider.

WP2: I arbeidspakke 2 var målet å gjennomføre en human klinisk intervensjonsstudie for å undersøke helseeffekter av fiskemel fra laks. Analyser er gjennomført på primærendepunkt (glukose toleranse) og sekundærendepunkter (lipider, vitaminer, mineraler, fremmedstoffer). Metabolom og transkriptom data er analysert og statistiske analyser er underveis.

WP3: I arbeidspakke 3 ble det gjennomført en diettintervensjon i mus for å sammenligne effekter av fiskemel fra laks mot andre proteinkilder som er vanlig i et humant kosthold. Bruk av en musemodell gir mulighet til å høste et bredt utvalg av biologisk prøvemateriale fra studien. Tilgang til vevsprøver gir mulighet til å undersøke endringene vi observerer på et molekylært nivå, noe som gir dypere innsikt i eventuelle helseeffekter ved inntak av fiskemel. Vi ønsket å teste hvordan fiskemelet tolereres ved å analysere markører for leverskade, toksisitetsmarkører, og hvorvidt det gir endringer i lipider i plasma, glukosesensitivitet eller energimetabolismen.

WP4: I arbeidspakke 4 var målet å undersøke effekter av fiskemel fra laks *in vitro* og *ex vivo*. Isolert sett vil *in vitro* og *ex vivo*-analyser ha en begrenset mulighet til å forutsi *in vivo*-effekter. Men sammenholdt med kliniske data, vil slike studier kunne forklare de underliggende mekanismene som observeres i f.eks. en human intervensjonsstudie. Vi ønsket derfor å avdekke hvilke effekter *in vitro*- og *in vivo*-fordøyd fiskemel har på metabolismen i leverceller og sammenlikne dette med effekten av myse. Her var det mulig å se for seg tre scenarioer: positiv effekt, ingen effekt eller negativ effekt. Samtidig ville vi vurdere mulige toksiske effekter av spesielt de *in vitro*-fordøyde proteinpreparatene.

4.0. PROSJEKTGJENNOMFØRING

WP 1: Produksjon av fiskemel fra avskjær av laks: Produksjon av fiskemel fra laks egnet for intervensjonsstudier ble produsert ved MOWI sitt anlegg på Hjelmeland. Her blir avskjær (hoder, rygger) etter foredling av fersk laks omdannet til fiskemel og olje i topp moderne anlegg. Med bistand fra Møreforskning AS bidro personell fra MOWI med produksjon av rundt 100 kg fiskemel i eget innleid småskalaanlegg beregnet for næringsmiddelproduksjon. Ferskt mel etter tørking ble stabilisert ved tilsetning av naturlige antioksidanter kompatibelt med næringsmiddelproduksjon, før pakking i egnet emballasje og merking. Kvalitetsevaluering ble

gjennomført ved analyser av næringssammensetning (råprotein, fett, vanninnhold, aske, og salt), proteinkvalitet (aminozyrer, frie aminozyrer, biogene aminer), fettkvalitet (fettsyreprofil, peroksid og anisidin), vitamin- og mineralinnhold, fremmedstoff og mikrobiologisk status (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, aerobe mikroorganismer og termotolerante, koliforme bakterier). Ferske prøver av mel ble sendt til innkapsling hos Optipharma AS (Drøbak).

Produksjon av enzymatisk hydrolysert fiskemelprotein: Fiskemel fra laks ble hydrolysert ved Møreforskning AS sitt laboratorium i Ålesund. Ferskprodusert fiskemel ble hydrolysert med Alcalase 2.4 L og Protamex (Novozymes, Danmark) som tidligere beskrevet (8). Fremstilling av laksemel hydrolysat ved INFOGEST metoden er en tre-trinns hydrolyse i kunstig fremstilt spytt- og tarmvæske som etterligner vår egen fordøyelse (9-10). Karbohydrat – og fettspaltende enzym ble ikke benyttet i metoden. Myseprotein (WPC80) ble benyttet som kontroll og hydrolysert på samme måte som fiskemel. Alle hydrolysat ble stabilisert ved vakuum-frysetørking før peptid – og bioaktivitetsanalyser.

