

Sammenlignende *in vitro* fordøyelse av fiskemuskel og kjøtt

Tatiana N. Ageeva

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap
Studieretning: Sjømatvitenskap (60 stp.)
Mai 2014

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Norges fiskerihøgskole (NFH) og markerer slutten på et interessant og lærerikt femårs studie.

Først og fremst vil jeg takke professor Ragnar L. Olsen ved UiT for en spennende oppgave å arbeide med, for inspirasjon og fantastisk god veiledning, tålmodighet, støtte, verdifulle råd både profesjonelle og generelt i livet, og ikke minst for et smittende godt humør. Dette har vært en utfordrende men spennende vei mot en ny kunnskapsverden som jeg ikke ville ha klart uten min "Far i Tromsø".

Jeg vil også rette en stor takk til Guro Kristine Edvinsen, Ida-Johanne Jensen, Birthe Vang og Hanne Mæhre for deres bidrag og gode råd under utføring av den praktiske delen til masteroppgaven.

En spesiell takk til Kull 2009 for sosiale og faglige aktiviteter og minneverdige dager gjennom studietid.

Til slutt vil jeg takke min familie for motivasjon og for at dere trodde på meg. Til min kjære mann, Jan Tore Didriksen, takk for din tålmodighet, kjærlighet og forståelse, støtte og oppmuntring. Det betyr alt for meg.

Tromsø, mai 2014

Tatiana N. Ageeva

Sammendrag

Man vet at det gir positive helseeffekter å spise sjømat. Helsemyndigheter i mange land anbefaler at man spiser fisk minst to ganger i uken. Dette knyttes mot at fisk og fiskefett har en forebyggende effekt mot hjerte- og karsykdommer. I tillegg har det blitt observert at høyt fiskeinntak kan også føre til optimal utvikling av hjerne og nervesystem hos nyfødte, forsinket demensutvikling og forebygging mot noen kreftformer. De positive effektene har til nå i hovedsak blitt forklart med innholdet av de langkjedede omega -3 fettsyrene eicosapentaensyre (EPA, 20:5 n-3) og docosaheksaensyre (DHA, 22:6 n-3). I de siste årene har man imidlertid kommet fram til at også andre stoffer i fisken bidrar til de positive effektene. Sjømat kan også være en god kilde for ulike vitaminer (A, D, E, B₁₂, B₆) og mineraler (fosfor, selen, sink, kalsium), den frie aminosyren taurin og andre forbindelser.

Fiskekjøtt inneholder like mye protein som dyrekjøtt og er like god kilde for de essensielle aminosyrene. Rådene er imidlertid å begrense inntaket av rødt kjøtt og bearbeidet kjøtt. Oppbygging og den kjemiske sammensetning til muskel er ganske forskjellig hos fisk og kjøtt. Kjøtt inneholder blant annet betydelig mer bindevev enn fisk. Ofte hevdes det at det er tyngre å fordøye kjøtt enn fisk noe som knyttes gjerne mod det høye kollageninnholdet i kjøtt. Dette kan bidra til at fisk er sunnere enn kjøtt.

Formålet med denne oppgaven var å sammenligne fordøyelsen av fiskemuskel og dyrekjøtt. I denne studien ble brukt filet fra sei (*Polachius virens*) og ytrefilet fra storfe (*Bos Taurus*).

Flere interessante resultater ble funnet i oppgaven. I magesekkefasen med bruk av pepsin ved pH 4,0 var liten eller ingen frigjøring av protein eller nedbrytning av protein. Først når pH ble senket til 2,0 økte løseligheten av protein samtidig med at mengden TCA-løselig protein økte kraftig. Dette skjedde i hovedsak i løpet av de første 20 min etter at pH var blitt redusert. Det ble ikke dannet frie aminosyrer i løpet av pepsinhydrolysen verken ved pH 4,0 eller 2,0.

Ved høy konsentrasjon av fordøyelsesenzymer foregikk nedbrytningen av rå produkter i hovedsak i magesekkefasen. Ved lavere konsentrasjon foregikk nedbrytning av protein i større grad også i tarmfasen. Dersom man ønsker å studere nedbrytningshastighet av forskjellige typer mat vil bruk av redusert enzymkonsentrasjon anbefales.

Resultatene viste at rå produkter ble brutt ned raskere i magefasen enn varmebehandlede produkter. Årsaken er antakelig at proteinene denatureres ved varmebehandling og derved er de mindre tilgjengelig for hydrolyse tidlig i fordøyelsen. De varmebehandlede produktene brytes i større grad ned i tarmfasen enn de rå produktene. Analyse av frie aminosyrer ble bare gjennomført på rå produkter og resultatene viste at disse dannes i tarmfasen.

Forsøkene i oppgaven både med bruk av rå og varmebehandlede produkter viste at proteinene i seimuskel ble lettere brutt ned enn proteiner i storfekjøttet. Sannsynligvis skyldes dette et høyere innhold av bindevev i kjøtt enn i fisk. Dette ble også bekreftet ved analyse av aminosyreinnholdet i kjøtt og fisk. Resultatene fra aminosyreanalysene bekreftet at fisk er en god kilde for taurin sammenlignet med kjøtt.

Dannelsen av TCA-løselig protein vil antakelig kunne gi et mer presist bilde av hydrolyseforløpet enn endring av mengde frigjort protein i denne typen *in vitro* fordøyelsesforsøk.

Summary

Seafood is known to provide health benefits for human. The health authorities in many countries recommend eating fish at least twice a week. Fish and fish oils can have a preventive effect on cardiovascular disease. In addition, it has been observed that high fish intake may also contribute to optimal development of the brain and nervous system in newborns, delay dementia and reduce the incidence of some cancers. The positive effects have mainly been associated with the content of the long chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3). In recent years, however, it was concluded that other substances in fish contribute to the positive effects. Seafood can also be a good source of various vitamins (A, D, E, B₁₂, B₆) and minerals (phosphorus, selenium, zinc, calcium), the free amino acid taurine, and other compounds.

Fish muscle contains as much protein as animal muscle and it is considered to be an equally good source of essential amino acids. The general advices are however to limit the intake of red meat and processed meat. The structure and the chemical composition of muscle are quite different in fish and meat. Meat contains among other things considerably more connective tissue than fish. Often it is claimed that fish is easier to digest than meat and this may be explained by a higher content of collagen in meat. This can be one of the reasons why fish is healthier than meat.

The purpose of this study was to compare the digestion of fish muscle and animal meat. Fillets of saithe (*Polachius virens*) and sirloin of cattle (*Bos Taurus*) were used in this study.

Several interesting results were found in the thesis. In the stomach phase using pepsin at pH 4.0 there was low or no release of proteins or degradation of the proteins. First, when the pH was decreased to 2.0 the solubility of the protein increased while the amount of TCA soluble protein increased remarkably. This occurred mainly during the first 20 min after the pH had been reduced. No free amino acids were formed at pH 4.0 or pH 2.0.

Degradation of raw products mainly occurred during the stomach phase when there was a high concentration of digestive enzymes. Degradation of proteins was extended to the intestinal phase when the concentrations of digestive enzymes were lower. To study the rate of degradation of different types of food, the use of lower enzyme concentrations is therefore probably better.

The results showed that the raw products were degraded faster in the stomach phase than the heat-treated products. The reason for this is probably that the proteins are denatured by heat treatment and thus they are less accessible to hydrolysis early in the course of the digestion. The heat-treated products were broken down to a greater extent in the intestinal phase compared to the raw products. Analysis of free amino acids was only conducted on the raw products and the results showed that amino acids were released in the intestinal phase.

The experiments both with the use of raw and heat-treated products showed that the proteins in saithe muscles were solubilized easier than proteins in cattle meat. This is probably because of a lower content of connective tissue in fish than in meat. The higher content of connective tissue in the meat was also confirmed by the amino acid analysis. The results of amino acid analysis confirmed that the fish is a good source of taurine compared to meat.

The changes in the concentration of TCA-soluble protein is likely to provide a more accurate picture of the hydrolysis process than changes in the amount of released protein in this type of *in vitro* digestion experiments.

Краткое содержание

Как известно, диета, богатая морепродуктами, приносит пользу здоровью человека. Органы здравоохранения многих стран рекомендуют употреблять рыбу не менее двух раз в неделю. Это связано с профилактическим действием рыбы и рыбьего жира в отношении сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, было обнаружено, что высокий уровень употребления рыбы может способствовать оптимальному развитию мозга и нервной системы у новорожденных, а также задержке развития деменции и предотвращению некоторых видов рака. Положительные эффекты часто связывают с содержанием длинноцепочечных омега-3 жирных кислот: эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5 n-3) и докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6 n-3).

