



UiT Norges arktiske universitet

Norges Fiskerihøgskole

Biokjemisk sammensetning og bioaktivitet i enzymatisk hydrolyserte torsk ehoder

Ronja Amalie Gabrielsen

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap FSK-3960 (60 stp) - Mai 2020

Biokjemisk sammensetning og bioaktive peptider i enzymatisk hydrolyserte torsk ehoder

Ronja Amalie Gabrielsen

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Norges fiskerihøgskole

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

UiT – Norges arktiske universitet

og

Vesterålen Marine Proteiner AS



Vesterålen
Marine
PROTEINER



Vesterålen
Marine
OLJE

Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på fem lærerike år på Norges fiskerihøgskole. Jeg ønsker å takke alle som har gjort disse årene i Tromsø helt uforglemmelig.

Først og fremst vil jeg takke mine fantastiske veiledere Ida-Johanne Jensen og Karl-Erik Eilertsen for eksepsjonell og uvurderlig veiledning, støtte og inspirasjon. Jeg er evig takknemlig for deres tilgjengelighet og initiativ under hele prosessen. Tusen takk.

Jeg ønsker også å takke Vesterålen Marine Proteiner AS for muligheten til å skrive om et tema som engasjerer meg.

Takk til Guro Kristine Edvinsen, Birthe Vang og sjømatgruppa for hjelp, råd og veiledning. Jeg vil også rette en takk til Chun Li, Kirsti Helland og Marte Albrigtsen for hjelp til analyser på MarBio. Tusen takk til mine flotte medstudenter for oppmuntring, råd og en trivelig studiehverdag.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til familie og venner - mine viktigste støttespillere. Uten deres støtte og omsorg hadde jeg ikke kommet i mål. Tusen takk.

Ronja Amalie Gabrielsen

Tromsø, mai 2020

Sammendrag

I Norge utgjør ikke-smittsomme sykdommer hele 87 % av sykdomsbyrden (FHI, 2018). Hovedårsaken til disse sykdommene er feilernæring (Mozaffarian, 2016). At fisk og sjømat er bra for helsen er godt akseptert, men helsefordelene har i hovedsak vært knyttet til den gunstige fettsyresammensetningen i sjømat. I de senere år har interessen for bioaktive komponenter økt, og marint restråstoff kan være en kilde til slike komponenter (Hamed et al., 2015). Vesterålen Marine Proteiner AS ønsker å se på muligheten for å implementere enzymatisk hydrolyse for å utnytte proteinene i torskeshoder (*Gadus Morhua*) til humant konsum. Dersom man kan dokumentere en helsefremmende effekt vil det gi en økt verdi til produktet. Formålet med denne oppgaven var å karakterisere biokjemisk sammensetning i torskeshoder, utbytte ved enzymatisk hydrolyse og kartlegge mulig bioaktive egenskaper i enzymatisk hydrolyserte torskeshoder. De bioaktive egenskapene som ble analysert var antioksidativ, metthetsregulerende, antidiabetes og antiinflammatorisk effekt.

Hoder av torsk fanget utfor Vesterålen i november ble kvernet og hydrolysert med fem ulike enzymer eller enzymkombinasjoner (A, B, C, D, E), i tillegg til en hydrolysekontroll uten enzymtilsetning. I torskeshoder var prosentinnholdet for protein, fett, vann og aske henholdsvis 14,9; 0,8; 71,9 og 15,3 %. Enzymatisk hydrolyse resulterte i proteinutbyttet mellom 25% og 31% og et proteininnhold på 52-53%. For hydrolysekontroll var proteinutbytte og proteininnhold henholdsvis 18,2% og 48%. Hydrolysat C hadde høyest proteinutbytte og proteininnhold, hydrolysat A hadde høyest innhold av essensielle aminosyrer, og hydrolysat D hadde høyest innhold av frie aminosyrer. Den antioksidative kapasiteten målt med ORAC var mellom 90 og 150 $\mu\text{mol TE/g}$ høyere for hydrolysatene sammenlignet med kontrollen, hydrolysat C hadde best antioksidativ kapasitet. Den antioksidative kapasiteten målt med FRAP var ikke høyere for hydrolysatene. Hydrolysat E og kontroll viste en dose-avhengig sekresjon av GLP-1 som gir indikasjon på metthetsregulerende effekt. Det ble ikke funnet antidiabetes eller antiinflammatorisk effekt i noen av hydrolysatene.

Konklusjonen er at enzymatisk hydrolyse øker utbytte, proteininnhold, essensielle aminosyrer og frie aminosyrer. Basert på resultatene bør videre arbeid fokusere på antioksidativ kapasitet i samtlige hydrolysat og metthetsregulerende effekt i hydrolysat E og kontrollen.

Summery

In Norway 87% of the disease burden are caused by non-communicable diseases (FHI, 2018). The main cause for these diseases is malnutrition (Mozaffarian, 2016). It is a well-accepted that seafood is good for our health, and mainly this has been linked to the omega-3 fatty acids. In the recent years, the interest for bioactive compounds has increased, and marine by-products are a potential source for such components. The company Vesteraalen Marine Proteiner AS considers utilizing proteins in cod heads (*Gadus Morhua*) for human consumption by enzymatic hydrolysis. Documenting health-promoting effect of such hydrolysates will add value to the product. The aim of this thesis was to determine the biochemical composition of cod heads, the yield of enzymatically hydrolysis and map potential bioactive properties in enzymatically hydrolysed cod heads. The bioactive properties analysed was antioxidative, appetite suppressive, anti-diabetic and anti-inflammatory effects.

Heads from cod caught outside Vesteraalen in November were minced and hydrolysed with five different enzymes or combinations of such (A, B, C, D, E). One sample without enzyme addition (hydrolysis control) was also included. The percentage of protein, fat, water and ash in cod heads was respectively 14,9; 0,8; 71,9 and 15,3. The protein yield of enzymatic hydrolysis ranged from 25% to 31%, and the protein content from 52% to 54%. For hydrolysis control the protein yield and content were respectively 18,2% and 48%. The hydrolysates had an acceptable amino acid composition with high content of essential amino acids. Hydrolysate C had the highest protein yield and protein content, hydrolysate A had the highest content of essential amino acids and hydrolysate D the highest content of free amino acids. The antioxidative capacity (measured as ORAC) was increased between 90 and 150 $\mu\text{mol TE/g}$ more for hydrolysates compared to hydrolysis control. Hydrolysate C had the best antioxidant capacity (180 $\mu\text{mol TE/g}$). No changes in antioxidant capacity was detected in the FRAP assay, and no anti-diabetes or anti-inflammatory effects were found for any of the hydrolysates. Both hydrolysate E and the hydrolysis control showed a dose-dependent secretion of GLP-1, indicating that it may have a satiety effect.

In conclusion hydrolysis increased the protein yield, protein content, essential amino acids and free amino acids. Based on the results further work should focus on antioxidative capacity of all the hydrolysates and satiety effect in hydrolysate E or hydrolysis control.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
2	Bakgrunn.....	3
2.1	Livsstilsykdommer.....	3
2.1.1	Overvekt.....	3
2.1.2	Diabetes.....	4
2.1.3	Oksidativt stress.....	4
2.1.4	Inflammasjon.....	6
2.2	Helseeffekt av sjømat.....	7
2.3	Proteiner og bioaktive peptider.....	11
2.3.1	Proteinbestemmelse.....	13
2.4	Torsk (<i>Gadus Morhua</i>).....	13
2.4.1	Restråstoff.....	13
2.4.2	Enzymatisk hydrolyse av proteiner.....	16
3	Materialer og metoder.....	18
3.1	Råmateriale.....	18
3.2	Enzymer.....	18
3.3	Forsøksdesign.....	19
3.4	Metoder.....	20
3.4.1	Bestemmelse av enzymaktivitet.....	20
3.4.2	Enzymatisk hydrolyse av torskehoder.....	21
3.4.3	Bestemmelse av proteininnhold.....	21
3.4.4	Bestemmelse av frie aminosyrer.....	21
3.4.5	Bestemmelse av fettinnhold.....	22
3.4.6	Bestemmelse av vann- og askeinnhold.....	22
3.4.7	Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved hjelp av oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay.....	23
3.4.8	Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved hjelp av ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	23
3.4.9	Bestemmelse av antidiabeteseffekt ved hjelp av hemming av protein tyrosin fosfatase 1 B (PTP1B) assay.....	24
3.4.10	Bestemmelse av metthetsregulerende effekt ved å studere sekresjon av glukagonliknende peptid-1 (GLP-1).....	25
3.4.11	Bestemmelse av antiinflammatorisk effekt ved å studere hemming av LPS-indusert uttrykk av TNF.....	27

4	Resultater.....	30
4.1	Biokjemisk sammensetning av råmaterialet	30
4.2	Enzymatisk hydrolyse.....	30
4.2.1	Utbytte ved enzymatisk hydrolyse	33
4.2.2	Visuell vurdering av hydrolysat	34
4.3	Proteininnhold og aminosyresammensetning av hydrolysatene.....	34
4.3.1	Proteininnhold	34
4.3.2	Frie aminosyrer	37
4.4	Bioaktivitet	38
4.4.1	Antioksidativ kapasitet (ORAC) av hydrolysatene	38
4.4.2	Antioksidativ kapasitet (FRAP) av hydrolysatene	39
4.4.3	Antidiabeteseffekt av hydrolysatene	40
4.4.4	Metthetsregulerende effekt av hydrolysatene	41
4.4.5	Antiinflammatorisk effekt av hydrolysatene	41
5	Diskusjon.....	42
5.1	Biokjemisk sammensetning og utbytte ved enzymatisk hydrolyse	43
5.2	Bioaktivitet	46
5.3	Begrensninger i studiet og videre arbeid	50
6	Konklusjon	51
	Referanseliste	52
	Vedlegg 1	62
	Vedlegg 2	62
	Vedlegg 3	62

Forkortelser:

AA:	Aminosyre
ACE:	Angiotensin-1-konverterende enzym
ALA:	Alfa-linolensyre, 18:3n-3
AOC:	Antioksidativ kapasitet
ARA:	Arakidonsyre
AU:	Aktive enheter
AUK:	Areal under kurve
BSA:	Bovint serumalbumin
DHA:	Dokoheksaensyre
DiFMU:	6,8-difluoro-metylbelloferyl
DiFMUP:	6,8-difluoro-metylbelloferylfosfat
DT2:	Diabetes type 2
DTT:	Dithiothreitol
EAA:	Essensielle aminosyrer
EDTA:	Etylendiamintetraeddiksyre
EHT:	Enzymatisk hydrolysert torskehode
EPA:	Eikosapentaensyre
FAA:	Frie aminosyrer
FAO:	Food Authority Organization
FHI:	Folkehelseinstituttet
FN:	Forente Nasjoner
FRAP:	Ferric-reducing antioxidant power
GLP-1:	Glukagonlignende peptid-1

HCl:	Hydrogenklorid (saltsyre)
HK:	Hydrolysekontroll
KMI:	Kroppsmasseindeks
KRB-buffer:	Krebs-Ringer bikarbonatbuffer
LA:	Linolensyre, 18:2n-6
LDL:	Low-density-lipids
LPS:	Liposakkarid
MDA:	Malondialdehyd
MCP-1:	Monocytkjemoattraktantprotein-1
CRP:	C-reaktivt protein
CCK:	Cholecystokinin
n-3:	Omega-3
n-6:	Omega-6
NCD:	Ikke-smittsomme sykdommer (non-communicable disease)
FFA:	Frie fettsyrer
ORAC:	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate-buffered saline (fosfatbufret saltvann)
PMA:	Phorbol 12-myristate 13 acetate
pNNP:	ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase
PTP1B:	Protein tyrosin fosfatase 1B
RCT:	Randomisert kontrollforsøk
ROS:	Reaktive oksygenforbindelser
RPMI:	Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium
SSA:	Sulfosalisyre
TAA:	Total aminosyre

TE:	Troloxeqvivalenter
TNF:	Tumor nekrose faktor alfa
TPTZ	Tripyridyltriazin
VMP:	Vesterålen Marine Proteiner AS
WHO:	World Health Organization

1 Innledning

Av sykdomsbyrden i Norge utgjør ikke-smittsomme sykdommer (NCD) som diabetes, kreft, hjerte- og karsykdommer og kols omtrent 87% (FHI, 2018). Sammenhengen mellom kosthold og utviklingen av NCD er godt dokumentert, og ved siden av røyking og alkohol, er kosthold og høyt blodtrykk de risikofaktorene vi kan påvirke som fører til flest dødsfall i Norge (Knudsen et al., 2015). Det er også en utfordring globalt og feilernæring er hovedårsaken til NCD (Mozaffarian, 2016; WHO, 2018). Innen det neste tiåret skal FN's 193 medlemsland nå bærekraftsmålene. Dette er 17 mål som medlemslandene i 2015 ble enig om for å sikre en bærekraftig utvikling av jorda. Hele 12 av bærekraftsmålene krever god ernæring og det vil være utfordrende å produsere nok næringsrik mat til en verdensbefolkning som er estimert å være 9 milliarder innen 2050 (FAO, 2018).

Det er godt dokumentert at sjømatkonsum er bra for helsen (Mozzafarian, 2016) og Helsedirektoratet anbefaler et inntak av fisk på 300-450 g hver uke, som tilsvarer to til tre middager (Helsedirektoratet, 2014). I hovedsak har helsegevinsten og anbefalingene vært knyttet til det marine fettstoffer som er karakterisert ved en høy andel omega-3-fettsyrer (eikosapentaensyre [EPA] og dokoheksaensyre [DHA]) og et lavt innhold av mettet fett. I tillegg til den gunstige fettsyresammensetningen er fisk en god kilde til vitamin A, D og B₁₂ (Lie et al., 1994) og er rik på proteiner med høyt innhold av essensielle aminosyrer, samt fordøyelighet av proteinene (Friedman, 1996). Til tross for at forskning på helsegevinsten av sjømatkonsum har fokusert på omega-3 fettsyrene, viser flere studier at både mager og fet fisk har en positiv effekt på helsen (Johnsen et al., 2018; Dale et al., 2019; He et al. 2004). Dette, sammen med meta-studier og store prospektive studier, har bidratt til at fokuset har vendt mot andre komponenter (Wu et al., 2012; Bernstein et al., 2010). Eksempel på komponenter som har fått stor interesse er såkalte bioaktive komponenter, eller ingredienser som kan ha positiv effekt utover det næringsmessige, særlig peptider med bioaktivitet. Slike peptider kan frigjøres gjennom fordøyelse eller enzymatisk hydrolyse av proteiner og er derfor særlig interessant for proteinrikmat. Tidligere har forskning på bioaktive peptider primært fokusert på meieriprodukter, men også marine organismer har vist seg å være kilde til slike komponenter (Hamed et al., 2015).

Utnyttelse av dagens ressurser må optimaliseres og det krever nye matkilder og endringer i produksjonsmetoder. Totalutnyttelse av marint restråstoff, og bærekraftig produksjon av nye marine ingredienser, er nevnt av flere nasjonale og internasjonale aktører som tiltak for å nå

målene. Enzymatisk hydrolyse er en miljøvennlig teknologi som kan benyttes for å ta i bruk restråstoff (Jegannathan & Nielsen, 2013).

På grunn av interessen for bioaktivitet i næringsmidler, og økt fokus på utnyttelse av restråstoff, har flere aktører sett på potensiale for å utnytte bioaktivitet i proteinhydrolysat fra restråstoff. Dersom det kan dokumenteres helsefremmende egenskaper, kan biprodukter få økt verdi. En av bedriftene som satser på å optimal utnyttelse av ressursene er Vesterålen Marine Proteiner AS (VMP). Bedriften er lokalisert i Øksnes, den kommunen i Norge hvor det landes mest hvitfisk, og har som mål å øke den lokale verdiskapningen og sikre en bedre utnyttelse av restråstoffene. Restråstoff må håndteres raskt for å oppnå god kvalitet, og logistikkutfordringer er en av årsakene til at restråstoffet fra hvitfisknæringen ikke blir optimalt utnyttet (RUBIN, 2003). Lokaliseringen av VMP bidrar til at bedriften kan få restråstoff av god kvalitet. I dag produserer VMP proteiner til fôrprodusenten BioMar AS, men ønsker å se på muligheten for å produsere proteiner for humant konsum. De vil derfor undersøke om proteinene fra restråstoff har bioaktive, helsefremmende egenskaper.

Det overordnede målet med denne oppgaven var å kartlegge om enzymatisk hydrolyserte torskehoder inneholder bioaktive peptider.

Delmål:

1. Bestemme biokjemisk sammensetning i torskehoder.
2. Bestemme hvordan ulike enzym påvirker utbyttet.
3. Bestemme hvordan ulike enzym for enzymatisk hydrolyse av torskehoder påvirker proteininnhold, aminosyresammensetning og bioaktivitet.
4. Bestemme hvordan enzymatisk hydrolyse påvirker farge på sluttprodukt.

2 Bakgrunn

2.1 Livsstilsykdommer

Selv om NCD har flere årsaker, er livsstil en viktig faktor i utviklingen av slike sykdommer. Metabolske risikofaktorer for å utvikle NCD er overvekt/fedme, høyt blodtrykk, hyperglykemi (høyt blodsukker) og hyperlipideimi (høyt fettinnhold i blodet) (WHO, 2018). Gjennom et sunt kosthold kan man redusere utviklingen av disse metabolske risikofaktorene.

2.1.1 Overvekt

Overvekt og fedme er et økende problem globalt i verden. Folkehelseinstituttet definerer overvekt som kroppsmasseindeks (KMI) mellom 25 og 30 kg/m² og fedme som KMI på minst 30 kg/m² (FHI, 2017). I 2016 var mer enn 1,9 milliarder mennesker over 18 år overvektige, noe som tilsvarer omtrent 39% av verdensbefolkningen, og så mye som 13 % av verdensbefolkningen over 18 år lider av fedme (WHO, 2020). Fedme er et stadig større problem også i Norge og i 2019 led om lag 23% av alle nordmenn over 18 år, eller om lag 1 million mennesker, av fedme (Wasskog et al., 2019). Overvekt og fedme var i 2019 beregnet å ha en samfunnsøkonomisk kostnad på 70 milliarder kroner bare i Norge (Wasskog et al., 2019) delvis gjennom at de er assosiert med økt risiko for flere sykdommer; deriblant diabetes, høyt blodtrykk, høyt kolesterol, astma, gikt og dårlig helsestatus (Mokdad, et al., 2001). I tillegg til de direkte negative effektene av overvekt, er det for mange en psykisk belastning å være overvektig (Malnick & Knobler, 2006). Det er flere årsaker til fedme, men i hovedsak skyldes fedmeepidemien en livsstil hvor inntaket av kalorier er større enn forbruket, slik at energioverskuddet blir lagret som fett. Dersom man kan redusere appetitten, kan matinntak og vekt også reduseres.

Det er flere hormoner som er kjent for å regulere appetitt. Blant annet ghrelin, insulin-liknende peptid 5, glukagon liknende peptid-1, glukoseavhengig insulintrofisk polypeptid, cholecystokinin og peptid-tyrosin-tyrosin (Zhao et al., 2017; Grosse et al., 2014). Disse hormonene som produseres i fordøyelsessystemet kan enten ha en appetittstimulerende eller appetittthemmende effekt. Hormonet GLP-1 er et peptid på 30 aminosyrer som utskilles fra L-celler, en spesiell type hormonproduserende epitelceller i mage-tarmkanalen, like etter matinntak og hormonet fører til en hurtig fordeling av næringsstoffer ved å stimulere glukoseavhengig utskillelse av insulin og dermed regulere blodglukosenivået (Baggio & Drucker, 2007). Andre dokumenterte effekter av GLP-1 er at det fremmer lipolyse og forsinker tømning av magesekken. Sekresjon av GLP-1 bidrar derfor til metthetsregulering og lavere inntak av mat.

2.1.2 Diabetes

Omtrent 70% av de som har sykdommen diabetes mellitus type 2 (DT2) er overvektige (diabetes.no, 2015). Diabetes er en kronisk sykdom med vedvarende høyt blodsukker og forstyrrelse av kroppens stoffskifte (omsetning av næringsstoffene, karbohydrater, proteiner og fett), videre kan sykdommen føre til nyresvikt, hjerteinfarkt og redusert syn (Norsk elektronisk legehåndbok, 2020). Blodsukker reguleres av hormonet insulin som produseres av B-cellene i bukspyttkjertelen etter matinntak. Hormonet binder seg til reseptorer på celleoverflatene slik at glukose fra maten kan tas opp i cellen. Blodsukkeret vil på denne måten stabilisere seg til normalt nivå (<7.0 mmol/l) etter måltid. Ved DT2 produserer kroppen for lite insulin, eller behøver større mengder insulin enn hva som produseres fordi insulinet virker dårligere (insulinresistens). Insulinresistens er definert som når et normalt eller forhøyet insulinnivå gir en svekket biologisk respons (Cefalu, 2001) og innebærer at cellenes evne til å ta opp insulin er begrenset fordi insulinreseptorene på cellene er forstyrret. Dette fører til redusert evne til glukoseopptak og utnyttelse hos et individ (Lebovitz, 2001; Reaven, 2004).