Analyser av peptidprofiler: Peptider i fiskemel fra laks brutt ned av proteolytiske enzym ble analysert ved størrelses kromatografi på egnen kolonne egnet høytrykk væskkromatografi (HPLC) hos Møreforskning AS. Dette gav mulighet til å forstå effekt av ulike enzymer på nedbrytning av protein og frigjøring av peptider. Peptider fra ulike hydrolysat av fiskemel fra laks ble sammenlignet med peptidprofiler fra hydrolysert myseprotein. Den vannløselige delen av fiskemel fra laks som ikke var behandlet med enzym, ble også undersøkt for innhold av peptider.

Analyser av bioaktive komponenter: En kritisk gjennomgang av nyere publisert litteratur på helsefremmende komponenter fra restråstoff av fisk i laksefamilien (Salmonider) ble gjennomført for å vurdere hensiktsmessige *in vitro* analyser. Det ble ut ifra denne gjennomgangen bestemt å fokusere på to bioaktiviteter med relevans til valgte endepunkt i arbeidspakke 2. Det ble gjennomført effekt av hydrolysert fiskemel fra laks på det blodtrykksregulerende enzymet angiotensin converting enzyme (ACE-1) (11), og på enzymet dipeptidyl peptidase (DPP-IV) assosiert med utvikling av diabetes 2 (12). Hemming av ACE-1 baserte seg på spektrofotometrisk måling av FA-PGG som tidligere beskrevet (8, 13). Hemming av baserte seg på kommersielt tilgjengelig bioassay. For å få et sammenligningsgrunnlag ble hemming i ulike hydrolysat sammenlignet med hydrolysert myseprotein og hydrolysert fiskemel, basert på restråstoff av uer. Enkle fraksjoneringsstudier av peptider ble også gjennomført ved bruk av C₁₈-kolonner for å se på hemmingseffekt på ACE-1 (14).

WP2: Gjennomføring av intervensjonsstudien. Den humane intervensjonsstudie ble gjennomført i perioden August 2018 til September 2019. Totalt var 243 personer inne til kartleggingsbesøk (screening). Av disse ble 88 randomisert og inkludert i studien og 76 personer fullførte hele intervensjonen. Inklusjonskriterier var: ≥ 20 år, forhøyet blodglukose [enten fastende s-glukose ≥ 5.6 mmol/l, 2-t OGTT-s-glukose ≥ 6.5 mmol/l eller HbA1c ≥ 40 mmol/mol (≥ 5.8 %)]. Eksklusjonskriterier var diabetes [definert som fastende s-glukose ≥ 7.0 mmol/l, 2-t OGTT-s-glukose ≥ 11.1 mmol/l eller HbA1c ≥ 40 mmol/mol (≥ 5.8 %)], høyt fiskekonsum (>450 g/week), fisk- eller skalldyr-allergi, og aldersbestemt høyt blodtrykk (≥ 70 år $\geq 180/110$ mmHg, $>40-70$ år $\geq 170/100$ mmHg og ≤ 40 år $\geq 160/100$ mmHg). I tillegg bruk av reseptbelagt medisiner mot diabetes, inflammasjon og systemisk bruk av kortikosteroider og ujevn bruk av lipid-senkende medikamenter, tyroksin, blodtrykksmedisiner og medisiner som påvirker appetitt. Deltakere som hadde ujevn bruk av kosttilskudd, omega-3 eller protein, var gravide, ammet eller planla graviditet ble også ekskludert. Alle deltakere skulle ha stabil kroppsvekt (definert som ± 5 %) gjennom de siste 3 måneder og skulle ikke planlegge for vektnedgang under intervensjonen. Fiskemelgruppen fikk kapsler som inneholdt laksefiskemel (250 mg/kapsel), antioksidanter og fyllstoff men placebogruppen fikk kapsler med samme mengde antioksidanter og fyllstoff. Daglig inntak var 7.5 g laksefiskemel tilsvarende total 5.2 g lakseprotein. Etterlevelse ble bestemt ved å telle gjenstående kapsler og deltakere med mindre enn 70% etterlevelse ble ekskludert fra analyser.

WP3: Utarbeidelse av diett: For å ha et godt referansegrunnlag for å se på helseeffekter valgte vi å lage tre dietter basert på fiskemel (fra laks), fiskefilet eller biff. Det gjorde at vi kunne sammenligne fiskemelet (ukjent effekt), med to proteinkilder som er vanlig brukt i et humant kosthold (godt tolerert av mennesker). Diettene ble laget av med utgangspunkt i en høy-fett diett som manglet halvparten av tiltenkt protein fra melk (casein). Den resterende

halvparten ble tilsatt fra frysetørket fiskemel (fra laks), laksefilet og biff. I tillegg til mye protein, inneholdt de frysetørkede proteinkildene en rekke andre næringsstoffer. For å kartlegge ulikheter i næringsstoffer mellom disse tre proteinkildene analyserte vi fettsyresammensetning, total mengde fettsyrer, aminosyrer, en del vitaminer og mineraler/sporstoffer. For å oppnå samme mengde av karbohydrat, fettsyrer og protein i de tre diettene, justerte vi til slutt diettene med en lav mengde av soyaolje.

