

UTVIKLING AV OMBORDPRODUSERT FISKEMEL FOR ET HUMANT KONSUMMARKED

TITTEL	Utvikling av ombordprodusert fiskemel for et humant konsummarked
FORFATTERE	Ola Ween, Janne Stangeland og Margareth Kjerstad
PROSJEKTLEDER	Ola Ween
RAPPORT NR.	MA 17-19
SIDER	24
PROSJEKTNUMMER	54858
PROSJEKTITTEL	Utvikling av ombordprodusert fiskemel for et humant konsummarked
OPPDRAKSGIVER	FHF
ANSVARLIG UTGIVER	Møreforskning Ålesund AS
ISSN	0804-5380
DISTRIBUSJON	Åpen
NØKKELOORD	Fiskemel, limvann, bioaktivitet, intervensjonsstudier, blodtrykk

SAMMENDRAG

Møreforskning Ålesund AS (MFÅ) har i samarbeid med Klinisk Institutt ved Universitet i Bergen og rederiene Strand Havfisk AS og Halstensen Granit AS undersøkt potensielle helseeffekter i ombordprodusert fiskemel fra biprodukt av torsk. Ombordprodusert fiskemel fra hvitfisktrålerne F/T Havstrand (med HG-produksjon) og F/T Granit (med filetproduksjon) ble sammenlignet ved kjemiske analyser, aminosyreprofiler, peptidprofiler ved HPLC, og hemmende effekt på det blodtrykksregulerende enzymet ACE-1. Videre ble fiskemel sin effekt på blodtrykk undersøkt i sykkelig overvektige rotter, i et klinisk oppsett. Fiskemel fra HG-produksjon (kalt SFM i det følgende) og filetproduksjon (kalt GFM i det følgende), er kjemisk relativt like. Undersøkelse av peptidprofiler tyder på at begge fiskemeltypene har et naturlig innhold av vannløselige peptider som kan være interessante med tanke på bioaktivitet. Begge typer fiskemel har hemmende effekt på ACE-1 og høyere effekt enn fiskemel produsert fra ren fiskefilet (kalt FFM i det følgende). Den hemmende effekten øker noe etter behandling med proteolytiske enzymer. Fiskemel testet ut i en spisestudie i rotter gjennom 4 uker dokumenterte kraftig senkning i blodtrykk for en av meltypene. Andre parametere var uforandret.

© FORFATTAR/MØREFORSKING

Forskriftene i åndsverkloven gjelder for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller framstille eksemplar til privat bruk. Uten særlig avtale med forfatter/Møreforskning er all annen eksemplarframstilling og tilgjengeliggjøring bare tillatt så langt det har hjemmel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettighetshavere til åndsverk.

SUMMARY

Møreforsking Ålesund AS (MFÅ) has collaborated with the Clinical Institute at University of Bergen and the shipping companies Strand Havfisk AS and Halstensen Granit AS to study the potential health-effects of fishmeal produced at sea. Fishmeal from the fishing trawlers F/T Havstrand and F/T Granit was compared with respect to chemical analysis, amino-acids, peptide-profiles and inhibition by the blood-pressure regulating enzyme, ACE-1. Obese Zucker rats were fed fishmeal-diets and the effect of blood pressure analysed in a clinical setting.

Fishmeals produced after HG-processing (referred to as SFM) or fileting of fish (referred to as GFM), have a similar chemical profile. Both types of fishmeal contain water-soluble peptides that could be interesting regarding bioactivities. They both also show inhibitory activity towards ACE-1. The measured inhibition of ACE-1 was higher compared to the results of an experimental fishmeal produced from pure fish-filet (referred to as FFM). The ACE-1 inhibitory activity increased when proteolytic enzymes were employed. A 4-week intervention study in obese rats documented that one of the fish meal types had a strong reducing effect on the measured blood-pressure. Additional analysed parameters, were not affected.

FORORD

Møreforskning, Ålesund AS (MFÅ) har vært prosjekteier, med Ola Ween som prosjektleder. Viktige prosjektmedarbeidere fra MFÅ har vært Margareth Kjerstad og Janne Kristine Stangeland. Prosjektet har vært gjennomført i tett samarbeid med Klinisk Institutt ved Universitetet i Bergen (ved Oddrun Gudbrandsen) og rederiene Strand Rederi AS (ved Janne Grethe Strand Aasnæs og Jon Grimstad) og Halstensen Granit AS (ved Alfred Halstensen).

Viktige bidragsytere har vært Åge Oterhals (Nofima, Bergen) og Jørgen Borthen (Norsk Sjømatcenter).

Alle resultater i prosjektet er basert på analyser av fiskemel og limvann produsert om bord i F/T Havstrand og F/T Granit. Fiskemel fra F/T Granit, omfattes av varemerket Granit Seafood®, Bekkjarvik, Norge. Det er planlagt 2 vitenskapelige publikasjoner basert på fremkomne resultater i prosjektet som vil publiseres i løpet av 2018. Disse vil inneholde detaljer rundt analyser og resultater.

Prosjektet har vært finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) gjennom «Fellesområder – Marint restråstoff» (prosjektnummer 901239). Kontaktpersoner i FHF har vært Frank Jakobsen og Lorena Gallart Jornet.

MFÅ ønsker å takke alle som har bidratt til gjennomføring av prosjektet, samt FHF for finansiering.

Ålesund 28.12.2017

INNHold

Sammendrag.....	3
Summary.....	4
FORORD	5
1. Bakgrunn	7
2. Prosjekt mål.....	8
3. Gjennomføring	9
4. Resultat og diskusjon	10
4.1. Kjemiske analyser	10
4.2. enzymatisk hydrolyse av fiskemel	11
4.3. HPLC analyser av hydrolyse av fiskemel - peptidprofiler	12
4.4 Hemming av det blodtrykkregulerende enzymet ACE-1.....	15
4.4. gjennomføring av dyreforsøk.....	18
5. Konklusjon	21
Referanser	22

1. BAKGRUNN

Norge har en moderne industrialisert trålerflåte bestående av rundt 40 havgående frysetrålere som utnytter hvitfisk som torsk, sei og hyse. Majoriteten av fartøyene produserer fryst fisk etter hodekapping og sløying (HG) av råstoffet. 11 av fartøyene har konsesjon for filetoproduksjon men kun 3 benytter seg av denne muligheten. Kun 8 av de største trålerne er utstyrt for videreforedling av biprodukt ombord og hoveddelen av flåten bidrar til lav utnyttelsesgrad av biprodukt [1].