Protein tyrosin fosfatase 1B (PTP1B) er et enzym som defosfilyrer insulinreseptoren og dens substrater. På denne måten hemmer PTP1B insulineffekten og øker insulinresistens (Zhang & Zhang, 2007). Dersom man kan hemme PTP1B-aktiviteten kan effektiviteten til insulin øke. Antidiabeteseffekt kan dermed måles ved hemming av PTP1B-aktivitet.

2.1.3 Oksidativt stress

Oksidativt stress er tilstand hvor balansen mellom radikaler/prooksidanter og antioksidanter skifter til fordel for førstnevnte. Halliwell og Gutteridge (2007) definerte et fritt radikal som «et hvert stoff som er i stand til uavhengig eksistens (derfor «fri») og inneholder et eller flere uparede elektroner». Frie oksygenradikaler og andre ikke-radikale agenser har fellesbetegnelsen ROS og blir konstant produsert i metabolismen. Disse kan reagere med og være skadelig for DNA, lipider og proteiner. Årsaken er at tilstedeværelsen av et uparet elektron i det ytterste skallet øker reaktiviteten til stoffet, siden det single elektronet «søker» en partner for å oppnå stabilitet

Selv om oksidativt stress ikke er hovedårsaken til sykdom er det sannsynligvis en medvirkende faktor til sykdommene kreft, depresjon, Alzheimers og Parkinsons sykdom (Halliwell & Gutteridge, 2007). I tillegg er oksidativt stress direkte linket til hjerte- og karsykdommer gjennom LDL-oksidasjon. Forholdet mellom oksidativt stress og åreforkalkning har blitt gjennomgått av Bonomini et al. (2008); Reaktive oksygenforbindelser kan direkte skade

karveggen ved å reagere med lipider og proteiner. Reparasjonsmekanismer etter vevskadene vil forårsake en akkumulering av plakk (klumper av fett), som bidrar til forhøyet blodtrykk. Plakket kan til slutt løsne og forårsake blodpropp (Guyton & Hall, 2006). Hos friske mennesker forårsaker produksjonen av ROS ingen skade fordi antioksidantsystemet fungerer balansert.

2.1.3.1 Antioksidanter

Definering av «antioksidant» avhenger av hvilket felt det skal benyttes i (matvareproduksjon og biologisk system). Antioksidant i et biologisk system er av Halliwell & Gutteridge (2007) definert som «et hvert stoff som forsinker, forhindrer eller fjerner oksidativ skade til et målmolekyl». Det skilles mellom høy- og lavmolekylære antioksidanter, som refererer til over og under 10 000 dalton. Blant de høymolekylære finner man metallbindende proteiner og enzymer. Eksempel på metallbindende proteiner er feritin og laktoferrin, som binder seg til jern, disse er naturlige antioksidanter som vi finner i kroppen (Halliwell & Gutteridge, 2007).

De lavmolekylære antioksidantene kan fungere på tre ulike måter; metallbindene, O_2^+ -fjernere og radikalfangere (scavengers). Den antioksidative kapasiteten avhenger av antioksidantens egenskaper. Vitamin-E fungerer både metallbindende og radikalfangende, derfor er syntetisk vitamin-E (trolox) er godt egnet som standard når antioksidativ kapasitet (AOC) til et stoff skal bestemmes. Benevnelsen for AOC til et stoff er dermed troloxequivalenter (TE). Både peptider og aminosyrer kan virke som antioksidant. Peptider er antatt å ha en bedre AOC enn frie aminosyrer, siden et peptidradikal vil være mer stabilt enn et aminosyreradikal (Elias et al. 2008). Peptider med lav molekylvekt (<1 kDa) har tidligere gitt god antioksidativkapasitet (Je et al, 2005; Kim et al, 2007), særlig ved ORAC-assay (Theodore et al. 2008). Det er ikke godt dokumentert nøyaktig hvilke strukturer som har antioksidativ kapasitet, men de mest reaktive aminosyrene er de med nukleofile (elektronrike) svovelholdige sidekjeder (som taurin, cystein og metionin) eller aromatiske sidekjeder (som tryptofan, tyrosin og fenylalanin) (Elias et al. 2008).

Det er flere metoder for å studere antioksidativ kapasitet, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) og Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) er to metoder som kan benyttes for å teste AOC til et stoff. Metodene tester henholdsvis oksygenradikalabsorberende kapasitet og jern(metall)bindende kapasitet. Begge metodene bruker syntetisk trolox som standard og AOC blir målt som TE.

2.1.4 Inflammasjon

Inflammasjon, eller betennelse, er en forsvarsmekanisme mot patogene mikroorganismer eller vevskader forårsaket av biologisk, kjemisk eller mekanisk skade. De klassiske tegnene på inflammasjon er hovenhet, rødhet, smerte, varme og tap av funksjon. Ved inflammasjonsreaksjonen vil det skje en aktivering av makrofager og andre immunceller som er til stede i det skadde vevet. I tillegg blir det fraktet plasma og leukocytter med blodet til området som er skadet, blant annet hvite blodceller. Disse produserer cytokiner (signalmolekyler) som aktiverer andre forsvarsceller som monocytter og lymfocytter. Ett av de frigjorte cytokinene som produseres av de hvite blodcellene (granulocytter og andre leukocytter) i den akutte fasen er tumor nekrose faktor (TNF eller TNF α som det tidligere ble kalt) (Arango & Descoteaux, 2014; Je & Kim, 2012). Oppgaven til TNF er å regulere immunceller og på den måten sette i gang reaksjoner i kroppen som feber, celledød, utmattelse og inflammasjon. Selv om inflammasjon er en viktig del av forsvarsmekanismen og skal beskytte mot infeksjoner, hender det at den akutte inflammasjonsreaksjonen ikke opphører. Inflammasjonen går da over til en kronisk tilstand hvor den vedvarende immunresponsen angriper kroppens eget vev. I slike tilfeller er inflammasjon skadelig og kan forårsake eller forverre kroniske sykdommer. Overproduksjon av TNF (og andre proinflammatoriske stoffer) er assosiert med utviklingen av autoimmune sykdommer som reumatoid artritt, astma, inflammatorisk tarmsykdom, Chrons sykdom, og endotoksinindusert skade på flere organer (Guslandi, 1998, Ritchlin et al. 2003, Simons et al. 1996, NHI, 2018). Midler som hemmer TNF har vist seg effektive i behandlingen av inflammatoriske, autoimmune sykdommer når det gis sammen med andre immundependende behandlinger (Breedveld et al., 2006; Klareskog et al., 2004). For å undersøke antiinflammatorisk effekt av en forbindelse (slik som torskelysolytaterne i denne oppgaven), kan man derfor måle om den aktuelle forbindelse er i stand til å hemme eller redusere produksjonen av TNF i THP1-celler når de stimuleres med LPS (et toksin). Produsert mengde TNF kvantifiseres ved bruk av et ELISA-sandwich assay (Lind et al., 2013).

2.2 Helseeffekt av sjømat

Fra midten av 80-tallet, da det ble funnet lavere dødelighet av hjerte- og karsykdommer hos Grønlandsinuitter sammenliknet med innbyggere i Danmark (Dyerberg et al., 1978), har helsefordelene av sjømatkonsum tradisjonelt vært forbundet med de marine flerumettede fettsyrene; I hovedsak EPA og DHA som i kroppen kan omdannes til fettsyrehormoner kalt eikosanoider. Fra de to essensielle fettsyrene Alfa-linolensyre, 18:3n-3 (ALA) og linolensyre, 18:2n-6 (LA) kan mennesker syntetisere begrensede mengder av disse flerumettede fettsyrene EPA, DHA i tillegg arakidonsyre (ARA). Eikosanoidene er sentrale i reguleringen av inflammasjonsreaksjoner, allergireaksjoner og celledeling (Psota et al., 2006). Eikosanoider produsert fra EPA og DHA er ansett å ha antiinflammatorisk, anti-arytmisk og anti-aterotrombotisk effekt, mens eikosanoider fra ARA er pro-inflammatoriske. På den måten vil de motvirke eikosanoidene av ARA. Det er de samme enzymene som syntetiserer EPA og DHA fra ALA som ARA fra LA. Simopoulos et al. (2004) anslo at det vestlige kostholdet inneholder cirka 20x mer n-6 enn n-3, noe som kan resultere i at det blir produsert mer eikosanoider fra ARA sammenlignet med EPA og DHA. Det høye innholdet av n-6 har bidratt til en økt forekomst av inflammasjonstilstander (Wall et al., 2010).

Som nevnt tidligere har det senere vært publisert motstridende resultater i studier på sammenhengen mellom inntak av omega-3 og risiko for hjerte- og karsykdommer. I 2020 ble et metastudium publisert (Abdelhamid et al., 2020) som inkluderte 86 randomiserte kontrollerte forsøk (med til sammen 162 796 deltakere). I studien ble effekt av inntak av fisk- og plantebasert omega-3-fettsyrer på kardiovaskulær helse ble vurdert. Konklusjonen viste at det foreligger moderat til lite bevis på at langkjede omega-3-fettsyrer kan redusere dødelighet forårsaket av koronare hjertesykdom og redusere serum triglyserider.

Det har også i økende grad blitt rapportert positive helseeffekter ved konsum av mager fisk. Blant annet på insulinsensitivitet, glukosemetabolisme, lipidstatus og kroppssammensetning (Tørris et al., 2017, Lavigne et al., 2001, Drotningvik et al. 2016). Dette bekrefter at det også er andre komponenter, som proteiner, i sjømat som har en fordelaktig effekt på metabolsk helse. Men også resultater fra humanstudier som undersøker helseeffekten av mager fisk har vært motstridende. Noe av grunnen til dette kan være at deltakergruppene er varierte (overvektige, hypertensive, diabetikere, osv.) slik at konklusjoner er vanskelig å trekke. Jensen & Elvevoll (2016) gjennomgikk human- og dyrestudier gjort på forskjellige marine proteiner og konkluderte med at det kreves flere humanstudier for å kunne trekke konklusjon angående

klinisk relevans. Basert på dyrestudier er det flere relevante fokusområder for effekten av marine proteiner, da særlig blodtrykk hos normale og mildt hypertensive individer, inflammasjonsmarkører sett i sammenheng med åreforkalkning og antioksidanter (Jensen & Elvevoll, 2016).

To studier har rapportert om effekt av fiskehydrolysat på kroppsvekt og appetitt. Nobile et al. (2016) fant at både 1,4 og 2,8 gram fiskehydrolysat fra sei reduserte kroppsvekt, KMI, fettmasse, midjemål og lår- og hofteomkrets sammenlignet med placebo. Begge dosene hadde lik effekt, noe som tyder på at også lavere doser kan være effektive. Dette samsvarer med Zair et al. (2014) som studerte effekten av 2-ukers innblanding av 2 g fiskeprotein fra kolmule hos 15 overvektige kvinner. Det ble konkludert at fiskehydrolysat signifikant reduserte appetitt sammenlignet med placebo. Postprandiale målinger av glukosekonsentrasjon og selv-rapportert appetittfølelse viste at søtsug og glukosenivå var redusert etter innblanding av fiskeproteiner. Også kohort-studien til Smith et al. (2015) indikerer at sjømatkonsum generelt har en slankende effekt. Islandske forskere har gjort tilsvarende funn assosiert ved konsum av torskefilet (Thorsdottir et al., 2007; Ramel et al. 2009).

Det er dokumentert effekt av torskhydrolysat på insulinkonsentrasjon og blodglukose i kliniske studier (Dale et al. 2018; Vildmyren et al., 2018). Det er også dokumentert antidiabeteseffekt ved konsum av sjømat og mager fisk (Rylander et al., 2014; Parra et al., 2007). Mekanismene bak dette er derimot ikke blitt gjort rede for.

Det foreligger ikke nok studier for å kunne trekke en konklusjon om klinisk relevans på sammenhengen mellom marine proteiner og inflammasjon. Et humanstudium er gjennomført uten å kunne dokumentere effekt (de Mello et al., 2009), mens et annet viste at inflammasjon ble redusert ved konsum av torsk (Ouellet et al., 2008). Dyrestudier har derimot gitt lovende resultater; Jensen et al., (2016) studerte atherosklerotisk plakkdannelse hos mus føret med kylling eller en blanding av torsk og kamskjell som proteinkilde. Studien påviste 24% mindre plakkdannelse i gruppen som var føret med de marine proteinkildene. Dort et al. (2012) føret rotter med torsk eller kasein i tre uker og injiserte deretter muskelgift i leggmuskelen, og fant at inflammasjonen opphørte raskere i gruppen som hadde bitt føret med torsk. Den samme forskningsgruppen dokumenterte senere at den antiinflammatoriske effekten til torsk kan tilskrives aminosyrene arginin, glycin og taurin (Dort et al., 2013).

Flere *in vitro* studier har indikert at peptider fra fisk har antioksidativ kapasitet i ulike oksidative systemer (Bougatef et al., 2008; Grigih et al., 2013; Raghavan & Kristinsson, 2008; Theodore

et al., 2008). Det er flere aminosyrer som det antas har en antioksidativ kapasitet; de svovelholdige sidekjerder (taurin, cystein og metionin), de aromatiske sidekjerder (tryptophan, tyrosin, og fenylalanin) og i tillegg glysin, prolin, leucin og alanin (Fang et al., 2002; Marcuse, 1960; Elias et al., 2008). Det er også funnet at hydrolysat fra torsk har en god oksygenradikalfangende absorpsjon, da særlig de mindre peptidene (>1Da) (Grigih et al., 2015).

Tabell 1 presenterer et utvalg av humanstudier som har påvist antidiabetes, antioksidativ, antiinflammatorisk og antioksidativ effekt av mager fisk eller proteinhydrolysat. Tabellen er modifisert av Jensen & Elvevoll (2016) og Dale (2020).

Tabell 1 Modifisert tabell av Jensen & Elvevoll (2016) og Dale (2020) med oversikt på humanstudier som har dokumenterer effekt av marine proteiner på diabetes, kroppsvekt, appetitt, inflammasjon og oksidativt stress.

Primært utfall	Forfatter	Deltakere	Forsøksdesign	Varighet	Proteinkilde	Kontroll	Resultat
Diabetes	Vildmyren et al. (2013)	42 overvektige voksne	RCT parallelle grupper	8 uker	6 g fiskeproteintilskudd	cellulose	Cod-PC: reduksjon i postprandial serum FFA
	Rylander et al., 2014	33740 friske kvinner	Populasjonsbasert kohort		75 g og 100 g mager fisk per uke		Risikoratio for å utvikle DT2 var redusert, henholdsvis 0,71 og 0,67
	Parra et al., 2007	Ca. 276 overvektige	RCT	8 uker	Torsk som proteinkilde	Fiskebegrenset, laks og EPA+DHA tilskudd	Insulin redusert fra 10 til 8,9 mU/l
	Dale et al., 2018	41 frisk individer	Dobbelt blindforsøk kryssforsøk	2 dager med 4-7 dager «wash-out» mellom	20mg/kg kroppsvekt Fiskehydrolysat	kasein	Postprandial glukose redusert
Appetitt Kroppsvekt	Ramel et al. 2009	126 overvektige og sykkelig overvektige, unge mennesker	3 eller 5 måltid med torsk hver uke, 30% energireduksjon	8 uker	Torsk: 150 g x 3/uke eller 150g x5/uke	Kontrollgruppe: ingen fisk	Gruppe med x5 hadde et vekttap på 1,7 kg mer enn kontroll
	Thorsdottir et al., 2007	Ca 324 overvektige individer	RCT parallelle grupper	8 uker	Torsk 3 x 150 g/uke	Solsikkeolje, fet fisk (laks) og EPA+DHA tilskudd	1 kg vekttap
	Smith et al., 2015	120784 friske individer	Kohort 16-20 år	4 år	sjømat		0,8 kg vekttap på 4 år per måltid sjømat
	Nobile et al., 2016	120 overvektige individer	RCT parallellgrupper	13 uker	1,4 g eller 2,4 g sei proteinhydrolysat	Hvete protein	Begge dosene: redusert kroppsvekt og fettmasse, plasma CCK og plasma GLP-1 opp.
	Zair et al., 2013	15 overvektige kvinner	RCT kryssforsøk	2 uker	100 ml drikke med 3 mg sardinhydrolysat	2 g cellulose	Reduksjon i postprandial glukose og søtsug
Inflammasjon	Drotingsvik et al. 2019	24 sykehjemsbeboere	RCT parallelle grupper	6 uker	5,2 g kolmule proteinhydrolysat i brus	brus	MCP-1: ned CRP: opp
	Ouellet et al., 2008		RCT kryssforsøk	4 uker	Torsk		24% reduksjon i CRP
Oksidativt stress	Parra et al. 2007	Ca. 70 overvektige	RCT parallelle grupper	8 uker	Torsk som proteinkilde	Fiskebegrenset, laks og EPA+DHA tilskudd	Torsk: MDA redusert, antioksidant økt

RCT: Randomisert kontrollforsøk
MDA: Malondialdehyd
MCP-1: Monocytkjemoattraktantprotein-1
CRP: C-reaktivt protein
CCK: Cholecystokinin
FFA: Frie aminosyrer

2.3 Proteiner og bioaktive peptider

Proteiner består av peptider som er aminosyrer bundet sammen ved peptidbindinger. To aminosyrer bundet ved peptidbinding kalles et di-peptid, tre aminosyrer kalles tri-peptid osv., et peptid kan inneholde opptil 50 aminosyrer. Det er totalt 20 ulike aminosyrer som proteiner er bygd opp av og ni av disse er essensielle (tabell 2), det vil si aminosyrer vi ikke kan syntetisere selv og må ha tilført gjennom kostholdet. Kvaliteten til en proteinkilde avgjøres av mengde essensielle aminosyrer (EAA) og fordøyeligheten til proteinene. I tabell 2 er anbefalt mengde EAA/g protein for voksne friske mennesker presentert (FAO/WHO/UNO, 2017).

Tabell 2 Oversikt på anbefalt mengde essensielle aminosyrer/protein for voksne friske mennesker (FAO/WHO/UNO, 2017).

Essensielle aminosyrer	mg EAA/g protein
Histidin	15
Theronin	23
Isoleucin	30
Leucin	59
Valin	39
Lysin	45
Metionin	16
Fenylalanin	38
Tryptofan	6

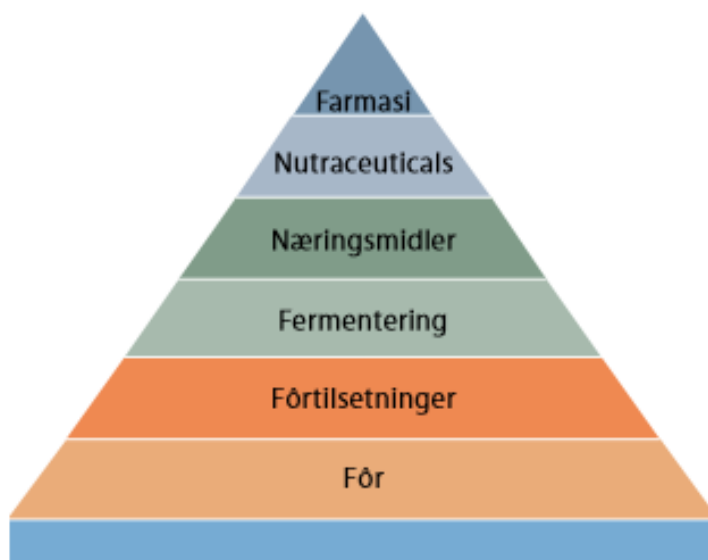
I tillegg til tilstedeværelsen av EAA og fordøyelighet kan proteinkvaliteten øke dersom der et bioaktive peptider til stede. Som nevnt innledningsvis er bioaktive peptider, peptider med en helsefremmende effekt utover sin næringsmessige verdi (Möller et al., 2008). Disse er vist å kunne utøve metthetsregulerende, antiinflammatoriske, antidiabetes og antioksidative effekt (Hamed et al., 2015). Bioaktive komponenter er definert som «matkomponenter som kan påvirke biologiske prosesser eller substrater, og som har innvirkning på kroppens funksjon eller tilsand og til slutt helse» (Möller et al., 2008).

Tilstedeværelsen ulike kombinasjoner av aminosyresekvenser er forbundet med bioaktivitet og gir et unikt potensial til å regulere metabolske ruter som kan bidra i sykdomsforebygging. Bioaktive produkter har lenge vært benyttet som kosttilskudd, men til nå tilsier resultater i vitenskapelige forsøk at effekten er begrenset. Det er dog flere indikasjoner på at bioaktive peptider kan brukes som klinisk behandling for en rekke sykdommer, men det er nødvendig med flere kliniske forsøk før konklusjoner kan trekkes (Ghosh & Playford, 2003; Jensen & Elvevoll, 2016). Normalt inneholder bioaktive peptider 2 til 20 aminosyrer (Bjorndal et al., 2013; Le). Små peptider (di-og tri-peptider) er mer effektivt absorbert enn store. Disse

peptidene er tenkt å ha effekt enten direkte i fordøyelsessystemet eller etter å ha entret sirkulasjonssystemet gjennom absorpsjon fra tarmen (Ryan et al., 2011).

