

# **Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoff – fremstilling, funksjon og markedsmuligheter**

Sissel Rønning, Mona E. Pedersen, Bente Kirkhus, Rune Rødbotten og Diana Lindberg





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunndalsøra:**

Sjølseng  
NO-6600 Sunndalsøra

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140

E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**

# Rapport

ISBN: 978-82-8296-345-9 (trykt) ISBN: 978-82-8296-346-6 (pdf) ISSN 1890-579X	
Tittel: Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoff – fremstilling, funksjon og markedsmuligheter	Rapportnr.: 1/2016
	Tilgjengelighet: <b>Åpen</b>
	Dato: 20.01.2016
Forfatter(e)/Prosjektleder: Sissel Rønning, Mona E. Pedersen, Bente Kirkhus, Rune Rødbotten og Diana Lindberg	Ant. sider og vedlegg: 19
Avdeling: Råvare og Prosess	Oppdragsgivers ref.: GB
Oppdragsgiver: Nofima AS	
Sammendrag/anbefalinger:  Se neste side.	

## Sammendrag

Bi-produkter fra matproduksjon har stort potensiale til å kunne bli brukt som høy-verdi produkter, og bioaktive peptider fra restråstoff har vist seg å inneha mange helsefremmende effekter. Mye av forskningen de siste 20 årene har vært på identifisering av peptider fra melkeproteiner, men peptider kan dannes av alle råvarer som inneholder protein, inkludert kjøtt og fisk. Det er lite publisert om bioaktive peptider i restråstoff fra kjøttproduksjon, mens bioaktive peptider fra hydrolysater av fisk er mer studert. Bioaktive peptider kan fremstilles på ulike måter, men industrielt er hydrolyse (spalting av proteiner til peptider) en vanlig fremgangsmåte. Dette kan være en spesifikk eller uspesifikk prosess, avhengig av hvilket enzym man bruker, og sluttproduktet varierer deretter. Kunnskap om prosess, renhet og bioaktivitet er viktig for optimal utnyttelse av det valgte råstoff. For å kunne måle helseeffekter er det svært viktig med en bredt sammensatt metodeplattform for uttesting av biologisk aktivitet, fra de enkleste *in vitro* assays til omfattende intervensjonsstudier. Det meste av forskningen på bioaktive peptider har fokusert på blodtrykkssenkende peptider og peptider med antioksidant effekt, men peptider kan også gi effekt på tarmhelse, metthet, muskler, bindevev og beinutvikling for å nevne noen. Noen peptider er også vist å ha bivirkninger. Å styrke forskning som bidrar til bærekraftige løsninger i samfunn og næringsliv er svært viktige satsningsområder hos nasjonale og internasjonale myndigheter, og dette gjenspeiles i programutlysninger både hos Forskningsrådet og i Horizon 2020. Bioøkonomien innebærer en visjon om kretsløpstankegang og full utnyttelse av råvarer, restråstoff og avfall fra våre primærnæringer. Nofima ønsker å ta aktivt del i forskningen rundt dette.

Nofima har gjennomgående høy kompetanse på *hele prosessen* fra råvare til produkt, fra lab til fabrikk, og har lang erfaring med bruk av marint restråstoff. Nofima har også høy kompetanse på sensorikk og forbrukerinnsikt, og videre et godt faglig nettverk, som i tillegg til industri, universiteter og forskningsinstitutter også inkluderer medisinske miljøer. Videre har Nofima en bredt sammensatt metodeplattform for uttesting av biologisk aktivitet, inkludert *in vitro* fordøyelse, *in vitro* fermentering (tykktarmsmodell) og cellekulturer. En utfordring med bioaktive peptider er å sikre at bioaktiviteten er bevart etter fordøyelse, og dette er en problemstilling Nofima kan studere med dagens metodeplattform. Nofima kan også studere effekt av hydrolysater/peptider på proteinfordøyelse og samspilleffekter i fordøyelseskanalen. Nofima har høy kompetanse på kjøtt, og kan bidra med forskning på restråstoff fra kjøttproduksjon, et område som ikke er prioritert av nasjonale konkurrenter. Det vil være naturlig å studere effekt av hydrolysater/peptider på muskelvekst, bindevev- og beinutvikling da Nofima har pågående aktiviteter og mye kunnskap på dette området, men det vil også være mulig å studere andre typer bioaktivitet avhengig av hva industrien ønsker.

# Innhold

<b>1</b>	<b>Bakgrunn .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Produksjon av bioaktive peptider .....</b>	<b>2</b>
2.1	Hydrolyse og betydningen av metode for egenskapene til de bioaktive peptidene .....	3
2.2	Renseprosessen - down-stream prosesseringstrinn .....	4
2.3	Alternative måter for fremstilling av peptidprodukter .....	5
<b>3</b>	<b>Analyse av mulig biologisk aktivitet .....</b>	<b>7</b>
3.1	Fordøyelsesmodell .....	7
3.2	Tykkarmsmodell .....	8
3.3	Assays til måling av bioaktivitet .....	9
3.4	Cellemodeller .....	9
3.5	Dyrestudier .....	10
3.6	Humane intervensjonsstudier .....	10
<b>4</b>	<b>Helseeffekter og bivirkninger .....</b>	<b>11</b>
4.1	Proteinkvalitet .....	11
4.2	Proteinfordøyelse .....	11
4.3	Helseeffekter av bioaktive peptider .....	12
4.4	Bivirkninger.....	14
<b>5</b>	<b>Markedsmuligheter.....</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>Referanser: .....</b>	<b>17</b>

# 1 Bakgrunn

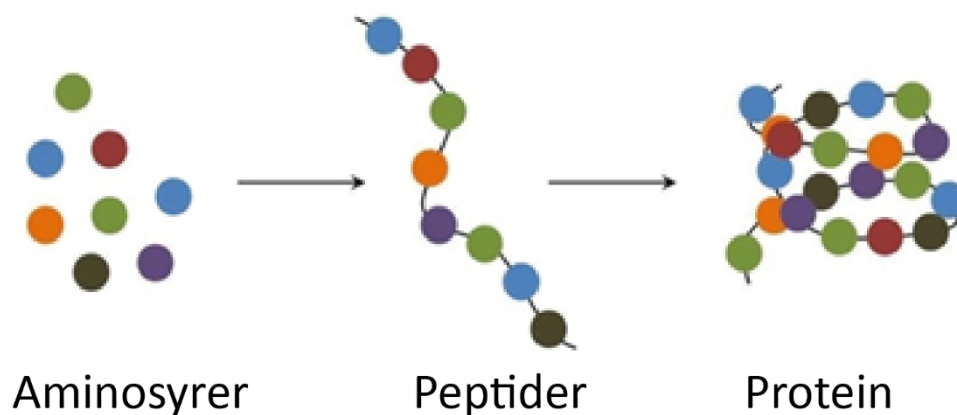
Bi-produkter fra animalsk matproduksjon er definert som produkter fra et dyr som kan, men ikke blir, konsumert av mennesker. Disse representerer både miljø- og økonomiske utfordringer, og en stor del blir i dag kastet eller blir brukt som lav-verdi produkter (dyrefôr og jordforbedring). Slike bi-produkter har imidlertid stort potensiale til å kunne bli brukt som høyverdi-produkter i funksjonell mat (mat med helsebringende ingredienser). Funksjonell mat er estimert til å være verdt over 130 mrd. dollar i 2015 (globalt). Et eksempel på høyverdige produkter som kan tilsettes funksjonell mat er proteinhydrolysater med bioaktive peptider, dvs korte kjeder med aminosyrer som er vist å kunne ha gunstige helseeffekter. Peptidene kan dannes fra alle proteinholdige matvarer, inkludert melk og muskel (fra animalske og marine organismer), og kan dannes ved hydrolyse, fermentering og speking. I 1950 ble det for første gang foreslått at bioaktive peptider har helsefremmende egenskaper, da det ble vist at bioaktive peptider fra melk økte vitamin D-uavhengig kalsifisering av bein hos barn med rakitt<sup>2</sup>. I de siste 20-årene har interessen for bioaktive peptider økt betraktelig, og mesteparten av forskningen har vært fokusert på identifisering av bioaktive peptider fra melkeproteiner. De mest karakteriserte peptidene identifisert fra melk og andre matkilder har vist seg å kunne redusere høyt blodtrykk. Det finnes allerede kommersielle peptider på markedet i dag; Calpis® er et surmelkprodukt fra Japan som inneholder de blodtrykksreducerende peptidene VPP og IPP (fra kasein). Evolus® er et finsk produkt som påstås å redusere blodtrykket. Det finnes også andre melkeprotein hydrolysater som påstås å inneholde bioaktive peptider, for eksempel det kasein-baserte produktet C12® fra DMV International. Det finnes flere rapporter om bioaktive peptider fremstilt fra storfe og grise proteiner. Tidligere ble det meste av innmat konsumert av oss mennesker, men i dag går mesteparten til pelsdyrfôr. Her er det mange muligheter for å «gjennoppdage» proteinkildene. Det er blant annet vist at hydrolysat fra griseblod kan redusere høyt blodtrykk (Wei, 2008). En av utfordringene med bioaktive peptider er imidlertid at selv om det er påvist bioaktivitet *in vitro* har det vist seg å være vanskelig å dokumentere en *in vivo* effekt. Det er tildels mange patenter på området. Likevel er det foreløpig få matprodukter som markedsføres med dokumentert helseeffekt av peptider fra proteinhydrolysat.