Produksjon av fiskemel fra ferskt restråstoff foregår ombord i kompakte melfabrikker. Prosessen består av en 6-trinns linje som inkluderer oppmaling av råstoff, koking, pressing, tørking, mølling og pakking. Pressvæske med olje og vannløselige komponenter går rett over bord fra de fleste fartøyene. Dette er forskjellig fra fiskemelindustrien på land. F/T Havstrand produserer per i dag fiskeolje ved sentrifugering av pressvæsken i en trikanter. Ombordprodusert fiskemel er derfor ikke et «hommel» sammenlignet med fiskemel fra landbaserte anlegg som tilbakefører limvann i tørkeprosessen. Anslagsvis produserer norske fiskefartøy årlig rundt 5000 tonn hvitfiskmel, noe som utgjør mindre enn 0.1 % av verdens totale volum av fiskemel [2]. Fiskemelet går hovedsakelig til fôrproduksjon for oppdrettsnæring og i noe grad til produksjon av gris og høns [3] [4]. Fiskemel med høyest proteininnhold får per i dag best betalt.

I HG-produksjonen er det hode og innmat som blir restråstoffet. Filetoproduksjon vil i tillegg gi tilgang på rygger og noe ekstra avskjær. Fiskemel basert på avskjær fra filetering vil derfor ha noe høyere innhold av protein og lavere innhold av mineraler sammenlignet med HG-mel og oppnår noe bedre pris i markedet. Produsentene av fiskemel fra hvitfisk opplever en uheldig prismessig avhengighet av et sterkt fôrmarked, noe som er lite gunstig for en bransje med liten påvirkningskraft. Alle typer dokumentasjon som bidrar til at norsk hvitfiskmel kan differensiere seg fra andre fiskemel i markedet, er derfor ønsket. Flere av de nyeste trålerne har lisens for produksjon av mel (og olje) for humant konsum. Mel og olje for humant konsum er et bedre betalende marked enn mel og olje til fiskefôr. De nyeste trålerne ønsker derfor å rette seg inn mot dette markedet for å kunne få bedre lønnsomhet av restråstoffet.

Det er kjent at restråstoff fra fisk inneholder lettfordøyelige muskelproteiner som med sin høye ernæringsverdi egner seg godt for humant konsum [5]. Proteiner fra fisk er koblet opp mot en rekke antatt gunstige helseeffekter på hjerte-karsystemet, fordøyelse, immunforsvar, nervesystemet og kroniske sykdommer [6], [7]. Gunstig effekt på blodtrykk er spesielt mye undersøkt gjennom studier av ulike marine proteiner sin regulerende effekt på Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE-1). [5], [8]. Det er kjent at problemer med blodtrykkregulering kan knyttes til utvikling av fedme, metabolske sykdommer (diabetes) og høyt blodtrykk [7]. Men hovedsakelig mye av denne dokumentasjonen basert på laboratoriestudier på fiskeprotein, og lite kjent om effekt i kliniske forsøk.

Møreforskning gjennomførte kjemiske studier av fiskemel fra HG-tråleren F/T Havstrand i et tidligere prosjekt og fant at proteinet er av høy kvalitet [3]. I dette arbeidet ble det i laboratorieforsøk også påvist at melet og limvannet sannsynligvis har en hemmende effekt på ACE-1, en effekt som økte etter behandling med proteinnedbrytende enzym [9]. Disse resultatene gjorde at man ønsket å teste effekten av HG-fiskemel i dyreforsøk eller i mennesker. Ved Klinisk Institutt ved Universitetet i Bergen har man i flere år undersøkt effekt av ulike marine proteiner ved intervensjonsstudier i dyr (rotter) og mennesker. Flere av disse arbeidene har vist positive effekter på hjerte-karsystemet, fedmeproblematikk og tilknyttede problemstillinger som diabetes

[10], [11]. I et pågående prosjekt ved instituttet, og med finansiering fra Regionale Forskingsfond Vest, testes ombordprodusert fiskemel og limvann produsert fra avskjær etter filetering på F/T Granit. Melet testes ut for effekt på fedme og aldersrelatert muskeltap (sarkopeni) hos mennesker ved inntak av proteintabletter med fiskemel og limvann fra filetproduksjon. Det var naturlig å undersøke muligheter for å koble på uttesting av HG-mel som en del av dette studiet. Men grunnet begrenset kapasitet og tilgang på frivillige forsøkspersoner ble det i stedet avgjort å sammenligne fiskemel i et eget prosjekt. I det følgende prosjektet ble derfor fiskemel fra F/T Havstrand (SFM) og F/T Granit (GFM) sammenlignet ved kjemiske analyser, effekt på blodtryksregulatoren ACE-1, og effekt på ulike parametere i sykkelig overvektige rotter. Fordelen med forsøk i en dyremodell er at man kan fange opp eventuelle endringer i organer og vev. Dette kan gi verdifull informasjon om virkningsmekanismer og endringer som ikke vises i blodprøver.

2. PROSJEKTMÅL

Mål

Den overordnede målsetningen med prosjektet er å utvikle kvalitetsprodukter av ombordprodusert fiskemel til human anvendelse. Målet er å avdekke nye lønnsomme produkttegenskaper og markedsmuligheter samt å utvikle en lønnsom og bærekraftig prosessering av restråstoff fra havfiskeflåten. Hovedfokus i prosjektet er å gjennomføre en intervensjonsstudie i en rottemodell for å dokumentere ernærings- og helsemessig effekter av ombordprodusert fiskemel og limvann.

Resultatmål

- Gjennomføre en intervensjonsstudie i en rottemodell for å dokumentere ernærings- og helsemessig effekter av ombordprodusert fiskemel og limvann. Studiet skal gjennomføres på følgende eksperimentelle grupper: - Kontroll (melkeprotein) - Filetmel - Limvann fra en filetråler - HG mel - Limvann fra en HG tråler ·
- Dokumentere effekt av ombordprodusert fiskemel og limvann på kliniske parametere tilknyttet hjerte-kar sykdommer og utvikling av fedme og diabetes.
- Dokumentere innhold av bioaktive komponenter i laboratorieanalyser som kan knyttes til regulering av blodtrykk, diabetes og fedme.