Siden fisk er rik på proteiner er dette en kilde til slike bioaktive peptider. Ulike aminosyresekvenser til stede i fiskepeptider er forbundet med metabolske egenskaper (Le Gouic et al., 2018). Noen har vist å ha en blodtrykksdempende effekt ved å hemme angiotensin-1-konverterende enzym (ACE-hemmere), andre peptider har vist å regulere blodglukosemetabolisme og påvirke tarmbiotika (Hamed et al., 2015; Bougatef et al., 2008). Bioaktive peptider kan tilføres dietten som ferdighydrolysert protein (kap. 2.4.2).

Proteinhydrolysat kan gå til flere markeder, avhengig av deres egenskaper. Figur 1 presenterer de ulike markedssegmentene for proteinhydrolysat, hvor fôr nederst har lavest verdi og farmasi har høyest markedsverdi. Etter hvert som man beveger seg oppover i markedsverdi stilles det strengere krav til egenskaper og dokumentering. Særlig fra næringsmidler til nutraceuticals kreves det en strengere dokumentering av effekt. Nutraceuticals kan deles i to grupper; kosttilskudd og functional foods. Functional foods er mat med helsefremmende dokumentert effekt og har strengere krav til dokumentering enn kosttilskudd (RUBIN, 2003).



Figur 1 Mulige markeder for proteiner. Verdien på produktet og krav for dokumentering øker etter hvert som man beveger seg opp i pyramiden.
Hentet fra RUBIN (2003)

2.3.1 Proteinbestemmelse

For å vurdere den næringsmessige verdien til hydrolysatene er proteininnholdet viktig. Næringsmidler er består av flere næringsstoffer slik at sammensetningen, struktur og inaktivering av næringsstoffene i maten kan redusere tilgjengeligheten til proteinet og proteininnholdet blir da underestimert (Mæhre et al. 2018). Metoder for bestemmelse av proteininnhold og aminosyresammensetning baserer seg på to ulike prinsipper: Direkte og indirekte måling. Indirekte måling beregner proteininnholdet basert på nitrogenmengde eller reaksjon på funksjonelle grupper hos proteiner. Den eneste direkte metoden er aminosyreanalyse. Ved aminosyreanalyse blir proteinet brutt ned ved syrehydrolyse og frigjorte aminosyrer blir deretter bestemt kromatografisk, slik at totalt proteininnhold blir beregnet som summen av aminosyrer, fratrukket et vannmolekyl per aminosyre. Det vanligst brukte hydrolysemetoden er beskrevet i Moore og Stein (1963) (6 M HCL ved 110 °C i 24 timer). Denne metoden er en svært effektiv og bryter de fleste peptidbindingene. Ulempen er at noen aminosyrer også vil bli redusert eller totalt nedbrutt av hydrolysen (Pickering & Newton, 1990).

2.4 Torsk (*Gadus Morhua*)

Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) er en mager fisk og lagrer i hovedsak fett i leveren (Huss, 1995; Love, 1988) hvor fettinnholdet kan øke til 70% (Black and Love, 1986). I muskel er fettinnholdet 0,1-0,9%, vanninnholdet ligger mellom 78% og 83%, mens proteininnhold varierer fra 15% til 19% og askeinnhold er på ca. 1,16% (Huss, 1995; Strasburg et al., 2008). En tredjedel av torskens kropp består av hodet. Torskebein er rik på mineraler (50%) og proteiner (35%), med en lav andel fett (1-2%). Av mineralene er det kalsium og fosfor som det eksisterer mest av, da i form av hydroksoapatitt [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$], dette mineralkomplekset er lite løselig og har lav fordøyelighet (Troppe et al, 2007; Nordrum et al., 1997).

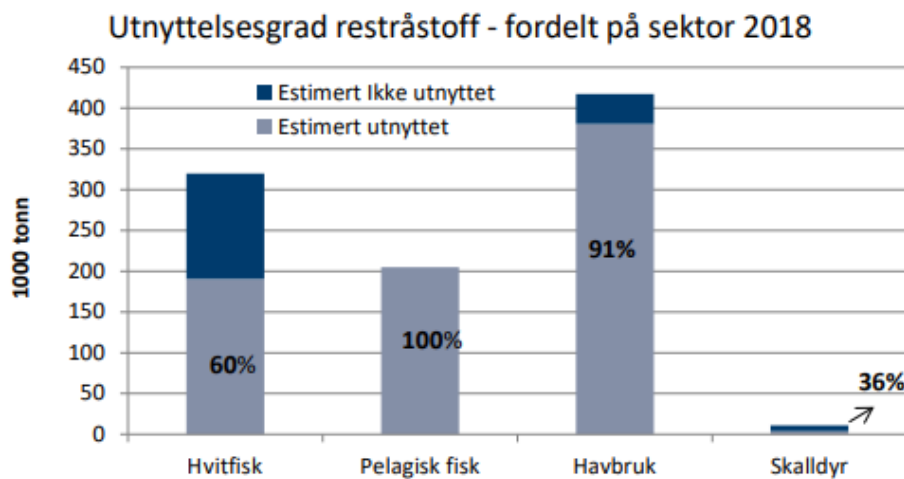
2.4.1 Restråstoff

Marint restråstoff er kilder til verdifulle komponenter som lipider, proteiner, vitaminer og mineraler. Disse kan fungere som både mat og funksjonelle komponenter (Hjellnes et al., 2020). Globalt er det stor etterspørsel av høykvalitetsproteiner og som nevnt innledningsvis kreves det en bærekraftig produksjon i industrien.

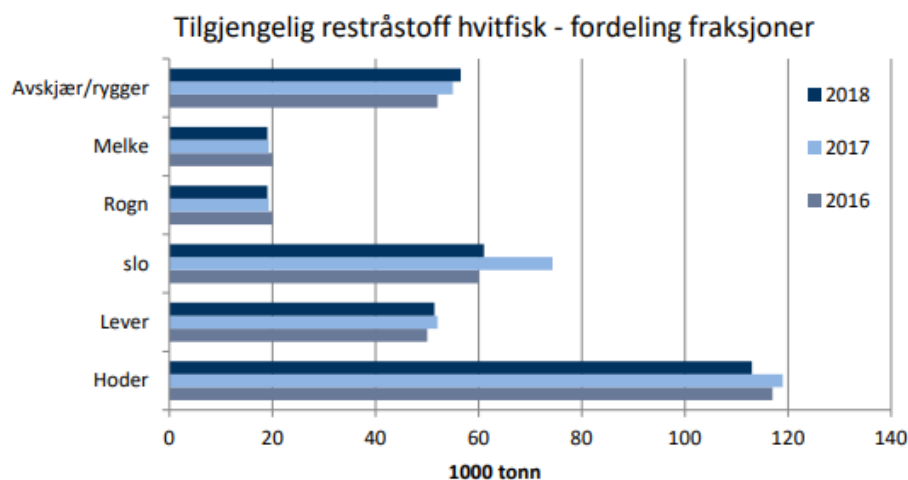
Restråstoff fra fiskeindustrien er gode kilder til høykvalitetsprotein (Le Gouic et al., 2018) siden fisk inneholder alle de essensielle aminosyrene, med et særlig et høyt innhold av lysin og leucin. Av ikke-essensielle aminosyrer er asparaginsyre, glutaminsyre og alanin til stede i store mengder i fiskeproteiner, i tillegg til et høyt innhold av taurin (Ross et al., 2017). Proteiner fra

sjømat har også høy fordøyelighet, normalt over 90%, og dermed er utnyttelsen av aminosyrene i proteinet god (Venugopal, 2018). Utnyttelse av restråstoff fra fiskeindustrien kan dermed være en god kilde til proteiner av høy kvalitet som er produsert bærekraftig og kostnadseffektiv (Le Gouic et al., 2018; Kristinsson, 2007).

Sammenlignet med havbruksnæringen og pelagisk sektor har hvitfisk- og skaldyrsektoren en lavere utnyttelsesgrad av det tilgjengelige råstoffet (figur 2) (Richardsen et al., 2019). Fra hvitfisksektoren ble det i 2018 totalt ilandført 905 000 tonn rundvekt i Norge av artene torsk, hyse, sei, blåkveite, brosme, uer og steinbit. Dette ga totalt 320 000 tonn tilgjengelig restråstoff, hvorav 188 000 tonn ble beregnet som utnyttet og 131 700 tonn ikke utnyttet. Noe som gir en utnyttelsesgrad på 60%.

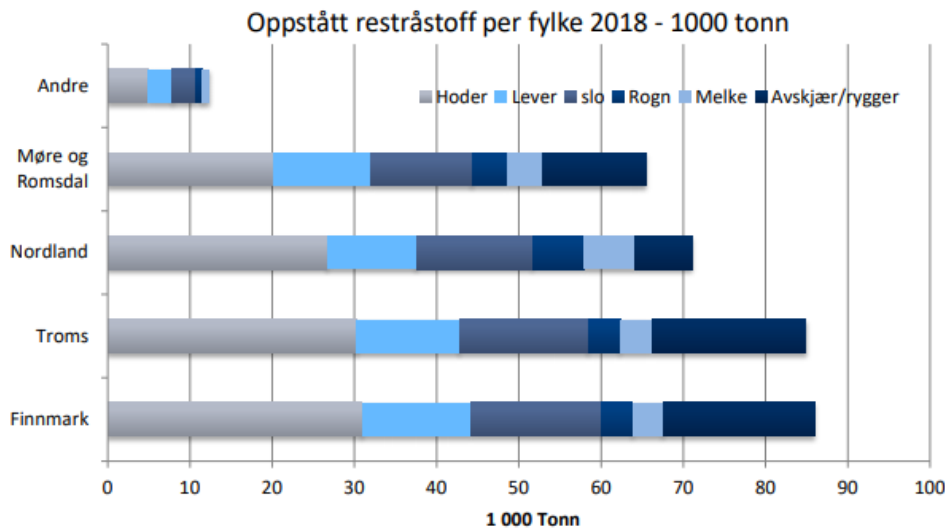


Figur 2 Utnyttelsesgrad av restråstoff (2018) fordelt på sektor. Hentet fra Richardsen et al. (2019).



Figur 3 Oversikt på tilgjengelig restråstoff i hvitfisksektoren fordelt på fraksjoner (2016, 2017 og 2018). Hentet fra Richardsen et al. (2019).

Av tilgjengelig råstoffet fra hvitfisk er det hoder som utgjør det største kvantumet; beregnet til 115 000 tonn i 2018 (figur 3), hvorav 85 000 er i de nordlige fylkene Nordland, Troms og Finnmark (Richardsen et al., 2019). I Nordland, hvor VMP er lokalisert, var det over 25 000 tonn hoder (figur 4).

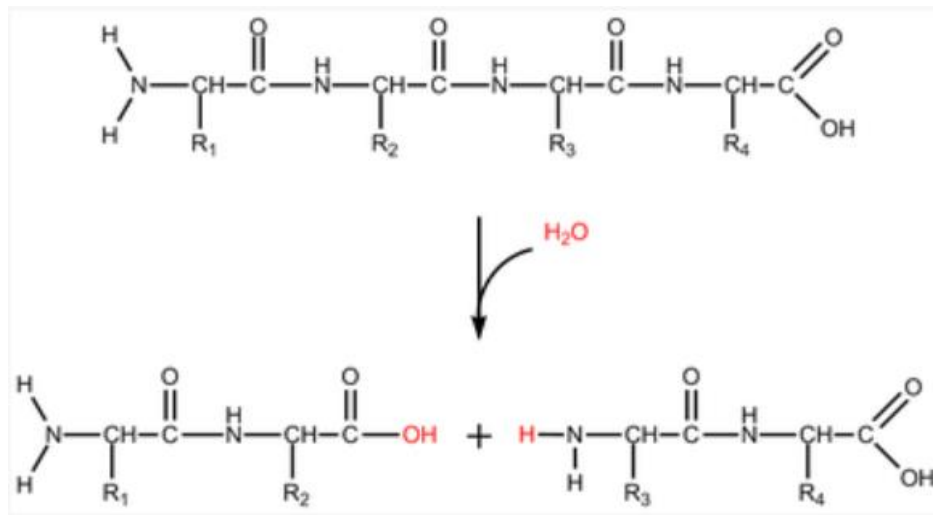


Figur 4 Oversik på oppstått restrstoff fordelt på fylker (2018). Hentet fra Richardsen et al. (2019).

I dag tørkes hodene og sendes nærmest utelukkende til Nigeria. Å basere seg på et marked er sårbart og eksporten er avhengig av gode rammebetingelser. Dersom det kan produseres flere produkter til flere markeder vil det gi en risikoavlasning, samtidig som man dekker et markedsbehov (Vassdal, 2015).

2.4.2 Enzymatisk hydrolyse av proteiner

Frigjøring av bioaktive peptider fra proteiner kan gjøres på flere måter, og enzymatisk hydrolyse er en metode for å utnytte proteiner i restråstoff fra fisk (Gildberg et al., 2002, Slizyte et al., 2005b, Dauksas et al., 2005). Enzymer er biologiske katalysatorer som får reaksjoner til å gå hurtigere, uten enzymer til stede vil reaksjoner gå tregere eller ikke finne sted i det hele tatt (Kristinsson & Rasco, 2000). Ved enzymatisk hydrolyse vil peptidbindingen spaltes og det tas opp et vannmolekyl (figur 5). Det er flere faktorer som må tas hensyn til under en slik hydrolyseprosess slik at sluttprodukt får ønskede egenskaper; valg av råstoff, enzym, vanntilsetning, hydrolysetid, temperatur og pH (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017; Kristinsson & Rasco, 2000).

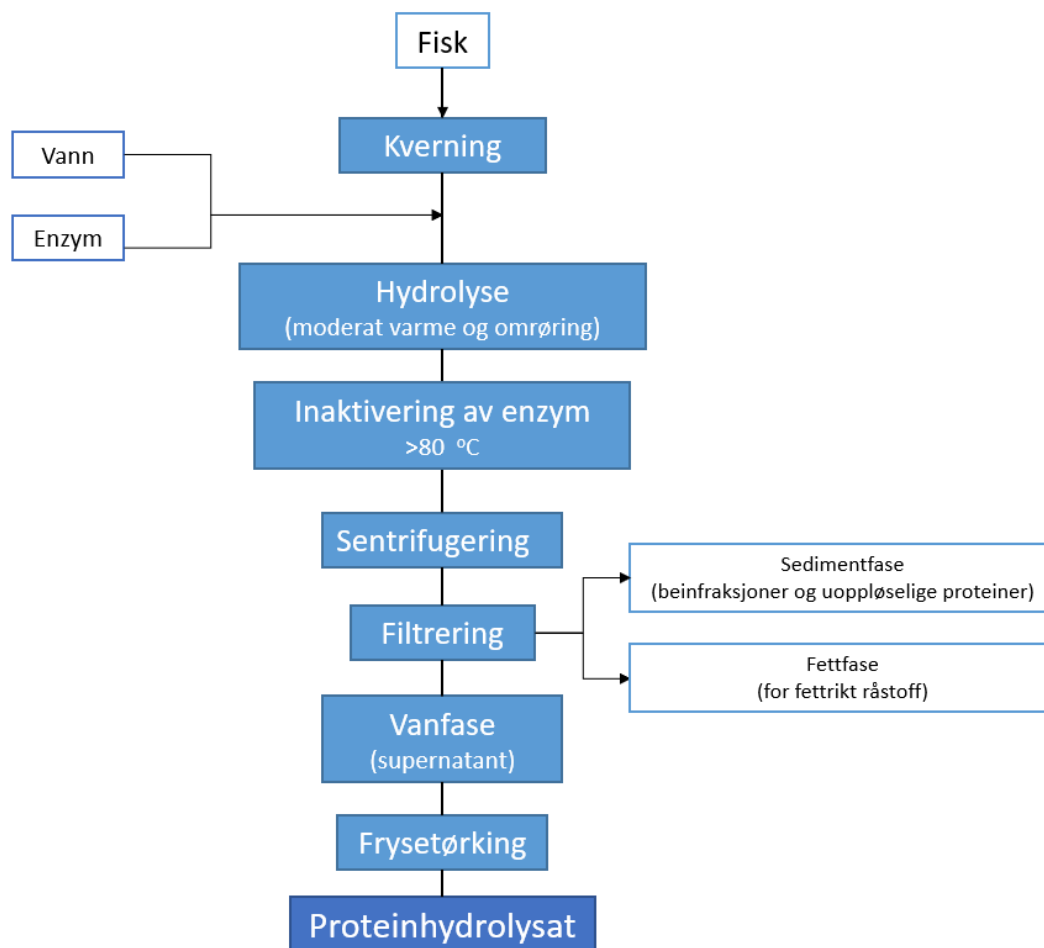


Figur 5 Hydrolysereaksjon innebærer at peptidbindingen mellom aminosyrene i proteinet blir brutt opp. Et vannmolekyl inngår i reaksjonen. Hentet fra *Biotechacademy.dk* (2020)

Enzymer som spalter proteiner kalles proteaser og det tilbys et vidt spekter av disse for industriell produksjon av proteinpulver (hydrolysat). Den næringsmessige verdien til sluttproduktet er avhengig av enzymet som benyttes (Higashi et al., 1965) og enzym velges derfor ut fra de egenskaper man ønsker (høyt utbytte, lite lukt, smak, bioaktivitet og proteininnhold). Ferskt råstoff vil gi et høyere utbytte og hvitere pulver sammenliknet med (Šližyte et al., 2009). Ved enzymatisk hydrolyse må råstoffet først kvernes opp og tilsettes vann for å øke tilgjengeligheten til proteiner (utbytte). I industrien gjøres ofte kompromiss mellom høyt hydrolyseutbytte og stor mengde vann som må fjernes for å oppnå tørrstoff. Fra et økonomisk perspektiv har det vist seg å være fordelaktig med lik mengde fisk og vann (Gildberg, 1992). Fiskevev inneholder proteasehemmere (Hjelmeland, 1983), slik at råstoffet

bør varmes opp før enzymtilsetning for å inaktivere disse proteasehemmerene (Gildberg et al., 2002). Mengde enzym som skal tilsettes er avhengig av aktive enheter (AU/ml) i enzymet. Som regel er 10 AU/g protein tilstrekkelig (B. Vang, personlig kommunikasjon, 2. juli 2019). Lengden på hydrolysering er avgjørende for utbytte og egenskapene til hydrolysatet. Lang hydrolyse fører til økt utbytte, men samtidig reduseres vannholdige egenskaper til hydrolysatet (Šližyte et al., 2009).

Etter hydrolyse vil det være en vann- og sedimentfase, og for fettriakt råstoff vil det også være en fettfase. Vannfasen vil inneholde vannløselige forbindelser, som peptider og aminosyrer, denne kan videre inndampes slik at man får et hydrolysat. Sedimentfase inneholder faste stoffer som bein og en videre implementering av to-trinns hydrolyse kan bli tatt i bruk for å utnytte næringsstoffene i disse beinrestene til humankonsum eller fôr (Arnesen et al., 2017). Figur 6 viser hydrolyseprosessen.



Figur 6 Enzymatisk hydrolyse av restråstoff, modifisert av RUBIN (2003) og Gildberg (1992).

3 Materialer og metoder

3.1 Råmateriale

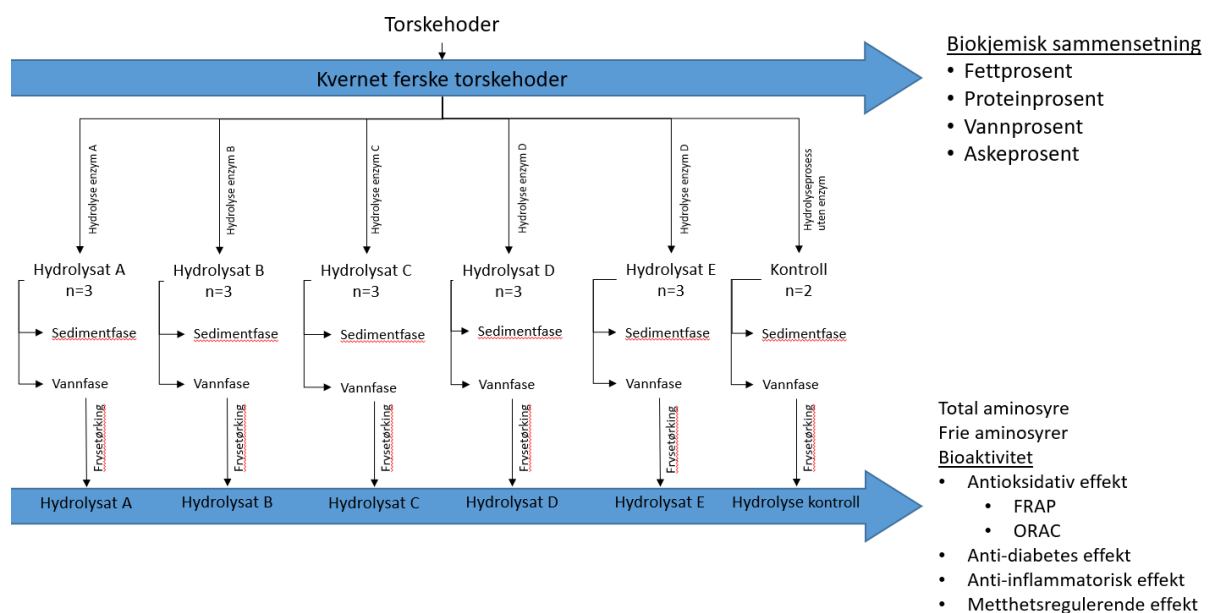
Torsk (*Gadus morhua*) ble fanget med autolinefartøy utfor Vesterålen og levert på Myre fiskemottak for slakting 15. november 2019. Ti hoder ble hakket på Gunnar Klo (Wolfking 200, Danmark) tre timer etter landing, pakket i isopor med kjøleelementer og fraktet til Tromsø med fly samme dag. Råstoffet ble fordelt i zip-lock-posere og lagt i is til de ble finkvernet (Refrigerated mincer A/E32 R, Minerva Omega group s.r.l, Bologna, Italia) og hydrolysert innen en uke etter slakt.