Мышечная ткань рыбы содержит столько же белка, сколько и мышцы наземных животных, и считается столь же хорошим источником незаменимых аминокислот. Однако, в отличие от рыбы, употребление красного и переработанного мяса рекомендуется ограничивать. Структура и химический состав мышц рыбы весьма отличается от мяса наземных животных. Последнее содержит среди прочего значительно больше соединительной ткани, чем рыба. Часто утверждается, что рыба усваивается легче, чем мясо, что можно объяснить более высоким содержанием коллагена в мясе. Это может быть одной из причин, почему рыба полезнее, чем мясо.

Задачей этого исследования было сравнить переваривание мышечной ткани рыб и мяса наземных животных. В данном исследовании были использованы филе сайды (*Polachius Virens*) и ростбиф (тонкий край) крупного рогатого скота (*Bos Taurus*).

В ходе данного исследования были получены интересные результаты. В желудочной фазе с использованием пепсина при pH 4,0 наблюдался низкий или нулевой уровень высвобождения или расщепления белков. Только после снижения pH до 2,0, растворимость белка увеличилась, и, в то же время, значительно увеличилось количество ТХУ-растворимых белковых соединений. Это произошло, преимущественно, в течение первых 20 мин после снижения pH. При pH 4,0 или pH 2,0 не было обнаружено образование свободных аминокислот.

При высокой концентрации пищеварительных ферментов деградация белков сырых продуктов, в основном, происходила во время желудочной фазы. При пониженной концентрации пищеварительных ферментов деградация белков также происходила в кишечной фазе. Для изучения скорости расщепления различных видов пищи рекомендуется использование более низких концентраций ферментов.

Результаты показали, что сырые продукты деградируются быстрее в желудочной фазе, чем термообработанные продукты. Вероятно, при термической обработке белки денатурируют и становятся менее доступными для гидролиза в начале процесса пищеварения. Термообработанные продукты расщеплялись в большей степени в кишечной фазе чем сырые продукты. Анализ свободных аминокислот был проведен только на сырых продуктах, и результаты показали, что высвобождение аминокислот происходило в кишечной фазе.

Эксперименты, как с использованием сырых, так и термически обработанных продуктов, показали, что белки мяса сайды солубилизировались легче, чем белки красного мяса. Вероятно, это результат более низкого содержания соединительной ткани в рыбе по сравнению с мясом, что было также подтверждено с помощью анализа аминокислот. Результаты анализа аминокислот показали, что рыба является более хорошим источником таурина, чем мясо.

Изменения в концентрации ТХУ-растворимых белковых соединений может дать более точное представление о процессе гидролиза, чем изменения в растворимом белке при подобном эксперименте с *in vitro* пищеварением.

Forkortelser

BSA	Bovine serum albumin
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Kobber(II)sulfat pentahydrat
F	Enzymatisk hydrolyse av rå fiskemuskel
FC	Folin Ciocalteus fenol reagens
FK	Inkubasjon av rå fiskemuskel uten tilsatt enzym (kontroll)
FKv	Inkubasjon av varmebehandlet fiskemuskel uten tilsatt enzym (kontroll)
Fv	Enzymatisk hydrolyse av varmebehandlet fiskemuskel
GI	Gastrointestinal
HCl	Saltsyre
K	Enzymatisk hydrolyse av rått kjøtt
kDa	Kilodalton
KK	Inkubasjon av rått kjøtt uten tilsatt enzym (kontroll)
KKv	Inkubasjon av varmebehandlet kjøtt uten tilsatt enzym (kontroll)
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$	Kaliumnatriumtartrat tetrahydrat
Kv	Enzymatisk hydrolyse av varmebehandlet kjøtt
M.A.C.R.	Modifisert alkalisk kopperreagens
MW	Molekylvekt
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Tri-Natriumcitrat dihydrat
Na_2CO_3	Natriumkarbonat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Natrium dihydrogenfosfat dihydrat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenfosfat dodekahydrat
N – leu	Norleucin
NaOH	Natriumhydroksid
P	Kontroll med kommersielt pancreatin (uten muskel)
RCF	Relativ sentrifugal kraft
rpm	Rotasjoner per minutt
TCA	Trikloreddiksyre
TE	Tyrosin ekvivalent

Innholdsfortegnelse	
Forord	2
Sammendrag	4
Summary	6
Краткое содержание	8
Forkortelser	10
1 Introduksjon	1
2 Generell bakgrunn	4
2.2 Muskelkjemi i fisk og dyrekjøtt	4
2.2.1 Struktur	4
2.2.2 Sammensetning	7
Strukturelle proteiner	7
Sarkoplasmatiske proteiner	8
Stromaproteiner og bindevev	8
2.3 Fordøyelsessystem	10
2.3.1 Munn	11
2.3.2 Magesekk	11
2.3.3 Tynntarm	12
2.3.4 Tykktarm	13
2.4 Proteinfoerdøyelse	13
3 Materialer og metoder	16
3.1 Materialer	16
3.2 Kjemikalier	16
3.3 Metoder	16
3.3.1 <i>In vitro</i> tarmfordøyelse	17
3.3.2 <i>In vitro</i> GI fordøyelse	18
3.4 Analyser	20
3.4.1 Konsentrasjon av løselig protein	20
3.4.2 TCA-løselig protein	21
3.5 Næringsinnhold i rå seimuskel og rått ytrefilet av storfe	22
3.5.1 Proteininnhold	22
3.5.2 Fettinnhold	23
3.5.3 Vann- og askeinnhold	24

3.6	Aminosyreanalyse	24
3.6.1	Totale aminosyrer i oppmalt muskel og supernatant.....	25
3.6.2	Frie aminosyrer i oppmalt muskel og supernatant	25
4	Resultater	26
4.1	Næringsinnhold	26
4.2	<i>In vitro</i> tarmfordøyelse av rå fisk og rått kjøtt.....	26
4.3	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt.....	28
4.4	Inaktivering av enzymer	30
4.5	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer	31
4.6	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede produkter.....	33
4.6.1	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede fiskemuskel og kjøtt	33
4.6.2	Sammenlignende <i>in vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede og rå fiskemuskel og kjøtt	35
4.7	Aminosyreanalyse av muskel	38
4.8	Aminosyreanalyse av supernatant	39
5	Diskusjon	43
6	Konklusjon.....	50
6.1	Videre studier	50
7	Referanseliste.....	51

1 Introduksjon

I dag er det velkjent at sunn og varierende hverdagskost er nødvendig for at kroppen skal fungere optimalt. ”*Det du spiser og drikker påvirker helsen din*” sies det av Helsedirektoratet i Norge (Nasjonal Råd for Ernæring, 2011). Sjømat er en viktig kostholdskomponent og man vet at det påvirker menneskenes helse positivt. Flere nasjonale og internasjonale organisasjoner har anbefalt et minimumsnivå av fiskekonsum for den generelle befolkningen. I følge Helsedirektoratet og Vitenskapskomiteen for mattrygghet i Norge bør man spise fisk, spesielt feit fisk, tilsvarende 2-3 middagsporsjoner i uken (Alexander *et al.*, 2006; Nasjonal Råd for Ernæring, 2011). Også internasjonalt anbefales det i mange land å spise fisk minst to ganger i uken (Kris-Etherton *et al.*, 2009). Det er generelt enighet om at fisk og fiskefett har en forebyggende effekt mot hjerte- og karsykdommer (Mozaffarian & Rimm, 2006; De Caterina, 2011; Landmark & Alm, 2012). I tillegg er det holdepunkter for at sjømat også kan forebygge noen kreftformer slik som tykktarmkreft (Norat *et al.*, 2005; Bourre, 2007) og prostatakreft (Terry *et al.*, 2001). I følge nyere artikler er det imidlertid usikkert om et høyt fiskekonsum kan redusere antall krefttilfeller og flere større studier anbefales (Sala-Vila & Calder, 2011; Torfadottir *et al.*, 2013). Det nevnes også andre positive effekter slik som forsinket demensutvikling (Morris *et al.*, 2005; Barberger-Gateau *et al.*, 2007) og optimal utvikling av hjerne og nervesystem hos nyfødte dersom mødrene har et høyt fiskeinntak (Hibbeln *et al.*, 2007; Oken *et al.*, 2008).

