

Sluttrapport DOCMAR

Delprosjekt: Taurin/ACE-hemmere

”Innhold av taurin og ACE- hemmere i restråstoffer. Dokumentasjon med spesiell vekt på hjerte- og karsykdom.”

Deltagere fra Norges Fiskerihøgskole; Bjørn Tore Dragnes, Svein K. Stormo; Frode Aspenes, Hege Holm Ernsten, Marita Holm Ernsten og Edel O. Elvevoll



Stikkord:

ACE – hemmende peptider, blodtrykksreducerende peptider, frie aminosyrer, taurin

Sammendrag:

Taurin;

Karakterisert innhold av taurin (og andre frie aminosyrer og små peptider i ulike organer fra restråstoff, laks og torsk). Studert lekkasje og ”uttynning” av slike molekyler ved tilberedelse av vanlige marine konsumprodukter. Gjennomført et rotteforsøk med dietter beriket med taurin og studert effekt på blodlipider og cellestørrelse (ødem). Gjennomført et klinisk humanforsøk med påleggsprodukt beriket med taurin (og n-3 fettsyrer).

ACE hemmere;

Etablert et nytt HPLC-målesystem for ACE-hemming. Etablert en enkel mage- og tarmmodell for studier av innhold av peptider (modell av vår egen fordøyelse). Karakterisert og hydrolysert en mengde ulike organer fra torsk, laks (samt studentarbeider; blåskjell, reke, biff og kylling). Innledet karakterisering av fraksjoner med høyere aktivitet av ACE-hemmere fra torskemuskel. Lakseorganene skaper ikke lenger problem med bakgrunn i høyt fettinnhold – metodetilpasninger ferdig utarbeidet.

INNHOOLD

1	INNLEDNING.....	1
2	BAKGRUNN.....	1
	2.1 Taurin	1
	2.2 Effekt av foredling og tilberedning	2
	2.3 Angiotensin konverterende enzymhemmere (ACE – hemmere)	2
	2.4 Effekt av foredling/tilberedning	3
3	MATERIALER OG METODER.....	4
	3.1 Råstoff	4
	3.2 Tørrstoff.....	4
	3.3 Frie aminosyrer.....	4
	3.4 Måling av hemming av Angiotensin konverterende enzym.....	4
	3.4.1 Forenklet modell av fordøyelsen (Gastro-Intestinal).....	4
	3.4.2 Oppsett for ACE-hemmende aktivitet	5
4	RESULTATER.....	5
	4.1 ACE Hemmere	5
	4.2 Taurin	9
5	FORMIDLING	10
	5.1 Internasjonale publikasjoner.....	10
	5.1.1 Tilgrensende fagaktiviteter	10
	5.2 Foredrag/Postere:.....	10
	5.2.1 Populærvitenskapelig.....	11
	5.2.2 Masteroppgaver i marine næringsmidler; Restprodukter/Funksjonell mat, 11	
6	KOMMERSIALISERINGSPOTENSIALE OG VIDERE ARBEID.....	12
7	REFERANSER.....	12

1 INNLEDNING

Rubins hovedmålsetning eller visjon tjener fint som innledning eller bakgrunn og utgangspunkt for DOCMAR. Biprodukter fra norske fiskerier og oppdrett består av innmat (lever, rogn, mager, slo, etc.), hoder, avskjær, utkastfisk, mm. Dette oppstår ved sløying og hodekapping, samt ved videreforedling av fisken. Totalt utgjør biproduktene rundt 600.000 tonn pr. år - ca 20 % av all fisk som fangstes og oppdrettes i Norge. Storparten utnyttes i dag til fôrråstoffer som fiskemel, ensilasje og pelsdyrfôr, men over 140.000 tonn dumpes i havet. Disse ressursene kan gi flere milliarder kroner i økt verdiskapning - hvis de i større grad utnyttes som menneskemat og som ingredienser til næringsmidler, helsekost, farmasi, kosmetikk, spesialfôr, mm.

Norges fiskerihøgskole (NFH) fikk i sin tid ansvaret for og ressurser til å studere innholdet/aktivitet av blodtrykkshemmende peptider og frie aminosyrer med spesiell vekt på aminosyren taurin.

Prosjektet var i utgangspunktet innrettet mot aminosyren taurin, men i løpet av prosjektperioden har prosjektet blitt dreid slik at prosjektaktivitet har hatt en bredere innretning mot også blodtrykksreducerende peptider. Følgende problemstillinger skulle og har vært behandlet i prosjektperioden.

- A. Dokumentasjon av innhold av taurin og blodtrykksreducerende peptider (ACE hemmere) i marine restråstoffer.
- B. Effekt av foredling/tilberedning på innhold av taurin og ACE - hemmer.
- C. Klinisk studie av effekt av produkter beriket med taurin.

2 BAKGRUNN

2.1 Taurin

Taurin er en eksklusiv fri aminosyre, den finnes ikke inkorporert i proteiner. Aminosyren inneholder, som methionin og cystein, en sulfatsyregruppe istedenfor en karboksylsyregruppe. Taurin er representert i relativt høye konsentrasjoner i dyreriket og spesielt forhøyede konsentrasjoner i marine dyr. Aminosyren finnes stort sett ikke i planter og bakterier.

Taurin blir ikke regnet som en essensiell aminosyre for voksne mennesker. Den antas imidlertid å være essensiell under spesielle forhold. For spedbarn er derimot taurin essensiell. Taurin er også essensiell for katter. Taurin syntetiseres fra aminosyrene methionin og cysteine ved hjelp av enzymet cystein svovelsyre dekarboksylase (CSD). Spedbarn (og katter) har et svært lavt nivå av dette enzymet, taurin tilsettes derfor morsmelkerstatning (og kattemat). Selv om taurin ikke er en essensiell aminosyre for voksne mennesker, er evnen til egensyntese begrenset. Det er derfor nødvendig å tilføre kroppen denne aminosyren også gjennom kosten (Georgia *et al.*, 2003). Sjømat regnes som en god kilde for taurin. Muskel av storfe, lam, gris og kylling viser generelt lavere taurinkonsentrasjoner enn sjømat.