3.2 Enzymer

Enzymene ble valgt ut basert på anbefaling fra Nofima og i dialog med Vesterålen Marine Proteiner AS. Fem ulike enzym eller enzymkombinasjoner (A, B, C, D, E) ble brukt til hydrolyse, i tillegg til en hydrolysekontroll (uten enzym).

3.3 Forsøksdesign

I dette forsøket ble torskeshoder kvernet og biokjemiske egenskaper bestemt. De kvernedede torskeshodene gjennomgikk enzymatisk hydrolyse med fem ulike enzymer/enzymkombinasjoner (EHT), i tillegg en kontroll uten enzymtilsetning som gjennomgikk samme prosess (HK). Vannfasen fra hydrolyse (hydrolysat) ble deretter frysetørket slik at man fikk et tørrstoff. Hydrolysat ble så testet for bioaktive egenskaper; antioksidativ kapasitet og antidiabetes, antiinflammatorisk og metthetsregulerende effekt. I tillegg ble proteininnhold og frie aminosyrer i EHT og HK kartlagt. I figur 7 er forsøksdesign illustrert.



Figur 7 Forsøksdesign for oppgaven. Biokjemiske egenskaper til torskeshoder skal bestemmes og gjennomgå enzymatisk hydrolyse, i tillegg en kontroll uten enzym. Vannfase fra hydrolyse skal bli frysetørket slik at det blir tørrstoff. Biokjemiske egenskaper, totalt protein og frie aminosyrer skal bestemmes i hydrolysat.

3.4 Metoder

3.4.1 Bestemmelse av enzymaktivitet

Enzymaktiviteten ble testet ved å bruke en metode fra Sigma (2020), modifisert av NOFIMA AS. Tyrosin ble brukt som standard med konsentrasjon fra 0 til 0,275 mM.

Kasein (0,65%, 0,5ml) ble inkubert (5 °C) i 5 minutter, før ulike mengder (0,01 ml, 0,02 ml, 0,06 ml, og 0,10 ml) enzymløsning fortynnet i *Enzyme Diluent Solution* ble tilsatt og inkubert i nøyaktig 10 minutter (37 °C). Triklorreddiksyre (0,5 ml) ble så tilsatt og prøvene ristet med Vortex Reax Torp (Heidolph, Instruments, Schwabach, Tyskland). *Enzym Diluent Solution* ble tilsatt slik at totalvolumet ble 0,1 ml før prøvene ble videre ristet med Vortex og inkubert i 30 minutter (37 °C). Prøvene ble deretter raskt avkjølt i isvann i ca. 10 minutter og sentrifugert (5424 R, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 15871 g i 5 minutter. I nytt eppendorfrør ble supernatanten (0,2 ml) blandet med 0,4 ml 500mM Na-karbonat og 0,1 ml 0,5M Folin & Ciocalteu'S phenol reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA) og ristet i Vortex. Deretter ble prøvene inkubert (37 °C) i 30 min, raskt avkjølt i isvann og sentrifugering ved 13000 rpm i 5 minutter (4 °C), supernatanten ble overført til plastkyvette og absorbansen målt ved 600nm (Genesys 20, Thermo Scientific, MA, USA).

Fra tyrosinfortynningene ble det laget en «best fit» standardkurve med stigningsligning for OD-verdi minus blank mot µmol tyrosin. OD-verdiene til prøvene ble så satt inn i ligningen og µMol tyrosin ble regnet ut.

Følgende ligning ble brukt for å bestemme enzymaktivitet (aktive enheter/ml enzymløsning)

$$Units/ml = \frac{\mu\text{Mol Tyrosin} \times 11}{\text{volum enzym} \times 10 \times 3}$$

3.4.2 Enzymatisk hydrolyse av torskeshoder

Omtrent 100 g (n=3) kvernet torskeshode ble blandet med 100 ml vann og varmet opp til 50 °C med omrøring før enzym ble tilsatt (10 U/g protein). Etter en time omrøring på 50 °C ble temperaturen økt til 90 °C i 20 minutter. Blandingen ble deretter sentrifugert i 20 minutter på 5927 g (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter Life Sciences, IN, USA) og filtrert (standard kaffefilter). Vannfasen ble fryst ved -70 °C og deretter frysetørket (Genesis EL 35, VirTis, SP Scientific, NY, USA).

Utbytte ved enzymatisk hydrolyse ble beregnet som proteinutbytte ved bruk av følgende formel:

$$\text{Proteinutbytte} = \frac{\text{gram protein etter enzymatisk hydrolyse}}{\text{gram protein i råstoff}} \times 100\%$$

3.4.3 Bestemmelse av proteininnhold

Analyse av proteininnhold (proteinbundet AA) ble gjennomført som beskrevet av Moore og Stein (1963). Frysetørket hydrolysat (40 mg) (n=3) ble tilsatt destillert H₂O (0,7 ml), 20 mM nor-leucine (0,5 ml) (Sigma Aldrich, MO, USA) og 1,2 ml 37% HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland). Deretter ble prøvene flushet med N₂-gass (AGA AS, Oslo, Norge) i 10-15 sekunder og inkubert ved 110 °C i 22-24 timer. Videre ble prøvene sentrifugert i 3 minutter ved 18407 g (sentrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) og 100 µl supernatant ble dampet tørr med N₂-gass, før 1 ml loading buffer ble tilsatt (Lithium citratbuffer med pH 2,2, Biochrom Co. Cambridge, Storbritannia).

For å analysere materiale ble det brukt kromatografisk separasjon med ionebytterkolonne. Prøvene ble analysert med en Biochrom 30 aminosyreanalysator (Biochrom 30+ aminosyreanalysator, Biochrom Co., Cambridge, Storbritannia) med litiumcitrat kolonne og postkolonne-derivatisering med ninhydrin. I aminosyreanalysatoren ble aminosyrene separert i kolonnen på en ionebytter med trinnvist bufferskifte, og derivatisert med ninhydrin og detektert ved 440 og 540 nm. Ved hjelp av kjente standarder ble aminosyrene identifisert basert på retensjonstiden, og mengden ble bestemt ved hjelp av norleucin som internstandard.

3.4.4 Bestemmelse av frie aminosyrer

Analyse av frie aminosyrer ble utført som beskrevet av Mæhre et al. (2016) modifisert fra Mierkre-Kleymeyer et al. (2008). Frysetørket hydrolysat (200 mg) eller fiskevev (1 g) ble tilsatt 1 ml 20 mM nor-leucine (intern standard, Sigma. Aldrich, MO, USA) og 9 ml destillert H₂O. Prøvene ble homogenisert med ultraturrax (Ultra Turrax T25 basic, IKA, Staufen, Tyskland)

(9500 rpm), tilsatt 1 ml 35% sulfosalisylysyre (SSA) og sentrifugert i 10 minutter ved 4000 x g (4 °C). En ml av supernatanten ble ytterligere sentrifugert ved 9391 g (sentrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) i 10 minutter før 200 µl supernatant og 800 µl loading buffer ble overført til analyserør og analysert på aminosyreanalysatoren.

3.4.5 Bestemmelse av fettinnhold

Fettinnholdet ble bestemt gravimetrisk ved bruk av Folch's metode (Folch et al., 1956) med noen modifikasjoner.

Omtrent 1 gram prøvemateriale ble veid ut og tilsatt 19 mL DCM:MeOH (2:1,v:v) før risting i en ristemaskin (MultireaxHeidolph Instruments, Schwabach, Tyskland) i 30 minutter. Deretter ble løsningen filtrert gjennom et (597 ½, Whatman GE Healthcare, IL; USA) og 4 ml 09% NaCl ble tilsatt før blanding ved bruk av en vortex Reax Top (Heidolph Instruments, Schwabach, Tyskland). Prøvene ble videre sentrifugert på 2000 g (Multifuge 1 S-R, Thermo Scientific, MA, USA) i 10 minutter og diklormetan-lipid-fasen ble overført til nye forhåndsveide glassrør og dampet til tørrhet ved bruk av nitrogen-gass. Rørene ble veid på nytt og fettinnholdet ble beregnet ved bruk av følgende formel:

$$\text{Fett\%} = \frac{(\text{Rør med innhold} - \text{rør uten innhold})}{\text{innveid mengde prøve}} \times 100\%$$

3.4.6 Bestemmelse av vann- og askeinnhold

Vann- og askeinnhold ble bestemt som forklart i AOAC 950.46b og AOAC 938.08 (Horwitz, 2004). Prøvene (10g, n=3) ble eid i forhåndsveide aluminiumsbeger og tørket i varmeskap (Termaks-Labolytic AS, Trondheim, Norge) ved 105 °C til konstant vekt ble oppnådd (2-5 døgn). Aluminiumsbegrene med prøve ble veid på nytt og vanninnholdet (%) beregnet med følgende formel:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Våttvekt (g)} - \text{Tørrvekt (g)}}{\text{Våttvekt (g)}} \times 100\%$$

Prøvene ble forbrent i forbrenningsovn (Nabertherm GmbH, Program Controller S27, Lilienthal, Tyskland) ved 560 °C i 16 timer og veid. Askeinnholdet (%) ble beregnet med følgende formel:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt etter forbrenning (g)}}{\text{Våttvekt}} \times 100\%$$

3.4.7 Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved hjelp av oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved bruk av Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay ble gjennomført som beskrevet av Dávalos et al. (2004). Hydrolysatene ble fortynnet i fosfatbuffer (75 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) og 25 µl ble tilsatt 120 µl fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) (88nM) i en Nunc 96-brønners plate svart (Thermo Scientific, MA, USA). Mikroplaten ble inkubert i 15 minutter (37 °C) og deretter ble 50 µl 38mM 2,2'-azobis-(isobuttersäureamidin)-dihydroklorid (AAPH) tilsatt hver brønn. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, MO, USA) fortynnet i fosfatbuffer ble brukt som standard med konsentrasjon fra 5 til 50 µM.

Prøvene ble avlest kinetisk hvert minutt i 35 minutter ved 485 nm eksitasjon og 520 nm emisjon (SpectraMax i3, Molecular Devices, USA). Mikroplaten ble automatisk ristet 5 sekunder før første avlesing og 3 sekunder i forkant av hver avlesing. En regresjonsligning mellom troloxxkonsentrasjon og areal under kurven (AUK) ble brukt for å beregne ORAC-verdiene. For å uttrykke ORAC-verdi ble µmol Troloxequivalenter (TE)/g tørrstoff brukt.

3.4.8 Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved hjelp av ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

Bestemmelse av antioksidativ kapasitet ved bruk av FRAP-assay ble gjennomført som tidligere beskrevet Benzie & Strain, (1996). FRAP-løsningen ble laget ved 50 ml acetatbuffer (1,505 g C₂H₃NaO₂, 8 ml C₂H₄O₂ og 500 ml dH₂O), 5 ml TPTZ (10mM i 40M HCl) og 5 ml FeCl₃•6H₂O (19Mm). Løsningen ble opparbeidet daglig og inkubert ved 37 °C frem til bruk.

Trolox ble brukt som standard og ble først oppløst i metanol til 1mM, før videre fortynning i vann til konsentrasjon fra 0 til 1000 µM. Prøve fortynnet i dH₂O eller standard (10 µl), dH₂O (30 µl) og FRAP-løsning (300 µl) ble tilsatt i brønn i mikroplate. Mikroplaten ble inkubert ved i 30 minutter (37 °C) og deretter avlest ved 593 nm (SpectraMax i3, Molecular Devices, USA). Antioksidativ kapasitet ble presentert som µmol TE/g tørrstoff.

3.4.9 Bestemmelse av antidiabeteseffekt ved hjelp av hemming av protein tyrosin fosfatase 1 B (PTP1B) assay

Enzymatisk protein tyrosin fosfatase 1B (PTP1B) assay ble gjennomført som forklart av Minor (2006).

Assaybuffer ble laget med 25 mM Hepes (2,975 g), 50 mM NaCl (1,461 g) 2 mM Dithiothreitol (DTT) (0,32g), 2m5 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) (0,365 g) og 0,01 mg/ml bovint serumalbumin (BSA) (5 mg) løst i destillert H₂O (pH 7,2) og løsningen ble oppbevart i kjøleskap (4 °C) frem til bruk. Fortynnet hydrolysat, inhibitor (80 µl PTP1B-inhibitor fortynnet i 5 ml assaybuffer) eller kontroll (25 µl) ble tilsatt brønnene på en sort, flatbrønnet 96-brønners mikroplate (Nunc, 437111). Alle brønnene fikk så tilsatt 50 µl PTP1B (31,2 ng/ml fortynnet i assaybuffer) og platen ble inkubert mørke i 30 minutter (37 °C) før det ble tilsatt 25 µl 10 µM 6,8-difluoro-4-methylumbelliferylfosfat (DiFMUP). Deretter ble platen på ny inkubert i mørke i 10 minutter (37 °C) før fluorescens ble målt ved eksitasjon 360 nm og emisjon 465 nm i en DTM 880 Multimode Detector.

Prøvene ble regnet som aktive dersom enzymaktiviteten var <30% sammenlignet med kontroll, usikre dersom enzymaktivitet var 30-50% av kontroll og inaktiver dersom enzymaktiviteten var >60% sammenlignet med kontroll.

3.4.10 Bestemmelse av metthetsregulerende effekt ved å studere sekresjon av glukagonliknende peptid-1 (GLP-1)

Tabell 3 Instrumenter, cellelinje, medium og reagenser brukt i GLP1-assay

Instrumenter	ID/produktnr.	Distributør, land
Lysmikroskop		Leica Microsystem, Tyskland
Envision HTS-plateleser		PerkinElmer life and analytical sciences, Turku, Finland
96-brønners plate		Nunclon™ Delta Surface (Thermo Scientific, Roskild, Denmark)
Cellelinje/medium		
RPMI 1640	FG1385	Biochorm
NCI-H716		LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
Reganser		
FBS	S1860-500	Biowest, Nuaille, France
L-glutamine		Sigma, St. Louis, MO
Penicillin		Sigma, St. Louis, MO
Streptomycin		Sigma, St. Louis, MO
Geltrex™ basement membrane matrix, LDEV-fri	354234	Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY
Liraglutide		Victoza®, Novo Nordisk
BSA	A2153	Sigma, St. Louis, MO
Krebs-Ringer bikarbonat buffer		In-house made, Marbio
GLP 7-36a elisa KIT, Human	EHGLP	Thermo Scientific, Frederick, MD

Sekresjon av glukagonliknende peptid-1 (GLP-1) ble studert ved bruk av en human cellemodell med NCI-H716 cellelinje som beskrevet av Raylene et al. (2001). Cellene ble dyrket og var klare til analyse ved en konsentrasjon $> 5 \times 10^5$ celler/ml.

I hver brønn i en 96-brønnsplate ble 20 μ l Geltrex™ basement membrane matrix, LDEV-fri tilsatt, pipette og platen ble holdt kaldt under prosedyretrinnene utenom inkuberingene. Platen ble lett ristet og inkubert i 30 minutter (37 °C). Celler (3×10^6) i 10 ml DMEM-medium (2mM L-glutamin, 10% FBS, 100UI/ml penicilin og 100 ug/ml strptomycin) ble tilsatt i 96-brønnsplaten, til en konsentrasjon på 3×10^4 celler i hver brønn. Platen ble inkubert (37 °C) og etter to døgn ble mediet i brønnene ble erstattet med hydrolysatene løst i Krebs-Ringer

bikarbonatbuffer (KRB-buffer) og inkubert i 2 timer (37° C). Supernatanten ble overført til nytt rør og lagret på -80 °C inntil ELISA-assay ble gjennomført.

ELISA-assay: Human GLP 7-36a

ELISA-assay ble gjennomført ved å bruke humant GLP-36a ELISA kit for å bestemme sekresjon av GLP-1. Prøve eller standard (100 µl) ble tilsatt i brønn på *Anti Human GLP 7-36a precoated 96 well plate* og ble inkubert ved romtemperatur i 2,5 time med risting. Løsningen ble fjernet og brønnene ble vasket med vaskebuffer (4x300 µl/brønn) før 100 µl av forberedt *biotinylated antibody* ble tilsatt i hver brønn og platen ble videre inkubert ved romtemperatur i 1 time, med risting. Løsningen ble fjernet og brønnene ble vasket ytterligere vasket med vaskebuffer (4x300 µl/brønn). Streptavidin-HRP løsning (100 µl) ble tilsatt i hver brønn og platen ble inkubert i 45 minutter ved romtemperatur, med risting. Løsningen ble fjernet og brønnene ble vasket (4x300 µl/brønn). TMB-substrat (100 µl) ble tilsatt hver brønn og platen ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter med lett risting før 50 ul STOP-løsning ble tilsatt og absorbanse ble avlest på 450 nm i Envision HTS plate reader (software workout 2.5 R3).

Som standard ble Human GLP-7-36a brukt med konsentrasjon fra 20 ng/µl til 0,1563 µg/ul og en blank prøve. For å bestemme sekresjon av GLP-1 ble Liraglutide (Victoza®) brukt til sammenligning. Det var to ulike konsentrasjoner av prøvene (1µg/ml og 1mg/ml) for å avdekke dose-avhengig respons.

3.4.11 Bestemmelse av antiinflammatorisk effekt ved å studere hemming av LPS-indusert uttrykk av TNF

Tabell 4 Instrument, celler, medium og reagenser brukt til antiinflammatorisk assay.

Utstyr/Instrumenter	ID	Distributør, land
Sentrifuge/Multifuge 1S		Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Bürker tellekammer,		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sanyo CO2 inkubator MCO-18AIC		Panasonic biomedical, Japan
96-brønners plate		Corning, New York, USA
Lysmikroskop		Leica Microsystem, Tyskland
Cellelinje/medium, ID		
RPMI, lavt endotoksin <0,5 EU/ml	FG1385	Biochorm
THP-1 celler		ATCC no. TIB-202
Gentamycin (10 mg/mL),	A2712	Merck, New Jersey, USA
FBS ultralow endotoxin, S1860-500		Biowest
Reagenser, ID		
PMA,	P1585	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Trypan blå		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS, med lav endotoksinnivå	D8537	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
LPS, L2630	L2630	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Antiinflammatorisk effekt ble undersøkt ved bruk av THP-1-celler, en human monocyttilignende cellelinje etablert fra en akutt leukemi pasient, dyrket under sterile betingelser. Cellene ble kontrollert i lysmikroskop og cellekulturen overført til 50 ml falconrør før sentrifugering i Multifuge 1S i 5 minutter ved 150 g. Deretter ble vekstmediet fjernet og cellepelletten resuspendert i 25 ml forvarmet (37 °C) Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI). Konsentrasjonen av celler ble estimert ved å overføre 50 µl cellesuspensjon til et falconrør med 450 µl trypan blå (og blandet godt) og deretter 10 µl overført i Bürker tellekammer, konsentrasjonen av levende celler ble bestemt under lysmikroskop. En cellesuspensjon med tetthet 10^6 celler/ml ble laget og 50 ng/ml phorbol 12-myrisate 13-acetate (PMA) ble tilsatt cellene.

Cellesuspensjon (100 µl) ble tilsatt hver brønn i en 96-brønners plate og inkubert i Sanyo CO₂ inkubator (37 °C, 5% CO₂) i 48 timer med kontroll i mikroskop etter 24 timer. Deretter ble cellene vasket med endotoksintestet PBS og tilsatt nytt vekstmedie uten PMA og inkubert i 24 timer (37 °C, 5 % CO₂).

Tilsetning av prøver

Følgende kontroller ble brukt; LPS-kontroll med 1 ng/ml LPS løst i RPMI medium og cellekontroll med 100 µl cellesuspensjon. Før prøvene kunne tilsettes ble 80 µl RPMI (37 °C) tilsatt cellene, for cellekontroll ble det tilsatt 100 µl RPMI og LPS-kontroll 90 µl RPMI. Hydrolysat (10 µl) fortynnet i dH₂O ble tilsatt cellene og platen ble inkubert (37 °C, 5% CO₂) i 1 time før 10 µl LPS (10 ng/ml) ble tilsatt samtlige brønner utenom cellekontroll og inkubert i 6 timer (37 °C, 5% CO₂). Brettet ble lagret ved -80 °C frem til ELISA-assay ble kjørt.

Deteksjon av TNF med ELISA assay: Human TNF-alfa

Tabell 5 Instrument og reagenser brukt i ELISA-assay for deteksjon av TNF.