Effektmål:

- Fokus på proteiner i hvitfiskemel og limvann kan gi nye innovative produkter og anvendelsesområder i norsk fiskerinæring. Kunnskapsgrunnlaget er overførbart til landbasert produksjon av fiskemel.
- Norske trålere har et potensial for å produsere 5000 tonn hvitfiskemel pr år. Dersom en lykkes med å få innpass i konsumsegmentet forventes en økt merverdi for hvitfiskemel på minst 20 %. Basert på dagens melpriser til fôr anvendelse på ca. 13 kr/kg, har flåten muligheter for å øke verdipotensialet fra 650 million i dagens nivå til 780 million kroner.
- Rederiene vil kunne øke sin konkurransevne både nasjonalt og internasjonalt og bli foretrukne leverandører til nye kunder og markedsegment.

- Økt lønnsomhet uten at en øker fangstintensiteten, noe som bidrar til mer bærekraftig utnyttelse av fiskeressursene og en økt miljøprofil for både trålerflåten så vel som for hele den norske fiskerinæringen.

3. GJENNOMFØRING

I prosessen med utforming av prosjektet, ble følgende spørsmål ansett som interessante å få svar på:

- Er det forskjell på fiskemel fra Havstrand (SFM) og Granit (GFM)? (Hypotese: Ingen forskjell).
- Er det forskjell på fiskemel fra filet (FFM) og restråstoff (SFM, GFM)? (Hypotese: Ingen forskjell).
- Er det forskjell fiskemel (SFM; GFM) og placebo (melkeprotein)? (Hypotese: Forskjell).

For å kunne sammenligne fiskemel fra F/T Havstrand (SFM) med og F/T Granit (GFM) ble det gjennomført en koordinert fangst av råstoff slik at utgangspunktet og råstoffegenskapene for fiskemelproduksjon fra var så likt som mulig. Dette ble gjort ved at fartøyene Havstrand og Granit gjennomførte en koordinert fangst av torsk i samme område noen dager i juli 2016. Det ble produsert presskake (PK) fiskemel omgående etter prosessering av fangst på feltet. Fiskemel og limvann (LV) fra produksjonen ble samlet på begge båtene for videre analyser på land. På land ble limvann konsentrert ved inndamping og deretter tørket til pulver ved frysetørking (FT). LV-pulver ble blandet inn i PK-mel fra Granit for å etterligne ett helmel (HM) og lage et produkt som kunne testes ut i dyreforsøk med rotter. Det ble også laget et fiskemel fra ren, torskefilet (FFM) som kunne benyttes for å sammenligne fiskemel fra restråstoff med protein fra ren fiskemuskel.

For detaljerte beskrivelser av metoder og resultater fra prosjektet, henvises det til to planlagte publikasjoner:

- Ola Ween^{a*}, Janne Stangeland^a, Oddrun Gudbrandsen^b, Åge Oterhals^c, Alfred Halstensen^b
Characterization of fish meal peptides produced from fresh by-products of cod (*Gadus Morehua*).
^aMøreforskning, Ålesund AS, PO Box 5075 – 6021 Ålesund, Norway
^bInstitute of Medicine, Section of Medical Biochemistry, University of Bergen, Haukeland University Hospital, Norway
^cNofima, Kjerreidviken 16, NO-5141 Fyllingsdalen, Norway
- Gudbrandsen et al (2018). Regulation of blood pressure in obese Zucker rats by fishmeal produced from fresh by-products of cod (*Gadus morhua*).

4. RESULTAT OG DISKUSJON

Alle prøvene som ble benyttet i rotteforsøkene er beskrevet i Tabell 1, hvor gruppenummer korresponderer med grupper det henvises til i kapittel 4.5 Gjennomføring av dyreforsøk.

Tabell 1. Oversikt over ulike fiskemel og prøver som ble produsert og analysert.

Gruppe	Restråstoff	Tråler	Produktnavn	Bearbeiding	Kommentar
1	Myse		Casein		Kontroll i dyreforsøk
2	HG-(torsk)	Havstrand	SLV	K + FT	Limvannspulver
3	HG-(torsk)	Havstrand	SFM	Ingen	PK-fiskemel
4	HG-(torsk)	Havstrand	HM	SFM + SLV	Helmel
5	Filetering (torsk)	Granit	GFM	Ingen	PK-fiskemel
6	Torskefilet	Granit	FFM	K + FT	Kontroll

HG (hodekappet og sløyd), LV (limvann), SLV (limvann, Havstrand), K (konsentrering ved inndamping), FT (frysetørking), PK (presskake), HM (helmel), SFM (presskakemel, Havstrand), GFM (presskakemel, Granit), FFM (fiskemel lager av ren torskefilet).

4.1. KJEMISKE ANALYSER

Resultater fra kjemiske analyser av innsamlede prøver er vist i tabell 2. Som forventet ligger proteininnholdet i fiskemel fra HG-produksjon (Strand fiskemel, SFM) noe lavere enn i fiskemel fra produksjon av filet (Granit fiskemel, GFM). I hovedsak skyldes dette at HG-produksjon gir restråstoff (hoder og innmat) med mindre andel protein, enn i en filetproduksjon som inkluderer rygger med kjøttrester og mer avskjær. Askeinnholdet er også som forventet noe høyere i SFM (24.2 %) enn i GFM (22.5 %). Innholdet av fett i HG melet fra Havstrand (SFM) var 9.1% og høyere enn i melet fra Granit 7.4%. Limvannsprøver ble konsentrert ved inndamping og tørket ved frysetørking. Limvann fra Granit ble ikke behandlet videre da råtten lukt og misfarging tydet på dårlig kvalitet. Dette limvannet (GLV) ble ikke analysert i prosjektet. Analyser av limvann fra Havstrand (SLV) viser at det er mulig å lage et pulver med høyt proteininnhold (72.3 %) og noe mindre aske (16.7 %) sammenlignet med fiskemel. Havstrand produserer høykvalitets fiskeolje etter trikantering av pressvæsken om bord, og således fjerne mye fett fra limvannet. Tørket limvann inneholdt 1.2% fett. Fiskemel produsert fra ren torskefilet (fiskemel filet, FFM) i en nedskalert prosess ved Nofima, viser høyt innhold av vannløselige proteiner, 3.6% fett og lavt innhold av aske.

Tabell 2. Kjemisk sammensetning av fiskemel og limvann produsert fra biprodukt av torsk.