Oftest knyttes forklaringen på hvorfor det er så sunt å spise feit fisk til et høyt innhold av de langkjedete flerumettede omega-3 fettsyrene eicosapentaensyre, EPA, 20:5 n-3, og docosaheksaensyre, DHA, 22:6 n-3, (Dyerberg *et al.*, 1978; Harris *et al.*, 2008; Mozaffarian & Wu, 2011). Mager fisk som inneholder små mengder med langkjedete omega-3 fettsyrer, har også vist seg å ha positive helseeffekter (Kromhout, 2012) og flere har i de senere år stilt spørsmålet om det bare er omega-3 fettsyrene som gjør at sjømat er sunn (Schiepers *et al.*, 2010; Lund, 2013). Sjømat kan være en god kilde for noen av de fettløselige vitaminene A, D, E og flere vannløselige vitaminer som B₁₂ og B₆. I tillegg kommer andre mikronæringsstoffer som mineralene fosfor, selen, sink, kalium, jod og magnesium (Ruxton, 2011). Små pelagiske fisk, for eksempel ansjos og brisling, er en spesielt god kilde for kalsium og fosfor fordi man gjerne spiser fisken hel (Roos *et al.*, 2007). Selen i sjømat har høy biotilgjengelighet (Fox *et al.*, 2004) og det er blitt foreslått at noen av de helsefordelene man har tilskrevet omega-3 fettsyrer kanskje kan komme fra selen (Berr *et al.*, 2009). Sjømat inneholder også spesielt

mye av den frie aminosyren taurin som er blitt forbundet med positive helseeffekter (Elvevoll *et al.*, 2008).

Sjømat inneholder omtrent like mye protein som dyrekjøtt, cirka 20 % (Ruxton, 2011) og kvaliteten med hensyn på essensielle aminosyrer er også tilsvarende gode (Tabell 1).

Tabell 1. Innhold av essensielle aminosyrer (mg/g protein) i de ulike proteinkilder fra Damodaran (2008).

Aminosyre	Fisk	Oksekjøtt	Egg Melk	Ris	Erter
Lysin	91	89	70	34	71
Tryptofan	11	12	17	11	9
Histidin	35	34	22	21	26
Fenylalanin+Tyrosin	76	80	93	94	76
Leucin	77	81	86	77	70
Isoleucin	48	48	54	40	41
Threonin	46	46	47	34	36
Metionin+Cystein	40	40	57	49	24
Valin	61	50	66	54	41
Totale essensielle aminosyrer	485	480	512	414	394
Proteininnhold (%)	19	18	12	7,5	28

Proteiner fra dyr og fisk har generelt høyere kvalitet enn vegetabiliske proteiner. Proteiner fra korn og belgfrukter er ofte mangelfull på minst en essensiell aminosyre. For eksempel, kornslag som ris, hvete, bygg og mais inneholder lite lysin men har høyt innhold av metionin, mens for belgfrukter er det motsatt (Tabell 1).

Karbohydrater, fett og protein er makronæringsstoffer i et vanlig kosthold. Karbohydrater (stivelse) kommer fra planter mens fett kommer både fra planter, dyreprodukter og fisk. Hovedkilden til proteiner i et vanlig kosthold er kjøtt, egg, melk og fisk. Flere vitenskapelige studier har i de siste årene vist at et for høyt inntak av rødt kjøtt og bearbeidet kjøtt kan føre til økt sykdomsrisiko og dødelighet av visse krefttyper og hjertekarsykdommer (Sinha *et al.*, 2009; Bernstein *et al.*, 2012). Kostholdsanbefalinger er derfor at man begrenser inntaket av rødt kjøtt og bearbeidet kjøtt (Nasjonalt råd for ernæring, 2011). Årsakene til at et høyt inntak av slike produkter kan gi negative helsemessige effekter er ikke kjent, men man vet at de kan ha et relativt høyt innhold av mettede fettsyrer og at de har et høyt innhold av jernholdige proteiner som gir den røde fargen. Jern er en sterk prooksidant som kan gi opphav til potensielt skadelige reaktive oksygenprodukter. Nye studier tyder på at spising av mager fisk som torsk daglig bidrar til å hemme utviklingen av type 2 diabetes (Ouellet *et al.*, 2007; Rylander *et al.*, 2014). Noe overraskende er det også at

selv små mengder torskproteiner, 3 eller 6 gram/dag, er tilstrekkelig for å redusere LDL-kolesterol, forbedre glukosetoleransen, øke muskelmassen og redusere kroppsfett hos overvektige personer (Vikøren *et al.*, 2013).

Det er en viktig forskjell i proteintypene i fiskemuskel og kjøtt (Tabell 2). Kjøtt inneholder betydelig mer bindevev enn fisk. Årsaken ligger i både muskeoppbyggingen og at landdyr må holde seg oppreist og blir mer påvirket av tyngdekraft mens fisk lever i et ”vektløst” miljø.

Tabell 2. Fordeling (%) av ulike proteingrupper i muskel fra storfe og fisk fra Espe & Lie (2001).

Dyr	Myofibrillært protein	Sarkoplasmatisk protein	Bindevevsprotein
Storfe	39 – 68	16 – 28	16 – 28
Fisk	70 – 90	10 - 25	3 – 10

Ofte hevdes det at det er tyngre å fordøye kjøtt enn fisk og dette forklares gjerne utfra mengden bindevevsproteiner, dvs. i hovedsak kollagen. Så vidt vi er kjent med så er det ikke dokumentert at kjøtt fordøyes vanskeligere enn fiskekjøtt.

Hovedmålet med oppgaven var å sammenligne fordøyelsen av fiskemuskel og dyrekjøtt. I denne studien ble brukt filet fra sei (*Pollachius virens*) og ytrefilet fra storfe (*Bos Taurus*).

- Et *in vitro* fordøyelsessystem bestående av simulert magefase og tarmfase ble benyttet.
- Både rå og varmebehandlede prøver ble undersøkt.