Mangel på taurin fører ikke til sykdom på kort tid, men langvarig mangel vil på sikt kunne føre til flere ernæringsrelaterte helseproblemer (Smayda, 2004). Det finnes imidlertid ingen anbefalinger angående daglig inntak av taurin. I januar 2005 utførte Vitenskapskomiteen For Mattrygghet (VKM) en risikovurdering av ”energidrikker” med koffein, taurin, glukuronolakton, inositol og vitaminer. Rapporten konkluderer med at det med hensyn til vurderingene fra SCF (EUs Scientific Committee in food) ikke finnes tilstrekkelige data til å fastsette UL (Tolerable Upper Intake Levels) for taurin. Det var således ikke mulig å fastsette et anbefalt daglig inntak for taurin (VKM, 2005). Da det ikke kan fastsettes anbefalt daglig inntak av taurin, kan anbefalt inntak av sulfonerte aminosyrer (SA) (summen av cystein og methionin) gi en indikasjon. WHO anbefaler et daglig inntak for disse aminosyrene på 13 mg/kg/dag (Shils *et al.*, 2002). Nye studier indikerer derimot at det er nødvendig med 25 mg/kg/dag. Vegetarianere og andre grupper som har et kosthold basert på lite proteiner kan i forhold til denne anbefalingen få i seg for små mengder.

Hos mennesker har taurin positiv effekt på flere funksjoner i kroppen. Taurin utgjør over 50 % av de frie aminosyrene i hjertet (Birdsall, 1998). Epidemiologiske studier har vist at inntak av taurin bidrar til redusert risiko for utvikling av hjerte- og karsykdommer ved å ha positiv effekt på blodtrykk og blodkolesterol (Yamori *et al.*, 1994, 2001, 2006). Det er de siste årene utført en mengde kliniske studier av effekter av tilførsel av taurin i dyremodeller (katt, hund, mus og rotter) (Balkan *et al.*, 2004, Millitante & Lombardini, 2004), men kontrollerte studier i humanmodeller mangler i stor grad. Et studie på inntak av taurin av overvektige med predisposisjon for Diabetes II fant imidlertid ingen effekt på blodlipider (Brøns *et al.*, 2004).

2.2 Effekt av foredling og tilberedning

Taurin er ikke inkorporert i proteiner, og vil derfor lett tapes under prosessering som lakebehandling og varmebehandling. Torskeprotein som utsettes for teknologisk prosessering viser lavere fordøyelighet enn rå protein. (Lipka & Ganowiak, 1993). Dette antas også (i tillegg til lekkasje) å skyldes maillardreaksjoner som oppstår under varmebehandling (Korhonen *et al.*, 1998). Fisk inneholder svært lite karbohydrater. Effekter av nedsatt tilgjengelighet med opphav i maillardreaksjoner gjelder derfor spesielt ved tilberedelse av kombinasjonsprodukter, med for eksempel poteter og fisk, samt farseprodukter. Forsøk utført på varmebehandlet kattefôr viser at slike reaksjoner fremmer en tarmflora hos katter som favoriserer degradering av taurin, samt reduserer taurin-resirkulering. Hermetisert kattefôr, som er utsatt for en sterkere varmebehandling, må derfor inneholde mer taurin enn tørrfôr for at kattene skal kunne opprettholde et tilfredsstillende taurinnivå i blodet (Kim *et al.*, 1996). Økt bakteriell vekst i tarm hos mennesker er assosiert med redusert nivå av plasma taurin. Komponenter dannet under varmebehandlingen kan føre til en økning i tilgjengelig substrat for mikrofloraen i tarmen (Sheikh, 1981). Dette indikerer at varmebehandlede produkter, i tillegg til å ha en lavere taurinkonsentrasjon grunnet prosessering, også inneholder stoffer som øker bakterieveksten i tarmen og dermed fører til ytterligere degradering av taurin.

2.3 Angiotensin konverterende enzymhemmere (ACE – hemmere)

Proteiner er fundamentale ernæringsmessige og funksjonelle komponenter i næringsmidler. Foruten å utgjøre en kilde for energi og aminosyrer, påvirker proteinene i stor grad sensoriske og funksjonelle egenskaper ved proteinrike matvarer. Proteiner tilsettes ofte som funksjonelle ingredienser i næringsmidler på bakgrunn av geldannende, emulgerende, vannbindende, smaksforsterkende og teksturforbedrende egenskaper. Noen proteiner har i tillegg biologiske

egenskaper som gjør dem egnet som ingredienser i funksjonell mat. En oversiktsartikkel om biologisk aktive forbindelser fra marine restråstoffer er nylig presentert av Kim *et al.*, 2006.

Angiotensin I konverterende enzym (ACE) spiller en viktig rolle i regulering av blodtrykket; inhibering av dette enzymet kan virke blodtrykksreducerende. ACE omdanner decapeptidet angiotensin I til en potent vasoconstrictor, oktapeptidet angiotensin II. ACE splitter dipeptidet fra C-terminalen til angiotensin I. Dette resulterer i økt blodtrykk (Astawan *et al.*, 1995). I Kallikrein-kinin systemet (KKS) vil mengden bradykinin opprettholdes og senke blodtrykket. ACE katalyserer degraderingen av bradykinin og enkephalin, noe som gir høyt blodtrykk. Den vanligste reaksjonsveien for angiotensin I er omdannelse til angiotensin II ved hjelp av ACE. Angiotensin II kan imidlertid omdannes videre til andre bioaktive former, ang-(1-7) og ang III, via Renin Angiotensin Systemet (RAS). RAS har som funksjon å opprettholde likevekten av salt og volum i blodet, samt regulere blodtrykket (Grant *et al.*, 1993). ACE-hemmere kan dermed virke blodtrykksreducerende ved at det blir dannet mindre angiotensin II, samtidig som mengden bradykinin opprettholdes (Matsumura *et al.*, 1993). Høyt blodtrykk er en vanlig lidelse hos voksne mennesker som kan føre til alvorlige helseproblemer, en risikofaktor for hjerte og karsykdom.