## 2 Produksjon av bioaktive peptider

Oppsummering av kapitlet:

Peptider er kortere kjeder av aminosyrer, som regel med færre enn 50 aminosyrer. Det finnes flere måter å lage peptider på, inkludert naturlige biologiske metoder og syntetiske metoder. Fermentering og speking er peptiddannende prosesser. Peptider kan også fremstilles ved hjelp av *hydrolyse* (spalting av proteiner til peptider). Ved spesifikk hydrolyse vet man hvilket enzym som utfører hydrolysen og hvilke peptidbindinger som brytes. Enzymatisk hydrolyse av proteinråstoff er ofte den foretrukne fremstillingsmetoden for bioaktive peptider som brukes av mat- og farmasøytisk industri. Jo mer man vet om bruken av enzymer og fermentering, og hvordan man kan kontrollere prosessen, jo lettere kan man designe spesifikke peptider med ønsket bioaktivitet. En miks av peptider og andre komponenter i en løsning kan enten renses fullstendig for å selektere enkelte peptider, brukes uten rensing etter påvisning av bioaktivitet, eller brukes som en fraksjon av peptider som et resultat av en eller flere påfølgende rensetrinn etter hydrolysen. Kunnskap om renseprosessen og renhet av bi-produktet er viktig for optimal utnyttelse.

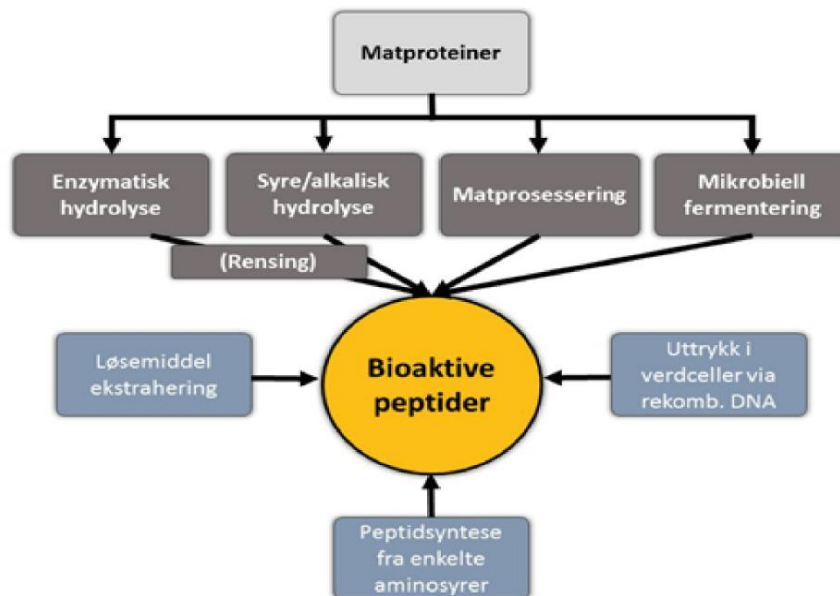
Et protein er et polypeptid som har en spesifikk funksjon og en tredimensjonal struktur bygget opp av enkeltaminozyrer i en kjede (Fig. 1). Peptider er kortere kjeder av aminosyrer. Vanligvis definerer man et peptid som en polypeptidkjede med færre enn 50 aminosyrer, men det er ikke uvanlig å definere alt under 100 aminosyrer som et peptid. Peptider finnes naturlig i alle organismer, og kan ha forskjellige oppgaver, for eksempel som hormoner og signalmolekyler, men også som toksiner og antibiotikum.



Figur 1      Forenklet figur som viser oppbygging av et protein. Ulike aminosyrer (illustrert i forskjellige farger) kobles sammen til et polypeptid bundet sammen av peptidbindinger. Peptidkjeden foldes deretter sammen til et protein med en unik tredimensjonal struktur.

## 2.1 Hydrolyse og betydningen av metode for egenskapene til de bioaktive peptidene

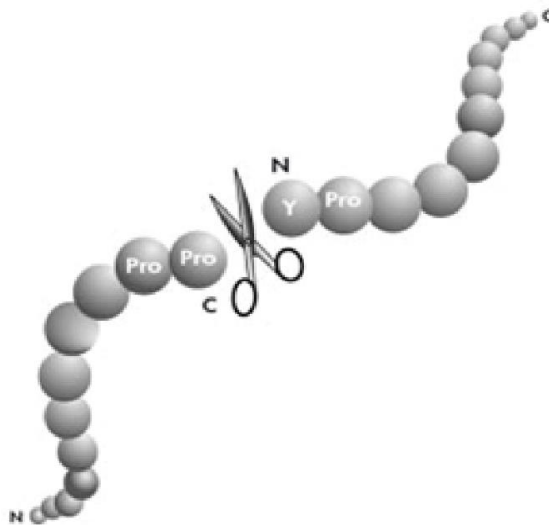
Det finnes flere måter å lage peptider på, inkludert naturlige biologiske metoder og syntetiske metoder (Fig. 2). Fermentering og speking er peptiddannende prosesser.



Figur 2 Sammenstilling av ulike metoder for fremstilling av bioaktive peptider, hvorav de øverste fire feltene i mørk grå farge, er de metoder som omtales i denne rapporten.

Mikroorganismene som dyrkes ved *fermentering/speking* bryter ned proteiner som finnes i produktet for å bruke dem som ernæring, og dermed dannes det peptider. Peptider kan også fremstilles ved hjelp av *hydrolyse* (spalting av proteiner til peptider), en prosess som enten kan være uspesifikk eller spesifikk. Ved spesifikk hydrolyse vet man hvilket enzym (protease) som utfører hydrolysen og hvilke peptidbindinger som brytes. Dette gir et sluttprodukt med en homogen gruppe peptider og lite variasjon. Ved uspesifikk hydrolyse vil enzymer, syrer eller baser splitte aminosyrekjedene ved tilfeldige peptidbindinger slik at det dannes mange forskjellige peptider. Forskjellige enzymer har ulik preferanse for hvor de kutter i peptidkjeden; de mest spesifikke kutter kun ved ett spesifikt kuttsete (ved en spesifikk aminosyre, se Fig. 3) i et spesifikt protein, mens andre er mindre spesifikke og kutter mange typer av proteiner ved flere forskjellige aminosyrer i peptidkjeden.