Diettintervensjonen i mus: Vi valgte å ta utgangspunkt i en innavlet musestamme (C57BL/6J) som blir overvektig når den spiser diett med høyt fettinnhold. For å mimikere den parallelle diettintervensjonen i overvektige mennesker ble musene først gitt en høy-fettdiett i 10 uker. Overvektige mus med nedsatt insulinresistens ble deretter gitt tre alternative høy-fettdietter hvor halvparten av proteinet i dietten var fra fiskemel (fra laks), laksefilet eller biff. I tillegg hadde vi en normalvektig kontrollgruppe som spiste normalt fôr (rodent chow). Underveis i diettintervensjonen målte vi kroppsvekt, kroppssammensetning (mengde fett og muskelmasse). I slutten av studien målte vi glukosesensitivitet (GTT) og energimetabolisme (metabolismebur for mus). Ved endt diettintervensjon ble blodplasma og en rekke vev og organer dissekert ut og fryst for senere analyser.

Molekylære analyser: Lipider, gallesyrer, glukose, insulin, markører for leverskade (AST/ALT) ble målt i plasma (og enkelte av de samme i leverprøver). Vi isolerte RNA fra lever og genuttrykk fra hele transkriptomet ble målt med RNA-sekvensering for et utvalg av musene. For noen utvalgte gener ble forskjeller i genuttrykk med RNA sekvensering validert med RT-qPCR analyse for alle individene. Fordi analysene våre avdekket forskjell i kolesterol i lever, målte vi mengden av proteiner som er viktig for opptak av kolesterol i lever (blant annet Pcsk9 protein i lever og i sirkulasjonen).

WP4: *In vitro*-studiene: Cellene i kroppen vår ser aldri intakte proteiner. Proteiner som inntas gjennom kosten brytes i hovedsak ned til frie aminosyrer, di- og tripeptider i den gastrointestinale trakten. Fiskemelet måtte derfor hydrolyseres før det kunne brukes i celledier. Møreforskning AS produsert tok jobben med å hydrolyse fiskemel og myse som kontroll, ved hjelp av tre ulike hydrolyseprotokoller (Alcalase, Protamex og Infogest). Dette ga opphav til produkter som besto av kortere peptider og frie aminosyrer som sammen og hver for seg kunne ha interessante biologiske effekter. Vi valgte å inkludere ulike hydrolyseprotokoller, fordi de gir ulik peptidprofil. Cellelinjene som ble valgt for å teste hydrolysatenes effekter var i første omgang å bruke HepG2 celler, en hepatocellulær kreftcellelinje som ofte brukes for å studere lever/hepatocytbiologi. Målingene som ble utført var toksisitetsanalyser (LDH og XTT assay) og genuttryksanalyser vha. qPCR.

Ex vivo-studiene: For å få tilgang til *in vivo*-fordøyd fiskemel som kunne brukes i tilsvarende celledersøk som beskrevet over, designet vi et spiseforsøk med fem forsøkspersoner som fastet en natt før de inntok fiskemel eller myse (randomisert, cross-over design). Deltagerne inntok 30 kapsler med fiskemel eller myse, tilsvarende 5,2 g protein. Dette var samme mengden fiskemel som ble brukt i den human intervensjonsstudien (arbeidspakke 1). Blodprøver ble tatt fastende, samt 30 og 60 minutter etter inntak (postprandialt; PP). Serum ble isolert og brukt til å stimulere HepG2 celler. Vi testet ut ulike stimuleringsprotokoller og endte opp med å serumfaste cellene over natt og deretter stimulere dem med 20% serum (i celle medium) fra de ulike måltid/tidspunktene: fastende, 30 min PP fiskemel, 60 min PP fiskemel, 30 min PP myse og 60 min PP myse. Etter stimulering ble RNA fra cellene isolert og genuttrykk fra hele transkriptomet målt vha. RNA-sekvensering. Sekvenseringen tok lenger tid enn planlagt, da vi gjennom våre bioinformatiske analyser avdekket en systematisk, metodologisk feil ved Norsk Sekvenseringssenter (NSC). Som en kompensasjon sekvenserte NSC våre prøver på nytt og etter ca. 2 måneders forsinkelse kunne vi endelig kjøre statistikk på datamaterialet i januar 2021.