<i>Prøve</i>	<i>Protein (N*6.25)</i>	<i>Aske</i>	<i>Vann</i>	<i>Vannløselig protein</i>	<i>Fett</i>	<i>Salt (Na)</i>
1 Fiskemel, HG-produksjon (SFM)	62.8	24.2	2.5	ia	9.1	ia
2 Fiskemel, Filet-produksjon (GFM)	65.4	22.5	6.4	13.7	7.4	0.69
3 Limvann, HG—produksjon (SLV)	72.3	16.7	ia	98.1	1.2	ia
4 Limvann, Filet—produksjon (GLV)*						
5 Fiskemel fra torskefilet (FFM)	91.8	7.1	2.6	24.1	3.6	0.53

*) Ikke analysert på grunn av dårlig kvalitet, ia (ikke analysert)

Analysert aminosyreprofil viste som forventet at SFM og GFM har lik sammensetning (Tabell 3). Eksempelvis er summen av essensielle aminosyrer (TEA) relativt lik og ligger nær verdi vist for analysert hvitfiskemel i tidligere prosjekt [9]. Innhold av en viktig aminosyre som Lysin, er noe lavere i SFM (4.61 %) i forhold til GFM (5.21 %). Innholdet av bindevevsprotein-assosierte aminosyrer (glysin, prolin og hydroxyprolin) er relativt likt. Innholdet av ikke-proteinbundne aminosyrer (frie aminosyrer) er noe høyere i SFM en i GFM.

4.2. ENZYMATISK HYDROLYSE AV FISKEMEL

Fordi bioaktivitetsanalyser i prosjektet er avhengig av analyser av vannløselige proteiner, ble det også gjennomført hydrolyse av fiskemel med proteinnedbrytende enzymer (såkalte proteaser). Denne prosessen vil frigjøre vannløselige peptider [12] og på den måten gi et indirekte inntrykk av fiskemelprotein som brytes ned gjennom naturlig fordøyelse. I prosjektet ble fiskemel behandlet med to effektive, industrielle proteaser (Protamex og Alcalase), samt en kombinasjon av tre kjente fordøyelsesenzym (pepsin, trypsin og chymotrypsin). Prøver ble hydrolysert i hhv 0, 1, 3 og 24 timer. Representativ aminosyreprofil av hydrolysert fiskemelprotein (24 timer) er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Aminosyreprofiler i fiskemel før og etter hydrolyse med Protamex, Alcalase og fordøyelsesenzym (pepsin, trypsin, chymotrypsin). TEA (sum essensielle aminosyrer), TAA (sum aminosyrer), TFA (sum frie aminosyrer). GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand).

	Uten enzym		SFM **	Protamex		Alcalase		Fordøyelsesenzym	
	SFM	GFM		SFM	GFM	SFM	GFM	SFM	GFM
<i>Aminosyre</i>									
Asparaginsyre	5.97	6.43	5.84	6.26	5.62	7.48	8.44	5.12	5.96
Serin	3.24	3.29	2.99	3.71	2.34	4.24	3.90	3.25	3.37
Glutaminsyre	8.36	9.00	8.19	9.65	9.21	11.10	13.20	7.71	8.97
Prolin	3.14	3.02	2.85	4.57	2.91	5.00	4.14	3.79	3.55
Glysin	5.48	5.21	4.65	9.27	5.11	9.73	7.23	7.38	6.50
Alanin	3.92	4.13	3.76	4.64	4.13	5.31	5.27	4.19	4.32
Valin*	2.99	3.20	3.00	2.59	2.33	3.28	3.45	2.43	2.77
Isoleucin*	2.53	2.67	2.65	1.86	1.43	2.44	2.57	1.76	2.09
Leucin*	4.50	4.81	4.54	3.99	3.05	5.00	5.35	3.69	4.26
Tyrosin*	2.06	2.18	2.07	1.36	0.86	1.93	1.84	1.48	1.74
Phenylalanin*	2.50	2.63	2.57	1.77	1.08	2.34	2.05	1.82	2.06
Histidin*	1.30	1.37	1.38	1.22	0.89	1.46	1.61	1.12	1.29
Lysin*	4.61	5.21	4.78	4.59	4.46	5.35	6.90	4.49	5.58
Arginin*	4.24	4.27	4.00	4.27	2.47	5.00	4.32	4.21	4.67
Tryptofan	0.66	0.69	0.70	0.28	0.25	0.41	0.42	0.34	0.42
Cystein-Cystein*	0.65	0.68	0.55	0.38	0.28	0.41	0.51	0.29	0.40
Methionin*	1.80	1.93	1.74	1.46	0.87	2.04	1.83	1.22	1.36
Hydrokysprolin	0.81	0.80	nd	2.07	1.00	2.07	1.25	1.55	1.24
Ornitin	<0.05	<0.05	nd	<0.05	0.46	<0.05	0.18	0.13	<0.05
Treonin*	2.80	2.94	2.83	2.55	1.78	3.22	3.27	2.43	2.71
sum, TEA	29.98	31.89	30.11	26.04	19.50	32.47	33.70	24.94	28.93
sum, TAA	61.56	64.46		66.49	50.53	77.81	77.73	58.40	63.26
<i>Frie aminosyrer***</i>									
Taurin	0.38	0.33	0.26	1.22	0.89	1.04	0.92	0.76	0.53
TFA inkludert taurin	0.75	0.56	0.7	3.18	6.01	3.22	3.76	2.17	2.01
sum TAA + TFA	62.31	65.02	59.70	69.67	56.54	81.03	81.49	60.57	65.27

*) Essensielle aminosyrer, **) Tall fra Ween et al [9], ***) Frie aminosyrer i vev, ikke assosiert med protein.

4.3. HPLC ANALYSER AV HYDROLYSE AV FISKEMEL - PEPTIDPROFILER

Mange av de påviste bioaktive peptider som er undersøkt er kjent for å ha en størrelse på rundt 2-20 aminosyrer. Med en gjennomsnittlig molekylvekt (MW) for aminosyrer på 110 Dalton, vil disse peptidene typisk ligge i området 200-2200 Dalton [13]. For å sammenligne peptidprofiler for

SFM og GFM, ble det gjennomført HPLC-analyser av peptider i vannløselig fraksjon av de to fiskemelene. Resultater av fiskemel løst i vann i 0, 1, 3 og 24 timer, er vist i tabell 4. Peptidprofilene for SFM og GFM er relativt like. Det er interessant at det er et naturlig høyt innhold av peptider (25 -35 % av total) i området 200-500 Dalton (di-tripeptider) i fiskemel fra begge båtene (markert rødt, tabell 4). Til tross for noe reduksjon over tid, ser denne fraksjonen ut til å være relativt stabil ved inkubasjon i vann opptil 24 timer. Hovedeffekten av å løse melet i vann ser ut til å påvirke proteiner med høyest molekylvekt hvor man en gradvis reduksjon av andel ble observert. Eksempelvis reduseres andelen protein med MW 20000 fra (32-35 %) ved tid = 0, til rundt 2-6 % etter 24 timer i vann.