2 Generell bakgrunn

2.2 Muskelkjemi i fisk og dyrekjøtt

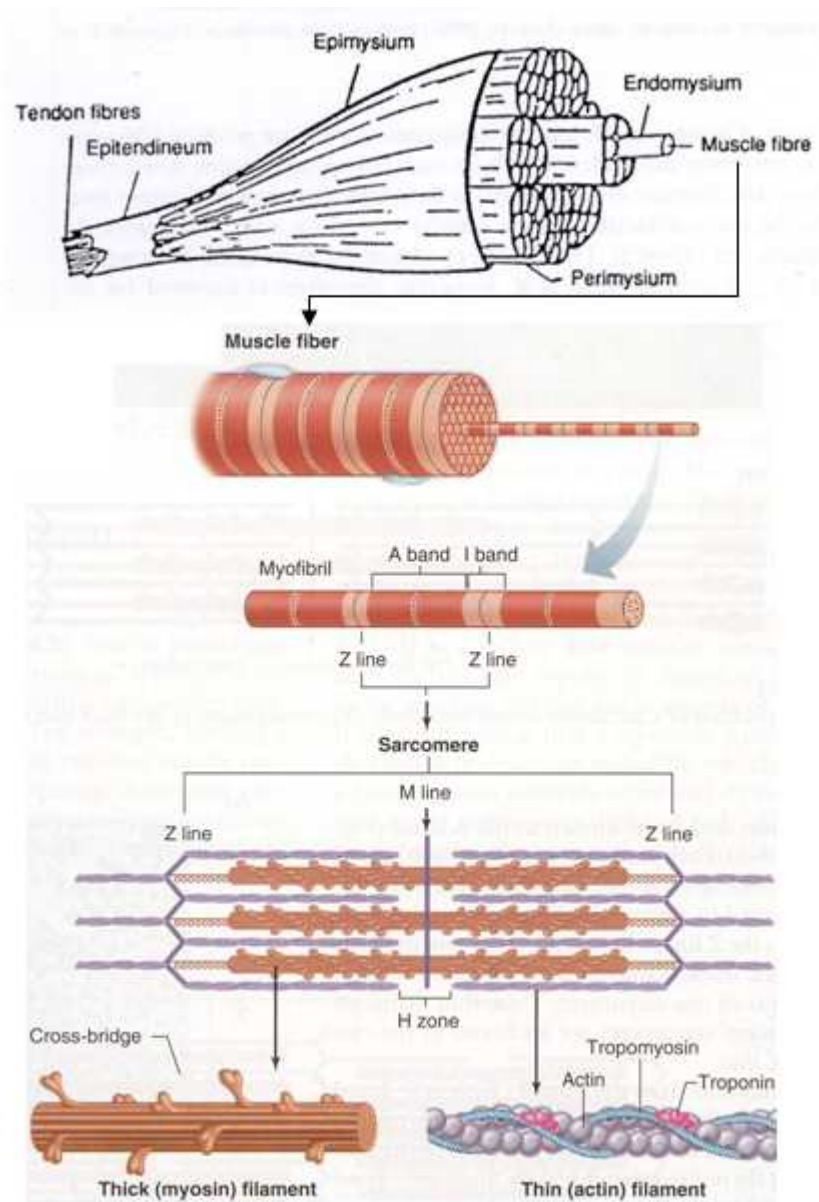
2.2.1 Struktur

Struktur og oppbygging av fiskemuskel og dyrekjøtt er ganske forskjellig. Ulike arrangementer av muskelceller og bindevev er avhengig av dyrets miljøomgivelser og måten det beveger seg på (Foegeding *et al.*, 1996). Hos pattedyr kan en dele inn skjelettmuskler i mange ulike typer; ytrefilet, indrefilet, rundbiff etc. Disse musklene er omgitt av bindevevshinner som går over i sener som i sin tur bindes til i knokler (Figur 1). Grunnenheten i en muskel er muskelfiberen, som er en lang, smal, flerkjernet celle omgitt av en cellemembran; sarkolemma. Sarkolemma har mange innbuktninger som danner transversell system kalt T-tubuli, og bidrar til at muskelen kan respondere som en enhet. Muskelfiberen består av grupper av proteintråder kalt myofibriller, som er 1-2 μm i diameter og er omgitt av cytoplasma kalt sarkoplasma i muskel, T-tubuli, sarkoplasmatiske retikulum (et membransystem inne i muskelcellen) og ulike organeller (lysosomer, mitokondrier).

Myofibrillene består av tykke og tynne proteinfilamenter, hovedsakelig myosin og aktin. Det er myofibrillene som gir muskelen den tverrstrippete design med mørke og lyse bånd, henholdsvis A- og I bånd. Både tykke og tynne filamenter er tilstedet i A-bånd mens I-bånd utgjøres kun av de tynne filamentene. I tillegg i midten av A-bånd finnes en lysere H-zone, område uten overlapping av de tynne og tykke proteinfilamentene i en avslappet muskel, som er igjen delt av en mørkere M-linje. M-linjen knytter sammen og bidrar til opprettholdelse av den riktige geometriske posisjonen til de tykke filamentene i en sarkomer. Sarkomeren er en kontraktile enhet i myofibrill og er det materialet som er lokalisert mellom to Z-linjer. Hver I-bånd deles av en mørkere Z-linje fra hvilken de tynne filamentene strekker seg utover i begge retninger.

En muskelfiber er i tillegg omgitt av en tynn bindevevshinne endomysium som blir forankret til sarkolemma via en basalmembran, et mellomlag imellom sarkolemma og endomysium. Muskelfiberen kan være fra få til flere centimeter i lengde og fra 10 til 100 μm i diameter. Muskelcellene i fisk er sjelden over 2 cm lang. I pattedyr kan muskelcellene være opptil 30 cm lange (Coultate, 2009). Grupper av muskelfibre danner en muskelbunt som er omgitt av en tykkere bindevevshinne, perimysium, og grupper av muskelbunter former muskel (Foegeding *et al.*, 1996). I fisk går muskelbuntene fra myosepta (myocommata) til myosepta (Figur 2). Hele dyremuskelen er omgitt av en tung bindevevshinne, epimysium.

Ved dyremuskelens ende slutter bindevevshinnene seg sammen i sener som fester muskelen til skjelett.



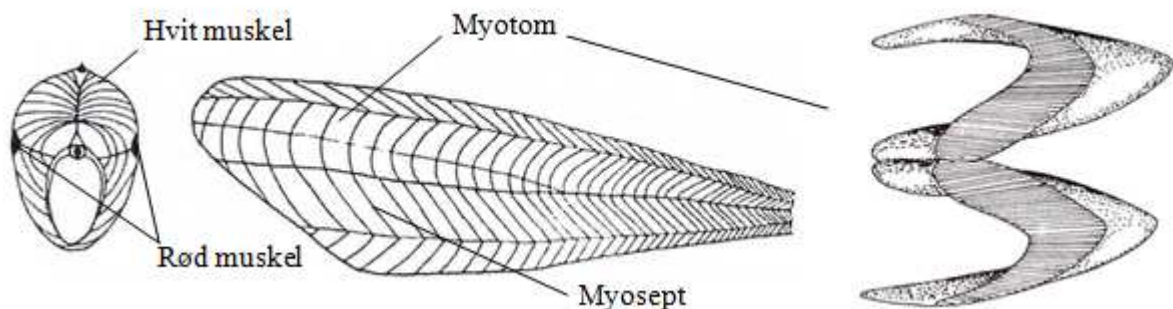
Figur 1. Skjematiske fremstilling av dyremuskel, samt oppbygging og struktur av en myofibrill modifisert etter Widmaier *et al.* (2006) og Eskin *et al.* (2013).

I motsetning til pattedyr mangler fisk senefester som kobler muskelen til skjelett. Den ulike muskelstrukturen i fisk er blant annet knyttet mot deres særegne bevegemåte. Fiskemuskel hos beinfisk danner fileten som er en stor lateral muskel på hver side av kroppen (Figur 2). Bunter av muskelfibre er ordnet i segmenter som er formet som en liggende W. Hvert segment, også kalt myotom, er omgitt av en tynn bindevevshinne, myocommata

(myosept). Det vil si at hos fisk er epimysium erstattet med myocommata. Myocommata er også festet til fiskens ryggvirvel og skinn.

Generelt har fisk to ulike typer muskelvev: den mørke (røde) og den lyse (hvite) muskeltypene. Hos de fleste fiskeslag består den største parten av fiskefileten av hvit muskel og det røde muskelvevet er lokalisert like under skinn langs sidelinje på hver side av kroppen. Den røde muskelen har aerob metabolisme med relativt rik blodtilførsel som gjør at muskelen får mørkere farge. Andel av den mørke muskelen varierer og avhengig av fiskens aktivitetsnivå. Hos pelagiske fisk, for eksempel, sild og makrell som svømmer relativt kontinuerlig, utgjør den aerobe mørke muskelen en betydelig andel av filetene. Hos bunnlevende fisk er andelen av den mørke muskelen vanligvis liten.

Den endelige muskel-pH hos pattedyr og fisk er avhengig av ernæringsstatus. Ubegrenset fødetilgang fører til økt glykogenmengde i muskel og deretter til en lav endelig pH i muskel. Den anaerobe degradering av glykogen til laktat vil foregå så lenge de glykolytiske enzymene ikke er inaktivert på grunn av den lave pH som oppstår (Lawrie & Ledward, 2006). Alternativt så vil glykolyten foregå til glykogenet er brukt opp. I følge Lynum (2005), generelt, inneholder fiskemuskel mindre glykogen (opptil 0,5 %) sammenlignet med pattedyr (cirka 1 %). Det er en medvirkende årsak til et mindre pH-fall post mortem hos fisk sammenlignet med landdyr. Et dyr med riktig tilgang på fôr får gjerne en endelig muskel-pH på cirka 5,5. Hos vill torsk blir pH gjerne cirka 6,8 mens oppdrettstorsk får pH rundt 6,2 (Kristoffersen *et al.*, 2006).



Figur 2. Skjematisk fremstilling av fiskemuskel modifisert etter Eskin *et al.* (2013) og Lynum (2005).

2.2.2 Sammensetning

Den kjemiske sammensetningen i fiskemuskel varierer avhengig av art, kjønn, alder, levested, årstid, ernæringsstatus og aktivitetsnivå.

Tabell 3. Kjemisk sammensetning av muskel i fisk og oksekjøtt etter Huss (1995).

Bestanddel	Fisk (filet)	Biff (muskel)
	Normal variasjon (%)	(%)
Vann	66 – 81	75
Protein	16 – 21	20
Lipid	0,2 – 25	3
Karbohydrat	< 0,5	1
Aske	1,2 – 1,5	1

Både fiskemuskel og dyrekjøtt består hovedsakelig av proteiner og vann (Tabell 3). Mestepart av vannet finnes inne eller mellom muskelceller, men noe vann er også bundet til proteiner. Lipidinnhold er den mest varierende komponenten og i muskel blir variasjonen reflektert med endringer i vanninnhold, men til sammen vil vann og fett utgjøre cirka 80 % av muskel (Huss, 1995; Strasburg *et al.*, 2008).