Utstyr/Instrumenter	ID	Distributør, land
Nunc MaxiSorp 96-brønners ELISA plate	735-0083	VWR International AS, Pennsylvania, USA
AquaMax ® mikroplatevasker		Molecular devices, California, USA
Platerister TiMax 5 Nr. 61666 BX 00188		Edmund Bühler GmbH, Tyskland
DTX880 plateleser		Beckman Coulter, California, USA
Reagenser, ID		
Tween ® 20	P1379	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	A2153	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Anti-human TBF-alpha purified	14-7348-85	eBioscience, San Diego, CA
ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase		Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
Human TNF alpha recombinant protein	14-8329-63	eBioscience, San Diego, CA
Anti-Human TNF alpha Biotin	13-7349-85	eBioscience, San Diego, CA
Phosphatase substrate (pNPP)	P5994	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

ELISA-assay ble kjørt ved å følge metode for «ELISA assay; Human TNF-alpha». (Lind et al., 2013)

Først ble bufferløsningene laget, TBS-buffer ble laget med TRIZMA base (12,1 g) og NaCl (88 g) løst i 1 liter destillert H₂O, pH ble justert til 7,4 med HCl og bufferen ble fortynnet 1:10. Dietanolaminbuffer (1M) ble laget MgCl₂ (100 mg) og dietanolamin (97 ml) løst i 1 liter destillert H₂O, pH ble justert til 9,8 med HCl. Deretter ble vaskebuffer (500 µl 0,5% Tween 20 i 1 liter TBS-buffer), blokkingsbuffer (TBS med 2% BSA) og assayløsning (TBS med 1% BSA) laget.

Antistoff anti-human TNF-alpha Purified ble fortynnet til 2 µg/ml TBS og 100 µl ble tilsatt brønnene i en Nunc MaxiSorp 96-brønners ELISA plate, før platen ble inkubert i kjøleskap til neste dag. Platen ble så vasket med vaskebuffer i AquaMax ® mikroplatevasker og 200 µl blokkings-buffer ble tilsatt hver brønn før platen ble inkubert ved romtemperatur i 1 time med risting og deretter ble vaskerutinen gjennomført på nytt.

Brønnene ble tilsatt prøver med LPS (5µl), uten LPS (50 µl) og standard, deretter ble det tilsatt assayløsning slik at totalvolum ble 100 µl i hver brønn. I tillegg var to brønner blank med bare assayløsning. Platen ble inkubert ved romtemperatur i to timer med risting og deretter vasket.

Anti-human TNF-alpha Biotin var fortynnet til 3 µg/ml i assayløsning og 100 µl ble tilsatt hver brønn før platen ble inkubert ved romtemperatur i 1 time med risting før ble platene vasket. ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase (pNPN) ble fortynnet 1:20000 og 100 µl ble tilsatt hver brønn før platen ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur med risting. Samtidig ble pNPN løst opp i 1 M dietanolamin buffer (1mg/ml) og løsningen sto 15 minutter før bruk. Platen ble så vasket i AquaMax4000 ved program «ELISA SOAK WASH» og deretter ble 100 µl pNPN substratløsning tilsatt hver brønn og inkubert i 45 minutter ved romtemperatur før platen ble avlest ved 405 i DTX880 plateleser med protokoll «E-AP ELISA 405 nm».

LPS-kontroll var et mål på fullstendig produksjon av TNF. For å tolke resultatene ble det laget en standardkurve basert på OD-verdiene til TNF fortynningsserien og TNF verdien til prøvene ble funnet og multiplisert med 20 siden prøvene var fortynnet 1:20. Prosent hemming ble funnet med følgende ligning

$$\% \text{ hemming} = 100 - \frac{TNF - ALPHA VERDI}{LPS KONTROLL} \times 100\%$$

Resultatene ble vurdert som følge:

Aktiv > 50% hemming

Usikker 40-50 % hemming

Inaktiv < 40% hemming

4 Resultater

4.1 Biokjemisk sammensetning av råmaterialet

Den biokjemiske sammensetningen av torskehoder ble bestemt ved hjelp av biokjemiske analyser på det kvernedede råstoffet (10 hoder). Fettinnholdet ble bestemt gravimetrisk ved Folch's ekstraksjon og vann og aske ble bestemt ved tørking og forbrenning. Proteininnhold ble analysert av ekstern lab (NOFIMA) ved Dumas metode. Torskehoder hadde et totalt innhold av fett, protein, vann og aske på $0,87 \pm 0,7$, $14,9^*$, $71,9 \pm 0,0$ og $15,3 \pm 0,0$.

Tabell 6 Biokjemisk sammensetning av torskehoder. Resultater er oppgitt i gjennomsnitt \pm standardavvik

	Fett (%) (n=5)	Protein* (%)	Vann (%) (n=3)	Aske (%) (n=3)
Torskehoder	$0,8 \pm 0,7$	14,9	$71,9 \pm 0,00$	$15,3 \pm 0,00$

*Proteininnhold analysert av ekstern lab (NOFIMA)

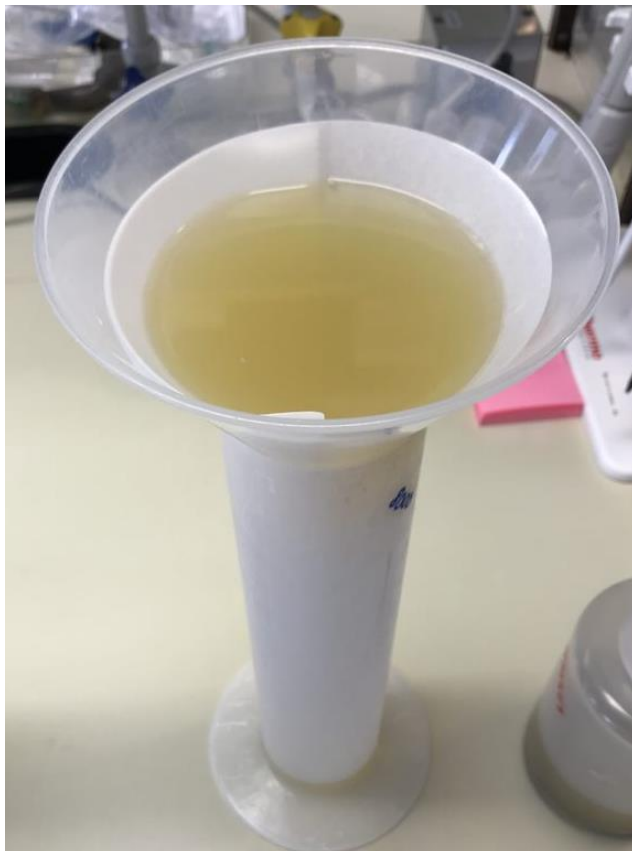
4.2 Enzymatisk hydrolyse

Aktiviteten til enzymene ble bestemt ved bruk av Sigma non-specific protease activity assay. Basert på aktiviteten (UA/ml proteaseløsning) ble det beregnet mengde (ml) som skulle tilsettes under hydrolyse. Beregninger for enzymaktivitet er presentert i vedlegg 1.

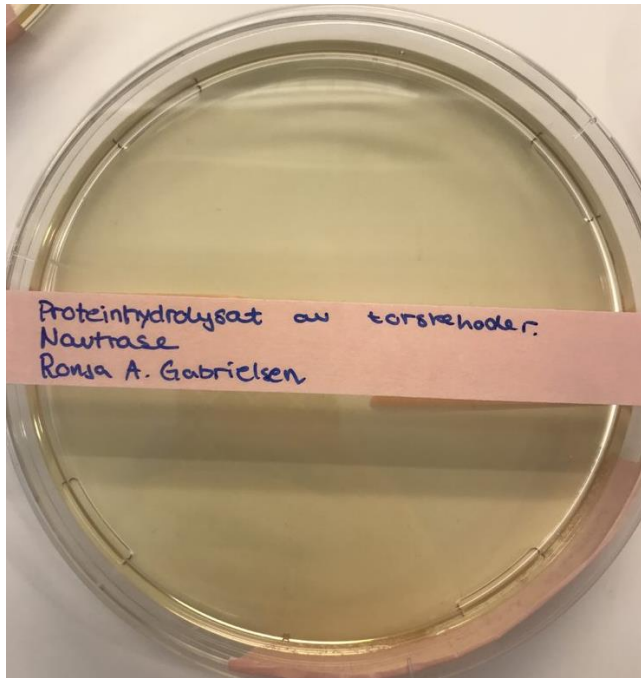
Kvernedede torskehoder ble hydrolysert enzymatisk ved bruk av fem forskjellige enzym eller enzymkombinasjoner (A, B, C, D og E). I tillegg ble det laget en hydrolysekontroll (HK) uten enzym. Figur 8 til 11 viser prosessen fra hakkede torskehoder frem til frysetørket hydrolysat.



Figur 8 Torskehoder ble hakket grovt før kverning med en Refrigerated mincer.



Figur 9 Etter hydrolyse ble hydrolysatet filtrert gjennom et standardkaffefilter, og resulterte i en vann- og en sedimentfase.



Figur 10 Vannfasen av hydrolysatet ble fryst ved -70°C før frysetørrking.



Figur 11 Vannfasen ble frysetørket til et proteinpulver. Dette ble videre finmalt og holdt fryst frem til videre analyser. Øverst til venstre og nederst i midten er HK, som har en betydelig mørkere farge.

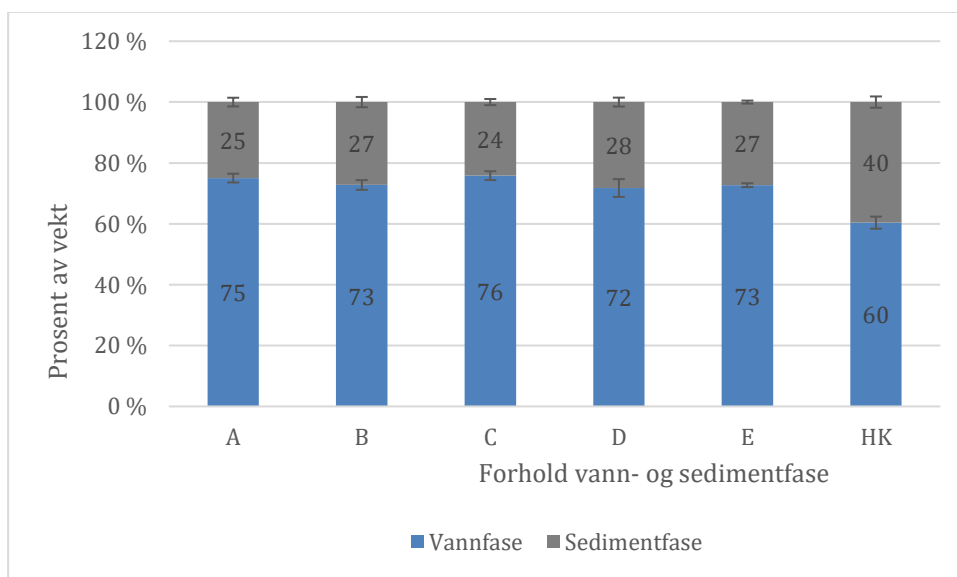
4.2.1 Utbytte ved enzymatisk hydrolyse

Utbytte ved enzymatisk hydrolyse ble beregnet som proteinutbytte og som frysetørket hydrolysat per g råstoff. Proteinutbyttet (tabell 7) etter varierte mellom 30,8% og 25,5%, som var høyere sammenlignet med HK (18,2%).

Tabell 7 Proteinutbytte ved enzymatisk hydrolyse i prosent for EHT og HK

	Proteinutbytte					
Hydrolysat	A	B	C	D	E	HK
Proteinutbytte (%)	28,2	27,9	30,8	25,1	25,9	18,2

Prosentvist forhold mellom vann- og sedimentfase etter sentrifugering ble beregnet (figur 12). Etter hydrolyse hadde HK en betydelig høyere andel sedimentfase og lavere andel vannfase, sammenlignet med EHT.



Figur 12 Fordeling (g) av vannfase og sedimentfase beregnet fra de ulike enzymatiske hydrolysene og hydrolysekontrollen. Resultatet er presentert som gjennomsnittl +/- standardavvik (n=3).

4.2.2 Visuell vurdering av hydrolysat

Fargen på hydrolysatene ble vurdert visuelt. Det var en betydelig mørkere farge på HK sammenlignet med de hydrolyserte prøvene (figur 11 og 13)



Figur 13 Ferdig frysetørket hydrolysat. HK hadde en betydelig mørkere farge sammenlignet med hydrolysatene.

4.3 Proteininnhold og aminosyresammensetning av hydrolysatene

Proteininnhold og aminosyresammensetningen i hydrolysatene ble bestemt ved hjelp av aminosyreanalyse. For beregning av proteininnhold ble de 17 aminosyrene som er proteinbundet subtrahert et vannmolekyl og summert.

4.3.1 Proteininnhold

Proteininnholdet varierte mellom 525-547 mg/g frysetørket hydrolysat (tabell 8). Resultatene viser at EHT har et høyere proteininnhold sammenlignet med HK (480 mg/g). Av prøvene var det EHT-C som hadde det høyeste proteininnholdet (546, mg/g), mens EHT-B hadde laveste innholdet (525 mg/g). Av essensielle AA var det EHT-A som hadde det høyest innholdet (183,7 mg/g) og EHT-D hadde det laveste innholdet av EAA (160,3 mg/g). Essensielle og ikke essensielle aminosyrer var lavest i HK (136 mg/g og 344 mg/g).

Tabell 8 Aminosyresammensetning i frysetørket hydrolysat (n=3). Inndelt i ni essensielle AA (for mennesker) og ti ikke-essensielle AA.

Aminosyrer	(mg/g hydrolysat)					
	A	B	C	D	E	HK
Essensielle AA						
His Histidin	10,2 ± 0,8	4,7 ± 4,7	9,4 ± 1,5	8,5 ± 0,7	9,2 ± 1,5	7,7 ± 0,1
Thr Theronin	22,8 ± 0,4	21,5 ± 1,0	23,0 ± 1,2	20,8 ± 2,0	20,9 ± 2,0	17,9 ± 0,2
Ile Isoleucin	15,7 ± 0,2	14,2 ± 1,5	15,3 ± 1,0	13,5 ± 1,8	13,3 ± 2,0	10,7 ± 0,0
Leu Leucin	34,5 ± 0,5	33,9 ± 0,5	35,1 ± 1,6	32,0 ± 2,9	31,5 ± 3,1	25,1 ± 0,4
Val Valin	19,6 ± 0,2	18,1 ± 1,4	19,4 ± 1,2	17,1 ± 1,8	16,8 ± 1,9	14,1 ± 0,0
Lys Lysin	39,3 ± 1,1	38,7 ± 0,9	39,5 ± 2,0	36,8 ± 2,4	36,5 ± 3,2	29,0 ± 0,4
Met Metionin	17,6 ± 0,3	14,7 ± 1,3	17,5 ± 1,0	16,3 ± 1,2	16,4 ± 1,2	14,7 ± 0,5
Phe Fenylalanin	18,1 ± 0,3	15,7 ± 0,8	17,4 ± 1,4	15,4 ± 1,8	15,6 ± 2,0	14,4 ± 0,2
Trp Tryptofan**	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Σ Essensielle AA	183,7 ± 5,3	164,5 ± 4,6	176,6 ± 10,7	160,3 ± 18,8	162,1 ± 18,8	136,0 ± 4,1
Ikke essensielle AA						
Arg Arginin	54,9 ± 1,8	48,7 ± 6,6	53,7 ± 0,6	54,9 ± 0,2	55,7 ± 1,3	49,2 ± 3,3
Ala Alanin	45,5 ± 1,1	46,5 ± 0,2	47,5 ± 0,4	46,8 ± 0,4	46,4 ± 0,2	44,2 ± 1,5
Asp Asparaginsyre*	37,5 ± 0,7	36,4 ± 1,2	38,5 ± 1,1	35,8 ± 2,1	35,8 ± 2,4	30,7 ± 0,4
Cys Cystein	1,9 ± 1,1	0,7 ± 0,7	0,9 ± 0,9	ID	1,1 ± 1,1	ID
Gly Glysin	85,1 ± 2,4	90,4 ± 1,6	88,6 ± 1,5	91,9 ± 4,4	91,5 ± 1,5	95,0 ± 4,5
Glu Glutamatsyre*	88,3 ± 2,0	88,7 ± 1,5	92,7 ± 1,5	89,6 ± 3,2	87,6 ± 2,9	73,3 ± 2,5
Pro Prolin	46,3 ± 1,1	49,4 ± 1,0	48,3 ± 0,2	50,9 ± 0,6	51,8 ± 0,0	51,8 ± 1,8
Ser Serin	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Tyr Tyrosin	6,0 ± 4,2	3,0 ± 2,9	ID	ID	1,9 ± 1,9	2,3 ± 2,3
Tau Taurin***	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Σ Ikke essensielle AA	359,4 ± 7,6	360,6 ± 7,4	370,2 ± 2,8	369,9 ± 1,3	369,9 ± 5,6	344,3 ± 13,2
Σ Proteinbundet AA	543,1 ± 11,5	525 ± 12,0	546,8 ± 13,5	530,3 ± 13,3	532,0 ± 24,4	480 ± 17,3

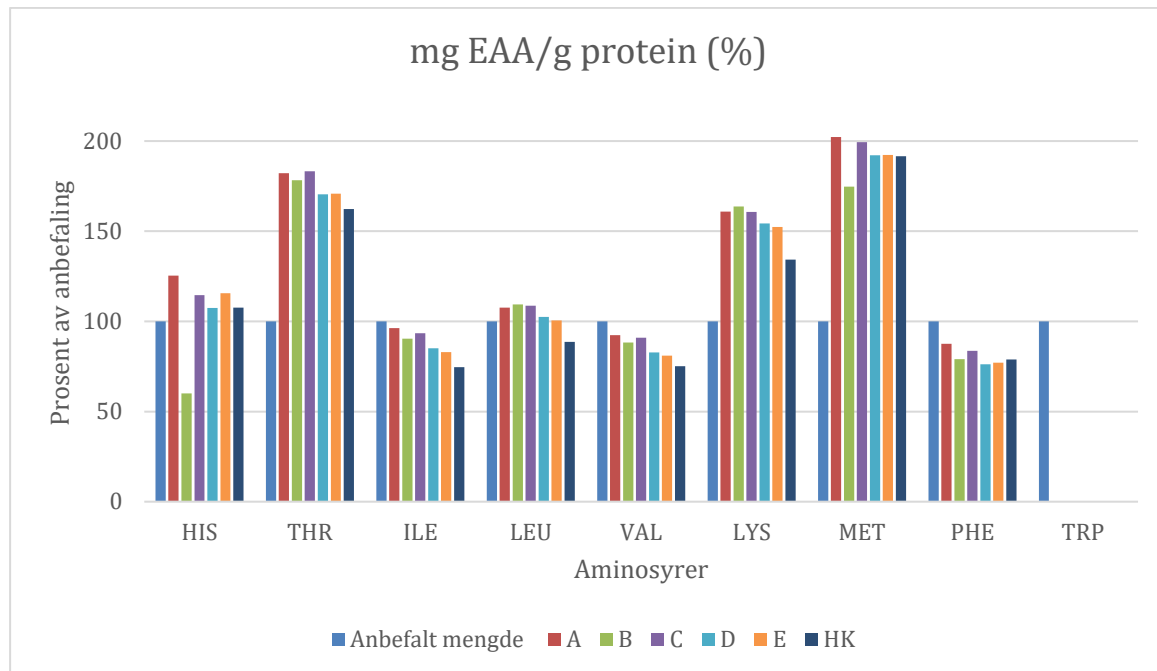
* Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamat- og asparaginsyre.

** Tryptofan ødelegges under syrehydrolyse og ble ikke detektert.

*** Taurin ble ikke tatt med i beregningen av det totale aminosyreinnholdet.

ID: Ikke detektert.

Figur 14 presenterer mengde EAA som prosent av anbefalingene til FAO/WHO/UNO (2017). Over 100% betyr at mengde EAA i hydrolysat er over referansenivå.



Figur 14 Essensielle aminosyrer av total aminosyre for EHT og HK presentert som prosent av anbefaling fra FAO/WHO/UNO (2007).

4.3.2 Frie aminosyrer

Frie aminosyrer (FAA) ble bestemt ved å fjerne store peptider og proteiner fra prøvene med SSA. Det totale FAA-innholdet var høyere i EHT (tabell 9) sammenliknet med HK. Innholdet var høyest i EHT-D (43,6 mg/g og 31,3 mg/g) med et totalt innhold av FAA på 78,5 mg/g. Det var et betydelig høyere innhold av EAA i EHT sammenliknet med HK (3,66 mg/g).

Tabell 9 Frie aminosyrer (mg/g) i frysetørket hydrolysat (n=3) og hydrolysekontroll (n=2).