Tabell 4. Analyser av prosentvis fordeling av vannløselige peptider i fiskemel etter 0, 1 og 3 timer i vann. GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand). MW (molekylvekt i Dalton).

MW	GFM t=0	SFM t=0	GFM t=1	SFM t=1	GFM t=3	SFM t=3	GFM t=24	SFM t=24
20000	32.9	35.8	28.1	29.8	32.3	29.9	6.4	1.7
15000	7	7.3	8.2	8.1	9.2	7	4.7	3.5
10000	7.6	9	8.6	9.9	8.8	8.2	10.6	10
7500	2.2	3.2	2.5	3.5	2.5	2.8	7.6	7.3
5000	1.7	3.2	2	3.4	2.1	2.7	13.4	10.5
3000	1.2	2.2	1.6	2.6	1.5	2.2	13.5	13
1500	1.3	2.7	1.9	3.4	2	2.9	7.9	15.3
1200	0.7	0.9	0.7	0.9	0.6	0.9	1	3.2
1000	3.2	2.1	2.9	1.8	2.6	2.5	2.2	3.1
800	2.4	2.3	2.3	2.3	2.1	2.6	2.1	3.4
500	18.3	12.1	16.3	10.8	13.9	14.1	10.2	10.7
200	17.5	14.2	20	16.1	18	16.5	14.2	12.3
0	4.1	5	4.9	7.3	4.5	7.6	6.2	6.1

Analyser av hydrolysert fiskemel ved HPLC viser at de ulike enzymene virker noe forskjellig på nedbrytning av melet og peptider som er anriket er uthevet i rødt som vist i tabell 5a-c. Alcalase og Protamex bryter raskt ned de største proteinene (15-20.000 Dalton) allerede etter en time (Tabell 4) og gir en større andel av peptider i området 1500-7500 Dalton. Protamex har i tillegg effekt på peptider i området 800-1000 Daltons. Begge enzymer bryter også ned små peptider i området 200-500 Dalton. Dette er innenfor et område hvor man potensielt kan ha naturlige bioaktive peptider med størrelse rundt 2-5 aminosyrer. Effekten av å behandle mel med fordøyelsesenzym (pepsin, trypsin og chymotrypsin) gav en anrikning av peptider i området 1500-7500 (13-50 aminosyrer).

Tabell 5a. Analyser av prosentvis fordeling av peptider i fiskemel hydrolysert med Alcalase (0,1,3 og 24 timer). Fiskemel behandlet med samme enzym er vist side ved side¹. GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand).

MW	GFM				SFM			
	0	<i>Alcalase</i>			0	<i>Alcalase</i>		
	0	1	3	24	0	1	3	24
20000	20.8	2.8	0.3	0.5	26.9	0.4	0.1	0.4
15000	5.2	0.7	0.2	0.2	6.9	1.4	0.4	0.2
10000	6.5	6.2	2.2	1.1	8.9	10	4.1	1.8
7500	2.2	7	4	2	3.4	10.6	6.5	3.3
5000	1.8	12.8	10.2	7.1	3.3	16.1	12.5	9.1
3000	1.6	17.1	17.3	14.2	2.4	16.1	17.8	14.8
1500	1.8	22.9	29	27.4	3.1	18	23.9	24.9
1200	0.9	4.4	7.2	7.6	1.1	3.2	4.5	6.4
1000	3.8	3.3	4.6	5	2.5	2.2	3.1	3.8
800	1.4	2.7	4.1	5.5	3	2.3	3.2	4.1
500	23.5	8.6	9.1	11.7	15.9	7	8.6	10.7
200	21	8.8	8.6	11	17.8	9.2	10.1	12.5
0	9.6	2.5	3.3	6.7	4.8	3.4	5.2	8

Tabell 5b. Analyser av prosentvis fordeling av peptider i fiskemel hydrolysert med Protamex (0,1,3 og 24 timer). Fiskemel behandlet med samme enzym er vist side ved side. GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand).

MW	GFM				SFM			
	0	<i>Protamex</i>			0	<i>Protamex</i>		
	0	1	3	24	0	1	3	24
20000	28.9	0.1	0.1	0.4	36.9	0.9	0.9	0.2
15000	5.3	0.7	0.3	0.2	6	0.8	0.3	0.1
10000	6.3	8.2	3.5	1.3	7.2	8.9	3.8	1.7
7500	1.9	7.6	4.5	2.1	2.8	9.1	5	2.7
5000	2.1	14.7	11.2	6.7	3	16.2	11.4	8.1
3000	1.5	19.2	18.8	15.3	2.3	17.6	17.2	16.3
1500	1.6	24.6	31.6	34	3.3	20.5	27.1	32.2
1200	0.7	6	8.7	10.8	1	4.8	7.1	10.1
1000	3.7	3.7	5.3	7.4	2.2	3.1	4.7	6.1
800	2.7	3.3	5.6	7.4	2.4	3	4.6	6
500	20.8	4.8	4.9	8.2	12.4	4.8	6.1	7.9
200	19.3	5.6	4.4	4.5	14	6.7	7.7	6.4
0	5.3	1.6	1.2	1.9	6.5	3.5	4.2	2

Tabell 5c. Analyser av prosentvis fordeling av peptider i fiskemel hydrolysert med fordøyelsesenzymmer (pepsin, trypsin, chymotrypsin) (0,1 og 6.5 timer). Fiskemel behandlet med samme enzym er vist side ved side. GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand).