*Figur 3 Saksen representerer en protease som kutter opp et polypeptid ved en spesifikk aminosyre. Resultatet blir to kortere polypeptidkjeder.*

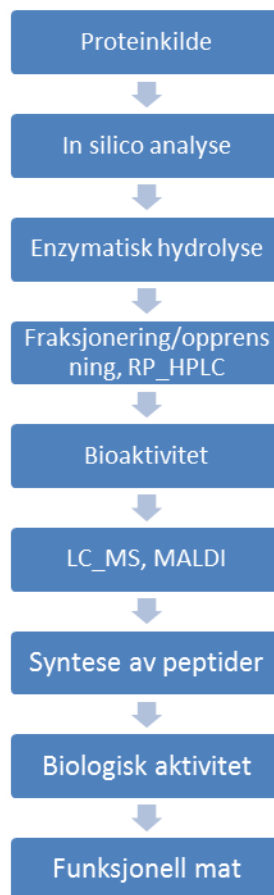
Enzymene har også ulike preferanse for ulike typer proteiner, samt pH og temperatur. Enzymene kategoriseres utifra kuttsete, kuttemekanisme, samt på preferanse for om de kutter inne i et protein (endoprotease/peptidase), eller på en av de to sidene av polypeptidkjeden (karboksy- eller aminopeptidase). Forskjellene i proteaseegenskaper fører til sluttprodukter som varierer når det gjelder for eksempel bioaktivitet, bitterhet og smak. Graden av nedbryting av et polypeptid (definert som hydrolysegrad) er svært viktig for å optimere bioaktivitet, og Nofima har utviklet nøyaktige NIR algoritmer som kan måle hydrolysegrad på produksjonslinjen.

## **2.2 Renseprosessen - down-stream prosesseringstrinn**

Bioaktive peptider kan dannes naturlig i tarmen under fordøyelsen, men kan ha så lav aktivitet eller så lav konsentrasjon at de ikke har noen reell helsefremmende effekt. Enzymatisk hydrolyse av proteinråstoff er ofte den foretrukne fremstillingsmetoden for bioaktive peptider som brukes av mat- og farmasøytisk industri. En miks av peptider og andre komponenter i en løsning kan enten i) renses fullstendig for å selektene enkelte peptider, ii) brukes uten rensing etter påvisning av bioaktivitet, eller iii) brukes som en fraksjon av peptider som et resultat av en eller flere påfølgende rensetrinn etter hydrolysen. Har man et definert restråstoff er det enklere og billigere å rense peptidblandingen slik at man kun sitter igjen med ett spesifikt peptid i ren form. Kasein for eksempel, er et enkelt og relativt homogent biprodukt fra melk som kan bli brutt ned av ett enzym med kun ett spesifikt kuttsted. Har man imidlertid et heterogent restråstoff er de to sistnevnte alternativene vanlige fremgangsmåter for peptider.

Det er ofte nødvendig å gjennomføre en grovrensing basert på de kjemiske og fysikalske egenskaper etter den enzymatiske hydrolysen (Fig. 4). Tidlig i prosessen skilles den vannløslige fraksjonen (som inneholder peptidene) fra olje og ikke hydrolyserbare deler (f.eks. bein). Dette er en grov separasjon hvor man bruker sil og industriskala-sentrifuger (dekanter/trikanter). Vannfraksjonen kan deretter renses videre. De vanligste måtene å rense peptidene på er ved å bruke ultrafiltrering (skiller molekyler av forskjellig størrelse fra hverandre), ionbytterkromatografi (skiller på ladning), og

størrelseskromatografi (skiller på peptidstørrelse, men i mindre skala). Det er svært viktig å undersøke bioaktiviteten så tidlig som mulig i renseprosessen, og følge den gjennom hvert rensetrinn. Det finnes mange måter å gjøre dette på som inkluderer *in vitro* testing av antimikrobiell aktivitet, antioksidant aktivitet, blodtrykksenkende aktivitet etc. Peptider som har bioaktivitet *in vitro* blir deretter karakterisert ved hjelp av MS (massespektrometri) teknikker, slik som MALDI-TOF, ESI-MS. Disse teknikkene kan måle nøyaktig molekylvekt, og er nyttige verktøy i den videre identifiseringen av peptidene. Etter at peptidene er identifisert og karakterisert kan de syntetiseres for å undersøke den biologiske aktiviteten. Dette inkluderer dose respons, mattrygghet og biotilgjengelighet.



Figur 4 Prosessen for fremstilling av bioaktive peptider <sup>1</sup>

## 2.3 Alternative måter for fremstilling av peptidprodukter

In silico analyse er en teknikk (datasimulering) som brukes til å identifisere mulige bioaktive peptider fra en gitt protein sekvens. Denne metoden hjelper til med å velge ut potensielle proteiner og enzymer. Tilgjengelig Software som kan brukes til å predikere potensielle kuttsteder i proteinet er PeptideCutter: [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)

EnzymePredictor: <http://bioware.ucd.ie/~enzpred/Enzpred.php>

PeptideRanker: [http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server\\_pages/peptideranker.php](http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php)

og PeptideLocator: [http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server\\_pages/biopred.php](http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/biopred.php).

Når man bruker komplekse bi-produkter er denne tilnærmingen utfordrende. Særlig fordi enzymene ofte er promiskuøse, det vil si at de kutter ved flere kuttsteder enn angitt i mange databaser. Har man derimot veldefinerte bi-produkter og bruker kjente enzymer, kan man benytte databaser over bioaktive peptider: for eksempel e.g. BIOPEP, PeptideDB, CAMP, APD2 og PepBank, i kombinasjon med software for peptid prediksjon (nevnt ovenfor) for å skreddersy prosesser for produksjon av enkelte peptider.

### 3 Analyse av mulig biologisk aktivitet

Oppsummering av kapittelet:

Det er viktig med en bred sammensatt metodeplattform i uttestingen av biologisk aktivitet av peptider, fra de enkleste *in vitro* assays i tidlige trinn til omfattende intervensjonsstudier for å måle langtidseffekter i de senere trinn. Nofima har utviklet en fordøyelsesmodell som brukes til å studere fordøyelse av ulike matvarer. Bioaktivitet i fordøyd materiale kan testes i ulike kommersielle «assays». Videre benyttes en tykktarmsmodell for å studere ufordøyd materiale som vil kunne påvirke tarmfloraen. Bruk av cellemodeller for uttesting kan gi mer kunnskap enn rene *in vitro* assays, både om den endogene effekten, hvilken dose-respons som vil fremkalle en mulig bioaktivitet, og i hvilket vev/organ man kan forvente en biologisk respons. Noen peptider kan ha en effekt på muskelutvikling, mens andre peptider kan ha effekt på leverutvikling, beinutvikling eller åredannelse. Videre i uttestingen er det nødvendig å bruke dyremodeller. Det vanligste er å bruke mus/rotter, men gris er også ofte fortrukket da det er mindre fysiologiske forskjeller mellom gris og menneske. Til sist, for å dokumentere en helseeffekt og få godkjent en helsepåstand kreves det at humane intervensjonsstudier er blitt utført (EFSA).

Det ideelle for å undersøke om bioaktive peptider fra restråstoff har en reell biologisk aktivitet er å gjennomføre humane intervensjonstudier. Slike studier er imidlertid kostbare, kompliserte og tidkrevende. En bred sammensatt metodeplattform er derfor svært viktig i uttestingen av biologisk aktivitet, fra de enkleste *in vitro* assays i tidlige trinn til omfattende intervensjonsstudier for å måle langtidseffekter i de senere trinn (Fig. 5).