Aminosyrer		(mg/g hydrolysat)					
		A	B	C	D	E	HK
Essensielle AA							
His	Histidin	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Thr	Theronin	1,3 ± 1,0	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,7	2,5 ± 0,3	ID
Ile	Isoleucin	1,1 ± 0,8	3,5 ± 0,2	2,6 ± 0,7	3,4 ± 0,3	2,5 ± 0,2	ID
Leu	Leucin	5,9 ± 1,1	11,3 ± 0,8	9,8 ± 1,0	12,5 ± 1,4	11,2 ± 1,4	ID
Val	Valin	1,6 ± 1,2	3,5 ± 0,1	3,1 ± 0,3	4,0 ± 0,5	3,4 ± 0,3	ID
Lys	Lysin	3,9 ± 1,1	3,1 ± 0,6	3,8 ± 0,8	4,7 ± 2,9	4,9 ± 0,6	1,0 ± 1,0
Met	Metionin	3,1 ± 0,5	3,2 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,3	ID
Phe	Fenylalanin	1,5 ± 1,1	4,3 ± 0,2	3,4 ± 0,7	5,2 ± 0,9	4,5 ± 0,8	ID
Trp	Tryptofan**	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Σ Essensielle AA		23,5 ± 7,1	37,4 ± 0,9	35,6 ± 2,0	43,6 ± 7,1	38,8 ± 3,6	3,7 ± 1,4
Ikke essensielle AA							
Arg	Arginin	1,7 ± 1,3	2,0 ± 1,4	1,4 ± 1,1	2,0 ± 1,4	3,6 ± 2,3	2,5 ± 0,4
Ala	Alanin	5,1 ± 0,6	6,3 ± 0,0	6,7 ± 0,3	7,5 ± 0,8	6,1 ± 0,2	2,7 ± 0,4
Asp	Asparginsyre*	1,0 ± 0,7	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,3	2,5 ± 1,28	2,1 ± 0,5	ID
Cys	Cystein	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Gly	Glysin	2,6 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,4
Glu	Glutamatsyre*	3,6 ± 0,3	3,1 ± 0,1	5,1 ± 1,6	5,0 ± 2,0	4,1 ± 0,8	2,2 ± 0,4
Pro	Prolin	I.D.	ID	ID	ID	ID	ID
Ser	Serin	2,1 ± 0,9	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,5	2,7 ± 0,7	2,4 ± 0,2	ID
Tyr	Tyrosin	0,7 ± 1,0	1,4 ± 2,0	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,8	2,2 ± 0,1	ID
Tau	Taurin***	13,4 ± 1,5	13,8 ± 0,6	13,5 ± 0,9	14,8 ± 0,7	16,0 ± 1,7	19,0 ± 0,5
Σ Ikke essensielle AA		23,5 ± 1,7	25,1 ± 1,6	28,6 ± 1,9	31,3 ± 4,5	29,6 ± 3,3	23,2 ± 1,3
Σ Frie AA		49,9 ± 7,7	65,8 ± 4,3	67,0 ± 0,7	78,5 ± 9,7	74,4 ± 7,6	31,6 ± 2,4

* Glutamin og asparagin deamineres under syrehydrolyse og er derfor inkludert i henholdsvis glutamat- og asparginsyre.

** Tryptofan ble ikke detektert, ettersom det ødelegges fullstendig under syrehydrolysen.

*** Taurin (ikke proteinbundet AA) er ikke tatt med i beregningene av de frie aminosyrene.

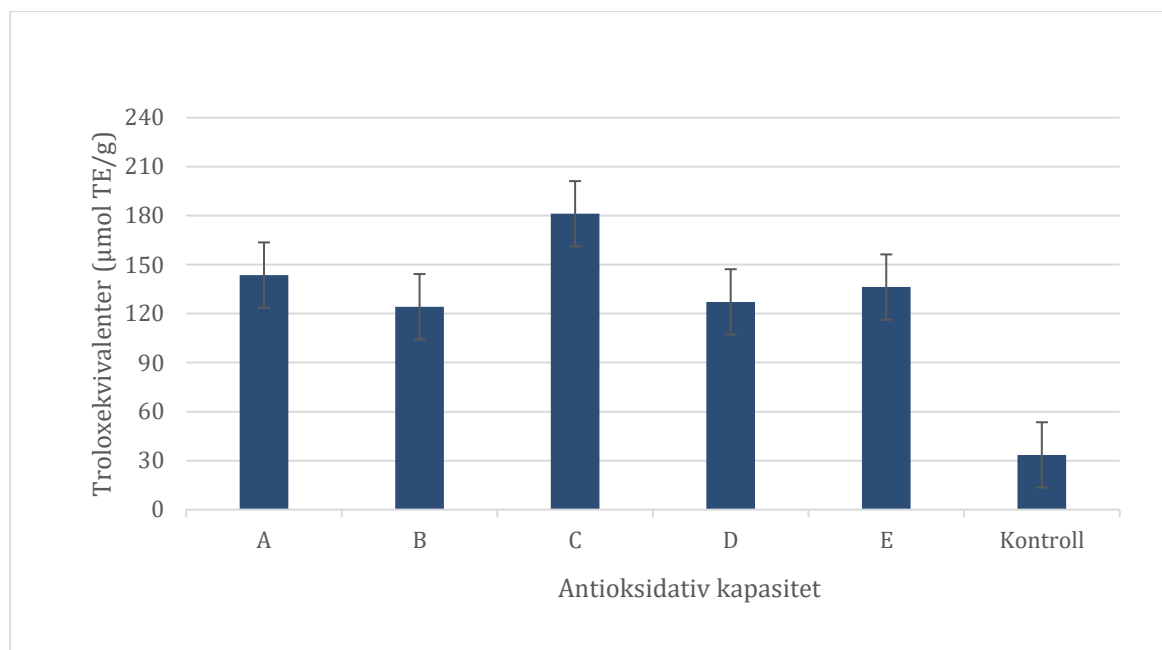
ID: ikke detektert.

4.4 Bioaktivitet

Hydrolysatene ble testet for ulike bioaktiviteter; antioksidativ kapasitet ble analysert ved hjelp av FRAP- og ORAC-metodene, antidiabeteseffekt ble målt ved hemming av enzym PTP1B, metthetsregulerende effekten ble undersøkt ved sekresjon av GLP-1 og antiinflammatorisk effekt ble analysert ved hemming av TNF-alfa.

4.4.1 Antioksidativ kapasitet (ORAC) av hydrolysatene

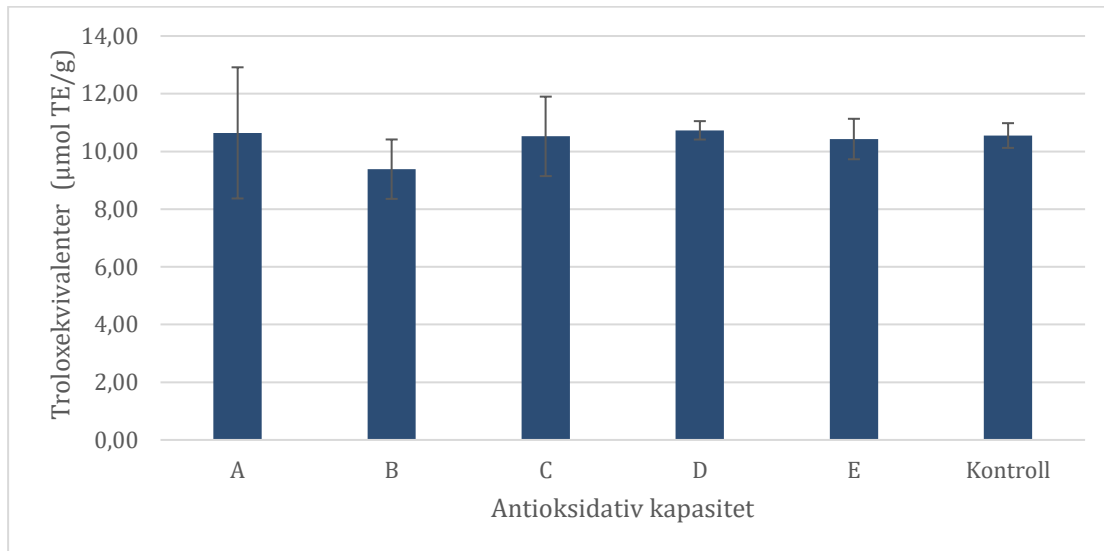
Figur 15 viser ORAC-verdiene for prøvene presentert som $\mu\text{mol TE/g}$ tørrstoff. Prøvene hadde en fortykning fra 0,002 g/ml til 0,00013 g/ml. Det var en betydelig høyere ORAC-verdi for EHT (124,26 til 181,17 $\mu\text{mol TE/g}$) sammenlignet med HK (33,51 $\mu\text{mol TE/g}$). Av prøvene var det EHT-C som hadde høyest ORAC-verdi, de resterende EHT var fra 124,26 til 143,64 $\mu\text{mol TE/g}$ tørrstoff.



Figur 15 Antioksidativ kapasitet målt ved Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay i frysetørkede hydrolysat ($n=3$) av kvernedede torskehoder. Resultatet er presentert som gjennomsnittlig μmol troloxekvivalenter per gram frysetørket hydrolysat \pm standardavvik..

4.4.2 Antioksidativ kapasitet (FRAP) av hydrolysatene

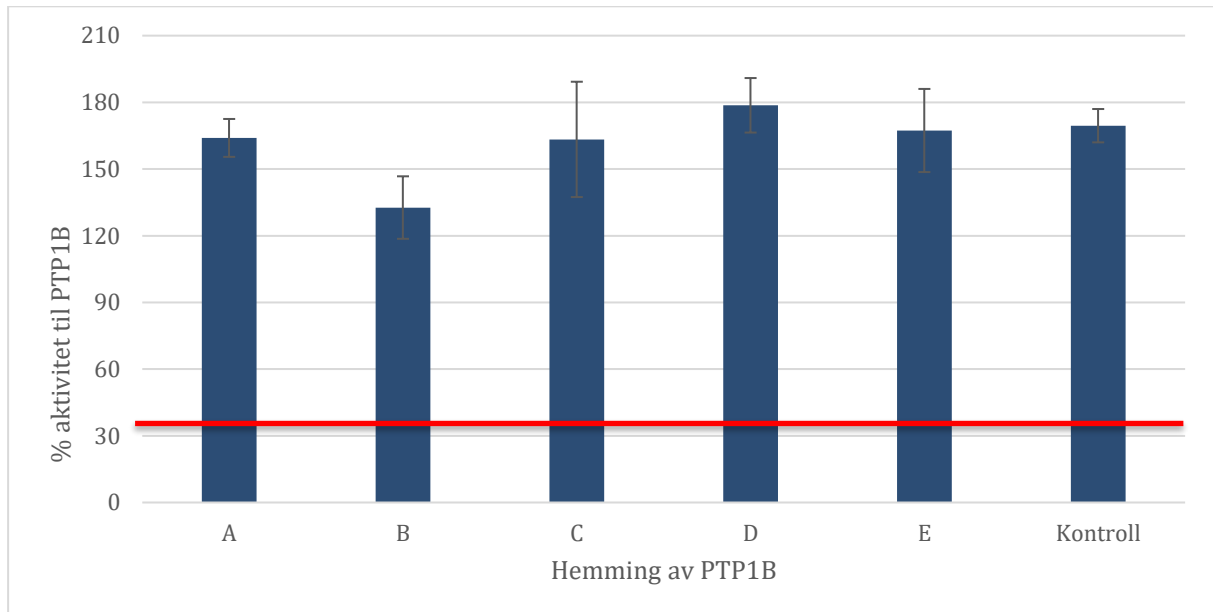
Antioksidativ kapasitet ble målt ved FRAP-assay. Det ble ikke observert noen forskjell mellom EHT og HK (figur 16), med omtrent 10 $\mu\text{mol TE/g}$ frysetørket EHT/HK.



Figur 16 Antioksidativ kapasitet (Ferric reducing ability of plasma) i frysetørkede hydrolysat ($n=3$) av kvernede torskehoder. Resultater presentert som gjennomsnittlig $\mu\text{mol toloxequivalenter per gram frysetørket hydrolysat} \pm$ standardavvik.

4.4.3 Antidiabeteseffekt av hydrolysatene

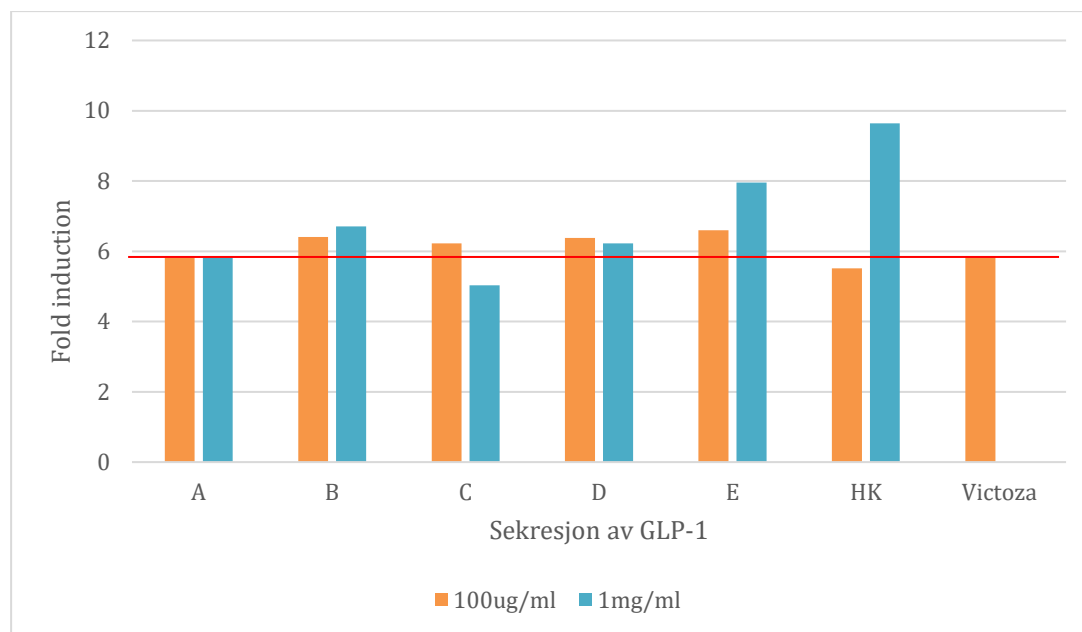
Antidiabeteseffekt ble målt som prosentvis hemming av PTP1B-aktivitet etter inkubering. Ved hjelp av spektrofotometer ble PTP1B-aktiviteten målt som fluorescensutvikling. For at et stoff skal regnes å ha en antidiabeteseffekt må enzymaktiviteten være redusert til <30%. Samtlige prøver viste en økt aktivitet fra 140% til 199% og ingen kunne regnet som aktive. Det var ingen forskjell mellom HK og EHT (figur 17).



Figur 17 Antidiabeteseffekt målt med PTP1B-assay. Den vannrette linjen på 30% indikerer grensen som ble benyttet for å vurdere om prøver var aktive som hemmere enzymet PTP1B.

4.4.4 Metthetsregulerende effekt av hydrolysatene

For å bestemme metthetsregulerende aktivitet ble GLP-1-assay brukt med Victoza® som positiv kontroll. Det ble brukt to forskjellige konsentrasjoner (100ug/ml og 1 mg/ml) slik at en dose-avhengig respons kan detekteres. EHT-B, -C, -D, -E og HK viser en høyere aktivitet sammenlignet med Victoza®. En doseavhengig respons ble funnet i EHT-E og HK (figur 18).



Figur 18 Metthetsregulerende ble bestemt ved å analysere sekresjon av GLP-1. Victoza® ble brukt som positiv kontroll og standard. Rød linje indikerer sekresjon av GLP-1 fra celler stimulert med Victoza®

4.4.5 Antiinflammatorisk effekt av hydrolysatene

Antiinflammatoriske egenskaper ble bestemt gjennom hemming av LPS-indusert uttrykk av TNF. For at en prøve skal regnes som aktiv må hemming være <50% sammenlignet med LPS-kontroll. Konsentrasjonen av LPS som ble benyttet var 1ng/ml. Ingen av hydrolysatene hadde antiinflammatorisk effekt på LPS-indusert TNF produksjon i disse forsøkene (tabell 10).

Tabell 10 Antiinflammatorisk effekt målt som mengde LSP industert uttrykk av TNF sekert i cellemediet av THP-1 celler. For at en prøve skal regnes som aktiv må det være >30% hemming.

	EHT-A	EHT-B	EHT-C	EHT-D	EHT-E	HK
% Hemming (n=2)	7,5	6	8	-9,5	21	6,5

5 Diskusjon

Vesterålen Marine Proteiner AS (VMP) er en bedrift som utnytter proteiner av restråstoff fra hvitfisknæringen. I dag produserer VMP proteiner som brukes i fôr til laks, men bedriften ønsker å se på mulighetene for å tilby et produkt til humant konsum. I fiskerinæringen genereres det til dels store mengder av verdifullt restråstoff som marine oljer, proteiner, kollagen og gelatin, enzymer og mineraler (Hjellnes et al., 2020). Flere studier har identifisert forskjellige bioaktive peptider fra fiskeproteiner (Kim & Mendis, 2006; Hamed et al., 2015). Dersom man kan dokumentere en helsefremmende effekt ved konsum av disse, kan man potensielt øke verdien på restråstoffet betydelig.

En metode for å utvinne proteiner fra restråstoff av hvitfisk er enzymatisk hydrolyse. Flere kommersielle enzymer som kan benyttes til hydrolyse er tilgjengelige, med varierende pris og effektivitet. Dette er en del av et prosjektsamarbeid mellom VMP og NOFIMA AS, hvor de ser på muligheten for implementering av enzymatisk hydrolyse for å utnytte proteiner i torskehoder. Formålet med denne masteroppgaven var å kartlegge mulig bioaktivitet i enzymatisk hydrolyserte torskehoder (EHT) og om ulike enzym hadde innvirkning på bioaktivitet, aminosyresammensetning og utbytte. Det ble også inkludert en hydrolysekontroll (HK) uten enzym for å verifisere om det var enzymtilsetning eller varmebehandlingen i seg selv som frigjorde proteinene og ga egenskaper til hydrolysatene. De bioaktive egenskapene som ble analysert var antioksidativ kapasitet og antidiabetes, antiinflammatorisk og metthetsregulerende effekt. Det ble gjennomført tre hydrolyseparalleller for hvert enzym og to paralleller for hydrolysekontroll av en samleprøve på 10 kvernende torskehoder. Enzymene som ble brukt i forsøket var valgt ut av VMP og Nofima AS basert på pris, tilgjengelighet og relevans i næringsmiddelproduksjon.

5.1 Biokjemisk sammensetning og utbytte ved enzymatisk hydrolyse

Prosentinnhold av fett, vann og aske i de analyserte torskehodene var på henholdsvis 0,8, 71,9 og 15,3. Proteininnholdet ble analysert på andre torskehoder fra samme årstid av eksternt laboratorium (NOFIMA) med Dumas metode og ble målt til 14,9%. Resultatene ble vurdert som overførbare. I studiet til Arnesen & Gildberg (2006) ble proteininnholdet målt til 15%, noe som samsvarer med proteininnholdet på 14,9%. Standardavviket på gjennomsnittlig fettprosent var 0,7. Dette kan begrunnes i upresis analyse da den innebærer mye manuell håndtering, noe som kan bidra til avvik. Fisk inneholder lite karbohydrater og det prosentvise innholdet av fett, protein, vann og aske ble 103% ($0,8+71,9+15,3+14,9=102,9\%$). Den biokjemiske sammensetningen avviker noe fra tidligere funn gjort av Arnesen & Gildberg (2006), hvor fettinnhold var 0,15%, vanninnhold 79,4% og askeinnhold på 6,8%. Sesongvariasjoner mellom råstoffet, nedbryting av endogene enzymer og unøyaktige analysemetoder, kan bidra til forskjellene. I tillegg består råstoffet av mange komponenter (bein, muskel, øyne, gjeller) og en årsak kan være at det ikke var tilstrekkelig homogenisert i forkant av analysene. I tillegg til årsakene nevnt over, er proteininnholdet målt med en nitrogen-basert metode. Det vil si at nitrogenmengde måles og multipliseres med en konverteringsfaktor på 6,25. Dette kan føre til at proteininnholdet overestimeres (Mæhre et al., 2018).

Enzymatisk hydrolyse ble gjennomført med fem ulike enzym eller enzymkombinasjoner, i tillegg ble det gjennomført en hydrolysekontroll med samme prosess uten enzymtilsetning. Utbyttet ved enzymatisk hydrolyse ble regnet ut på to måter; proteinutbytte og vektforholdet mellom vann- og sedimentfase.

Proteinutbyttet varierte fra 25% til 31%, hvorav EHT-C hadde best utbytte. For HK var proteinutbyttet over 10 prosentpoeng lavere (18,2%). For å regne ut proteinutbyttet ble proteininnholdet til råstoffet for NOFIMA brukt (14,9%), siden eget råstoff ikke ble analysert. Proteininnholdet til hydrolysatene ble analysert med aminosyreanalysator. Ved aminosyreanalyse vil noen av aminosyrene bli fullstendig oppløst og derfor ikke detektert, derfor kan denne metoden underestimere proteininnhold. Dersom samme analysemetode hadde vært benyttet på råstoff og hydrolysat ville man sannsynligvis fått et høyere proteinutbytte i dette tilfellet. Fordi aminosyreanalysator underestimerer og Duma's overestimerer proteininnholdet. Det var også hydrolysat som «boblet» over beholder under frysetørking, slik at ikke alt ble veid og den faktiske mengden hydrolysat var litt mer. Dette medførte nok også

til at proteinutbyttet ble estimert lavere enn det reelt er og det gir et dårlig grunnlag for å trekke en konkret konklusjon.