5.0. OPPNÅDDE RESULTATER

WP1. Prøveproduksjon: Det ble gjennomført en vellykket prøveproduksjon av fiskemel fra laks av god kvalitet i. Teknologien i det innleide anlegget er skalerbar og kan benyttes i eventuell fremtidig fullskalaproduksjon for fiskemel påtenkt et konsum marked. Analyser av næringsmiddelinnhold og hygieneparametere viste at laksemelet

er en fullverdig proteinkilde (> 72 %) med et moderat innhold av fett (14 %) og mineral (6 %). Alle essensielle aminosyrer ble påvist. Innholdet av hydroksyprolin antyder et innhold av kollagenprotein på rundt 1.7 %.

Peptidanalyser: Analyser av peptider før hydrolyse viser at det finnes naturlig, vannløselige peptider i melet. Denne andelen øker betraktelig ved bruk av proteinnedbrytende enzym, noe som viser at fiskemel fra laks responderer godt på ulike proteolytiske enzym. Dette bekreftes ved å sammenligne med hydrolysert myseprotein som har høyere andel peptider med større molekylvekt. Det er også interessant å se at industrielle enzymer som Protamex og Alcalase gir en peptidfordelingsprofil ulik effekt av fordøyelsesenzym. Behandling i en simulerte fordøyelse gav et mye høyere innhold av de korteste peptidene som ofte er assosiert med bioaktivitet. Peptidinnholdet i hydrolyserte protein i fiskemel fra laks, lignet peptidprofiler i hydrolysert mel av hvitfisk (torsk) og rødfisk (uer).

Bioaktivitet: Det ble funnet at protein i fiskemel fra laks ser ut til å ha en hemmende effekt på ACE-1. Hemming av ACE-1 ble påvist for ikke-hydrolysert fiskemel fra laks noe som viser at hemmende komponenter er en naturlig del av melet ($IC_{50}=10.7 \mu\text{g protein}$). Hemmingseffekten øker betydelig når melet behandles med proteinnedbrytende enzym ($IC_{50}=1.7 \mu\text{g protein}$). Dette peker på at hemmingen skyldes nedbrutt protein i melet og ikke andre komponenter. Omtrent samme hemmingsverdier ble oppnådd ved sammenligning med fiskemel av uer. Ved sammenligning av enzymbehandling viser det seg at simulert fordøyelse gir bedre effekt på hemming av ACE-1 ($IC_{50}=3.35 \mu\text{g protein}$), sammenlignet med Alcalase ($IC_{50}=9.9 \mu\text{g protein}$). Dette er i overensstemmelse med ulikheter funnet for peptidprofiler fra de ulike enzymbehandlingene. ACE-1 hemmingsanalyser gjennomført for hydrolysat fraksjonert med C_{18} kolonne varierer en del mellom ulike forsøk og vil kreve derfor et større antall analyser for å få robuste data. Men foreløpige resultat antyder ulike ACE-1 hemming for ulike deler av peptidspekteret. Analyser av DPP-IV hemming gav innledningsvis ingen utslag i analysene og ble derfor ikke fulgt opp videre. Men dette kan skyldes utforming av bioassay fra produsenten og bør analysene bør sannsynligvis følges opp ved bruk av andre metoder.

Formidling: Basert på data som er kommet frem i Arbeidspakke 1, er det påbegynt et manuskript for publisering. På det nåværende tidspunkt vurderes innholdet å være for knapt til å publiseres direkte. Men supplering av funn med enkelte nye analyser som bygger opp om data vil bli forsøkt gjennomført i nærmeste fremtid.

WP2: Formålet med studien var å undersøke effekten av inntak av fiskemel på kardiometabolske risikofaktorer i en dobbelt-blindet randomisert kontroller studie. Vår hypotese var at daglig inntak av lakseprotein i form av et fiskemel tilskudd kunne forbedre glukose toleranse hos personer med risiko for diabetes.