Proteininnhold i muskel varierer i mindre grad sammenlignet med fettinnhold. Imidlertid kan mengden protein variere sterkt i sultende fisk og fisk i forskjellige stadier av kjønnsmodning. Uten tilgang på føde i lengre tid kan fisken benytte sitt muskelvev, og det resulterende proteintappet erstattes med vann. Vanninnholdet i muskel kan stige opp til 95 % i levende, men alvorlig sultet torsk (Foegeding *et al.*, 1996).

Proteiner i muskel kan bli kategorisert etter sin løselighet eller biologisk funksjon (Strasburg *et al.*, 2008). Den sist nevnte klassifisering er knyttet mot proteinets rolle i muskelstruktur, kontraksjon, metabolisme etc. Basert på proteinets løselighet og cellulær plassering kan muskelproteiner deles inn i tre grupper: strukturelle (myofibrillære), sarkoplasmatiske og bindevevsproteiner (Huss, 1995; Strasburg *et al.*, 2008).

Strukturelle proteiner

Strukturelle (myofibrillære) proteiner, for eksempel aktin, myosin, tropomyosin, titin, nebulin, bygger opp det kontraktile systemet i skjelettmuskel som er ansvarlig for muskelbevegelser. Aktin og myosin er hovedkomponenter i henholdsvis tynne og tykke filamenter og til sammen utgjør cirka 40 % av totalt innhold av muskeprotein og 65 % av totalt innhold av myofibrillært protein (Strasburg *et al.*, 2008). Ved dødsstivhet låses aktin og myosin til et aktomyosinkompleks. Titin er den tredje mest forekommende myofibrillære protein.

Strukturelle proteiner er løselige i saltløsninger med ionestyrke $\geq 0,5$ M (Huss, 1995), noe som gjør at den lave fysiologiske saltkonsentrasjonen (0,15 M) i muskelvev forhindrer oppløsning av myofibrillære proteiner i sarkoplasma (Strasburg *et al.*, 2008). Det isoelektriske punktet til proteinene er rundt pH 4,5 – 5,5 (Huss, 1995). Ved denne surhetsgraden er de myofibrillære proteinene ladningsnøytrale og har den laveste løselighet og vannbindingsevne.

Sarkoplasmatiske proteiner

Sarkoplasmatiske proteiner er løselige i nøytrale saltløsninger med ionestyrke $< 0,15$ M. De fleste sarkoplasmatiske proteiner er enzymer som tar del i cellenes metabolisme (Strasburg *et al.*, 2008). Innholdet av noen sarkoplasmatiske proteiner kan variere avhengig av art, rase, muskelfibertype, alder til dyret og individuell genetikk. For eksempel, myoglobin finnes i mindre mengder hos en kalv noe som gjør at kjøttet har blekere fargen i forhold til en voksen okse. Den hvite muskeltypen i fisk inneholder lite myoglobin, mens hvalmuskelen kan inneholde opptil 70 % myoglobin av sarkoplasmatiske proteininnhold.

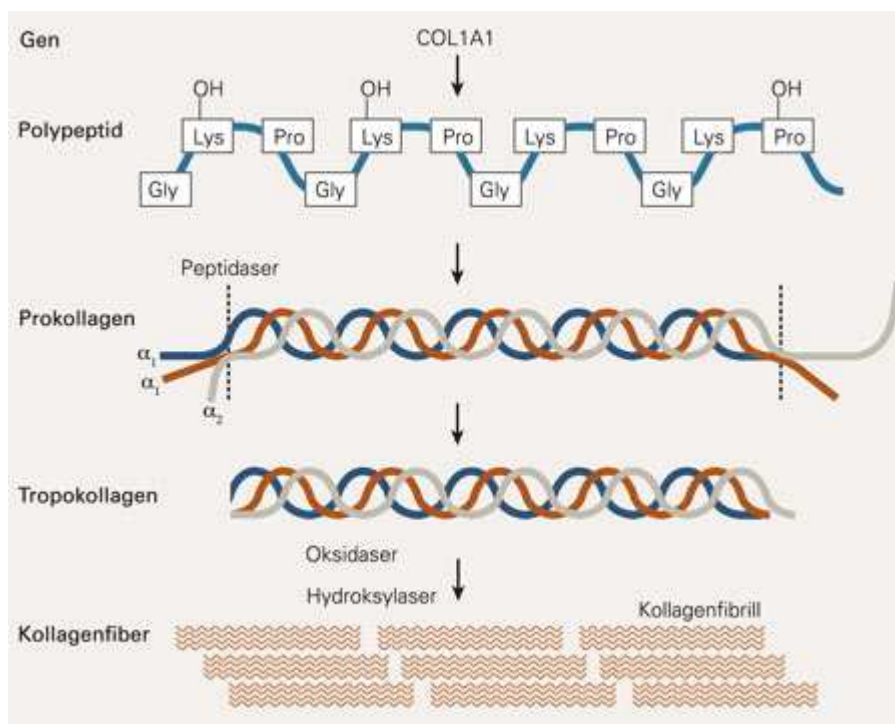
Stromaproteiner og bindevev

Bindevevsproteiner også kalt stromaproteiner (kollagen, retikulin og elastin) er uløselige under de vanlige betingelser for ekstraksjon slik som nøytral pH, lavt eller høyt saltkonsentrasjon og lav temperatur (Strasburg *et al.*, 2008). Stromaproteinene danner bindevevslag og innhold av bindevevsproteinene varierer med arten, alder og muskel.

Bindevev er et dynamisk rammeverk som binder sammen muskelcellene, gir mekanisk styrke og støtte til muskelen samt opprettholder elastisitet. Bindevev i muskel oppstår som intramuskulær bindevev (intramuscular connective tissue, IMCT), som i sin tur består av ekstracellulær matriks (ekstracellular matrix, ECM) og celler slik som fibroblaster (produserer kollagen, retikulære og elastiske fibre, proteoglykaner), adipocytter (fettceller) og makrofager (forsvarsceller). ECM i muskel inkluderer kollagen, elastin, proteoglykaner og glykoproteiner. Den bidrar både til muskelstøtte og til kontroll av ulike biologiske prosesser som vekst, reparasjon av vev, differensiering, adhesjon og migrering av celler (Strasburg *et al.*, 2008).

Bindevevens hovedkomponent er glykoproteinet kollagen. Den spiller en viktig rolle knyttet mot seighet av kjøtt. Hos landlevende pattedyr finnes mye kollagen i sener, skinn, bein, vaskulær system og i muskelens bindevevshinner (Foegeding *et al.*, 1996). Kollagenandel i pattedyr tilsvarer cirka en tredjedel eller mer av totalt proteininnhold og cirka 10 % av muskelprotein. Fisk har et lavere innhold av kollagen sammenlignet med landlevende pattedyr, omtrent en tiendedel av kollagen i rødt kjøtt (Eskin *et al.*, 2013). I fiskemuskel er mye av kollagen lokalisert i myocommata (Dunajski, 1980).

Oppbyggingen av kollagen er vist i Figur 3. Aminosyresekvensen i polypeptidkjeder som danner prokollagen er sammensatt av gjentakende tripeptid med hovedsekvens (Gly-X-Y)_n, hvor X oftest er prolin og Y ofte er enten hydroksyprolin eller hydroksylisin (Strasburg *et al.*, 2008). Denne repeterende sekvensen, hvor hver tredje aminosyre er glysin, danner en lang α - polypeptidkjede som former en venstrehendt heliks. Tropokollagen, en høyrehendt trippelheliks, dannes ved at peptider ved prokollagenets N- og C- terminale ender fjernes av henholdsvis N- og C- terminale peptidaser. Flere tropokollagenmolekyler, arrangert i parallelle rader, danner en kollagenfibrill. Grupper av kollagenfibriller danner en kollagenfiber (Hendriksen *et al.*, 2006).



Figur 3. Oppbyggingen av kollagen fra Hendriksen *et al.* (2006).