ACE-hemmere er kortere aminosyresekvenser som er inaktive i sitt opprinnelige protein, men som frigjøres gjennom hydrolyse (fordøyelsen) og deretter utøver spesifikk biologisk aktivitet, hemmer aktiviteten av ACE. På bakgrunn av fordelaktige helseeffekter av ACE-hemmende peptider kan det være gunstig å spise mat som inneholder forløpere til ACE-hemmere. Melkeprotein, kasein og myse, er den viktigste kilden for bioaktive proteiner. En annen viktig kilde for bioaktive proteiner er egg (Korhonen *et al.*, 1998). Dyreprotein som gelatin og fiskemuskelprotein inneholder bioaktive peptider.

Marine organismer lever i omgivelser som er svært forskjellig fra de landbaserte, særlig med hensyn på temperatur, saltinnhold og mikrobiologiske omgivelser (andre enzymsystemer). Det er utført flere studier på innhold av ACE-hemmere i fisk og fiskeprodukter. ACE-hemmere er isolert fra blant annet collagen i fiskeskjell, biprodukter av sardiner, gelatin i Alaska Pollack (skinn), tunfiskmuskel og reker (Byun & Kim, 2000; Fahmi *et al.*, 2003; He *et al.*, 2006; Ravallec-Ple *et al.*, 2001). I følge Kouno *et al.*, 2005 førte oral tilførsel av ACE hemmende peptider fra hydrolysert tørket tunfisk til høyere *in vivo* enn *in vitro* aktivitet i en rottemodell. De foreslår også en tilleggs mekanisme som involverer effekt på glatt muskulatur som forklaring på dette resultatet. En høy *in vivo* aktivitet er også funnet (rottemodell) ved bruk av restfraksjoner av flatfisk (Jung, 2006).

De siste årene er det utviklet mange syntetiske blodtrykksmedisiner. Slike ACE-hemmere er betydelig kraftigere enn naturlige ACE-hemmere funnet i mat. Bivirkninger, som ødem, er sjeldne, men kan være alvorlige og har vært rapportert ved bruk av syntetiske ACE-hemmere. Funksjonell mat med naturlige kilder for ACE-hemmere kan muligens i fremtiden gi et alternativ (van Elswijk *et al.*, 2003) når en mildere behandling er å foretrekke.

2.4 Effekt av foredling/tilberedning

ACE-hemmere er lokalisert inne i større proteiner. Effekten av foredling og tilberedning på disse molekylene vil derfor være av betydning for den mengde potensielle ACE-hemmere som frigjøres og tilgjengeliggjøres under fordøyelse. Utlekking av andre komponenter under

prosessering vil også være av betydning, da dette kan føre til en oppkonsentrering av komponenter som kan gi opphav til ACE-hemmere.

3 MATERIALER OG METODER

Vedlagt rapporten finnes to ferdigstilte manuskripter/publikasjoner som gjengir materialer og metoder knyttet til det kliniske studiet og noen av forsøkene på effekter av foredling og tilberedning i stor detalj. Her gjengis derfor kun de sentrale metodene for måling av innhold av frie aminosyrer og ACE-hemmere i restråstoffer. Prosedyrene avviker noe for fettrike prøver og i noen grad må de også justeres for svært høyt eller lavt innhold av aminosyrer. De gjengitte prosedyrene må derfor ansees som summariske.

3.1 Råstoff

Hel torsk (*Gadus morhua*) (n = 6-7) ble ved hentet fra fiskeværet Sommarøy utenfor Tromsø. Fisken ble deretter sløyd, delt i ulike fraksjoner og frosset ned for senere analyse ved NFH. Samme prosedyre ble gjennomført for laks (*Salmo salar*) hentet fra Sjøanlegget ved Havbruksstasjonen i Kårvika utenfor Tromsø.

3.2 Tørrstoff

Innholdet av tørrstoff i prøver ble bestemt etter en standard prosedyre (AOAC 950.46, 1991).

3.3 Frie aminosyrer

Mengden frie aminosyrer prøver ble målt ved hjelp av aminosyreanalysator (er) (Biochrom 30, Biochrom Ltd., Cambridge, UK og Knauer A220 Knauer GmbH, Berlin, Tyskland) Eluering med fem forskjellige Li-citrat buffere. Norleusin brukes som internstandard (IS). 3 g tinte (fiskemuskel) prøver ble blandet med 1 ml 20 mM Norleusin. 5 ml 20 % trikloreddiksyre (TCA, Merck) og 2.5 ml deionisert vann ble tilsatt prøvene for å felle protein. Blandingen ble homogenisert med en Ultra Turrax T25 basic. Prøvene ble sentrifugert ved 20000g, 15 min. 100 µl prøve ble blandet med 400 µl "loading buffer" (Li-citrate buffer, pH 2.2) og sentrifugert i en eppendorfsentrifuge (15000 rpm, 15 min., 4C).

3.4 Måling av hemming av Angiotensin konverterende enzym

Tilstedeværelse og mengde ACE-hemmere i prøvene ble bestemt etter følgende prosedyre:

3.4.1 Forenklet modell av fordøyelsen (Gastro-Intestinal)

Før selve analysen ble en forenklet fordøyelsesmodell (GI) utført tilpasset etter Vermeierssen *et al.*, 2003. Modellen går ut på å simulere nedbrytning av næringsmidler slik det foregår i mammalsk mage- og tarmfase ved å tilsette fordøyelsesenzymmer. Nedbrytning av proteiner og peptider er nødvendig for å gjøre ACE-hemmerene aktive.