MW	GFM			SFM		
	<i>Fordøyelse</i>			<i>Fordøyelse</i>		
	0	1	6.5	0	1	6.5
20000	28.4	36.8	29.9	39.4	32.6	32.5
15000	4.6	8.9	8.3	5.8	11.8	11
10000	4.6	11.5	11	7.2	12.2	11.7
7500	1.6	6.3	9.3	2.6	6	6.3
5000	1.9	8.1	7.5	2.5	8.4	8.5
3000	1.3	6.3	8.4	2.3	7.1	8.2
1500	1.3	4.1	5.6	2	5.5	6.5
1200	0.8	0.6	0.9	0.7	1.2	1.1
1000	4.1	1.2	1.9	2.2	1.2	1
800	2.8	1	1.3	2.8	1	1
500	22.7	6.7	8.2	14.2	4.7	3.6
200	19.4	7	6.5	14.3	6.1	5.3
0	6.5	1.4	1.3	4.1	2.3	3.1

4.4 HEMMING AV DET BLODTRYKKREGULERENDE ENZYMET ACE-1

Alle hydrolysat ble testet ut for eventuell hemmende effekt på det blodtrykkregulerende enzymet ACE-1. ACE-1 er kun et av flere enzymer som regulerer blodtrykk i kroppen. Men fordi det er kjent at dette enzymet kan reguleres av marine proteiner og peptider [14], kan det være en god indikator på om man har bevart bioaktive peptider i fiskemel. Effekt på ACE-1 er også koblet opp mot effekt på en rekke livsstilssykdommer som overvekt og diabetes [13], [15].

Først ble det gjennomført analyser av ACE-1 hemmingseffekt av vannløselige peptider fra *ikke-hydrolysert* fiskemel. Det er tidligere vist at naturlige, vannløselige proteiner fra fiskemel kan ha hemmende effekt på ACE-1 [9]. I dette prosjektet ble vannløselige peptider konsentrert ved tørking for å oppnå en konsentrasjon mer lik det naturlige innholdet. Resultat av vannløselige komponenter på ACE-1 hemming er vist i Tabell 5 hvor effekt av SFM og GFM er sammenlignet med FFM (filet-mel fra torskefilet). Resultatene er vist etter å ha løst mel i vann i 0 timer og 3 timer. ACE-1 hemming er målt 3 ganger per forsøk og repetert tre ganger (forsøk 1, 2, og 3). Beregning av standardavvik i forsøkene viser gjennomgående store utslag og resultatene bør tolkes med en viss varsomhet. Men om man ser på snittverdi av tre forsøk, er det mulig å se en trend. Etter 1 og 3 timer oppløsning i vann gir fiskemel basert på HG-avskjær (SFM) bedre hemmende effekt (58.04 ± 10.54 og 59.05 ± 12.89) sammenlignet med fiskemel basert på filetavskjær (GFM) som viser (49.92 ± 12.32 og 53.85 ± 12.19). Basert på målt protein innhold (Prot. kons) i fraksjonene som ble testet for ACE-1 hemming ser man økende mengde protein med oppløsningstid i vann. Basert på proteinkonsentrasjon kan man beregne ACE-hemmingseffekt per vektenhet protein i reaksjonen (mikrogram, μg). Baserer man seg på dette, viser GFM høyere

spesifikk aktivitet per μg protein etter 3 timer oppløsning i vann, sammenlignet med SFM. Måling av proteinkonsentrasjon er gjort ved bruk av BCA-metoden [16], noe som gir varierende og sannsynligvis unøyaktige resultat (rådata, ikke vist). Fremtidige forsøk bør basere seg på aminosyreanalyser eller Kjeldahl, for å måle nøyaktig proteininnhold.

Tabell 6. Resultat av målt ACE-hemming i vannløselig protein i fiskemel etter 0 og 3 timer.

Prøve	Tid	% ACE-hemming (\pm SD)				Prot.kons ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% ACE/ μg protein
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>Snitt (\pmSD)</u>		
SFM	0	50.94 \pm 8.68	44.55 \pm 3.55	42.79 \pm 4.21	46.10 \pm 4.29	186.94 \pm 5.91	24.66
	3	62.66 \pm 3.06	44.75 \pm 1.22	69.75 \pm 11.56	59.05 \pm 12.89	221.89 \pm 6.82	26.61
GFM	0	59.09 \pm 7.54	43.77 \pm 4.38	35.42 \pm 4.00	46.09 \pm 12.00	168.69 \pm 5.47	27.33
	3	65.04 \pm 2.82	40.86 \pm 1.47	55.64 \pm 3.34	53.85 \pm 12.19	260.86 \pm 10.35	20.62
FFM	0	5.61 \pm 9.77				246.60 \pm 10.65	2.73
	3	12.22 \pm 0.41				172.90 \pm 4.78	7.07

Effekt av hydrolysert fiskemel på ACE-1 hemming er oppsummert i Tabell 7 og viser generelt at enzymbehandling øker ACE-1 hemmingseffekt. Hydrolyse med Protamex gir lignede effekter både i SFM og GFM. Effekten går ned etter 3 timers hydrolyse, sannsynligvis fordi enzymet bryter ned bioaktive komponenter som er frigjort innledningsvis eller finnes naturlig tilstede i melet. Denne effekten ble ikke observert for Alcalase, hvor hemmingseffekten bevares (SFM) eller øker (GFM) med hydrolysegraden (Ht). Filetmelet (FFM) har gjennomgående lavere hemmingsverdier sammenlignet med SFM og GFM, men får relativt høy spesifikk % ACE-hemming/ μg protein (Alcalase), grunnet målt, høyt innhold av protein i hydrolysatene og aktiviteten bevares med økende hydrolysetid.

Tabell 7. Eksempel på ACE-hemming i hydrolysert fiskemel. P (Protamex), A (Alcalase), F (Fordøyelsesenzym), Ht (hydrolysetid, timer). Negative verdier skyldes resultater utenfor det lineære området. GFM (filetmel fra Granit), SFM (HG-mel fra Havstrand).

Prøve	Enzym	Ht	% ACE-hemming					Prot.kons (µg/ml)	% ACE/µg protein
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>Snitt</u>	<u>SD</u>		
SFM	P	0	42.60±1.24	42.79±2.67	40.27±4.46	41.89	1.40	292.59±9.22	14.32
		3	46.97±0.60	73.98±17.29	68.48±1.17	63.14	14.27	323.11±10.41	19.54
	A	0	63.65±4.17	43.42±3.80	43.19±3.52	50.09	11.75	301.45±8.81	16.62
		3	64.25±0.60	88.09±3.65	75.10±3.21	75.81	11.93	332.19±10.58	22.82
	F	0	19.17±2.34	-17.40±0.54	-8.76±3.89	-2.33	19.11	213.48±7.40	-1.09
		6.5	62.07±9.87	86.99±3.65	59.14±2.10	69.40	15.30	455.26±14.11	15.24
GFM	P	0	54.32±3.37	33.39±1.90	40.47±5.57	42.72	10.65	355.55±10.13	12.02
		3	60.28±2.34	54.08±3.34	71.40±2.54	61.92	8.78	360.92±11.28	17.16
	A	0	67.03±0.69	36.52±3.33	41.05±3.03	48.20	16.46	367.72±11.58	13.11
		3	74.98±3.15	87.15±1.90	84.63±8.30	82.25	6.43	370.00±12.23	22.23
	F	0	35.05±6.77	-16.77±7.47	-11.48±4.03	2.27	28.52	234.06±7.38	0.97
		6.5	67.23±13.05	91.07±4.31	53.11±4.68	70.47	19.18	478.44±15.61	14.73
FFM	P	0	-8.78±0.81					224.65±5.04	-3.91
		3	37.55±4.48					360.42±9.35	10.42
	A	0	13.09±1.63					300.45±7.07	4.36
		3	49.35±2.44					251.30±11.29	19.64
	F	0	34.38±2.44					462.31±11.19	7.44
		6.5	44.46±0.41					230.64±10.66	19.28