På grunn av overnevnte feilkilder ble også utbyttet beregnet som vektforhold mellom vann- og sedimentfase etter hydrolyse. Ved hydrolyse ble det tilsatt lik mengde vann og prøve (100g). Vektforholdet mellom sediment og vannfase etter hydrolyse gir derfor indikasjon på hvor mye av råstoffet som ble løst opp til vannløselige komponenter (som peptider og aminosyrer). Fordamping av vann kan ha påvirket vektforholdet og er en mulig feilkilde, men temperatur og tid var lik på samtlige forsøk slik at differanse i fordamping var minimal. Vekten av vannfasen for EHT varierte fra 71,8% (EHT-D) til 75,8% (EHT-C) og var betydelig høyere enn HK (60,4%).

Siden proteinutbytte og vektforholdforhold vann-sediment samsvarer med hverandre er det mulig å sammenligne utbytte til hydrolysaten. Det var EHT-C som hadde best utbytte og EHT-D lavest. Det er tydelig at enzymtilsetning øker utbytte, siden HK hadde et betydelig lavere proteinutbytte og vannfase. Tidligere er det funnet et proteinutbytte på nærmere 40%, avhengig av enzym benyttet til hydrolyse (Gildberg et al., 2002). Proteinutbyttet er i dette forsøket betydelig lavere og kan blant annet begrunnes i overnevnte årsaker.

Sedimentfasen utgjorde 14 til 19% for EHT og i hovedsak består denne fasen av beinrester (Arnesen et al., 2017). Videre hydrolyse av sedimentfasen eller mineralekstraksjon kan være et alternativ for ytterligere utnyttelse til humankonsum eller fôr.

Hakkede hoder ble lagret på is 42 timer før kverning og deretter ble kvernede torskehoder lagret på is frem til hydrolyse, opp mot 72 timer for den første hydrolyseparallellen. I løpet av denne perioden kan endogene enzymer ha brutt ned råstoffet. Ideelt burde samtlige hydrolyser blitt gjennomført samtidig, slik at nedbryting som følge av endogene enzymer ikke var en usikkerhet. Dette var dog ikke mulig å gjennomføre på grunn av tidsaspekt og tilgjengelig apparatur. Det ble sørget for at råstoffet var lageret på is og en parallell fra hvert enzym ble gjort tettest mulig, altså i rekkefølge A1-B1-C1-D1-E1-HK1-A2-B2-osv. Prøvene ble ikke fryst for å unngå usikkerhet omkring fryse- og tineprosessen (Arnesen et al., 2017).

Det ble gjort visuell vurdering av proteinpulverne, hvor HK skilte seg ut med mørkere farge. Hydrolysaten med enzymtilsetning hadde et lite gul-skjær. Dersom hydrolysene hadde blitt gjennomført samme dag som slakt kan man ha forventet at pulveret hadde vært hvitere. Siden det tidligere er vist at et ferskt råstoff vil gi et hvitere hydrolysat (Šližyte et al., 2009).

Proteinbundet AA i EHT varierte fra 548 til 525 mg/g (52,5% til 54,6%). For HK var proteininnholdet 480 mg/g (48%), altså lavere enn samtlige EHT. På grunn av begrensninger i mengde frysetørket hydrolysat ble ikke mengde restvann etter frysetørking undersøkt, dette kunne gitt en høyere protein% til hydrolysatene. Cystein og tyrosin var til stede i noen prøver, men ikke alle og er sannsynligvis til en viss grad brutt ned under syrehydrolyse sammen med tryptofan. Arnesen et al. (2017) studerte en to-trinns hydrolyse hvor proteininnhold varierte fra 42% til 50% etter første hydrolysetrinn (2% enzymtilsetning), og økte til >60% etter andre hydrolysetrinn (2% enzymtilsetning). Resultatene i dette forsøket viser altså et høyere proteininnhold sammenlignet med første hydrolysetrinn, dette kan muligens være på grunn av variasjoner i råstoff eller ulik enzymaktivitet. I forsøket til Arnesen et al. (2017) var det benyttet maursyre (99%) for pH-justering i forkant av hydrolyse, noe som kan ha påvirket tilgjengeligheten på proteinene under hydrolyse.

Resultatene i tabell 8 viser at både EHT og HK inneholdt samtlige essensielle aminosyrer (EAA), foruten tryptofan som blir ødelagt under syrehydrolysen. Det var EHT-A som hadde høyest innhold (18%) av EAA. Blant EAA er det lysin, theronin og tryptofan, samt de svovelholdige AA metionin og cystein som er de begrensede i kostholdet (Damodaran, 2012). Hydrolysatene hadde et høyt innhold av disse begrensede aminosyrene og over referansenivået (foruten tryptofan). Basert på mengde EAA er kvaliteten på både EHT og HK god, men EHT-B, -E og HK hadde under anbefalt nivå av phe, val, leu og ile.

Innholdet av frie AA varierte fra 49,9 til 78,5 mg/g (5 til 8%) for EHT, og var 31,6 mg/g (3%) for HK. Enzymtilsetning økte altså mengde frie aminosyrer i råstoffet, noe som er forventet da enzymer bryter opp proteiner og peptider. Normalt er innholdet av FAA i organisk vev lavt, ettersom AA i kroppen er bundet sammen og bestanddeler i proteiner. Derfor ser man en lav mengde FAA i HK sammenlignet med prøvene tilsatt enzymer.

Av essensielle aminosyrer var bare lysin var til stede i HK som FAA, i EHT var samtlige essensielle aminosyrer til stede foruten histidin og tryptofan som ikke blir detektert.

5.2 Bioaktivitet

Antioksidativ kapasitet ble målt med ferric reducing antioxidant power (FRAP) og oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Antioksidativ kapasitet målt med FRAP var på omtrent 10 $\mu\text{mol TE/g}$, mens målt med ORAC assay var den 120 til 180 $\mu\text{mol TE/g}$. Siden FRAP assay måler evne til å redusere et jernkompleks ved elektronoverføring og ORAC er et hydrogenatom-overførende assay, indikerer resultatene at EHT hadde en bedre kapasitet til å donere et H-atom enn til å redusere et jernkompleks. Den antioksidative kapasiteten ved ORAC var også betydelig høyere for EHT sammenlignet med HK (30 $\mu\text{mol TE/g}$). Dette samsvarer med tidligere publiserte funn hvor peptider med lav molekylvekt (MW) har vist seg å ha høyere ORAC-verdier og peptider med høy MW har gitt høyere verdi på FRAP og DPPH radical scavenging assay (Theodore et al. 2008). Selv om molekylvekten på prøvene ikke ble målt i dette forsøket, er det nærliggende å anta at EHT hadde peptider som var mindre, noe som også blir bekreftet ved at det er flere FAA i EHT (tabell 9).

Tilsynelatende var det stor forskjell i AOC mellom prøvene målt med ORAC, men det må påpekes at standardavvikene var høye. Dette kan komme av at prøvene var høyt fortynnet i tillegg til at ORAC er en meget sensitiv metode. Resultatene indikerer at EHT-C hadde høyest ORAC-verdi, med 180 $\mu\text{mol TE/g}$ hydrolysat.

Flere aminosyrer er antatt å ha en antioksidativ effekt; de med svovelholdige sidekjeder (taurin, cystein og metionin), de med aromatiske sidekjeder (tryptophan, tyrosin, og fenylalanin) og i tillegg glysin, prolin, leucin og alanin (Fang et al., 2002; Marcuse, 1960; Elias et al., 2008). Det var større mengder av cystein, metionin, fenylalanin, arginin og leucin i EHT sammenlignet med HK som TAA. Som FAA er metionin, tyrosin, fenylalanin, leucin og alanin til stede i større mengder i EHT enn HK, noe som kan forklare hvorfor den antioksidative kapasiteten var større i EHT. Felles for EHT-A og EHT-C som hadde høyest ORAC-verdi, er at disse hydrolysatene hadde høyest proteininnhold og innhold av histidin (proteinbundet). Histidin er vist å ha god antioksidativ kapasitet (Wade & Tucker, 1998). Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor EHT-C og EHT-A ble målt til å ha best antioksidativ kapasitet.

Peptider er antatt å ha bedre AOC enn frie aminosyrer siden et peptidradikal vil være mer stabilt enn et aminosyreradikal (Elias et al., 2008). De prøvene med størst mengde FAA er trolig mer hydrolysert og kan dermed inneholde færre peptidradikaler, noe som kan forklare hvorfor EHT-D og -B målte lavest AOC.

Den antioksidative kapasiteten til aminosyrer er avhengig av pH (Marcuse, 1962). Mens ORAC ble gjennomført under pH 7,4 ble FRAP-assay gjennomført ved pH 3,6. Det kan derfor argumenteres for at ORAC er mer fysiologisk relevant enn FRAP assay. Videre måler ORAC over en tid, mens FRAP har endpoint.

Det er få humanstudier som har undersøkt sammenhengen mellom marine proteiner og oksidativt stress. Parra et al. (2007) observerte at en torskebasert diett reduserte oksidativt stress sammenlignet med laks og magert kjøtt. Det var særlig proteinkarakteristikken i torsk og det høye innholdet av taurin som forklarte dette (Parra et al., 2007; Kitts & Weiler, 2003; Oriyhan et al., 2005). Taurin er ikke i stand til å direkte fjerne klassiske reaktive oksygenforbindelser (ROS), men mange studier antyder at aminosyren er en effektiv hemmer av ROS-dannelse (Schaffer et al., 2009). Hydrolysatene hadde et relativt høyt innhold av taurin og muligens kan forhindre ROS-dannelse og dermed kan ha en preventiv effekt på oksidativt stress. Også dyrestudier har gitt lovende indikasjon på fiskeprotein til å bedre oksidativ status, da både på antioksidativ status hos hypertensive rotter og lipidoksidasjon i nyre og hjerte hos rotter (Bourkott et al., 2004; Yahia et al., 2003; Tastesen et al. 2014)

De frysetørkede hydrolysatene ble undersøkt for antidiabeteseffekt ved å måle prosentvis hemming av enzymet protein tyrosin fosfatase 1B i et PTP1B-assay. Samtlige prøver resulterte i mer enn 100% økning av aktiviteten av enzymet PTP1B. Årsaken til de høye verdiene skyldes at hydrolysatene sannsynligvis inneholdt auto-fluorescense. Det kunne derfor ikke konkluderes med noen effekt på insulinsensitivitet. Flere kliniske studier har undersøkt effekten av torskeprotein på insulin. Dale et al. (2018) dokumenterte effekten av torskehydrolysat inntatt før frokost på insulinrespons etter matinntak. Det er også dokumentert effekt at fiskeproteintilskudd senker fastende glukose (Vildmyren et al., 2018). Begge disse studiene en indikasjon på mulig antidiabeteseffekt, men de har bare dokumentert respons på enten insulin eller glukose. Ideelt bør både insulin- og glukoseresponsen påvirkes.

Det er også gjort funn i studier på antidiabeteseffekt ved konsum av mager fisk og torskefilet. Rylander et al. (2014) gjennomførte en kohort-studie hvor risikoraten for å utvikle DT2 ble redusert ved konsum av mager fisk, det var også en tilsynelatende redusert risiko ved 100 g/uke sammenlignet med 75 g/uke. I slike kohortstudier kan man dog ikke utelukke at positiv effekt skyldes endringer i livsstilen. Effekten av torsk som hovedproteinkilde har også dokumentert en redusert insulinkonsentrasjon sammenlignet med laks (Parra et al., 2007). På grunn av tidligere funn i studier er det absolutt interessant å se nærmere på mekanismer som proteiner fra torsk kan reguler i forbindelse med diabetesutvikling.

Antiinflammatorisk effekt ble målt gjennom hemming av LPS-indusert uttrykk av TNF. I dette forsøket ble det ikke detektert noen antiinflammatorisk effekt ved konsentrasjonen som var brukt (1ng/ml LPS). Sjømatkonsum har vært ansett som inflammasjonsdempende, men vært begrunnet i omega-3 fettsyrene som blir dannet til eikosanoider (Psota et al., 2006; Wall et al., 2010). Det er gjort for få human- og dyrestudier på fiskeproteiner og inflammasjon til at det kan trekkes konklusjoner om klinisk relevans.

Humanstudiene gjennomført på sammenheng mellom inflammasjon og marine proteiner har motstridende resultater: Noen har vist å øke C-reaktivt protein (CRP) (Drotningvik et al., 2019) og andre redusere CRP (Ouellet et al., 2008). Det er også studier som har vist null effekt på inflammasjonsparameterne (Elvevoll et al., 2006). Studiet til Ouellet et al., (2008), hvor antiinflammatorisk effekt ved torskproteiner ble dokumentert, besto 19 overvektige og insulinresistente deltakere. Deltakerne fikk torsk eller andre animalske proteinkilder (kjøtt, egg og melk) og gruppen som fikk andre animalske proteinkilder hadde en 13% økning av CRP. En mulig forklaring på at torskproteiner reduserte CRP (24%) kan være at pro-inflammatoriske proteinkilder var fjernet fra kosten, heller enn at torskproteiner er antiinflammatoriske.

I dyrestudier er det blitt indikert at den antiinflammatoriske effekten til torsk kan tilskrives aminosyrene arginin, glycin og taurin (Dort et al., 2013). I prøvene var arginin og glycin var til stede i relativt store mengder, men mesteparten var proteinbundet (TAA) mens det i fri form (FAA) var svært lite arginin og glycin og relativt mye taurin. En mulighet er at fordøyelse øker biotilgjengeligheten av arginin og glycin og på den måten gi en antiinflammatorisk effekt.

Inflammasjon er meget komplekse responser som reguleres av mange faktorer. Selv om det ikke ble gjort funn av antiinflammatorisk effekt i dette assayet, kan det være andre mekanismer enn LPS-induser TNF-sekresjon som hydrolysatene potensielt regulerer. Tidligere er det heller ikke gjort funn hvor fiskeprotein påvirker TNF. Effekt på CRP (Ouellet et al., 2008), nøytrofile granulocytter og makrofager (Dort et al., 2012) og plakkdannelse (Jensen et al., 2016) er derimot dokumentert. I tillegg må det påpekes at taurin var til stede i prøvene, en aminosyre som har dokumentert antiinflammatorisk effekt.

Hormonet GLP-1 skilles ut fra tarmcellene like etter matinntak og er kjent for å bidra til metthetsregulering og redusere inntak av mat (Baggio & Drucker, 2007). Metthetsregulerende effekt ble derfor analysert ved å studere sekresjon av GLP-1 *in vitro*. Det var EHT-C og HK som viste en doseavhengig sekresjon av GLP-1, i tillegg viste EHT-B en svak doseavhengig sekresjon.

Det er dokumentert sammenhengen mellom vekttap og konsum av torsk (Ramel et al., 2009; Thorsdottir et al., 2007) og sjømatkonsum generelt (Smith et al., 2015). Å utnytte proteiner fra restråstoff til vektreduksjon og vektkontroll er derfor et interessant marked. To humanstudier har tidligere dokumentert sammenheng mellom inntak av fiskehydrolysat og kroppsvekt og appetitt (Zair et al., 2014; Nobile et al., 2016). I tillegg er det vist at også lave doser av fiskehydrolysat er effektive og fører til sekresjon av GLP-1 (Nobile et al., 2016). Dale et al., (2019b) fant derimot ikke samme effekt ved tilskudd av fiskehydrolysat. Ulike funn i humanstudier på fiskehydrolysat gjenspeiler funnene i dette forsøket, hvor noen hydrolysat gir en dose-avhengig sekresjon og andre ikke. Dette kan begrunnes i at hydrolyse og valg av enzym gir ulike egenskaper til peptidene som dannes.

De aminosyrene som er til stede i større mengder i HK sammenlignet med EHT-E er glysin, prolin og taurin. Det er ikke bekreftet i tidligere studier at disse aminosyrene påvirker sekresjon av GLP-1. Det er derfor tenkelig at kombinasjonen av aminosyresekvensene kan være årsaken til sekresjonen. En annen forklaring er at det kreves lavere konsentrasjon for å få en dose-avhengig respons på de resterende hydrolysatene. Noen prøver hadde en høyere effekt ved den laveste konsentrasjonen. Årsaker til dette kan være 1) cellene kan være følsomme for den høyeste konsentrasjonen og produksjonen av GLP-1 er blitt hemmet, eller 2) antall celler ble redusert etter tilsetning av disse prøvene (C. Li, personlig kommunikasjon, 17. mars 2020).

Tyrosin har godkjent helsepåstand som vektreduserende og vedlikeholde vekt (European Commission, 2020). Som nevnt tidligere ble tyrosin sannsynligvis ødelagt under syrehydrolyse. For å få et produkt med høy markedsverdi vil det derfor kanskje være aktuelt å gjennomføre alternative analyseprotokoller som gjør det mulig å undersøke mengden tyrosin i prøvene.

Det er flere hormoner som er kjent til å regulere appetitt. Blant disse finner man ghrelin, insulin-liknende peptid 5, glukagon liknende peptid-1, glukoseavhengig insulin-trofisk polypeptid, cholecystokinin og peptid-tyrosin-tyrosin og flere (Zhao et al., 2017; Grosse et al., 2014). Det kan heller ikke her utelukkes at torskhydrolysatene kan ha en effekt på disse, men det er så langt ikke gjort funn i humanstudier på dette.

5.3 Begrensninger i studiet og videre arbeid

Denne oppgaven skal danne et grunnlag for industriell oppskalering for enzymatisk hydrolyse av torskehoder. Det må først og fremst påpekes at en oppskalering av hydrolyseprosessen vil kunne påvirke sluttproduktet og resultater er derfor ikke direkte overførbart.

I dette forsøket ble enzymatisk hydrolyse gjennomført uten pH-justering eller -måling. Det er kjent at enzymaktiviteten påvirkes av pH (Kristinsson & Rasco, 2000). Det bør derfor undersøkes i hvilken grad pH påvirker utbytte, proteininnhold og egenskaper til hydrolysatet, før en industriell oppskalering. Siden tilgangen på ferskt råstoff kan variere i industrien, bør det også undersøkes om man oppnår likt utbytte og bioaktivitet ved å hydrolysere fryst og opptint råstoff.

Siden det ble påvist en økt antioksidativ kapasitet for hydrolysatene er det interessant å undersøke dette videre. Under fordøyelse vil pH endres, og den antioksidative kapasiteten til peptidene kan endre seg i takt med pH. Antioksidativ kapasitet målt med ORAC er et ikke-cellulært assay. Med cellulære assay vil man også ta med biotilgjengelighet og metabolisme i vurderingen (Lü et al., 2010, Wolfie & Liu, 2008). Slike assay vil være ytterligere relevante for å dokumentere den antioksidative kapasiteten. HepG2-celler, human lever hepatocellulær carcinoma cellelinje er ofte brukt for å studere antioksidativ kapasitet i produkter (Goya et al., 2007).

På grunn av en dose-avhengig sekresjon av GLP-1 er det aktuelt å videre studere hvordan hydrolysatene påvirkes av metabolisme, fordi biotilgjengelighet kan endres gjennom fordøyelsen. Det kan også være aktuelt å studere GLP-1 sekresjon ved lavere konsentrasjoner, siden noen av hydrolysatene hadde en høyere respons ved lav konsentrasjon. Mengde tyrosin i hydrolysatene bør også analyseres, siden dette er en aminosyre med godkjent «Health Claim» av EU.

Organoleptiske egenskaper ved hydrolysatene bør også vurderes. Et smaksnøytralt hydrolysat er ønskelig, men tidligere er det dokumentert smak av bitterhet og fisk (Arnesen et al., 2017). Det eksisterer metoder for å fjerne/reducere uønsket lukt og smak, men det bør undersøkes i hvilken grad en slik prosessering endrer bioaktive egenskaper i hydrolysatet

6 Konklusjon

Målet med oppgaven var å kartlegge mulig bioaktivitet i enzymatisk hydrolyserte torskehoder, i tillegg ble utbytte ved hydrolyse og biokjemisk sammensetning i torskehoder bestemt.

Innholdet av protein, fett, vann og aske i torskehoder var henholdsvis 14,9, 0,8, 71,9 og 15,3 prosent. Enzymatisk hydrolyse økte proteinutbytte, proteininnhold, essensielle aminosyrer og frie aminosyrer. Alle hydrolysatene inneholdt tilstrekkelig med essensielle aminosyrer som er begrensende i kostholdet, basert på anbefalingene til FAO/WHO/UNO (2017). Antioksidantaktivitet målt med ORAC-metoden var høyere for hydrolysatene sammenlignet med kontroll, mens ingen forskjeller i antioksidantaktivitet ble funnet i FRAP-metoden. Det er indikasjon på hydrolysat E og kontroll har en metthetsregulerende effekt gjennom å stimulere til sekresjon av hormonet GLP-1. Ingen av hydrolysatene utviste hverken antiinflammatorisk eller antidiabeteseffekt.

Basert på funnene gir enzymatisk hydrolyse av torskehoder et produkt som kan være egnet til humankonsum og derfor bidra til å øke verdien av restråstoffet. Ved industriell oppskalering og optimalisering av hydrolysen bør det også optimaliseres med tanke på å øke bioaktiviteten i hydrolysatene.