Homogeniserte prøver a` 12,5 g, tilsatt 50 ml destillert vann, ble satt i inkubatorskap (37 °C). HCl ble tilsatt for å justere pH til 2. Pepsin ble så tilsatt for å simulere den delen av fordøyelsen som foregår i magen. NaOH ble tilsatt for å oppnå nøytral pH. To timer senere ble trypsin og chymotrypsin tilsatt. Etter 2,5 timer i ”tarmfasen” ble den hydrolyserte væsken helt over i vakuumkolber for frysetørrking.

3.4.2 Oppsett for ACE-hemmende aktivitet

Metode tilpasset etter Wu *et al.* (2002) ble benyttet. Som utgangspunkt for fortynningsserien ble det laget en stamløsning av den frysetørkede prøven. Fortynningsserien hadde i regelen følgende mengder; 5, 10, 20, 30, 50 og 100 µg.. Det ble benyttet titerplater a` 24 brønner, der det ble tilsatt 250 µl substrat; 2 mM HHL (N-hippuryl-His-Leu-tetrahydrate) og 50 µl prøve, med ulike konsentrasjoner ut fra fortynningsserien, i hver brønn. I brønnene for standardene ble det tilsatt 100 mM boratbuffer (300 mM NaCl, pH 8,3) istedenfor prøve. Etter forvarming i inkubatorskap ble 50 µl enzym (til 1 U tilsettes 5 ml buffer→ 10 mU/50µl) tilsatt i hver brønn. 430 µl HCl ble tilsatt etter en inkubasjonstid på 30 min, dette stoppet reaksjonen.

HPLC analyse; Mobilfasen ble gjort mindre polar ved å tilsette acetonitril i en egen gradient. Kolonnen som ble benyttet (Symmetry Shield RP18 3,5). Detektoren (Waters Diode Array) var et spektrofotometer med en flowcelle. Prøvestørrelse 85 µl. 228 nm absorpsjonsmaksimum for Hippurylsyre benyttes til beregning. Til styring og bearbeiding av resultater ble programvaren Millennium benyttet.

Metoden er basert på at ACE hydrolyserer Hippuryl-histidyl-leucine (HHL) til Hippurylsyre (HA) og Histidyl-leucine (HL). Frigjorte enzymer fra fiskemuskel antas å gi hemming av dette systemet. Tilsetning av en økende mengde råstoff vil derfor gi dannelse av en mindre mengde HA. ACE-hemming blir beregnet ut fra mengde HA i prøven etter tilsetning av HHL. Hemming blir vanligvis angitt som IC_{50%} som er den konsentrasjonen av prøve (mg/ml) som hemmer 50 prosent av ACE-aktiviteten. Beregning av denne verdien forutsetter at konsentrasjonen av prøven som skal hemme ACE er kjent. Ulike fortynninger av denne ble analysert, før konsentrasjonen som gav verdien IC_{50%} ble beregnet.

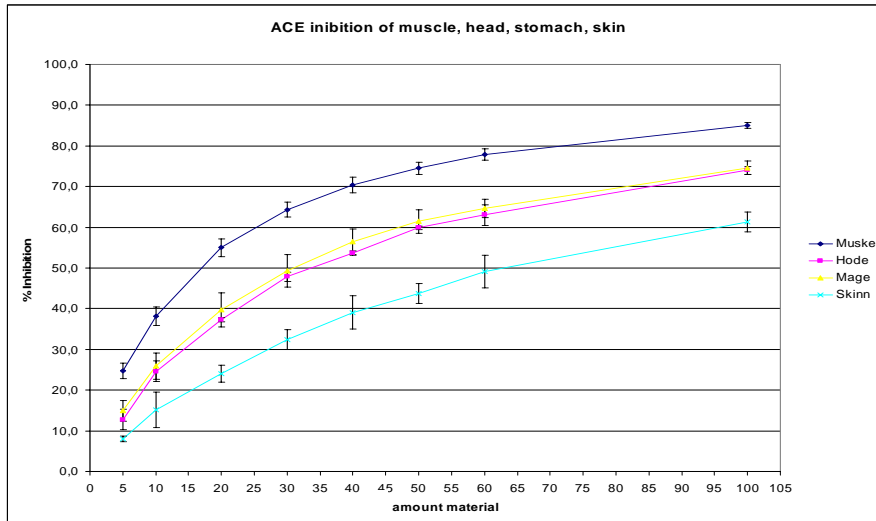
Resultatene fra forsøkene med ACE-hemmere ble analysert ved linearisering av data (Lineweaver – burk plot). Resultatene viser at en for alle de analyserte prøvene fant ikke-konkurrerende hemmere - som er det vanlige for ACE hemmere (Jung , 2006).