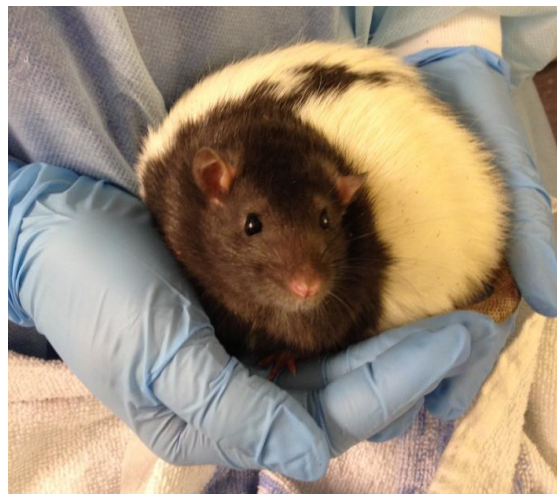
Det ble også gjennomført ACE-1 hemming av konsentrert og tørket limvann for å undersøke innholdet av eventuelle bioaktive komponenter der. Som vist i tabell 8 er det effekt i limvann som bevares eller øker med økende konsentrasjon. Resultatet antyder at limvann inneholder bioaktive komponenter som kan hemme ACE-1. Peptid og aminosyreinnhold i limvann bør i påfølgende prosjekter analyseres for å forstå mer om sammensetning.

Tabell 8. Eksempel på målt ACE-hemming i limvann (SLV, HG-avskjær). Resultat av tre separate forsøk (1,2 og 3) er vist med uttesting av ulike konsentrasjoner.

<i>Konsentrasjon</i>	% ACE-hemming			Snitt ±SD
	1	2	3	
5 mg/ml	32.88	30.55	34.63	32.68±2.05
10 mg/ml	49.22	49.22	44.55	47.67±2.70
20 mg/ml	21.79	49.22	62.65	44.55±20.82

4.4. GJENNOMFØRING AV DYREFORSØK

Uttesting av effekt av å spise fiskemel ble testet ut i Zucker-rotter som er en god modell for human fedme. Disse rottene utvikler sykelig-fedme («obesity») allerede ved ca 4 ukers alder (se figur 1). Som et resultat av dette utvikler rottene nyreskade, diabetes, høyt kolesterol og høyt blodtrykk i takt med økende fedme, noe som ligner forløpet i mennesker. Effekt av det å spise fiskemel, testes således ut i en dyremodell som etterligner tilstanden i sykelig, overvektige mennesker.



Figur 1. Zucker-rotte før og etter utvikling av overvekt.

Det ble bestemt å teste ut 6 ulike grupper av rotter (6 rotter i hver gruppe, i kontrollgruppa) for å undersøke flest mulig av våre hypoteser. Dette ble gjort etter at det ble kjent limvannsprøver fra Granit ikke lot seg bruke i dette prosjektet. Forsøksgrupper tilsvarer grupper i tabell 1 og sammensetning av rottefôr til uttesting er vist i tabell 9. Fôret er laget slik at det er det samme proteininnholdet i alle gruppene.

Tabell 9: Innhold av fiskeprotein i fôr som ble laget for uttesting i rotter (g/kg fôr).

	Kontroll	SLW ²	SFM ³	SLW + SFM ⁴	GFM ⁵	FFM ⁶
Casein protein ¹	223.8	167.8	167.8	167.8	167.8	167.8
Fish protein	-	82.2	81.9	84.6	77.6	60.7
Soybean Oil	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Cornstarch	504.1	477.8	478.2	475.5	482.5	499.3
Sucrose	90.0	90.0	90.0	90.0	90.0	90.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral Mix (AIN-93MX)	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin Mix (AIN-93VX)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Methionine	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline Bitartrate ⁷	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Growth and Maintenance Supplement ⁸	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

¹ contains 89.4 % crude protein

² contains 60.8 % crude protein

³ contains 61.1 % crude protein

⁴ contains 59.1 % crude protein

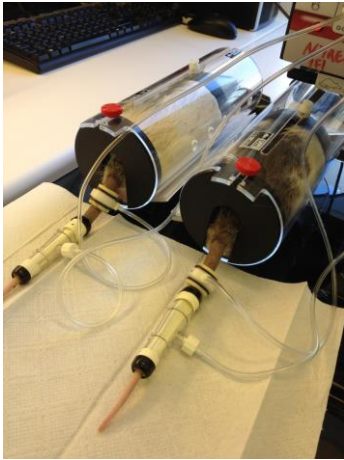
⁵ contains 64.5 % crude protein

⁶ contains 82.3 % crude protein

⁷ contains 41.1% choline

⁸ contains 2.5 g vitamin B12, 2.5g vitamin K1, and 995g sucrose per kg.

Blodtrykk ble målt ved baseline (dag 0), dag 14 og 3 dager før endepunkt (4 uker) som illustrert i figur 2. En uke før endepunkt ble det registrert inntak av fôr og vann og innsamling av avføring. Etter endt foring (4 uker) ble rottene utsatt for faste i 12 timer før bedøvelse. Etter avliving av rotter ble det samlet inn blodprøver for isolasjon av serum. Det ble tatt ut vev fra lever, muskel, hjerte. Milt, fettvev og nyrer. Alt vev er lagret ved -80°C og klart til videre analyser.



Figur 2. Måling av blodtrykk i rottehaler ved bruk av blodtrykksmonitor-utstyr (CODA-6, Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA)¹.