Primær endepunktet var serum glukose, to timer etter oral glukose belastning. Totalt ble 88 personer randomisert til å innta 7.5 g laksefiskeprotein pr dag og 74 personer ble inkludert i analysene. Vi fant ingen signifikant effekt av laksefiskeprotein tilskudd på primærendepunktet eller andre markører relatert til glukose toleranse, serum lipider, vekt eller blodtrykk sammenlignet med placebo. Våre data støtter ikke hypotesen om at daglig inntak av laksefiskeprotein tilskudd i åtte uker forbedrer glukose toleranse i personer med risiko for type 2 diabetes (15).

Sekundær endepunkt: Vi analyserte deretter vitaminer (Vitamin D, Vitamin B12 og Folat), fettsyrer (omega-3), mineraler (sink og selen) homocystein og kvikksølv. Gruppen som inntok fiskemel fra laks økte nivået av vitamin B12 og selen i blodet sammenlignet med placebo gruppen. Frekvensen av personer med lav vitamin B12 status ble redusert fra 15.4% til 2.6% i fiskemelgruppen under intervensjonen. Det var ingen forskjell mellom gruppene på de andre mikronæringsstoffer som vi målte. Å inkludere et fiskeprotein tilskudd i kosten i åtte uker økte serum nivå av vitamin B 12 og selen. Sett i et bærekraftig perspektiv kan restråstoffer med høy konsentrasjon av mikronæringsstoffer og lave nivåer av kontaminanter (som dioksin og kvikksølv) utnyttets som tilskudd eller mat ingrediens til befolkninger med sub-optimalt inntak (Hustad et al, submitted 2021).

Transkriptom-og metabolom analyser: RNA fra perifere blod mononukleære celler ble isolert og gen ekspresjonsanalyser ble analysert på en nCounter® analysis system (Nanostring). Vi brukte "nCounter® Metabolic Pathways Panel (Nanostring)" og vi målte 768 humane gener relater til biosyntese og anabolske signalveier, cellular stress, metabolsk signalering og transkripsjonell regulering. Vi brukte «Nsolver Analysis Software (Nanostring)" for automatisk kvalitets kontroll og normalisering av dataene. Metabolomet ble analysert fra plasma ved bruk av Nightingale platformen, en kommersiell high-throughput nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

platform (<https://nightingalehealth.com>). Denne metoden kvantifiserer 14 subklasser av lipoprotein partikler, partikkel størrelse, apolipoproteiner, så vel som fraksjoner av kolesterol, triglyserider, fosfolipider, albumin, ketonlegemer, laktat, citrat og glycoprotein acetyl. Statistiske analyser er nå underveis og et manus basert på disse data forventes ferdigstilt innen sommer 2022.

WP3: Sammenligning av proteinkildene: De tre frysetørkede proteinrike kildene (fiskemel, laksefilet, biff) hadde ulikt innhold av protein og andre næringsstoffer. Frysetørket fiskemel hadde et høyere innhold av protein (70 %) enn laksefilet (58%) mens innholdet var nokså likt innholdet i biff (68 %). Fiskemel ser ut til å være en god kilde til protein, men samtidig skiller fiskemel seg ut med et høyt innhold av enkelte andre næringsstoffer. Fiskemel inneholdt mye av de samme fettsyrene som laksefilet, men mengden var lavere. Det totale innholdet av gunstige flerumettede fettsyrer (PUFA) var høyest i fiskefilet, noe lavere i fiskemel, og mye lavere i biff. Aminosyresammensetningen var relativt lik mellom de tre proteinkildene, men fiskemel utmerket seg med høyere innhold av glycin, prolin og hydroksyprolin. Det er sannsynlig at dette skyldes et større innhold av kollagen i fiskefilet (f. eks fra skinn). Fiskefilet hadde også et høyt innhold av vitamin B₂ og B₁₂, og mineralene kalsium, kobber, jod og zink. Spesielt var innholdet av kobber høyt, noe som tilsier at et moderat daglig inntak av fiskemel kan medføre at en overstiger anbefalt inntak av kobber hos mennesker.