Den mekaniske styrken til bindevevet bestemmes av kryssbindinger mellom tropokollagentrådene. Det er to typer av kovalente bindinger: divalente og trivalente. I utgangspunkt er de divalente kryssbindingene reduserbare og varmelabile, men med økende alder til pattedyr omdannes de til mer varmestabile, ikke reduserbare trivalente kryssbindinger (Strasburg *et al.*, 2008). I tillegg så øker antallet av kovalente intermolekulære kryssbindinger med alderen i dyrekjøtt, noe som bidrar til økt kjøttseighet hos eldre dyr (Strasburg *et al.*, 2008; Coultate, 2009) Hos fisk skjer det motsatte. Stor fisk har svakere kollagen i myocommata og færre kryssbindinger enn i kollagen hos liten fisk (Strasburg *et al.*, 2008). På

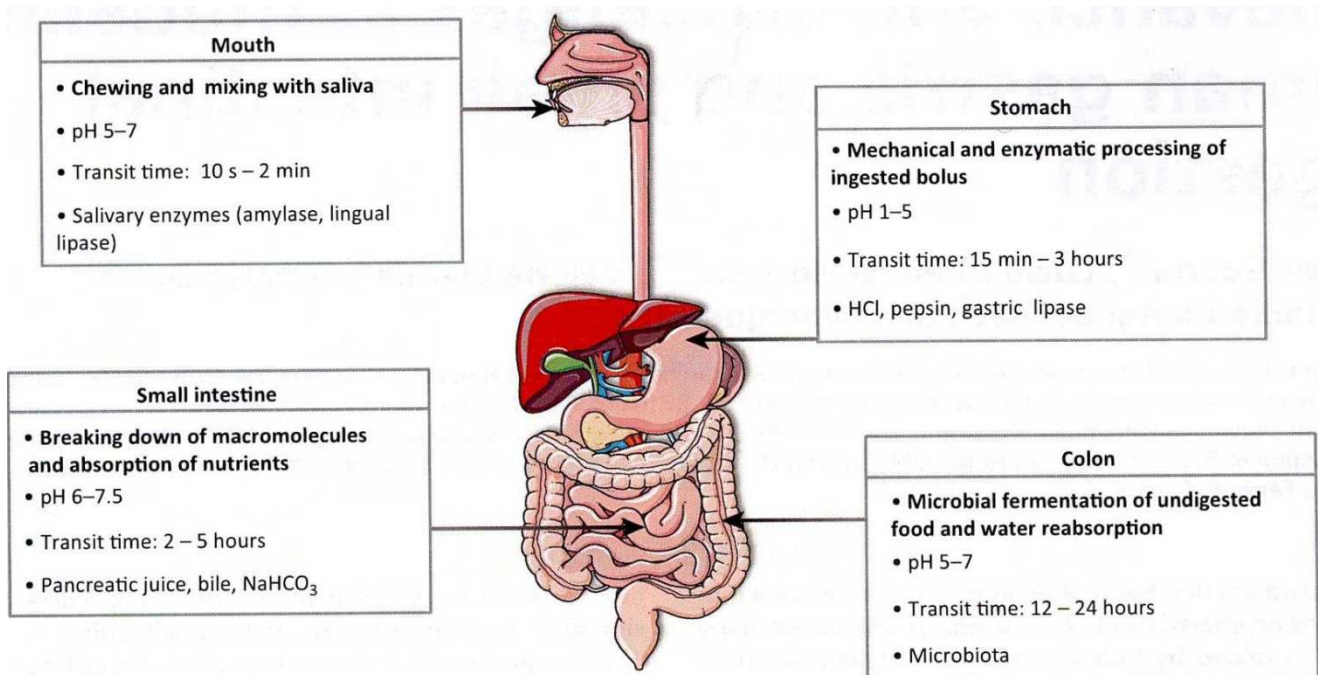
den andre siden inneholder eldre fisk mer kollagen i muskelen, en tykkere myocommata, enn yngre fisk.

Fisk er tilpasset omgivelser med lavere temperatur, noe som bidrar til at fiskekollagen er mindre varmestabilt og mer løselig enn kollagen fra kjøtt.

Kollagen er en av de få proteiner som inneholder store mengder av hydrokxyprolin og det er mer prolin og hydroxyprolin i pattedyrets kollagen enn i fiskekollagen (Foegeding *et al.*, 1996). Kollagen er også nesten fri for tryptophan (Strasburg *et al.*, 2008). Høyt innhold av slike aminosyrer som glycin, prolin, alanin, hydroxyprolin og fravær av flere essensielle aminosyrer gjør kollagen til en dårlig proteinkilde for mennesker.

2.3 Fordøyelsessystem

Menneskets fordøyelsessystem består av magetarm kanalen (munn, svelg, spiserør, magesekk, tynn- og tykktarmen) og tilliggende organer (spyttkjertel, lever, galleblære, bukspyttkjertel) som skiller ut stoffer i magetarmkanalen (Widmaier *et al.*, 2006). Før kroppen kan absorbere maten må den brytes ned både mekanisk og kjemisk. Denne oppløsnings- og nedbrytningsprosess - fordøyelsen - oppnås ved innvirkning av saltsyre i magesekken, gallen fra leveren, og flere enzymer som blir utskilt av det eksokrine systemet. I tillegg vil muskelsammentrekninger i magetarmkanalen føre maten gjennom fordøyelsessystem og blande den med ulike sekreter. Skjematisk oversikt av human fordøyelse er vist i Figur 4.



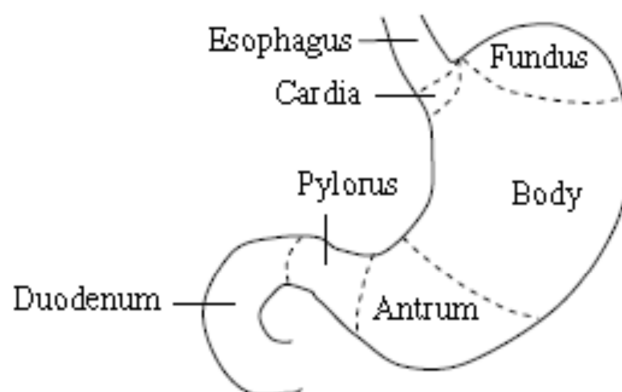
Figur 4. Generell oversikt over fordøyelsessystem hos mennesker fra Guerra *et al.* (2012).

2.3.1 Munn

Fordøyelsen starter i munnen hvor maten blir tygd ned til mindre biter og fuktet av spyttet som blir produsert av spyttkjertler. Spyttet inneholder cirka 99 % vann, under 1 % mineraler og omtrent 0,1 – 0,2 % proteiner (McClements & Li, 2010). Proteinfraksjon i spyttet består av flere ulike enzymer (amylase, lingual lipase), antibakterielle proteiner, immunoglobuliner og muciner. Mastikasjon (tygging) av mat er et kortvarig (10 sek – 2 min), men viktig trinn for fordøyelsen (Guerra *et al.*, 2012). Vannet i spyttet fukter matpartikler hvor muciner binder tygd mat til en sammenhengende og glatt bolus. Dette gjør det lettere å svelge maten og ved hjelp av peristaltiske muskelsammentrekkninger transporteres bolusen gjennom spiserøret til magesekken (McClements & Decker, 2009; Guerra *et al.*, 2012).

2.3.2 Magesekk

Magesekk er et sekkklignende, J-formet organ lokalisert mellom spiserør og tynntarmen (Figur 5). Den deles inn i fire soner: fundus, body, antrum og pylorus (Kong & Singh, 2008). I magesekken blir maten lagret, oppløst og delvis fordøyd til mindre partikler før den porsjonsvis blir videreført til tynntarmen (Widmaier *et al.*, 2006). Den maksimale størrelsen på partiklene som kan passere via pylorys til tynntarmen er omtrent 1 – 2 mm og partiklene av større dimensjoner forblir i magen til videre nedbrytning (Kong & Sign, 2008). Nedbrytningen av mat og blanding av bolus med magesaft muliggjøres ved hjelp av muskelkontraksjon som blir generert av den distale magesekkdelen. Inntatt mat kan forbli i magen fra 15 min til 3 timer, avhengig av dens mengde, sammensetning, struktur og andre biologiske faktorer (Guerra *et al.*, 2012).

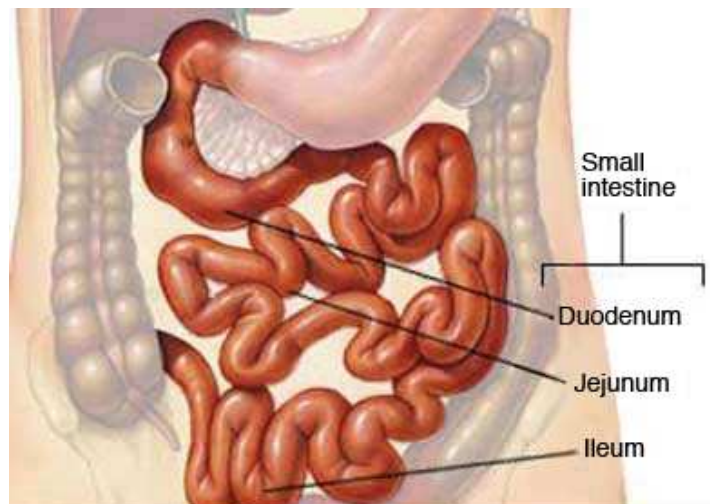


Figur 4. Magesekk inndelt i ulike soner fra Kong og Singh (2008).