En oppsummering av foreløpige resultat etter dyreforsøket er vist i tabell 10 (rådata ikke vist).

Tabell 10. Status på parametere før og etter foring av rotter på fiskeprotein.

Parameter	Status
Energi i diett	Lik for alle grupper
Fettsyrer i diett	Ikke målt (utfordring med metode)
Vekst i rotter	Lik vekst i alle grupper
Målt fettprosent av vekt	Lik for alle grupper
Målt BMI	Lik for alle grupper
Ulike kolesterolmålinger	Ikke ferdig analysert
Ulike serumparametere	Ikke ferdig analysert
Ulike urinprøve analyser (effekt på nyrer)	Ikke ferdig analysert

Om man sammenligner resultatene med kontrollen (kasein), skiller en type fiskemel seg ut og gav en kraftig reduserende effekt på blodtrykk etter 2 og 4 uker. Tatt i betraktning at fiskemel fra begge fartøyene er relativt like kjemisk (tabell 2-5), er resultatet uventet og meget spennende. Dette er interessante funn som må kartlegges i mer detalj før man kan konkludere nærmere. Resultatene vil i sin helhet presenteres og diskuteres i en planlagt publikasjon.

¹ Video av hvordan måling av blodtrykk foregår:
https://www.youtube.com/watch?time_continue=44&v=0HGcQRiwjuU

5. KONKLUSJON

- I dette prosjektet ble ombordprodusert fiskemel fra F/T Havstrand (SFM)) sammenlignet med fiskemel fra F/T Granit (GFM) på kjemisk sammensetning, aminosyrer, ACE-1 hemming og effekt på overvektige rotter.
- SFM og GFM har relativt lik kjemisk sammensetning og sammensetning av proteiner.
- Begge meltyper viser høyere ACE-hemming sammenlignet med fiskemel produsert fra ren torskefilet (FFM). ACE-1 hemmende effekt ble også dokumentert i limvannspulver fra produksjon av HG-mel.
- En type fiskemel gir kraftig blodtrykkreduserende effekt i overvektige rotter.
- Det ble ikke registrert andre fysiologiske effekter som for eksempel vektreduksjon eller nedgang i BMI i rottene.
- Prosjektet har gitt en dypere forståelse for protein fra marint restråstoff sitt potensial innen ernæring og helse.
- Prosjektet bidrar med funn som vil kunne ha positiv innvirkning på pris på ombordprodusert fiskemel og bidra til bedre utnytting av restråstoff i trålerflåten.
- Funn i prosjektet vil kvalitetssikres gjennom publisering av data.

REFERANSER

- [1] R. Richardsen, R. Nystøyl, G. Strandheim, and A. Marthinussen, "Sintef report OC2017A-95-Analyse marint restråstoff, 2016," 2016.
- [2] C. Mullon, J.-F. Mittaine, O. Thebaud, G. Peron, G. Merion, and M. Barange, "MODELING THE GLOBAL FISHMEAL AND FISH OIL MARKETS," *Natural Resource Modeling*, vol. 22, no. 4, pp. 564–609, Nov. 2009.
- [3] G. Hansen Aas, M. Kjerstad, and O. Ween, "Utviklingsbehov for ombordproduksjon av hvitfiskmel Møreforsking rapport MA 14-19." p. 19, 2014.
- [4] G. Péron, J. François Mittaine, and B. Le Gallic, "Where do fishmeal and fish oil products come from? An analysis of the conversion ratios in the global fishmeal industry," *Marine Policy*, vol. 34, no. 4, pp. 815–820, 2010.
- [5] R. V. Brooks MS and B. S. and D. D. Ghaly AE, Ramakrishnan VV, Brooks MS, "Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review," *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, vol. 5, no. 4, pp. 107–129, 2013.
- [6] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Novel functional food ingredients from marine sources," *Current Opinion in Food Science*, vol. 2, no. Table 1, pp. 123–129, 2015.
- [7] V. Manikkam, T. Vasiljevic, O. N. Donkor, and M. L. Mathai, "A Review of Potential Marine-Derived Hypotensive and Anti-Obesity Peptides.," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 8398, no. January, pp. 37–41, 2015.
- [8] B.-N. Ahn and S.-K. Kim, "Muscle Proteins of Fish and Their Functions," in *Marine Proteins and Peptides*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 641–645.
- [9] O. Ween, J. K. Stangeland, T. S. Fylling, and G. H. Aas, "Nutritional and functional properties of fishmeal produced from fresh by-products of cod (*Gadus morhua* L .) and saithe (*Pollachius virens*)," *Heliyon*, vol. 3, no. 7, p. e00343, 2017.
- [10] L. A. Vikøren, O. K. Nygård, E. Lied, E. Rostrup, and O. A. Gudbrandsen, "A randomised study on the effects of fish protein supplement on glucose tolerance, lipids and body composition in overweight adults.," *The British journal of nutrition*, vol. 109, no. 4, pp. 1–10, May 2012.
- [11] A. Drotningvik, S. A. Mjøs, I. Høggøy, T. Remman, and O. A. Gudbrandsen, "A low dietary intake of cod protein is sufficient to increase growth, improve serum and tissue fatty acid compositions, and lower serum postprandial glucose and fasting non-esterified fatty acid concentrations in obese Zucker fa/fa rats.," *European journal of nutrition*, vol. 54, no. 7, pp. 1151–60, Oct. 2015.
- [12] L. Mora and M. Hayes, "Cardioprotective cryptides derived from fish and other food sources: generation, application, and future markets.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 63, no. 5, pp. 1319–31, Feb. 2015.
- [13] A. Sánchez and A. Vázquez, "Bioactive peptides: A review," *Food Quality and Safety*, vol. 1, no. 1, pp. 29–46, Mar. 2017.

- [14] M. Zeng, Y. Zhao, Z. Liu, and S. Dong, "ACE-inhibitory Activities of Marine Proteins and Peptides," in *Marine Proteins and Peptides*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 431–440.
- [15] R. Cheung, T. Ng, and J. Wong, *Marine Peptides: Bioactivities and Applications*, vol. 13, no. 7. 2015.
- [16] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, "Measurement of protein using bicinchoninic acid.," *Analytical biochemistry*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, Oct. 1985.
- [17] M. Martin and A. Deussen, "Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1–20, Dec. 2017.



MØREFORSKING

MØREFORSKING AS
Postboks 5075
6021 Ålesund
TEL +47 70 11 16 00
www.moreforsk.no
NO 991 436 502