Diettintervensjonen i mus: Musene tolererte 10 ukers diett hvor 50 % av proteinet kom fra fiskemel, laksefilet eller biff tilsvarende godt. Det var ingen forskjell i matinntak, vektøkning, kroppssammensetning, energimetabolisme, glukoseopptak, markører for leverskade eller toksisitet i lever. Fiskemel medførte høyere innhold av kolesterol i lever (med en tendens til høyere kolesterol i plasma). Dette kan skyldes at fiskemel inneholder dobbelt så mye kolesterol som de to andre proteinkildene. Analyse av transkriptomet i lever viste større forskjeller i RNA uttrykk mellom fiskemel og de to andre diettene, mens det var få forskjeller mellom laksefilet og biff. Mange gener (og biologiske pathways) som var lavere uttrykket med fiskemel inngår i syntesen av kolesterol og steroidhormoner. Det var også antydninger til endringer i opptak av kolesterol i lever. Uttrykket av PCSK9 var redusert i lever og i plasma med fiskemel sammenlignet med inntak av fiskefilet. Disse forskjellene var ikke like klare ved sammenligning mot biff. Protein PCSK9 binder til LDL-reseptor og er med på å fjerne denne reseptoren fra overflaten av leverceller. Lavere uttrykk av PCSK9 legger til rette for at levercellene kan forbedre evnen til å ta opp kolesterol fra sirkulasjonen, men det ble ikke funnet noen forskjell i en totale mengden av LDL-reseptorer i levercellene mellom de tre diettene.

Forskjellen i næringsinnhold mellom de tre proteinkildene tilsier at fiskemel har et godt potensiale som proteinkilde, men høyt innholdet av enkelte andre næringsstoffer som kolesterol og kobber tilsier at mengden som tilsettes i human kost bør utredes nærmere. Alternativt kan fiskefilet prosesseres annerledes, eller renses opp, for å begrense mengden av enkelte næringsstoffer.

Et manuskript som beskriver funnene fra diettintervensjonen i mus sirkulerer hos medforfatterne og er snart ferdigstilt. Manuskriptet vil sendes for publisering i et egnet fagfelle-vurdert internasjonalt tidsskrift (vil bli forsøkt sendt til *Acta Physiologica*).

WP4: In vitro-studiene: De innledende toksisitetstudiene viste at spesielt Infogest hadde en celletoksisk effekt på HepG2 celler ved en konsentrasjon over 2,5 mg/mL. Dette kan skyldes flere forhold, men mest sannsynlig den høye saltkonsentrasjonen som følger av en slik hydrolyseringsprotokoll. Dette ser ut til å være et mindre problem når disse hydrolysatenes testes i biokjemiske/enzymatiske assay uten celler tilstede, men utgjør et problem for celler i kultur. Dette tvang oss til å legge høyeste hydrolysatdose til 0,25 mg/mL når vi skulle undersøke hydrolysatenes effekt på genuttrykk i leverceller. Disse studiene ble utført som småskala forsøk med kvantitativ real-time PCR (qPCR). Vi undersøkte effekten på uttrykk av gener som *TIPARP*, *CYP1A1*, og *CYP1B1* (detoksifisering) og *FASN*, *LXRA*, *ABCA1*, *ABCG1*, *ACOX1*, *MLXIPL*, *CHREBP*, *SCD* og *SREBF1* (lipidmetabolisme). Av disse var det *CYP1A1* genet som responderte mest ulikt på de ulike hydrolysatenes. Dette sammen med generell lav effekt av hydrolysatenes sammenliknet med vannkontrollen, gjorde at vi la dette arbeidet til side i påvente av bedre dialyseløsninger for a desalte peptidpreparatene.

Ex vivo-studiene: Det randomiserte spiseforsøket ble gjennomført som planlagt høsten 2019 og serum fra de ulike måltid/tidspunktene ble isolert. Konsentrasjon av glukose, triglyserider, kolesterol, insulin, GLP-1, betennelsesmarkører og 28 aminosyrer og aminosyrederivater ble analysert i disse prøvene. Serumanalysene som ble utført på akkrediterte laboratorier viste at både fiskemel og myse reduserte glukose og triglyseridnivåer i serum uten at dette påvirket insulinnivået. Videre førte inntak av begge disse proteinkildene til at 22 aminosyrer/aminosyrederivater økte i serum. Fiskemel fra laks ga en signifikant større økning i arginin, metionin, serin, glysin, cystationin and 2-aminobutyrat (2-aminobutyric acid; AMBA) sammenliknet med myse.