Magesaften består av magesyre, slim, mineraler og fordøyelsesenzymer (pepsin, gastrisk lipase). Det utskilles cirka 2 liter saltsyre (0,1 M) hver dag. Surhetsgrad i magesekken ligger ved pH 1 – 3 under faste, men etter fødeinntak kan øke til 4,5 - 5,8, og deretter innen en time blir redusert igjen til mindre enn 3,1 (Dressman, 1986). Den tiden som kreves for å gjenopprette surhetsgradsnivå som var under faste avhenger primært av sammensetning og inntatt mengde av mat, mens inntatt føde-pH er av mindre betydning (Kalantzi *et al.*, 2006). Den lave pH verdien i magesekken har en rekke viktige fysiologiske roller, for eksempel å aktivere pepsinogen til pepsin, denaturere proteiner og drepe mikroorganismer. Pepsinkonsentrasjon i magesaften ligger ved cirka 0,8 og 1 mg/ml (Kong & Singh, 2008). Pepsin bidrar til nedbrytning av proteiner (cirka 20 % av total proteininnhold) til kortere polypeptidkjeder og er også viktig ved fordøyelse av kollageninnholdende kjøtt (Widmaier *et al.*, 2006).

2.3.3 Tynntarm

Tynntarmen er et rør lignende fordøyelsesorgan lokalisert mellom magesekken og tykktarmen, og kan være fra 2,7 til 4,5 m lang *in vivo* og har diameter på 2,5 cm (Saladin, 2010). Tynntarmen består av tre segment: duodenum (tolvfangertarmen, de første 25 cm etter magesekken), den midterste delen av tynntarmen, jejunum, og det nederste og lengste tarmsegmentet, ileum (Figur 6).



Figur 5. Skjematisk fremstilling av tynntarmen (<http://histologyolm.stevegallik.org>, hentet 04.04.2014).

I tolvfangertarmen blandes kymus ("magefelling") med fordøyelsesvæsker fra bukspyttkjertel, galleblæren og tynntarmens kjertler. Bukspyttkjertel er en avlang kjertel som finnes bak magesekken og har både endokrin (indresekretorisk) og eksokrin (ytresekretorisk) funksjon.

Hver dag sekreteres mellom 1200 og 1500 ml bukspytt som er en alkalisk blanding av vann, enzymer, natriumbikarbonat og andre biologiske stoffer (Saladin, 2010). Natriumbikarbonat nøytraliserer pH i den sure kymus fra magesekken slik at pH øker fra 1 – 3 til rund 5,8 – 6,5 i duodenum (McClements & Li, 2010). Tynntarmsceller skiller ut cirka 1 – 2 liter tarmsaft, spesielt i respons til høy surhetsgrad og mengder innkommende kymus. Tarmsaften består av vann, mukus og i mindre mengder enzymer. Den har pH 7,4 – 7,8 og er også med på å nøytralisere pH i tarminnholdet (Saladin, 2010). Leveren er den største kjertelen (cirka 1,4 kg) i kroppen som er lokalisert i den øverste delen av abdomen og bidrar i fordøyelsesprosessen med å sekretere galle som blir lagret i galleblære i mellommåltid.

2.3.4 Tykktarm

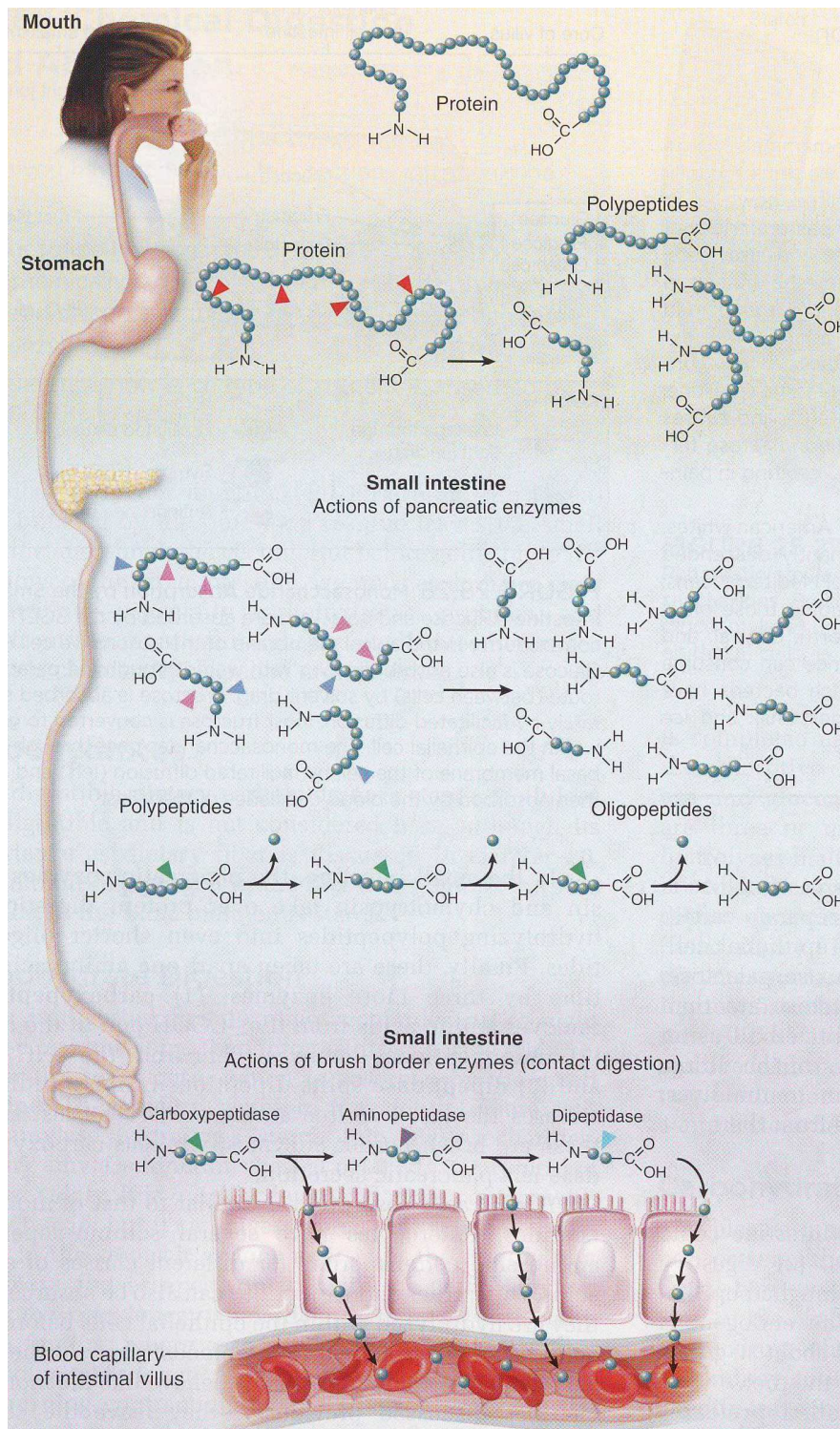
Tykktarmen består av tre hoveddeler: blindtarmen, den egentlige tykktarmen og endetarmen. Tykktarmen ligger som en ramme rundt tynntarmen og er omtrent 1,5 m lang (Saladin, 2010). Tykktarmens funksjon er å ta opp vann fra tarminnholdet, og delvis også lagre feces (avføring) frem til defekasjon (uttømming av endetarmen). Mestepart av vannet i tarminnhold blir absorbert, og kun 50 – 200 ml tapes med feces (Pedersen *et al.*, 2012). Det er så mye som 1 kg med bakterieflora i tarmkanalen og det meste av disse bakteriene (omtrent 800 arter) finnes i tykktarmen (Saladin, 2010; Pedersen *et al.*, 2012). Bakteriene fordøyer flere polysakkarider, for hvilke vi mangler fordøyelsesenzymer, og vi absorberer de resulterende sukkere. Noen bakterier syntetiserer også B-vitaminer og vitamin K som blir absorbert i tykktarmen. Transisjonstid for tarminnholdet gjennom tykktarmen kan være fra 12 til 24 timer og surhetsgrad ligger fra pH 5 til 7 (Guerra *et al.*, 2012).