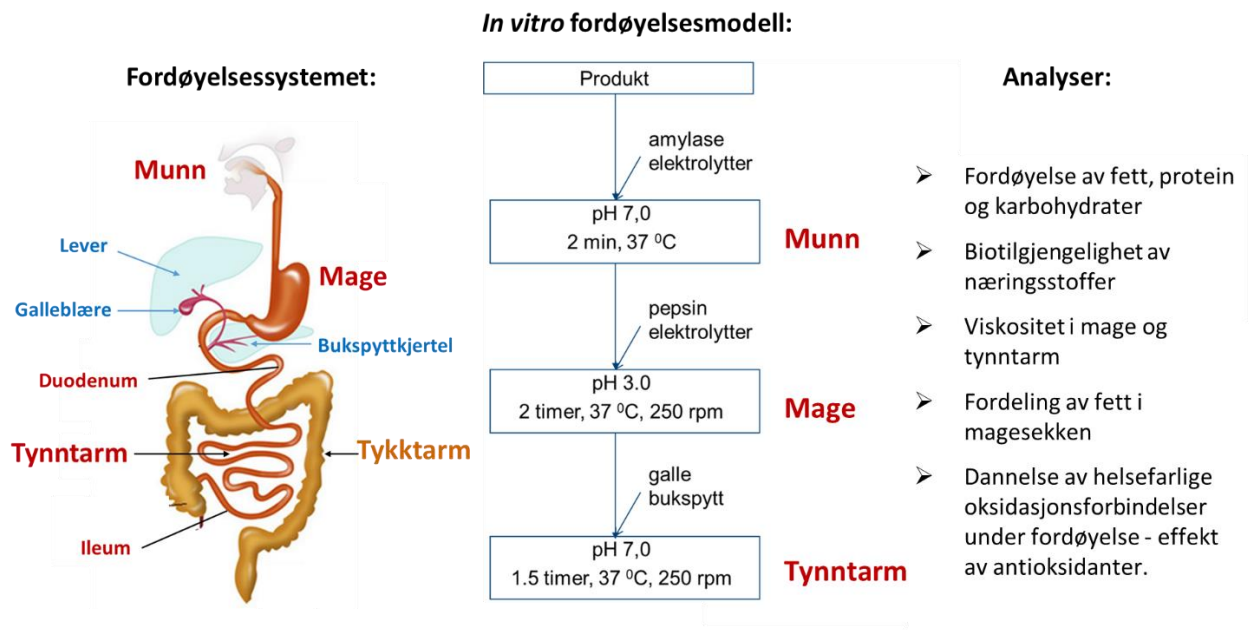


Figur 5 Metodeplattform for uttesting av potensiell biologisk aktivitet. Fra de enkleste *in vitro* assays i tidlige trinn til intervensjonsstudier for å måle langtidseffekter i de senere trinn.

#### 3.1 Fordøyelsesmodell

Nofima har i samarbeid med NMBU og gjennom deltakelse i EU Cost Action 1005 INFOGEST, etablert en kunstig mage-tarm modell <sup>3</sup>. Modellen er en statisk *in vitro* fordøyelsesmodell som simulerer det som skjer i munn, mage og øverste del av tynntarmen (*duodenum*). Til dette benyttes enzymer og elektrolyttløsninger som har samme sammensetning som i humant spytt, magesaft og tarmsaft. Fordøyelsesenzymene er kommersielt tilgjengelige (Sigma), og i tarmfasen benyttes galle og bukspytt fra gris. Selv om INFOGEST nå er offisielt avsluttet, vil nettverket fortsatt arrangere møter der man

vrurderer mulighetene for å utvikle egne fordøyelsesmodeller for spebarn og eldre, og også en semi-dynamisk modell. Nofima vil følge opp dette.



Figur 6 Nofimas in vitro fordøyelsesmodell (INFOGEST) og etablerte analyser/metoder.

I Nofima er fordøyelsesmodellen benyttet til å studere fordøyelse av fett og karbohydrater, noe som har resultert i flere vitenskapelige artikler de siste årene. Vi har bl.a. undersøkt hvordan fiber og plantestoffer påvirker fordøyelsesenzymene, der målet har vært å finne komponenter som kan gi en langsommere økning i blodsukkeret og forlenget fettfordøyelse. Forlenget fettfordøyelse er vist å gi økt produksjon av metthetshormoner i endokrine celler i nederste del av tynntarmen (*ileum*). Vi kan måleviskositet i mage- og tarmfasen, og vi kan studere hvordan fett fordeler seg i magefasen.

I tillegg til å måle hvor raskt fettfordøyelsen går, dvs dannelsen av frie fettsyrer, kan vi også studere biotilgjengeligheten av spesielle fettsyrer (f.eks. omega-3) og fettløselige vitaminer og næringsstoffer (f.eks. lykopen). Vi har også benyttet modellen til å måle peroksidering gjennom fordøyelsen, dvs dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukter, malondialdehyd (TBARS) og 4-hydroxyalkenaler (HPLC), som er potensielt genotoksiske (kreftfremkallende). Spesielt har vi hatt fokus på betydning av dette når det gjelder inntak av rødt kjøtt og tarmkreft.

### 3.2 Tykktarmsmodell

Etter *in vitro* fordøyelse benyttes dialyse for å filtrere bort alle småmolekylære komponenter som antas å bli absorbert i tynntarmen. Det som blir igjen av ufordøyd materiale blir så frysetørket og tilsatt bakteriekulturer der human feces benyttes som inokulum (batch kultur). Prøver tas ut etter ulike tidsintervaller og bakteriesammensetning (pyrosekvensering) og metabolitter (f.eks. kortkjedete fettsyrer) måles. Bakterier i tarmen antas å spille en sentral rolle for utvikling av ulike sykdomstilstander. De kan omsette ufordøyde matkomponenter og skille ut nye stoffer som taes opp i tykktarmen og på den måten påvirker helsen.

### 3.3 Assays til måling av bioaktivitet

Bioaktivitet i fordøyd materiale kan testes i ulike kommersielle «assays» (kjemiske reagenser). For noen anvendelser brukes frysetørket materiale. Det finnes en rekke ulike assays for å måle biologisk aktivitet, som for eksempel antioksidant egenskaper (ABST scavenger assay), blodtrykk regulering (ACE-hemmer assays), regulering av insulin sekresjon (DPP-IV inhibering assay), kalsifisering (effekt av CPPs), eller enzymaktivitet (bruk av ulike rekombinante enzym assays).

Ved Nofima har vi metoder for å teste aktivitet av en rekke ulike enzymer, proteaser, lipaser og karbohydraser, der vi måler aktivitetsnivå og sammenligner med kjente kontroller. Vi kan gjennomføre tester på ulike typer råstoff og på fordøyd/ufordøyd materiale. I tillegg har vi et panel av enzymer som hemmer proteaser i ulike sykdomsforløp; ACE-hemmer, HIV, Alzheimers, humant cytomegalovirus for å nevne noen.

### 3.4 Cellemodeller

Bruk av cellemodeller for uttesting kan gi mer kunnskap enn rene *in vitro* assays, både om den endogene effekten, hvilken dose-respons som vil fremkalle en mulig bioaktivitet, og i hvilket vev/organ man kan forvente en biologisk respons. Noen peptider kan ha en effekt på muskelutvikling, mens andre peptider kan ha effekt på leverutvikling, beinutvikling, åredannelse etc. Det er derfor nødvendig med bruk av flere typer cellemodeller når en screener for biologisk aktivitet av peptider/hydrolysater og et mulige potensiale for videre bruk. Ved bruk av cellemodeller kan man teste effekt på cellevekst, modning av celler, celledød (apoptose) og enzymaktivitet. Det er også mulig å teste ut om peptidene har en mulig effekt på immunforsvaret. Standard biokjemiske, molekylære og histologiske metoder benyttes i arbeidet for forståelse av virkningsmekanismer, i tillegg til metoder som mRNA array eller proteomikk for måling av et større antall gener eller proteiner. Bruk av co-cultur systemer, dvs at en dyrker flere celletyper sammen er også noe som vil etterligne en *in vivo* tilstand bedre. I alle vev er det et samspill mellom ulike celletyper, og utskillelse av signalmolekyler/cytokiner påvirker funksjon og utvikling til andre celletyper.