Referanseliste

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1119- 1132
- Adelhamid, A.S., Brown, T.J., Brainard, J.S., Biswas, P., Thorpe, G.C., Moore, H.J., Deane, K.O.H., Summerbell, C.D., Worthington, H.V., Song, F. & Hooper, L. (2020). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No.: CD003177
- Arango, D.G. & Descoteaux, A. (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, *Frontiers in Immunology*, 5,419.
- Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2006). Extraction of muscle proteins and gelatine from cod head. *Process Biochemistry*, 41(3), 697-700.
- Arnesen, J. A., Vang, B., Albrektsen, S. & Whitaker, R. (2017) *Høyverdiskaping fra hvitfisk restråstoff* (NOFIMA rapport 25/2017. Hentet fra <https://nofima.no/publikasjon/1547556/>
- Baggio, L.L. & Drucker, D.J. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 132(6), 2131-2157.
- Benzie, I. F. F. og Strain, J. J. (1996) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bernstein, A. M., Sun, Q., Hu, F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E. & Willett, W. C. 2010. Major Dietary Protein Sources and Risk of Coronary Heart Disease in Women. *Circulation*, 122(9), 876-883.
- Biotechacademy.dk (2020) *Figur 15*. Hentet 8. mai 2020 fra <https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/enzymer/#1510836471991-838b65e4-1461f38c-5b729e0c-8ab9>
- Bjorndal, B., Berge, C., Ramsvik, M.S., Sverdal, A., Bohov, B., & Berge, R. (2013). 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 and Disease*.12:E:143
- Black, D., & Love, R. M. (1986). The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(4), 469-479.
- Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R. & Rezzani, R. (2008) Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*. 23, 381-390.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume N., Ravallec-Plé R, Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia A. & Nasri M. (2008) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*, 111, 350-356

- Breedveld, F. C., Weisman, M.H., Kavanaugh, A. F., Cohen, S.T.B., Pavelka, K. van Vollenhoven, R., Sharp, J., Perez, J.L. & Spencer-Green, G.T. (2006). The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis & Rheumatism*. 54(1), 26–37.
- Cefalu WT. (2001). Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Experimental Biology and Medicine*. 226:13–26.
- Dale H.F, Jensen C, Hausken T, Lied E, Hatlebakk JG, Brønstad I, Hoff DAL, Lied GA. (2018) Effect of a cod protein hydrolysate on postprandial glucose metabolism in healthy subjects: a double-blind cross-over trial, *Journal of Nutritional Science*, 7:e33.
- Dale, H. F., Madsen L. & Lied, A.G. (2019b) Fish–derived proteins and their potential to improve human health. *Nutrition Reviews*. 77 (8),572 -583
- Dale, H.F. (2020). *Health effect of supplementation with cod protein hydrolysate – Impact on glucose metabolism and appetite in healthy subjects and gut health in irritable bowel syndrome* (Doktorgradsavhandling). University of Bergen.
- Dale, H.F., Jensen, C., Hausken, T., Lied, E., Hatlebakk, J.G., Brønstad, I., Hoff, D.A.L. & Lied, G.A. (2019). Acute effect of a cod protein hydrolysate on postprandial acylated ghrelin concentration and sensations associated with appetite in healthy subjects: a double-blind crossover trial. *Food & Nutrition Research*, 63. <https://doi.org/10.29219/fnr.v63.3507>
- Damodaran, S. (2012). Amino Acids, Peptides, and Proteins. S. Damodaran, K. L. Parkin & O. R. Fennema (Red.), Fennema's Food Chemistry, 4, 217-330). Boca Raton: CRC Press.
- Dauksas, E, Falch, E., Slizyte, R. & Rustad T. (2005) Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*; 40(8):2659–2670.
- Dávalos, W., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004) Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.
- de Mello, V. D., Erkkilä, A. T., Schwab, U. S., Pulkkinen, L., Kolehmainen, M., Atalay, M., Mussalo, H., Lankinen, M., Oresic, M., Lehto, S. & Uusitupa, M. (2009). The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *European Journal of Nutrition*, 48, 447-455
- Diabetes.no (2019), «Årsaker til diabetes. Hentet 03.mars 2020 <https://www.diabetes.no/leksikon/a3/arsaker-til-diabetes/>
- Dort, J., Leblanc, N., Maltais-Giguere, J., Liaset, B., Cote, C. H. & Jacques, H. (2013). Beneficial effects of cod protein on inflammatory cell accumulation in rat skeletal muscle after injury are driven by its high levels of arginine, glycine, taurine and lysine. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 8, e77274.
- Drotningvik, A., Oterhals, Å., Flesland, O., Nygård, O., & Gudbrandsen, O. A. (2019). Fish protein supplementation in older nursing home residents: a randomised, double-blind, pilot study. *Pilot and feasibility studies*, 5(1), 35.

- Drotningstvik, A, Mjøs, SA, Pampanin, DM, et al. (2016). Dietary fish protein hydrolysates containing bioactive motifs affect serum and adipose tissue fatty acid compositions, serum lipids, postprandial glucose regulation and growth in obese Zucker fa/fa rats. *British Journal of Nutrition*, 116, 1336–1345
- Dyerberg, J., Bang, H.O. & Nielsen A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic Westcoast Eskimos. *Lancet*, 297(7710),1143-1145
- Elias, R. J., Kellerby, S.S. & Decker E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:430-41.
- European Commission (2020). *EU Register of nutrition and health claims made on foods*. Hentet 01. mai 2020 fra https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search
- Fang, Y.Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- FAO. (2003) *Food Energy – Methods of Analysis and conversion Factors*; Food and Agriculture Organization of The United Nations: Rome, Italy.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 (SOFIA) - Meeting the sustainable development goals. *The state of the world, 2019*. Rome, Italy.
- FAO/WHO/UNU (2007) *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*. World Health Organization, Geneva, Sveits.
- FHI. (2017). Overvekt og fedme i Norge. Hentet 15. april 2020 fra <https://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/overvekt-og-fedme/>
- FHI. (2018). Folkehelse rapporten – helsetilstanden i Norge 2018 (5/2018) Hentet fra <https://www.fhi.no/publ/2018/fhr-2018/>
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Ford, E. S., Giles, W. H., & Dietz, W. H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama*, 287(3), 356-359.
- Friedman, M. (1996) Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6-29.
- Friskogfunksjonell.no (2012) Hentet fra <https://www.friskogfunksjonell.no/protein/peptidbinding/>
- Ghosh, S. & Playford, R.J. (2003). Bioactive natural compounds for the treatment of gastrointestinal disorders. *Clinical Science*. 104(6), 547-556.
- Gildberg, A. (1992). Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera *Bioresource Technology*. 39, 271-276.
- Gildberg, A., Arnesen, J.A. & Carlehog, M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochemistry* 38(4):475–480.

- Goya, L., Mateos, R. & Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. *European Journal of Nutrition.*, 46, 70–78.
- Grigih A.T., Udenigwe, C.C., Hasan, F.M., Gill, T.A. & Aluko, R.E. (2013). Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International*, 52,315-322.
- Grigih, A.T., He, R., Hasan, F.M., Udenigwe. C.C., Gill, T.A. & Aluko R.E (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652-659.
- Grosse,J., Heffron,H., Burling, K., Hossain, M. A., Habib, A.M., Gareth J., ... Gribble, F.M. (2014). Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(30):11133-11138.
- Guslandi M. (1998). Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *European Journal of Clinical Investigation*, 28, 904-907.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2006) *Textbook of Medical Physiology*, Philadelphia, Elsevier Inc
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, New York, Oxford University Press Inc
- Hamed, Imen, Özogul, Fatih, Özogul, Yesim, & Regenstein, Joe M. (2015). Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(4), 446-465.
- He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., Goldbourt, U. & Greenland, P. (2004) Fish consumption and incidence of stroke - A meta-analysis of cohort studies. *Stroke*, 35, 1538-1542.
- Helsedirektoratet. (2014). *Anbefalinger om kosthold, ernæring og fysisk aktivitet. Nasjonalt råd for ernæring*. (IS-2170) Hentet fra <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter>
- Higashi, H., Murayama S., Onishi, T., Iseki, S. & Watanabe, T. (1965). Studies on “liquefied fish protein”. In. Nutritive value of “liquefied fish protein”. *Bulletin of Tokai Region Fisheries Research Laboratory*, 43, 77-86
- Hjellnes, V., Rustad, T. & Falch, E. (2020). The value chain of the white fish industry in Norway: History, current status and possibilities for improvement – A review. *Regional Studies in Marine Science*, 36, <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101293>
- Hjelmeland, K., (1983). Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.*, 76(2) 365-372
- Horwitz, W. (2004). *Official methods of analysis of the AOAC international*. AOAC international, Gaithersburg, MD, USA.
- Huss, H. H. (1995) Quality and Quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*: 348, FAO Rome, Italy.

- Je, J.Y. & Kim, S.K. (2012); Chitosan as potential marine nutraceutical. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 121-135.
- Je, J.Y., Park, P.J. & Kim, S.K. (2005) Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38, 45-50.
- Jegannathan K.R. & Nielsen P.H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Jensen, I. J., Walquist, M., Liaset, B., Elvevoll, E. O. & Eilertsen, K. E. (2016). Dietary intake of cod and scallop reduces atherosclerotic burden in female apolipoprotein E-deficient mice fed a Western-type high fat diet for 13 weeks. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), 8.
- Jensen, IJ. & Elvevoll, E. (2016). *Sluttrapport: Human helseeffekt av marine proteiner* (Norges fiskerihøgskole). Hentet fra <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901229/>
- Johnsen, S.H., Jacobsen, B.K., Brækkan, S.K., Hansen, J-B. & Mathiesen, E.B. (2018). Fish consumption, fish oil supplements and risk of atherosclerosis in the Tromsø study. *Nutrition Journal*. 17, 56.
- Kim, S.K. & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts - a review. *Food Research International*. 39(4),383–393.
- Kim, S.Y., Je, J.Y. & Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belangerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 31-38.
- Kitts D, Weiler K (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16), 1309–1323.
- Klareskog, L., van der Heijde, D., de Jager, J.P., Gough, A., Kalden, J., Malaise, M., ... Sanda, M. (2004). Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 363, 675–681.
- Knudsen, A.K., Tollånes, M.C., Haaland, Ø.A., Kinge, J.M., Skirbekk, V. & Vollset S.E., (2017). *Sykdomsbyrde i Norge 2015. Resultater fra Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2015* (GBD 2015). Hentet fra <https://www.fhi.no/publ/2017/sykdomsbyrde-i-norge-2015/>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81
- Kristinsson, H.G. (2014). Aquatic food protein hydrolysates. In: Shahidi F, editor. Maximising the value of marine by-products. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 2007, 229-248.
- Langmyhr, E. (1981). *Enzymatisk hydrolyse av fiskeprotein: avhandling for graden doktor ingeniør ved Norges tekniske høyskole e Eyolf Langmyhr*. Institutt for teknisk biokjemi, Norges tekniskehøgskole.

- Lavigne, C., Tremblay, F., Asselin, G., Jacques, H., & Marette, A. (2001). Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 281(1), E62-E71.
- Le Gouic, A. V., Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2018). Bioactive peptides from fish protein by-products. In *Bioactive Molecules in Food; Mérillon, JM, Ramawat, KG, Eds*, 355-388.
- Lie, Ø., Lied, E., Maage, A., Njaa, L. R., & Sandnes, K. (1994). Nutrient content in fish and shellfish. *Fiskeridirektoratets skrifter Serie ernæring*, 6(2), 83-105.
- Lind, K. F., Hansen, E., Østerud, B., Eilertsen, K. E., Bayer, A., Engqvist, M., ... & Andersen, J. H. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of baretin. *Marine drugs*, 11(7), 2655-2666.
- Love, R. M. (1988). *The food fishes: their intrinsic variation and practical implications*. Farrand Press, London, 276 pp.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.
- Maehre, H. K., Edvinsen, G. K., Eilertsen, K. E., & Elvevoll, E. O. (2016). Heat treatment increases the protein bioaccessibility in the red seaweed dulse (*Palmaria palmata*), but not in the brown seaweed winged kelp (*Alaria esculenta*). *Journal of applied phycology*, 28(1), 581-590.
- Malnick, S. D., & Knobler, H. (2006). The medical complications of obesity. *Journal of the Association of Physicians*, 99(9), 565-579.
- Marcuse, R. (1960). Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*, 186(4728), 886-887.
- Marcuse, R. (1962). The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 39(2), 97-103.
- Mierke-Klemeyer, S., Larsen, R., Oehlenschläger, J., Maehre, H., Elvevoll, E. O., Bandarra, N. M., ... & Lutén, J. (2008). Retention of health-related beneficial components during household preparation of selenium-enriched African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets. *European Food Research and Technology*, 227(3), 827-833.
- Minor, L. K. (Ed.). (2006). *Handbook of assay development in drug discovery*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA.
- Mokdad, A., Ford, E. S., & Bowman, B. (2003). The continued spread of the obesity epidemic. *JAMA*, 289(1), 76-79.
- Moore, S., & Stein, W. H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, (6) 819-831
- Mozaffarian, D. (2016). Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation*, 133(2), 187-225.
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, 7(1), 5.

- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*, 47(4), 171-182.
- NHI. (2018, 4. januar) *Biologiske legemidler*. Hentet fra <https://nhi.no/sykdommer/muskelskjelett/legemiddel/biologiske-legemidler/>
- Nobile, V., Duclos, E., Michelotti, A., Bizzaro, G., Negro, M., & Soisson, F. (2016). Supplementation with a fish protein hydrolysate (*Micromesistius poutassou*): effects on body weight, body composition, and CCK/GLP-1 secretion. *Food & nutrition research*, 60(1), 29857.
- Nordrum, S., Åsgård, T., Shearer, K. D., & Arnessen, P. (1997). Availability of phosphorus in fish bone meal and inorganic salts to Atlantic salmon (*Salmo salar*) as determined by retention. *Aquaculture*, 157(1-2), 51-61.
- Norsk elektronisk legehåndbok. Diabetes type 2 (T2D). (2020). Hentet 05.mai 2020 fra <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/endokrinologi/tilstander-og-sykdommer/diabetes-mellitus/diabetes-type-2/>.
- Oriyanhan, W., Yamazaki, K., Miwa, S., Takaba, K., Ikeda, T., & Komeda, M. (2005). Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart and vessels*, 20(6), 278-285.
- Ouellet, V., Weisnagel, S. J., Marois, J., Bergeron, J., Julien, P., Gougeon, R., ... & Jacques, H. (2008). Dietary cod protein reduces plasma C-reactive protein in insulin-resistant men and women. *The Journal of nutrition*, 138(12), 2386-2391.
- Parra, D., Bandarra, N. M., Kiely, M., Thorsdottir, I., & Martínez, J. A. (2007). Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *European journal of nutrition*, 46(8), 460-467.
- Pickering, M. V., & Newton, P. (1990). Amino acid hydrolysis: Old problems, new solutions. *Lc Gc*, 8(10), 778-781.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American journal of cardiology*, 98(4), 3-18.
- Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1434-1441.
- Ramel, A., Jonsdottir, M. T., & Thorsdottir, I. (2009). Consumption of cod and weight loss in young overweight and obese adults on an energy reduced diet for 8-weeks. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(10), 690-696.
- Reaven, G. (2004). The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 33(2), 283-303.
- Reimer, R. A., Darimont, C., Gremlich, S., Nicolas-Métral, V., Rüegg, U. T., & Macé, K. (2001). A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*, 142(10), 4522-4528.

- Richardsen, R. Myhre, M. Nystøyl, R., Strandheim, G. & Marthinussen, A. (2019) *Rapport SINTEF Analyse av marint restråstoff 2018 tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge.* (2019:00475). Hentet fra <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901336/>
- Ritchlin C.T, Haas-Smith, S.A., Li, P., Hicks, D.G. & Schwarz, E.M (2003) Mechanisms of TNF- α and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of Clinical Investigation.* 111(6):821-831
- Ross, A., Vincent, A., Savolainen, O. I., Sandberg, A. S., & Undeland, I. (2017). Dietary Protein Sources Beyond Proteins and Amino Acids-A Comparative Study of the Small Molecular Weight Components of Meat and Fish using Metabolomics. *The FASEB Journal*, 31(1_supplement), 652-13.
- RUBIN (2003) *Kontinuerlig enzymprosessering av ferske marine biprodukter. Marine Bioproducts.* (rapport 108).
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9), 765-791.
- Rylander, C., Sandanger, T. M., Engeset, D., & Lund, E. (2014). Consumption of lean fish reduces the risk of type 2 diabetes mellitus: a prospective population based cohort study of Norwegian women. *PloS one*, 9(2).
- SIGMA (2020). *Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate.* Hentet 3.april 2020 fra <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/protease-activity-assay.html>
- Simons, R. K., Junger, W. G., Loomis, W. H., & Hoyt, D. B. (1996). Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment--role of circulating TNF-alpha and IL-beta? *Shock*, 6(1), 39-45.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food reviews international*, 20(1), 77-90.
- Slizyte R, Dauksas E, Falch E, Storro I, Rustad T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 2005;40(6):2021–2033.
- Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., & Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6), 668-677.
- Smith, J. D., Hou, T., Ludwig, D. S., Rimm, E. B., Willett, W., Hu, F. B., & Mozaffarian, D. (2015). Changes in intake of protein foods, carbohydrate amount and quality, and long-term weight change: results from 3 prospective cohorts. *The American journal of clinical nutrition*, 101(6), 1216-1224.
- Strasburg, G., Xiong, Y. L., & Chiang, W. (2007). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. In *Fennema's Food Chemistry* (pp. 935-986). CRC Press.
- Tastesen, H.S., Keenan, A.H., Madsen, L., Kristiansen, K. & Liaset, B. (2014). Scallop protein with endogenous high taurine and glycine content prevents high-fat, high-sucrose-induced obesity and improves plasma lipid profile in male C57BL/6J mice. *Amino Acids*, 46, 1659-1671.

- Theodore, A. E., Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7459-7466.
- Thorsdottir, I., Tomasson, H., Gunnarsdottir, I., Gisladdottir, E., Kiely, M., Parra, M. D., ... & Martinez, J. A. (2007). Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *International journal of obesity*, 31(10), 1560-1566.
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(3), 395-401.
- Tørris, C., Molin, M., & Småstuen, M. C. (2017). Lean fish consumption is associated with beneficial changes in the metabolic syndrome components: a 13-year follow-up study from the Norwegian Tromsø study. *Nutrients*, 9(3), 247.
- Vassdal, T. (2015), *Sluttrapport FHF-prosjekt: 900890*. Tromsø, Universitet i Tromsø – Norges arktiske universitet
- Venugopal, V. (2019). Nutrients and nutraceuticals from seafood. In *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1397-1440). Springer, Cham.
- Vildmyren, I., Cao, H. J. V., Haug, L. B., Valand, I. U., Eng, Ø., Oterhals, Å., ... & Gudbrandsen, O. A. (2018). 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. *Marine drugs*, 16(6), 197.
- Wade, A. M., & Tucker, H. N. (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(6), 308-315.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*, 68(5), 280-289.
- Wasskog, A., Lind, L.H., Myklebust, A., Stormo, K. L. & Skogli, E. (2019). *Overvekt og fedme i Norge: Omfang, utvikling og samfunnskostnader*. (Menon-publikasjon 9/2019). Hentet fra <https://www.menon.no/wp-content/uploads/2019-09-Overvekt-og-fedme-i-Norge.pdf>
- WHO. (2018). Noncommunicable diseases. Hentet 1.april 2020 fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- WHO. (2020, 1. april) Obesity and overweight. Hentet fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Winther, U., Myhre, M. S & Nystøyl, R, (2019). Verdiskapings- og restråstoffanalyser i norsk sjømatnæring 2017-2019, Trondheim: SINTEF Ocean, Kontali Analyse AS.
- Wu, J. H., Micha, R., Imamura, F., Pan, A., Biggs, M. L., Ajaz, O., ... & Mozaffarian, D. (2012). Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *British journal of nutrition*, 107(S2), S214-S227
- Zair, Y., Duclos, E., Housez, B., Vergara, C., Cazaubiel, M., & Soisson, F. (2014). Evaluation of the satiating properties of a fish protein hydrolysate among overweight women. *Nutrition & Food Science*.

- Zhang, S., & Zhang, Z. Y. (2007). PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug discovery today*, 12(9-10), 373-381.
- Zhao, X., Han, Q., Gang, X., Lv, Y., Liu, Y., Sun, C., & Wang, G. (2017). The role of gut hormones in diet-induced weight change: a systematic review. *Hormone and Metabolic Research*, 49(11), 816-825.

Vedlegg 1

Utregning for mengde enzym som skulle tilsettes i hydrolyse.

Enzym	A	B	C	D	E
UA/ml løsning	0,563	0,975	1,4	0,74	0,51
% protein torskehoder	15	15	15	15	15
gram kvernedede torskehoder	100	100	100	100	100
UA/g protein ønsket	10	10	10	10	10
ml enzym tilsatt	0,160	0,092	0,064	0,122	0,178

Vedlegg 2

Rangering av hydrolysatene basert på proteinkvalitet og utbytte

Proteinkvalitet og utbytte						
	Proteinutbytte	Forhold vann:sediment	Proteininnhold	EAA	FAA	EAA i FAA
1	C	C	C	A	D	D
2	A	A	A	C	E	E
3	B	B/E	E	B	C	B
4	E	B/E	D	E	B	C
5	D	D	B	D	A	A
6	HK	HK	HK	HK	HK	HK

Vedlegg 3

Rangering av hydrolysatene basert på bioaktivitet

Bioaktivitet					
	ORAC	FRAP	PTP1B	GLP-1	TNF
1	C	D	-	HK	-
2	A	HK	-	E	-
3	E	A	-	B	-
4	D	E	-	-	-
5	B	C	-	-	-
6	HK	B	-	-	-