4 RESULTATER

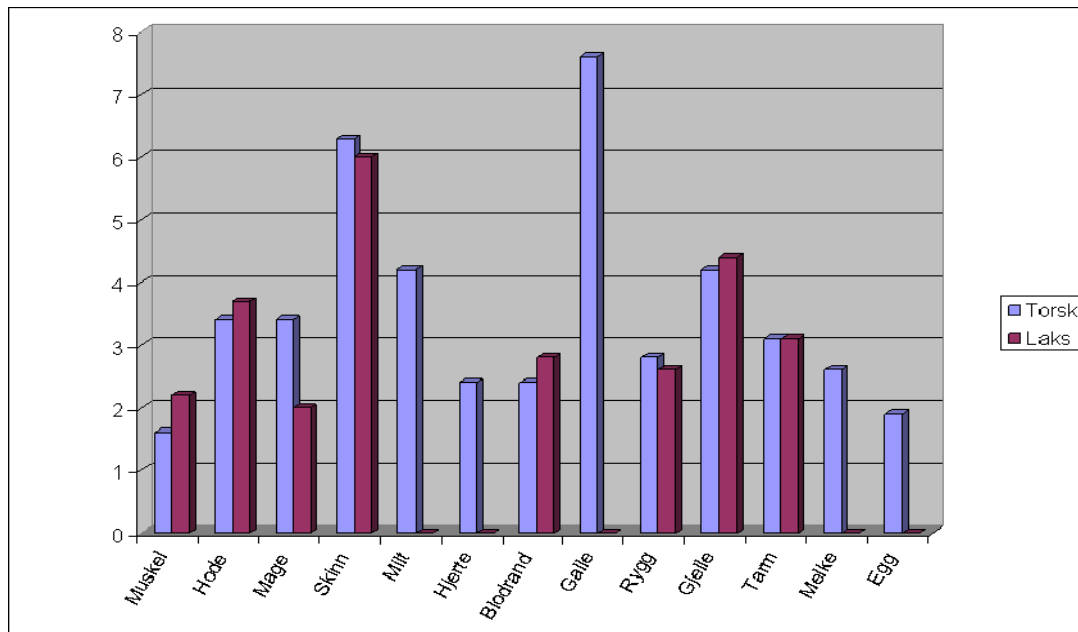
4.1 ACE Hemmere

Innholdet (aktivitet) av ACE hemmere i biprodukter fra torsk og laks er dokumentert (*in vitro*). Identifisering og rensing av potente ACE hemmende peptider er innledet. Vi har også startet isolering av enkeltpeptider fra torskehydrolysater for sammenligning med kommersielle/farmaceutiske preparater. Det ble observert svært varierende grad av hemming (IC_{50%}) for forskjellige fraksjoner.

Etter å ha funnet tillitsvekkende prosedyrer for analyse av fettrike fraksjoner finner vi at biproduktene fra laks eller lakseprøver (fettrike) ga tilsvarende nivå av ACE hemmere som torskeprøvene. Vi planlegger å ferdigstille publikasjon med innhold av aminosyrer og ACE-hemmere i biprodukter fra torsk og laks våren 2007.



Figur 1; ACE - inhiberende aktivitet av hydrolysater (muskel, hode, mage og skinn) av ulike fraksjoner av torsk (*Gadhus morhua*). Hydrolysat av torskemuskel gir eksempelvis 3 ganger så høy inhibering i denne modellen (se metoder) enn torskesskinn når en sammenligner mengden som må til for å hemme 50% av aktiviteten ($IC_{50\%}$) av ACE.



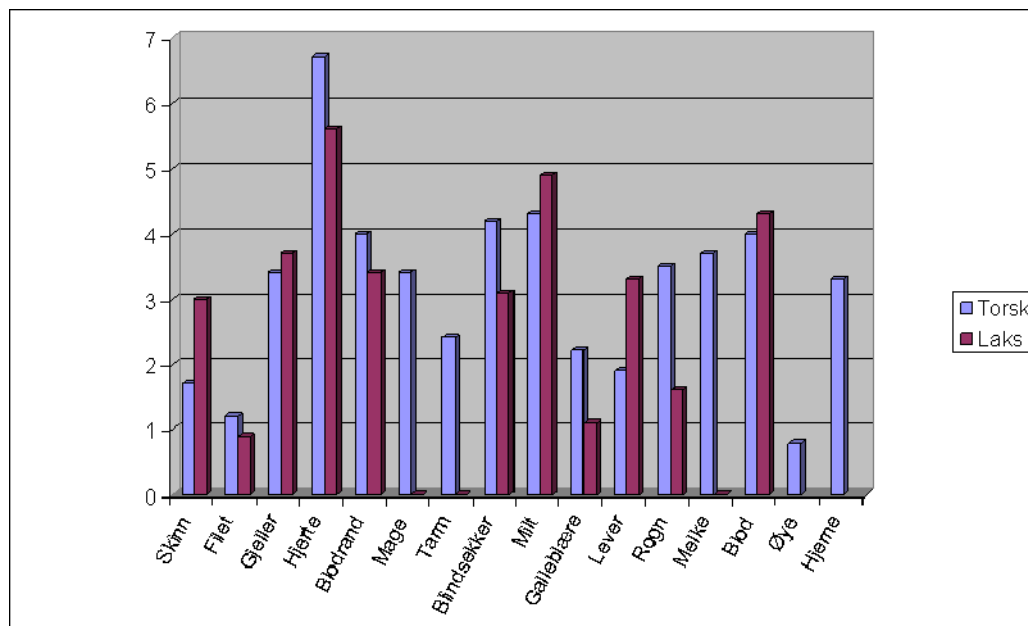
Figur 2; Relative mengder ($IC_{50\%}$) blodtrykkreduserende peptider eller ACE - hemming i ulike fraksjoner av torsk og laks.

Ved å bruke BioMar sin HPLC som er utstyrt med en Preparativ C-8 kolonne og en nøyaktig fraksjonssamler var det mulig å injisere betraktelige større mengder per injeksjon enn hva vi kan på en analytisk HPLC. Et større antall fraksjoner (med mulighet for veiing for å kvantitere aktiviteten) ble samlet. Disse ble tørket i speedvac og frysetørket over natt. Stoffmengde ble beregnet, og av hver prøve ble det laget 3 fortyninger (1.0, 0.5 og 0.1 mg/ml) som ble brukt i et ACE assay for å bestemme $IC_{50\%}$ for hver fraksjon. Ved ytterligere fraksjonering av hydrolysat av torskemuskel var det mulig å fremstille fraksjoner med høyere aktivitet av ACE hemmende peptider (16-17x).

ACE aktivitet i 21 ulike fraksjoner ble målt ved å injisere en stor prøve i et preparativt HPLC system. Etter tørking av fraksjonene er det mulig å veie mengde prøve i hver fraksjon, noe som gjør det mulig å lage fortyninger av hver enkelt fraksjon. Det ble observert varierende IC_{50} for de forskjellige fraksjonene. Et bra utgangspunkt for å identifisere spesifikke peptider.