Nofima har et bredt utvalg av cellelinjer og primære celler. Det er viktig at de ulike cellemodellene representerer *in vivo* opptaket av peptider/hydrolysater, dvs opptak i tarm og videre transport via blodbanen for opptak/effekt på målorganer (muskler, bein, bindevev, immunceller). Vi har på Nofima human tarmcellelinje (Caco2) hvor opptak og utskillelse av peptider/hydrolysater kan testes. Vi har videre en rekke andre «målganceller», blant annet primære bovine muskelceller hvor vi kan måle muskelvekst, modning, i tillegg til apoptose. Muskelcellesystemet brukes i dag til uttesting av hydrolysat fra pågående eggeskallmembranprosjekt, og også til uttesting av effekten av blant annet vitaminer. Det bovine muskelcellesystemet er et godt modellsystem for human muskelvekst, ved at det bovine og humane genomet er relativt like. Vi har primære humane beinceller, hvor vi kan måle vekst, modning og mineralisering. Vi har også humane fibroblaster, som er viktig i sårtilheling. Dette vil også være et modellsystem for uttesting av peptider/hydrolysater på produksjon av bindevev/ekstracellulær matriks ved at fibroblaster er selve bindevevsprodusenten. Et sunn og friskt bindevev/ekstracellulær matriks er helt avgjørende for human helse. Vi har også humane immunceller hvor vi kan teste immunresponsen og produksjon av en rekke signalmolekyler (cytokiner). Dette benyttes i dag til uttesting av bioaktivitet av olje/karbohydrater/fibre i forhold til human helse. Det vil ved pågående eggeskallmembran prosjekt etableres cellemodell for åredannelse (endotelceller), hvilket i dag benyttes ved andre forskningsinstitusjoner i forhold diabetesproblematikk og

helsefrembringende stoffer. I tillegg vil vi forsøke å etablere co-kulturer i andre fremtidige prosjekter for å utvide cellekulturene ved Nofima ytterligere. Vi har også en rekke primære celler fra fisk, blant annet muskelceller, leverceller og beinceller. Dette benyttes i dag til uttesting av nye føringredienser i akvakulturoppdrett og fiskehelse, i tillegg til effekter av omega-3 i fôret på human helse.

### 3.5 Dyrestudier

*In vitro* modeller vil aldri fullstendig erstatte bruken av dyremodeller. Det vanligste er å bruke mus/rotter, men gris er også ofte fortrukket da det er mindre fysiologiske forskjeller mellom gris og menneske. Fordelen ved dyremodeller er at man måler en mer realistisk bioaktivitet ved at dyrenes naturlige metabolisme er inkludert. Bruk av forsøksdyr er derimot mer kostnadsbelastende enn bruk av *in vitro* modeller for screening. Nofima har samarbeid med ulike partnere for bruk av dyremodeller for å teste biolologisk aktivitet relatert til human helse. Når det gjelder bioaktive peptider som ingrediens i dyrefôr har Nofima tilgang til forsøksfisk.

### 3.6 Humane intervensjonsstudier

For å dokumentere en helseeffekt og få godkjent en helsepåstand kreves det at humane intervensjonsstudier er blitt utført (EFSA). Bioaktive peptider kan ha en rekke positive helseeffekter (se nedenfor), men det har det vist seg vanskelig å bekrefte helseeffektene *in vivo*. Det er flere årsaker til dette, blant annet kjemisk ustabilitet og enzymatisk nedbrytning i fordøyelseskanalen eller i blodbanen. Før et peptid kan påvirke et vev, må det tas inn i blodstrømmen via fordøyelseskanalen, men dårlig oppløselighet, lang transittid gjennom mage og tarm, og manglende evne til å trenge gjennom tarmveggen kan bidra til å redusere absorpsjonen. For at et peptid skal virke bioaktivt på et målorgan, må det være kjemisk stabilt, ha rett konsentrasjon, og kunne taes opp av målorganet.

Ved Nofima i dag har vi mulighet til å gjennomføre postprandiale studier, dvs vi studerer hva som skjer i perioden fram til 4-8 timer etter inntak. Blant annet er Nofimas sensoriske panel benyttet i metthetsstudier. Hvis man ønsker å måle på parametere i blod, f.eks. for å dokumentere biotilgjengelighet av peptider, er "Dried Blood Spots» (DBS) en enkel og smertefri metode. Prøvene sendes til VITAS i Forskningsparken, Oslo, som kan utvikle analyser etter behov. For større intervensjonsstudier er samarbeid med ulike medisinske miljøer helt nødvendig.

## 4 Helseeffekter og bivirkninger

### Oppsummering av kapittelet:

Animalske proteiner er regnet for å ha gjennomgående høyere kvalitet enn vegetabiliske proteiner siden de har en aminosyresammensetning som ligner proteinene hos mennesket. Økt kunnskap om hva som skjer under fordøyelsen er viktig for å forstå sammenhengen mellom mat og helse, og vil gi mulighet for å utvikle produkter som bevarer og/eller frigir helsegunstige komponenter til riktig tid og sted i mage-tarm kanalen slik at helseeffekten blir optimal. Bioaktive peptider er identifisert i mange ulike råstoffer, blant annet planter, melk, kjøtt og fisk, og har vist potensielt gunstige effekter på hjerte/kar-systemet, immunsystemet, muskler, bein og bindevev, nervesystemet og mage/tarm systemet.

Proteiner i kosten brukes både som energikilde (12-15% av energien) og til oppbygging og vedlikehold av organismen, f.eks. som byggestener i muskler og bindevev, og som enzymer, transportproteiner, hormoner mm. Den biologiske funksjonen er avhengig av proteinets aminosyresammensetning.

### 4.1 Proteinkvalitet

Anbefalt inntak av protein er 0,75 gram/kg kroppsvekt (FAO 1985). I Norge er gjennomsnittlig inntak langt høyere, ca 100 g per person per dag, og proteinkvaliteten regnes for meget tilfredsstillende for hele befolkningen. I gjennomsnitt kommer 59% av proteinet fra animalske varer, hvorav 27% fra kjøtt. Proteinets ernæringsverdi bestemmes av aminosyre-sammensetningen (kjemisk score) og prosentandelen som absorberes og utnyttes til vekst og vedlikehold i kroppen (biologisk verdi).

I de vanligste matvarene er det lysin, tryptofan, cystein og metionin som er begrensende, men ved å spise proteiner fra ulike kilder kan svakheten ved en type protein oppveies av et annet. Det er flere metoder som benyttes til å bestemme proteinets biologiske verdi. Den mest anvendte metoden er å bestemme PER (Protein Efficiency Ratio) som angir vektøkningen i rotter i forhold til inntatt mengde protein. En nyere metode for vurdering av proteinkvalitet, DIAAS-metoden (The Digestible Indispensable Amino Acid Score) (FAO 2012), beregner biotilgjengeligheten av hver enkelt aminosyre, målt i ileum (nedre del av tynntarmen) etter inntak av ferdig tilberedt mat.