Fiskemel inneholder høye nivåer av aminosyrene glysin og arginin, noe som kan forklare de økte postprandiale serumkonsentrasjonene av disse aminosyrene. Når det gjelder økning i serin kan dette ikke forklares med proteinkildenes sammensetning, da nivået av serin faktisk er høyere i myse. Den markante økningen i cystationin og AMBA etter inntak av fiskemel kan forklares med tilsvarende økning i metioninnivå. Fiskemel inneholder mer metionin enn myse, og man har sett at metionin fra kosten øker både cystationin og homocystein, i tillegg til metionin i løpet av 1-2 timer (16). Mens cystationin ser ut til å være en tidlig og sensitiv markør for endringer i fluksen gjennom transmetylerings-transsulfureringsveien (16), tror man at AMBA, et biprodukt fra syntesen av cystein fra cystationin, kan fungere som en form for glutationkompensasjon mot oksidativt stress, noe som må sees på som positivt (17).

Inkubasjon med postprandialt serum resulterte i store transkripsjonelle endringer i de serumfastende HepG2-celler. Mer enn 4500 proteinkodende gener endret uttrykket signifikant (opp eller ned), og s.k. pathway-analyser viste at *PI3K-Akt-signalering*, *fokal adhesjon* og *regulering av aktin* var de tre mest oppregulerte pathwayene, mens *PPAR-signalering* og *insulinresistens* var de mest nedregulerte. Likevel, når vi sammenlignet celler dyrket i fastende serum med postprandialt serum etter inntak av fiskemel og myse, fant vi ingen differensielt regulerte gener, verken med hensyn til proteinkilde eller tid etter måltid. Her vil vi gjøre leseren oppmerksom på at dette ikke betyr at det ikke er noen forskjell mellom proteinkildene hvis man studerer ett og ett gen, men betydningen av disse små, subtile endringene nulles ut som et resultat av multiple statistiske tester, slik konsensus er i forbindelse med hel-transkriptomanalyser (18). Et manuskript som beskriver funnene fra ex vivo-studiene er nå i revisjon hos tidsskriftet *Frontiers in Nutrition* [Hjorth et al. submitted 2021]

6.0. HOVEDFUNN

WP1:

- Peptidprofil i laksemel ligner fiskemel produsert fra restråstoff av hvitfisk (torsk) og rødfisk (uer).
- Hydrolysat av laksemel har en hemmende effekt på ACE-1 som regulerer blodtrykk.

WP2:

- Ingen effekt etter inntak av 7.5 g fiskemel fra laks i 8 uker på markører relatert til glukose toleranse, serum lipider, vekt eller blodtrykk sammenlignet med placebo.
- Gruppen som inntok fiskemel fra laks fikk økte blodnivået av vitamin B12 og selen sammenlignet med placebo gruppen.

WP3:

- Et høyt inntak av fiskemel (50 % av protein) er godt tolerert av mus
- Protein fra fiskemel er i stor grad sammenlignbart med inntak av laksefilet eller biff (gir ingen forskjell i matinntak, vektøkning, kroppssammensetning, energimetabolisme, glukoseopptak, markører for leverskade eller toksisitet i lever).
- Fiskemel inneholder mer enn dobbelt så mye kolesterol som laksefilet eller biff.
- Fiskemel fører til økt akkumulering av kolesterol i lever.

WP4:

- Fiskemelhydrolysater har begrenset bruksområde uten mer raffinerte desalting og renseprosesser etter hydrolyse.

- Inntak av små doser (~5g) fiskemel gir en signifikant økning av 22 av 28 aminosyrer/aminosyre derivater, i likhet med inntak av tilsvarende mengde myse.
- Inntak av små doser fiskemel og myse fører ikke til noen signifikant postprandial endring i genreguleringen i leverceller.