4.2 Taurin

Innholdet av frie aminosyrer (herunder også taurin) i ulike restfraksjoner av torsk og laks er dokumentert.



Figur 3; Relative mengder (mg/g våtvekt) av taurin i ulike fraksjoner av torsk og laks

Vi har også dokumentert hvordan ulike vanlige foredlingsprosesser og tilberedningsmetoder for sjømat påvirker innhold av frie aminosyrer og mineraler. Store andeler av de frie aminosyrene lekker ut ved tilberedning av vanlige sjømatprodukter. Lett varmebehandling av ren muskel gir for eksempel tap på rundt 30-40% av taurin, alanin og glysin (Larsen et al., 2007). Annen industriell prosessering kan gi opp mot 100% tap av taurin.

Resultater fra forsøkene viser at taurinkonsentrasjonen i tradisjonelle norske fiskeprodukter reduseres med inntil 100 % under prosessering. Tidligere forsøk utført viste at taurinkonsentrasjonen i fersk torsk reduseres med henholdsvis 27% og 77 % under prosessering av henholdsvis fiskepinner og fiskeboller (Dragnes *et al.*, 2004). Det er også blitt vist at inntil 70 % av taurin lekker ut under prosessering til kokte pillede reker (Kanstad, 2005). Innenfor rammene av dette prosjektet er vi i ferd med å slutføre en publikasjon om foredlingsprosessers effekt på innhold av taurin i vanlige sjømatprodukter (Dragnes et al., 2007).

Et klinisk studium med et pålegg produkter beriket med taurin er gjennomført. Vi var så heldige å få "hekte på" en ekstra gruppe i et klinisk studie som i utgangspunktet skulle dokumentere effekter av et smørbart fiskepålegg (Mills). Dette bidro til at det ble mulig å få gjennomført et klinisk studie med relativt store grupper (40 friske forsøkspersoner: normalt kolesterol) innenfor rammene av DOCMAR prosjektet. Resultatene fra det kliniske studiet med taurin beriket fiskepålegg er svært oppløftende med hensyn til å dokumentere effekter av taurin i kostholdet. Begge produktene var beriket med n-3, slik at "taurin-effekten" kom i tillegg til eller i synergi med n-3 fettsyrene. Taurin i fiskeproduktet ga en signifikant nedgang av LDL kolesterol og økning i HDL kolesterol (og nedgang i total kolesterol). Et annet viktig resultat er en reduksjon i monocytt chemoattractant protein (MCP-1). Dette arbeidet er

presentert ved flere anledninger. Publikasjon er ferdigstilt, men med bakgrunn i at det også inngår et samarbeide med en industriaktør er endelig publisering antatt å finne sted i løpet av 2007. Utkast til publikasjon vedlegges i sin helhet.

5 FORMIDLING

5.1 Internasjonale publikasjoner

Bjørn Tore Dragnes, Svein Kristian Stormo, Rune Larsen, Hege Holm Ernsten, Edel O. Elvevoll (2007) *Utilization of fish industry waste – contents of free amino acids and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in cod, salmon, blue mussel and shrimp (manuscript)*

Dragnes, B.T., Larsen, R., Ernsten, M.H., Mæhre, H., Elvevoll, E.O. Impact of processing on water soluble compounds: Taurine content in seafood and their corresponding raw materials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. In press

Larsen, R., Stormo, S.K., Dragnes, B.T., Elvevoll, E.O., 2007. Losses of taurine, creatine, glycine and alanine from cod (*Gadus morhua* L.) fillet during processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 396-402

Edel O. Elvevoll, Jan Brox³, Bjørn Tore Dragnes¹, Karl-Erik Eilertsen², Pål Falkenberg¹, Jan Ole Olsen² and Bjarne Østerud² (2007) “Seafood diets; Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids” (Submitted)

Elvevoll EO (2005) “Fish Waste and Functional Foods” in *Co-Products - Minimising Waste*. Waldron, K., Faulds, C. & Smith, A. (Eds), 49-57. ISBN 0-7084-0644-5 (<http://www.totalfood2004.com/TotalFood.pdf>)

5.1.1 Tilgrensende fagaktiviteter

Edel O. Elvevoll¹, Harald Barstad², Einar S. Breimo³, Jan Brox⁴, Karl-Erik Eilertsen³, Trine Lund³, Jan Ole Olsen³ and Bjarne Østerud³. (2006) *Enhanced Incorporation of n-3 Fatty Acids from Fish Muscle Products Compared to Fish Oils*. *Lipids* 41 (12)1109-14.

Mierke-Klemeyer, S., Larsen, R., Oehlenschläger, J., Mæhre, H., Elvevoll, E.O., Bandarra, N.M., Parreira, R., Andrade, A.M., Nunes, M.L., Schram, E., Luten, J. Retention of health related beneficial components during household preparation of selenium-enriched African Catfish (*Clarias gariepinus*) fillets. *European Food Research and Technology*. In press.

Elvevoll, E.O. & Østerud, B. (2003). *Impact of processing on nutritional quality of marine food items*. Elmadfa, I., Anklam, E., Konig, J.S. (eds): *Modern Aspects of Nutrition- Present Knowledge and Future Perspectives*. Forum Nutr. Basel, Krager. 56:337-341.

5.2 Foredrag/Postere:

Dragnes BT, Stormo SK, Elvevoll EO (2007) *Presentasjon av DOCMAR, Taurin og ACE Hemmere*. RUBIN konferansen, 7-8 februar, Hell, (Norwegian)

Valdimarson G, Elvevoll EO (2006) *Risks and Benefits of Seafood consumption: can they be balanced in a meaningful way?* TAFT 2nd Joint Trans Atlantic Fisheries Technology Conference Quebec Oct 29-01 Nov

Østerud B, Elvevoll (2006) *Bioactivities in marine lipids, what are they good for?* BIOPROSP. 11-12 Oktober, Tromsø.