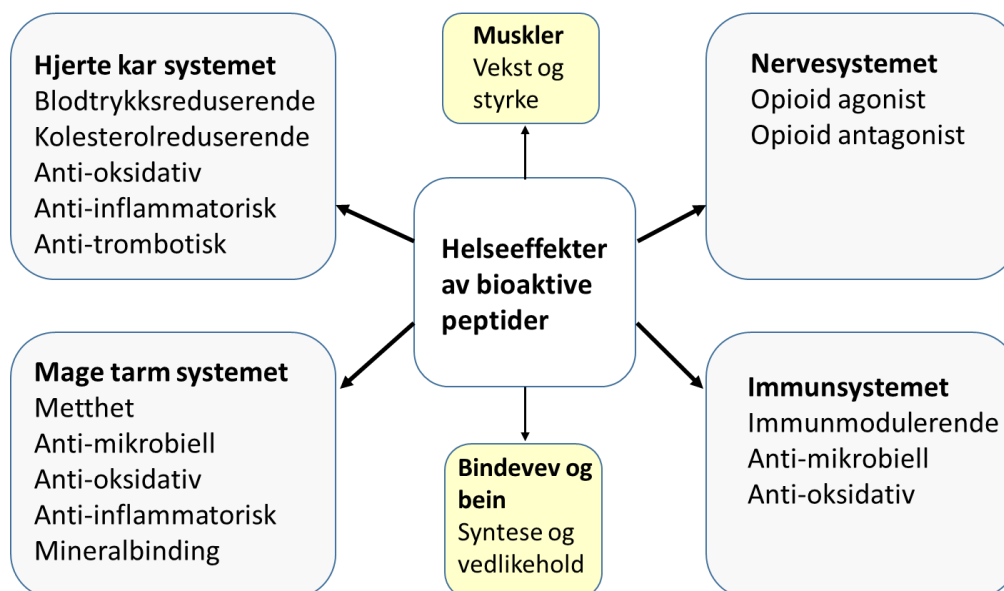
### 4.2 Proteinfordøyelse

I magesekken blir proteinet denaturert ved lav pH, noe som gjør det mer tilgjengelig for fordøyesesenzymene. Pepsin spalter proteinet til polypeptider, og når maten kommer ut av magesekken er ca 20% av proteinet spaltet. I tynntarmen spalter de ulike enzymene trypsin, kymotrypsin, elastase og endopeptidaser bindinger inne i peptidkjeden. Pepsin spalter fenylalanin og tyrosinbindinger, trypsin spalter peptidbindinger med arginin eller lysin, kymotrypsin bindinger med tyrosin, fenylalanin og tryptofan. Peptidbindinger som gjenstår blir spaltet til frie aminosyrer av peptidaser i børstesømmen på innsiden av tarmen. Frie aminosyrer, di- og tri- peptider blir deretter tatt opp i tarmcellene ved en selektiv prosess, dvs de transporteres aktivt ved hjelp av membranproteiner. Inne i tarmcellene kan peptidene spaltes videre til frie aminosyrer med cytoplasmapeptidase. Lavmolekylære peptider kan også transporteres paracellulært, dvs diffundere passivt gjennom vannkanaler mellom cellene <sup>4</sup>.



Fordøyelse av melkeproteiner er studert både *in vivo* (dyre- og human studier) og *in vitro*, mens det er lite gjort på proteiner fra kjøtt og restråstoff fra kjøttproduksjon. En ileostomi studie viser bedre fordøyelighet av kjøttproteiner sammenlignet med soyaprotein <sup>5</sup>. Flere studier antyder også at prosessering, som varmebehandling, kverning og fermentering kan påvirke proteinfordøyelsen <sup>6-8</sup>.

### 4.3 Helseeffekter av bioaktive peptider



Figur 7 Fysiologiske effekter av bioaktive proteiner og peptider i mat.

Bioaktive peptider er identifisert i mange ulike råstoffer, blant annet planter, melk, kjøtt og fisk. Bioaktive peptider må absorberes i tarmen og komme over i blodbanen for å kunne utøve fysiologiske effekter, men peptider kan også ha effekter lokalt i tarmen. Det meste av forskningen på bioaktive peptider har fokusert på blodtrykksenkende peptider og peptider med antioksidant effekt <sup>9</sup>, men peptider kan også ha en rekke andre fysiologiske effekter:

- Effekt på mikrobiota (tarmhelse). Det er stadig økende fokus på tarmfloraens betydning for helsen, blant annet hvilken rolle tarmbakteriene har mht energitilførsel, metthet, immunapparat, og tykktarmskreft. Proteiner og peptider som ikke blir fordøyd og tatt opp i tynntarmen kommer ned til tykktarmen (ca 13 g/dag) der de blir fermentert til kortkjedete fettsyrer og en rekke nitrogenforbindelser. Noen av disse sluttproduktene kan være toksiske, og det er antydnet at økt proteinfermentering i siste del av tykktarmen er assosiert med tykktarmskreft <sup>10</sup>. Det er vist at noen peptider har anti-mikrobiell effekt og disse kan dermed ha en beskyttende effekt på tarmepitelet <sup>11,12</sup>.
- Effekt på metthet og vektkontroll. Proteiner er vist å gi økt metthet sammenlignet med fett og karbohydrater, og ulike typer proteiner ser ut til å ha varierende effekt avhengig av aminosyresammensetning og molekylstruktur <sup>13,14</sup>. Blant annet er myseprotein vist å gi redusert appetitt sammenlignet med protein fra kalkun og albumin fra egg. Forskning har vist at hydrolysert fiskeprotein gir mindre bukfedme sammenlignet med melkeprotein (casein) i rotteforsøk <sup>15</sup>. Videre er det vist at peptider som resultat av proteinfordøyelse kan bidra til økt metthet ved å aktivere

både opiat reseptorer og reseptorer for CCK, et hormon som regulerer tømming av magesekken<sup>16</sup>. Avhengig av proteinstruktur kan noen proteiner også gi økt viskositet i mage-tarm, noe som gir forlenget tømming av magesekken og økt metthetsfølelse.

- Effekt på muskler, bindevev og beinutvikling. Proteiner er viktig for muskeltilvekst, og behovet øker med økende grad av fysisk aktivitet. Protein hydrolysater er antydnet å gi bedre effekt på muskeltilvekst (muskel protein syntese) enn intakt protein, trolig fordi hydrolysater lettere fordøyes og absorberes i kroppen<sup>17</sup>. Blant annet er det antydnet at hydrolysat av myseprotein kan gi økt muskelvekst<sup>18</sup>, og peptider fra kollagen er vist å øke muskelmasse og muskelstyrke hos eldre menn<sup>19</sup>. Forskningen har i stor grad fokusert på muskelfunksjon hos sportsutøvere, og det er usikkert i hvilken grad tilskudd av protein, peptider og aminosyrer gir effekt hos utrenede individer<sup>20</sup>. Når det gjelder mulig effekt på bindevev og beinutvikling er det i hovedsak kollagenhydrolysat som er undersøkt. Kollagenhydrolysat inneholder peptider som ikke brytes ned under fordøyelsen, men tas opp i blod og anrikes i bindevev<sup>21</sup>. Det er publisert flere studier som antyder at inntak av kollagenhydrolysat gir økt bentetthet og redusert bentap ved osteoporose (benskjørhet) og bedret leddfunksjon ved osteoartritt (leddsykdom)<sup>22</sup>. Kollagenhydrolysat er vist å stimulere syntese og vedlikehold av bindevev, og kan påvirke sammensetningen av glykosaminoglykaner. Videre ser det ut til at hydrolysatet øker vannbindingskapasiteten i epidermis (overhuden) og gir økt dannelse av kollagen fibre i dermis (underhuden). Kliniske studier viser at det er trygt å innta kollagenhydrolysat også ved langtids bruk.
- Blodtrykksreducerende effekt (ACE hemming). Mange studier har identifisert peptider fra kjøtt med hemmende effekt på angiotensin- 1- converting enzyme (ACE) og dermed med mulig blodtrykkssenkende effekt<sup>9, 12, 23, 24</sup>. Det er også funnet ACE hemmende peptider i kollagen fra bindevev i storfe<sup>25, 26</sup> og i restråstoff fra fisk, mens det er lite publisert om bioaktive peptider i restråstoff fra kjøttproduksjon. Peptidene binder seg enten direkte til det aktive setet på ACE enzymet eller modifiserer strukturen slik at substratet blir hindret i å binde seg. Det er imidlertid få produkter på markedet med blodtrykkssenkende peptider<sup>27</sup>, trolig fordi man ikke har tatt høyde for at peptidene må være resistente mot fordøyelse og bli tatt opp i kroppen for å ha effekt. Noen få nyere studier har ved bruk av *in vitro* fordøyelsesmodeller identifisert ACE hemmende peptider fra fordøyd svinekjøtt<sup>28</sup> og karpe<sup>29</sup>, og det antydes at graden av ACE hemming varierer med tid i mage og tynntarm.
- Antioksidant effekt. Peptider med antioksidant effekt er funnet i mange matvarer som melk, hvete, potet og fisk, mens forskning på antioksidant peptider fra hydrolysater av kjøtt er svært begrenset<sup>9</sup>. Det er imidlertid vist at peptider utvunnet fra svineprotein, og fra hydrolysat av svinekollagen, kan ha antioksidant effekt<sup>30, 31</sup>. De fleste studiene har benyttet antioksidant-assays (DPPH, ORAC, TRAP) eller cellesystemer, mens det er få studier som har undersøkt antioksidanteffekt under og etter *in vitro* fordøyelse. Av et svært begrenset antall *in vivo* studier kan nevnes en human studie som viser at inntak av proteinhydrolysat av raps reduserer nivået av malondialdehyd i blod, et mulig kreftfremkallende sekundært oksidasjonsprodukt<sup>32</sup>. I prinsipp kan man tenke seg at antioksidant peptider kan hindre oksidativ skade både inne i kroppen og lokalt i tarmen. Peroksidering i tarmen kan føre til betennelsestilstander og utvikling av tarmkreft.
- Anti-inflammatorisk effekt. Flere studier antyder at peptider kan ha immunmodulerende effekt<sup>33</sup>. Blant annet er det funnet peptider i egg og marine alger som kan hemme cytokinproduksjon i LPS stimulerte makrofager<sup>34</sup>, og det er funnet tripeptider i melk som kan dempe betennelsesreaksjoner ved irritabel tarm<sup>35</sup>. Hydrolysater og peptider fra soyabønner er vist å ha gunstig effekt på makrofag cellelinjer, og også på immunapparatet hos mennesker<sup>36</sup>. Detaljerte