6.0. REFERANSER

1. World Health Organization (2017) Cardiovascular diseases (CVDs) fact sheet. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed september 2019)
2. Mozaffarian D & Rimm EB (2006) Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama* **296**, 1885-1899.
3. Raatz SK, Silverstein JT, Jahns L *et al.* (2013) Issues of fish consumption for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrients* **5**, 1081-1097.
4. Telle-Hansen VH *et al.* Daily Intake of Cod or Salmon for 2 Weeks Decreases the 18:1n-9/18:0 Ratio and Serum Triacylglycerols in Healthy Subjects Lipids. 2012 Feb;47(2):151-60.
5. Erkkilä AT *et al.* Effects of fatty and lean fish intake on blood pressure in subjects with coronary heart disease using multiple medications. *Eur J Nutr.* 2008;47(6):319-28).
6. Pot GK *et al.* Increased consumption of fatty and lean fish reduces serum C-reactive protein concentrations but not inflammation markers in feces and in colonic biopsies. *J Nutr.* 2010;140(2):371-6.
7. Magnus Myhre, R.R., Ragnar Nystøyl, Gunn Strandheim, *Analyse marint restråstoff 2019*. SINTEF Ocean AS Report 2020:00904, 2019.
8. Ween O, Stangeland JK, Fylling TS, Aas GH. Nutritional and functional properties of fishmeal produced from fresh by-products of cod (*Gadus morhua* L.) and saithe (*Pollachius virens*). *Heliyon*. 2017 3(7).
9. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P. *et al.* (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.
10. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019. 14(4):991-1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1. PMID: 30886367
11. Neves AC, Harnedy PA, O'Keeffe MB, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2017;218:396-405.
12. Li-Chan EC, Hunag SL, Jao CL, Ho KP, Hsu KC. Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(4):973-8.
13. Shalaby S, Zakora M and Orre J. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates *Journal of Dairy Research* 73(2):178-86
14. Abachi S, Bazinet L, Beaulieu L. Antihypertensive and Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Fish as Potential Cardioprotective Compounds. *Mar Drugs*. 2019;17(11):613.
15. Hustad KS, Ottestad I, Hjorth M, Dalen KT, Sæther T, Sheikh NA, Strømnes M, Ulven SM, Holven KB. No effect of salmon protein on 2h-glucose in adults with increased risk of type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2021 Jan 8:1-32.
16. Guttormsen, A.B., E. Solheim, and H. Refsum, *Variation in plasma cystathionine and its relation to changes in plasma concentrations of homocysteine and methionine in healthy subjects during a 24-h observation period*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**(1): p. 76-9.
17. Irino, Y., *et al.*, *2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36749.
18. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(1): p. 139-40.

8.0 LEVERANSER/FORMIDLING

Artikler/Manuskripter

1. Ween O, Stangeland JK, Fylling TS, Aas GH. Nutritional and functional properties of fishmeal produced from fresh by-products of cod (*Gadus morhua* L.) and saithe (*Pollachius virens*). *Heliyon*. 2017 3(7). PMID: 28721399; PMCID: PMC5499105.
2. K.S. Hustad, I. Ottestad, M. Hjorth, K.T. Dalen, T. Sæther, N.A. Sheikh, M. Strømnes, S.M. Ulven, K.B. Holven. No effect of salmon protein on 2h-glucose in adults with increased risk of type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Br J Nutr*. 2021 Jan 8:1-32.
3. K.S. Hustad, I. Ottestad, T. Olsen, T. Sæther, S.M. Ulven, K.B. Holven. Salmon fish protein supplement increases serum vitamin B12 and selenium concentrations: secondary analysis of a randomized controlled trial. Submitted.
4. Marit Hjorth, Atanaska Doncheva, Frode Norheim, Stine M. Ulven, Kirsten B. Holven, Thomas Sæther, and Knut Tomas Dalen. Consumption of salmon fishmeal increases hepatic cholesterol content in obese C57BL/6 mice. Manuscript in preparation.
5. Hjorth, M., et al., Postprandial effects of salmon fishmeal and whey on metabolic markers in serum and gene expression in liver cells. 2021: in revision. *Frontiers in Nutrition*. p. 19

Formidling

1. Kirsten B Holven. Oslo Life Science 2018 (Torsdag 15 Februar 2018): Is Salmon fishmeal a future sustainable and healthy ingredients for human consumption?
2. Stine M Ulven. Oslo Life Science 2019 (torsdag 13 Februar 2019): Hvordan kan vi utnytte restråstoff og utvikle nye matprodukter som er både sunne og bærekraftige – og gir verdiskaping?
3. Kan fisk utnyttes enda mer og samtidig fremme folkehelsen; FishMeal studien. Ved FishMeal gruppen ved UiO. En populærvitenskapelig presentasjon av prosjektet. *Norsk Tidsskrift for Ernæring*: nr 2; Juni 2019.
4. Marthe Strømnes: Master thesis in clinical nutrition, UiO. «Compliance with the Norwegian and Nordic dietary recommendations in subjects with increased risk of type 2 diabetes».
5. Ola Ween, Møreforskning presenterte prosjektet på Marint Protein Nettverk sin fagdag, 7 november, 2019.
6. Kirsten B Holven presenterte prosjektet på møtet «Fra industri til marin ingrediens» på Gardermoen 20/11 2019.
7. Marit Hjort: Poster-presentasjon (data fra WP3) på NuGO week i Sveits i september 2019.

EVENTUELLE KOMMENTARER