- Elvevoll EO, Østerud B (2006) *Impact of processing on nutrition. Plenary at 2nd SEAFOODplus Confernce Tromsø, May.*
- Elvevoll EO, Eilertsen KE, Østerud B (2006) “Beneficial effects of enriched food; Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n- 3 fatty acids”. SEAFOODplus – “Consumerproducts” delprosjekt 4.5 / Pillar 4. Antwerp.28 September, Nederland
- Elvevoll EO (2005) ” Sjømat et billig og komplett kosttilskudd” FISK 2005 November 28-29, Tromsø (<http://www.fisk2005.no/Foredrag2005/Elvevoll.pdf>)
- Elvevoll EO, Eilertsen KE, Østerud B (2005) “The Impact of Processing and Preparation on Nutritional Benefits” Seafood and health `05, 5-7 December, Washington DC, USA, (www.seafoodandhealth.org/press.pdf)
- Elvevoll E.O. (2004) “Fish Waste and Functional Food” Total Food, Norwich, England, April 25- 28.
- Elvevoll, E.O., Østerud, B., Dragnes, B.T., Aspenes, F. (2004). *Seafood and marine ingredients in functional food. BIOPROSP, Tromsø, Norge, Oktober 13-14* (<http://www.mabit.no/pdf/elvevoll.pdf>)
- Elvevoll E.O. (2004) “Industri og forskning?” FISK2004 Nov (Norwegian)
- Dragnes, B.T. and Elvevoll, E.O. (2003) "Documentation and novel functions of marine by-products" *Proceedings TAFT, Reykjavik, Iceland, June 11 – 14,* (http://vefur.rf.is/TAFT2003/TAFT_final&abstractbok1.pdf) P65, pp 368

5.2.1 Populærvitenskapelig

- Nyhetsbrev ved NFH (2006) ” Sjømat som helsekost – ennå bedre enn sitt gode rykte” Nr 4 Næringsmiddelforskning
- Elvevoll, E.O. (2003). “Ekspertene krangler om hva man skal spise, men de er enige om at sjømat er sunt”. *Fiskerikandidaten, Studenttidsskrift ved NFH, UITØ.*
- Elvevoll E.O. (2004) ”Arena – Utvikling, bioteknologi, akvakultur og fiskeri ” May, prosessleder Lillehammer, (Norwegian)
- Østerud B (2006) ”Helseeffekt av sjømat” Senjahopen, Forskningsdagene 28 sept

5.2.2 Masteroppgaver i marine næringsmidler; Restprodukter/Funksjonell mat,

- Pål Skavås (2006) ”Taurinberiket torskefilet”.
- Ingvild Sørensen (2005) ”Japanske lakseflak – et nytt konsumprodukt fra norske lakserygger”
- Tonje Binderø (2005) ”Varmebehandling av blåskjell – effekt på innhold av taurin og frigjøring av ACE hemmere”
- Hege Ernsten (2005) ”Konservering av blåskjell ved hydrolyse – frigjøring av ACE hemmere og innhold av taurin”
- Reidun Klykken Lie (2005) ”Oljer i blåskjell (*Mytilus edulis*) – mulige produkter”
- Merete Lund Østby (2005) ”Effekt av lake- og varmebehandling - frigjøring av ACE-hemmere og tap av taurin”
- Robert B Pedersen (2004) ”Lakebehandling av torskefilet. Effekter av taurin, vitamin C, fosfat og salt på kvalitet under lagring”
- Ragnhild Berg Schistad (2004) ”Taurin fra marine produkter” Fiskerikandidatoppgave
- Marianne Kanstad (2004) ”Tap av smak og næringsstoffer under industriell bearbeiding av reke (*Pandalus borealis*)” Fiskerikandidatoppgave

6 KOMMERSIALISERINGSPOTENSIALE OG VIDERE ARBEID

Det er ikke lov å tilsette syntetisk taurin i næringsmidler i Norge (unntatt morsmelktillegg). Det er også lite sannsynlig at det vil lønne seg å produsere rent taurin fra organisk materiale, fordi kostnadene ved rensing er relativt store. Biprodukter som er rike på taurin og oppkonsentrerte fraksjoner kan derved benyttes fordi de er ”naturlige” og kan anvendes både som smaksetting og mer rensede marine ingredienser samt som kosttilskudd. Høyt innholdet av taurin gjør også slike biproduktene godt egnet til ”petfood” f.eks. kattenmat ettersom taurin er essensielt for katter).

Videre kartlegging av fraksjoner som er rike på taurin og vurdering av teknologi for å utnytte disse fra restråstoff må forsette. Vi har i denne sammenheng meget interessante data fra hovedfagsarbeider på innhold av taurin i biprodukter fra blåskjell, reker, krill og rauåte. Vi vil framover også se på muligheten til å anvende slike fraksjoner i spesialfôr til oppdrettsfisk for på den måten å produsere oppdrettsfisk med forhøyede nivåer av taurin.

Ettersom mye av de frie aminosyrene og mineraler tapes ved forholdsvis enkel prosessering og tilberedning av sjømat er det også ønskelig å bruke denne kunnskapen til å endre rutinene ved produksjon av sjømatproduktene for på denne måten å hindre lekkasje av nyttige næringsstoffer.

Vi har nå gjennomført ett klinisk humanstudium med dokumentasjon av effekter av taurin, sammen med n-3 fettsyrer, på parametere som er av betydning for hjerte –og karsykdommer. Resultatene fra dette var i tråd med resultatene fra en rekke lignende studier med taurin alene i dyremodeller. Det skal mer enn ett studium til for å kunne gi klare anbefalinger generelt eller spesielt. Om en sammenligner med utviklingen av produkter med marine n-3 fettsyrer som industrielle produkter er det åpenbart behov for å dokumentere effekter av produkter til ulike formål (ingrediens, kosttilskudd, farmasøytisk preparater så vel som ulike helseforhold som hjerte- og karsykdommer, diabetes etc.). Det vil være framover spesielt være ønskelig å også studere effekten av taurin(rike) produkter alene (uten n-3 fettyrer).