studier på peptider fra kjøtt og fisk er svært begrenset, men det er indikasjoner på at også hydrolysater av fisk og kylling (kollagen) kan ha anti-inflammatorisk effekt. Det er også antydning at peptider kan styrke tarmens barriere funksjon<sup>37</sup>, men her trengs mer forskning.

- Anti-bakteriell effekt. Antimikrobielle peptider (AMP) er hovedsakelig identifisert i melk, men det er funnet AMP fra storfemuskel som hemmer vekst av Gram-positive og Gram-negative patogener<sup>12</sup>, og AMP fra østers muskel som hemmer vekst av E-coli<sup>38</sup>. Det er også vist at hydrolysat fra eggehviteprotein kan redusere bakterievekst<sup>39</sup>. En nyere studie av kyllingprotein hydrolysat (fra restråstoff) tilsatt kalkunburger viste reduksjon i bakterievekst, pga økt vannbinding, og hydrolysatet er dermed et godt alternativ ved saltreduksjon<sup>40</sup>.
- Anti-proliferativ effekt. Det er vist at hydrolysater fra fisk kan ha anti-proliferativ effekt på ulike cellelinjer. Peptidfraksjoner med molekylvekt mellom 400 og 1400 Da utvunnet fra restråstoff fra tunfisk viste betydelig anti-proliferativ effekt på brystkreftceller i kultur<sup>41</sup>.
- Kolesterolreducerende effekt. Proteiner og peptider er vist å kunne binde gallesyrer<sup>42, 43</sup>. Dette kan føre til redusert reabsorpsjon av gallesyrer i tarmen og kroppen må da benytte kolesterol i blodet til å lage nye gallesyrer, noe som medfører en reduksjon i serumkolesterolet. Det er bl.a. identifisert et gallesyre-bindende peptid fra soyaprotein som reduserer kolesterolet hos rotter<sup>44</sup>.
- Blodsukkerregulerende effekt. Peptider som hemmer dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), et enzym som bryter ned det blodsukkerregulerende hormonet incretin, kan potensielt benyttes i behandling av Diabetes Type 2. *In silico* analyse har identifisert slike peptider i melk og kjøtt (storfe og svin), spesielt i proteiner som finnes i restråstoff fra kjøtt (kollagen, serum albumin)<sup>45-47</sup>.
- Binding av mineraler. Noen peptider er vist å kunne binde mineraler (f.eks. kalsium) og dermed øke biotilgjengeligheten av disse.
- Annet. Hydrolysat av kyllingkjøtt og bein kan brukes i produksjon av probiotiske bakterier, f.eks. bifidobakterier, da det gir god vekst og høy viabilitet<sup>48</sup>.

#### 4.4 Bivirkninger

Artsfremmede proteiner, peptider og aminosyrer kan påføre kroppen skade ved ulike immunologiske reaksjoner. For eksempel kan små peptider (di-, tri- og oligo) passere tarmcellene og gi opphav til allergiske reaksjoner. Visse proteinsekvenser som vanskelig lar seg fordøye antas å være en viktig faktor i utvikling av allergier, og det forskes på muligheter for å påvirke fordøyelse gjennom strukturendringer for å hindre allergiske reaksjoner. Det er også antydning at noen peptider fra fordøyelsen som fraktes via blodbanen til hjernen kan ha opiat-lignende effekter. Det er bl.a. vist en assosiasjon mellom autisme, schizofreni og økte nivåer av peptider i urin. Videre er det vist at peptider fra gluten (hvete) og casein (melk) kan forverre tilstanden hos autister. Generelt bør man unngå for høyt inntak av protein da dette kan føre til nyreskade.

I forbindelse med hydrolyse av protein restråstoff, kan det forekomme racemisering (isomerisering) av aminosyrer slik at det vil kunne dannes D-aminosyrer, både bundet i protein, peptider eller i fri form (Personlig kommunikasjon: John-Erik Haugen, Nofima). D-aminosyrer vil kunne bidra til nedsatt proteinfordøyelighet og redusert næringsverdi. Det har også vært mye fokus på dipeptidet lysinoalanin i isomeriserte D-former, som også kan dannes under proteinhydrolyse. Studier på dyr har vist at D-aminosyrer og lysinoalanin kan gi negative helseeffekter i form av svekket immunsystem, skade på nyrer, lever og nervesystem<sup>49, 50</sup>. Mengdene som dannes av de nevnte stoffer under proteinhydrolyse er avhengig av hydrolysebetingelsene, som temperatur, ionestyrke og pH og om det anvendes kjemisk

eller enzymatisk hydrolyse. Det er spesielt under kjemisk hydrolyse at det vil kunne dannes betydelige mengder av disse stoffene.

## 5 Markedsmuligheter

Oppsummering kapittelet:

Bi-produkter fra matproduksjon, inkludert kjøttproduksjon, har stort potensiale til å kunne bli brukt som høy-verdi produkter. Markedsmuligheter for bruk av bioaktive peptider inkluderer både mat, helsekost, kosmetikk og farmasøytika. Det er også et økende marked for bruk av helsebringende stoffer i dyre- og fiskefôr.

Markedsmuligheter for bruk av bioaktive peptider er mange (Figur 8), inkludert helsekost, ernæringsdrikker og proteintilskudd til den økende eldre befolkning, sportsdrikker, og ulike matprodukter innen matindustrien.

Kosmetikkindustrien bruker i dag en rekke ulike peptider for å sikre god hudhelse og bekjempelse av rynker. Forskning innen hudhelse viser at komponenter som kan passere hudens ytterste celledag vil kunne stimulere cellevekst og produksjon av ny ekstracellulær matriks for bevaring av god hudhelse. Bioaktive komponenter som kan regulere enzymaktivitet, og dermed redusere nedbrytning er derfor svært aktuelt. Det er også ønskelig med satsning på produkter som ikke må tas oralt, grunnet en mer kontrollerbar bioaktiv effekt (unngår fordøyelsesenzymer). Bioaktive komponenter som kan øke regenereringen av hud etter sårskade er svært ønsket i farmasøytisk industri. Hydrolysater fra eggskallemembran er i pågående eggskalprosjektet på Nofima påvist å fremme regenerering. Om dette skyldes frigjørelse av bioaktive peptider er ukjent.

Fôr-industrien (dyre og fiskefôr) er også et aktuelt marked. Akvakultur må sikre økt vekst og opprettholde god fiskehelse. Lakselusproblematikk, sårskader, skjelettdeformiteter, bindevevspåleiringer, muskelvekst og kvalitet er stadig aktuelle problemstillinger, og helsebringende komponenter i fôr som kan hjelpe på dette er ønsket. Kjøledyrmarkedet i Norge er økende, og her er potensialet stort. Det konsumeres mer enn 20 000 tonn tørrfor til hund pr år i Norge, megatrender i markedet viser at kjøledyrene skal ha sunn ernæring, den skal være bærekraftig og ren. En stadig mer bevisst gruppe eiere med fokus på dyrehelse er med på å skape et marked innen helsebringende stoffer i dyrefôr.

## 6 Referanser

1. Lafarga, T. & Hayes, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci* **98**, 227-239 (2014).
2. Mellander, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis* **55**, 247-255 (1950).
3. Minekus, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* **5**, 1113-1124 (2014).
4. Renukuntla, J., Vadlapudi, A.D., Patel, A., Boddu, S.H.S. & Mitra, A.K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics* **447**, 75-93 (2013).
5. Sandstrom, B., Andersson, H., Kivisto, B. & Sandberg, A.S. Apparent Small Intestinal-Absorption of Nitrogen and Minerals from Soy and Meat-Protein-Based Diets - a Study on Human Ileostomy Subjects. *Journal of Nutrition* **116**, 2209-2218 (1986).
6. Pennings, B. et al. Minced beef is more rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting in greater postprandial protein retention in older Men. *American Journal of Clinical Nutrition* **98**, 121-128 (2013).
7. Montoya, C.A., Hindmarsh, J.P., Moughan, P.J. & Rutherford, S.M. Magnetic Resonance Spectroscopy Technique to Determine the Stomach Emptying Rate of Mixed Diets in Growing Rats. *Journal of Nutrition* **143**, 541-547 (2013).
8. Bax, M.L. et al. Effects of Meat Cooking, and of Ingested Amount, on Protein Digestion Speed and Entry of Residual Proteins into the Colon: A Study in Minipigs. *Plos One* **8** (2013).
9. Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* **3**, 765-791 (2011).
10. Magee, E.A., Richardson, C.J., Hughes, R. & Cummings, J.H. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 1488-1494 (2000).
11. Tollin, M. et al. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides* **24**, 523-530 (2003).
12. Jang, A., Jo, C., Kang, K.S. & Lee, M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry* **107**, 327-336 (2008).
13. Paddon-Jones, D. et al. Protein, weight management, and satiety. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**, 1558s-1561s (2008).
14. Mikkelsen, P.B., Toubro, S. & Astrup, A. Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 1135-1141 (2000).
15. Liaset, B. et al. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1791**, 254-262 (2009).
16. Pupovac, J. & Anderson, G.H. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *Journal of Nutrition* **132**, 2775-2780 (2002).
17. Koopman, R. et al. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *American Journal of Clinical Nutrition* **90**, 106-115 (2009).
18. Pennings, B. et al. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *American Journal of Clinical Nutrition* **93**, 997-1005 (2011).
19. Zdzieblik, D., Oesser, S., Baumstark, M.W., Gollhofer, A. & Konig, D. Collagen peptide supplementation in combination with resistance training improves body composition and

- increases muscle strength in elderly sarcopenic men: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* **114**, 1237-1245 (2015).
20. Pasiakos, S.M., McLellan, T.M. & Lieberman, H.R. The Effects of Protein Supplements on Muscle Mass, Strength, and Aerobic and Anaerobic Power in Healthy Adults: A Systematic Review. *Sports Medicine* **45**, 111-131 (2015).
  21. Oesser, S., Adam, M., Babel, W. & Seifert, J. Oral administration of C-14 labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *Journal of Nutrition* **129**, 1891-1895 (1999).
  22. Elam, M.L. et al. A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Medicinal Food* **18**, 324-331 (2015).
  23. Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. & Itoh, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science* **57**, 319-324 (2001).
  24. Muguruma, M. et al. Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects in vivo. *Food Chemistry* **114**, 516-522 (2009).
  25. Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J. & Shahidi, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2992-2997 (2001).
  26. Fu, Y., Young, J.F., Dalsgaard, T.K. & Therkildsen, M. Separation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine connective tissue and their stability towards temperature, pH and digestive enzymes. *International Journal of Food Science and Technology* **50**, 1234-1243 (2015).
  27. Hartmann, R. & Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 163-169 (2007).
  28. Escudero, E., Sentandreu, M.A., Arihara, K. & Toldra, F. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Generated from in Vitro Gastrointestinal Digestion of Pork Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2895-2901 (2010).
  29. Borawska, J., Darewicz, M., Vegarud, G.E., Iwaniak, A. & Minkiewicz, P. Ex vivo digestion of carp muscle tissue - ACE inhibitory and antioxidant activities of the obtained hydrolysates. *Food & Function* **6**, 211-218 (2015).
  30. Saiga, A., Tanabe, S. & Nishimura, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3661-3667 (2003).
  31. Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B.P. & Wu, Y.N. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* **102**, 1135-1143 (2007).
  32. Xue, Z.H., Yu, W.C., Wu, M.C. & Wang, J.H. In Vivo Antitumor and Antioxidative Effects of a Rapeseed Meal Protein Hydrolysate on an S180 Tumor-Bearing Murine Model. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**, 2412-2415 (2009).
  33. Chakrabarti, S., Jahandideh, F. & Wu, J.P. Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *Biomed Research International* (2014).
  34. Lee, H.A. Bioactive peptide from *Pyropia yezoensis* and its anti-inflammatory activities. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 1701-1706 (2015).
  35. de Medina, F.S. et al. Session 9: Food ingredients, immunity and inflammation: animal and in vitro models New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society* **69**, 454-462 (2010).
  36. Yimit, D., Hoxur, P., Amat, N., Uchikawa, K. & Yamaguchi, N. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers. *Nutrition* **28**, 154-159 (2012).

37. Martinez-Augustin, O., Rivero-Gutierrez, B., Mascaraque, C. & de Medina, F.S. Food Derived Bioactive Peptides and Intestinal Barrier Function. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 22857-22873 (2014).
38. Liu, Z.Y. et al. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control* **19**, 231-235 (2008).
39. Pellegrini, A., Hulsmeier, A.J., Hunziker, P. & Thomas, U. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1672**, 76-85 (2004).
40. Zanello, P.P. et al. Antimicrobial activity of poultry bone and meat trimmings hydrolyzates in low-sodium turkey food. *Food & Function* **5**, 220-228 (2014).
41. Hsu, K.C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry* **122**, 42-48 (2010).
42. Kahlon, T.S. & Woodruff, C.L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. *Food Chemistry* **79**, 425-429 (2002).
43. Nagaoka, S. et al. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* **129**, 1725-1730 (1999).
44. Nagaoka, S., Nakamura, A., Shibata, H. & Kanamaru, Y. Soystatin (VAWWMY), a Novel Bile Acid-Binding Peptide, Decreased Micellar Solubility and Inhibited Cholesterol Absorption in Rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **74**, 1738-1741 (2010).
45. Power, O., Nongonierma, A.B., Jakeman, P. & FitzGerald, R.J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society* **73**, 34-46 (2014).
46. Lafarga, T., O'Connor, P. & Hayes, M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis. *Peptides* **59**, 53-62 (2014).
47. Nongonierma, A.B. & FitzGerald, R.J. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry* **165**, 489-498 (2014).
48. Lazzi, C., Meli, F., Dossena, A., Gatti, M. & Neviani, E. Growth Promotion of Bifidobacterium Species by Poultry Bone and Meat Trimming Hydrolyzate. *Journal of Food Science* **76**, M392-M397 (2011).
49. Ministry, T.N.C.o. Process - induced changes of amino acids and proteins: health aspects. (1993:623).
50. Bellagamba, F., Caprino, F., Mentasti, T., Vasconi, M. & Moretti, V.M. The impact of processing on amino acid racemization and protein quality in processed animal proteins of poultry origin. *Ital J Anim Sci* **14**, 238-245 (2015).