Aktiviteten av ACE- hemmere er i dette prosjektet kun dokumentert *in vitro*. Med bakgrunn i ny litteratur, som framhever forskjellene på *in vitro* og *in vivo* aktivitet av ACE – hemmere med opphav i marine materialer, vil det også være ønskelig å kunne dokumentere slike effekter *in vivo*. Vi vil selvsagt også forsøke å identifisere (størrelse og aminosyresekvens) de peptidene som ga høyest spesifikk aktivitet.

7 REFERANSER

- Astawan, M., Wahyuni, M., Yashura, T., Yamada, K., Tadokoro, T., Maekawa, A. (1995). Effects of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Substances Derived from Indonesian Dried-salted fish on Blood Pressure of Rats. *Biosci Biotech Biochem* 59(3):425-429.
- Balkan J, Oztezcan S, Hatipoglu A, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. (2004) Effect of a taurine treatment on the regression of existing atherosclerotic lesions in rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 68:1035-9.
- Birdsall, T.C. (1998). Therapeutic Applications of Taurine. *Alt Med Rev* 3(2):128-136.
- Brøns C, Spohr C, Storgaard H, Dyerberg J, Vaag A. (2004) Effect of taurine treatment on insulin secretion and action, and on serum lipid levels in overweight men with a genetic predisposition for type II diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr*. 58:1239-47.

- Byun, H. & Kim, S. (2000). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack skin. *Proc Biochem* 36:1155-1162
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H.C., Shigematsu, T., Kida, K., Uemura, Y. (2003). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Proc Biochem* 39:1195-1200.
- Georgia, B., Schuller-Levis, S., Park, E. (2003). Taurine: new implications for an old amino acid. *Fems Microbiol Lett* 226:195-202.
- Grant, S.K., Meek, T.D., Metcalf, B.W., Petteway, S.R. (1993). Design of Peptide Analog Inhibitors of Proteolytic Processes. I: Williams, W.V., Weiner, D.B (eds), *Biologically Active Peptides: Design, Synthesis and Utilization*. Technomic Publishing Company, Inc, Pennsylvania. 325-353.
- He, H. *et al.* (2006) Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *J. Pept. Sci.*, 12, 726-733.
- Jung, W.K. (2006) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.*, 94, 26-32.
- Kim SW, Rogers QR, Morris JG (1996) Dietary antibiotics decrease taurine loss in cats fed a canned heat-processed diet. *J Nutr.* 126 (2): 509-515
- Kim, S.K. & Mendis, E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Res. Internat.*, 39, 383-393.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P., Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Agricultural Research Centre of Finland. *Trends Food Science Tech* 9:307-319.
- Kouno K, Hirano S, Kuboki H, Kasai M, Hatae K (2005) Effects of dried bonito (Katsuobushi) and captopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, on rat isolated aorta: A possible mechanism of antihypertensive action. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 69 (5): 911-915
- Lipka, E. & Ganowiak, Z. (1993). Nutritional value of protein subjected to technologic processing. Changes in content of biologically active amino acids; methionine, cysteine and taurine under influence of sterilisation. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 44(2-3):151-6.
- Matsumura, N., Fuji, M., Takeda, Y., Shimizu, T. (1993). Isolation and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bonito Bowels. *Biosci Biotch Biochem* 57(10):1743-1744.
- Militante J D, Lombardini J B (2004) Dietary taurine supplementation: Hypolipidemic and antiatherogenic effects. *Nutr Res.* 24:787-801
- Ravallec-Ple, R., Charlot, C., Pires, C., Braga, V., Batista, I., Wormhoudt, A., Le Gal, Y., Fouchereau-Peron, M. (2001). The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine. *J Food Agric* 81:1120-1125.
- Sheikh, K. (1981). Taurine deficiency and retina defects associated with small intestinal bacterial overgrowth. *Gastrotech* 80(5):1363-1363.
- Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. (2002). Modern nutrition in health and disease. 9:543-554.
- Smayda, R. (2004). Contemporary review and therapeutic benefits of the amino acid taurine. <http://www.mgwater.com/taurine.shtml>.
- Smidsrød, O. & Moe, S.T. (1995). *Biopolymerkjemi*. Tapir forlag, Trondheim. 55-72.
- van Elswijk, D.A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J. (2003). Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *J Chromat A.* 1020 (1): 45-58

- Vermeirssen V, van Camp J, Devos L. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. *J Agric Food Chem.* 51(19):5680-5687.
- Vitenskapskomiteen For Mattrygghet. (2005). Risikovurdering av "energidrikker" med koffein, taurin, glukuronolakton, inositol og vitaminer. <http://www.mattilsynet.no>.
- Wu, J., Rotimi, E., Aluko, Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *J Chromat A* 950:125-130.
- Yamori Y, Liu L, Ikeda K, Miura A, Mizushima S, Miki T, Nara Y (2001) Distribution of twenty-four hour urinary taurine excretion and association with ischemic heart disease mortality in 24 populations of 16 countries: results from the WHO-CARDIAC study. *Hypertension Res Clin Exp.* 24:453-57.
- Yamori Y, Murakami S, Ikeda K, Nara Y (2004) Fish and Life style related disease prevention: Experimental and epidemiological evidence for Anti-atherogenic potential of taurine. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 ;31:Suppl 2:S20-23.
- Yamori, Y., Nara, Y., Mizushima, S., Sawamura, M., Horie, R (1994) Nutritional factors for stroke and major cardiovascular diseases: international epidemiological comparison of dietary prevention. *Health Rep.* 6 (1) 22-7.
- Yamori Y, Liu L, Mizushima S, Ikeda K, Nara Y for the CARDIAC study (2006) Male cardiovascular mortality and dietary markers in 25 population samples of 16 countries J. *Hypertension* 24(8) 1499-1505.