2.4 Proteinfordøyelse

Under fordøyelsen blir proteinene spaltet til frie aminosyrer, dipeptider og tripeptider før de blir transportert gjennom tarmslimhinnen. Di- og tripeptider blir deretter hydrolysert intracellulært (i tarmcellene) til frie aminosyrer før de blir sendt videre i blod. En voksen person må innta 40 – 50 g protein av god kvalitet per dag for å sikre tilførsel av de essensielle aminosyrene (Wildmaier, 2006). Pepsin i magesekken begynner å bryte ned proteiner i maten. Saltsyren denaturerer matprotein og denne strukturendringen gjør peptidbindinger i proteinene mer lett tilgjengelig for fordøyelsesenzymer.

Pepsin hydrolyserer peptidbindinger mellom tyrosin og fenylylalanin, og 10-20 % av inntatt protein blir bearbeidet til kortere polypeptider og et mindre antall av frie aminosyrer (Saladin, 2010). Den optimale pH for pepsinaktivitet er rundt 1,5 - 3,5, noe som gjør at dette

enzymet blir inaktivert i tolvfingertarmen når det kommer i kontakt med det basiske bukspyttet. Proteinfordøyelse (generelt oversikt) er fremstilt i Figur 7.



Ingen kjemisk fordøyelse av protein

Pepsin hydrolyserer protein til mindre polypeptider

Trypsin og chymotrypsin bryter ned polypeptider til mindre oligopeptider

Karboksyptidase fjerner en aminosyre fra karboksylenden av oligopeptid

Karboksyptidase i børstesømmen fortsetter å spalte av aminosyrer fra karboksylenden.

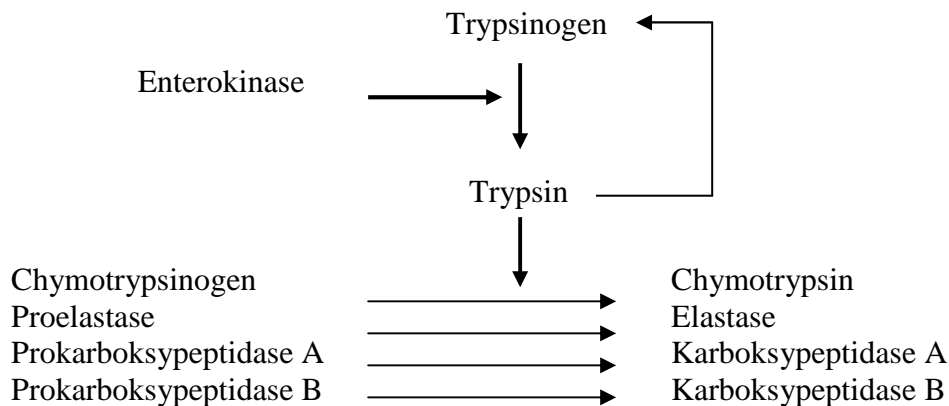
Aminopeptidase ved børstesømmen spalter av aminosyrer fra aminoenden.

Dipeptidase spalter dipeptider til to separate aminosyrer

Figur 6. Proteinfordøyelse – generelt oversikt fra Saladin (2010). Aminosyrer blir absorbert av tarmepitelcellene (enterocytene). Også små peptider blir absorbert av tarmepitel. Disse blir så hydrolysert intracellulært til aminosyrer.

Pankressekretet inneholder den inaktive formen av trypsin, chymotrypsin, elastase og karboksylpeptidase. Trypsin blir dannet fra trypsinogen som følge av aktivitet til enzymet enterokinase fra tarmveggen. Deretter virker trypsinet autokatalytisk, altså fremskynder sin egen omdannelse fra trypsinogen, samtidig som det aktiverer de andre enzymene (Figur 8).

De pankreatiske enzymene i tynntarmen vil fortsette proteinfordøyelsen ved å hydrolysere polypeptider til enda kortere oligopeptider. Trypsin, chymotrypsin og elastase spalter peptidbindinger inne i peptidkjeden. Trypsin splitter peptidbinger med lysin eller arginin, mens chymotrypsin spalter bindinger med karboksylgruppen fra tyrosin, fenylalanin og tryptofan. I motsetning til de tre sistnevnte enzymene som er endopeptidaser, er karboksypeptidase en eksopeptidase, og bidrar til nedbrytning av oligopeptider til frie aminosyrer ved å fjerne den ytterste aminosyren med en karboksylgruppe. I tillegg blir de peptidblandingene, som er nedbrytningsprodukter etter aktivitet til de pankreatiske enzymene, hydrolysert til frie aminosyrer av enzymer på tynntarmoverflate før absorpsjon. Det finnes minst 20 ulike slike enzymer som kløyver peptidbindinger på ulike steder. Aminopeptidaser og dipeptidaser er blant dem. Aminopeptidasene spalter av en aminosyre fra peptidkjedens aminoenden, mens dipeptidasene splitter dipeptider i to separerte frie aminosyrer.



Figur 7. Aktivering av inaktive proteaser (proenzymer) fra pankreas modifisert etter Krogdahl (2001).

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Ferske fileter (à cirka 0,5 kg) av sei (*Pollachius virens*) ble kjøpt hos Dragøy AS, Tromsø i september 2013 og transportert på is til Norges fiskerihøgskole. Ytrefilet (0,78 kg, X-tra, Norge, vakuumpakket 26.08.2013) av storfe (*Bos Taurus*) ble kjøpt samtidig hos Jekta Coop Obs, Tromsø. Både fiskefileter og storfekjøtt ble grovhakket ved bruk av stavmikser og fryst ned (- 55°C) i små porsjoner (25 gram) i plastposer («zip lock») inntil videre analyse. Før hydrolyseforsøkene ble en porsjon tint over natt i kjøleskap (+7°C) og homogenisert manuelt før forsøk.

3.2 Kjemikalier

Pepsin fra gris (P7125), Pancreatin fra gris (P1750), Bovine serum albumin (A 7906), Folin Ciocalteus fenol reagens (F9252), Natriumkarbonat (S7795), Triklorediksyre (33731), L-tyrosin (T3754), Dinatriumhydrogenfosfat dodekahydrat (30414), Natrium dihydrogenfosfat dihydrat (71500), DL-Norleucin (N1398) var fra Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

Borsyre (1.00165), Bromkresolgrønn (1.08121), Kopper(II)sulfat pentahydrat (1.02790), Natriumhydroksid (1.06498), Natriumhydroksid 32 % (1.05590), Natriumsulfat (1.06649), tri-Natriumcitrat dihydrat (1.06448), Kaliumnatriumtartrat tetrahydrat (1.08087), Metylrødt (1.06076), saltsyre (20252), svovelsyre (1.00731), petroleumbensin (1.00909) var fra Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland).

Lithium Citrate Loading Loading buffer (pH 2,2) var fra Biochrom Ltd (Camridge, England). Kjeltabs (15270018) var fra Foss Analytical AB (Höganäs, Sverige).

3.3 Metoder

Fordøyelsesforsøkene ble gjennomført i to hovedtrinn; først et trinn som simulerer fordøyelsen i magesekken og deretter fordøyelsen i tynntarmen, dvs. såkalt gastrointestinal fordøyelse (GI fordøyelse), modifisert etter Jensen *et al.* (2009).

Forsøksoversikt samt konsentrasjon av fordøyelsesenzymmer benyttet under hydrolyseforsøkene er gitt i Tabell 4.

Tabell 4. Hydrolyseforsøkene. Startkonsentrasjon = enzymkonsentrasjon i løsning tilsatt til muskel (mg pepsin/ml 0,01M HCl; mg pancreatin/ml 0,2 M Natriumfosfat buffer). Sluttkonsentrasjon = enzymkonsentrasjon i løsning med muskel (mg/ml inkubasjonsløsning).

Forsøks nummer	Forsøks navn	Avsnitt i resultat delen	Konsentrasjon av tilsatt enzymer (mg/ml)			
			startkonsentrasjon		sluttkonsentrasjon	
			pepsin	pancreatin	pepsin	pancreatin
1	<i>In vitro</i> tarmfordøyelse av rå fisk og rått kjøtt	4.2		4		0,8
2	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt	4.3	3	4	3	1,05
3	Inaktivering av enzymer	4.4	0,3	0,4	0,3	0,07
4	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer	4.5	0,3	0,4	0,3	0,1
5	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede produkter	4.6	0,3	0,4	0,3	0,1
5.1	<i>In vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede fiskemuskel og kjøtt	4.6.1	0,3	0,4	0,3	0,1
5.2	Sammenlignende <i>in vitro</i> GI fordøyelse av varmebehandlede og rå fiskemuskel og kjøtt	4.6.2	0,3	0,4	0,3	0,1

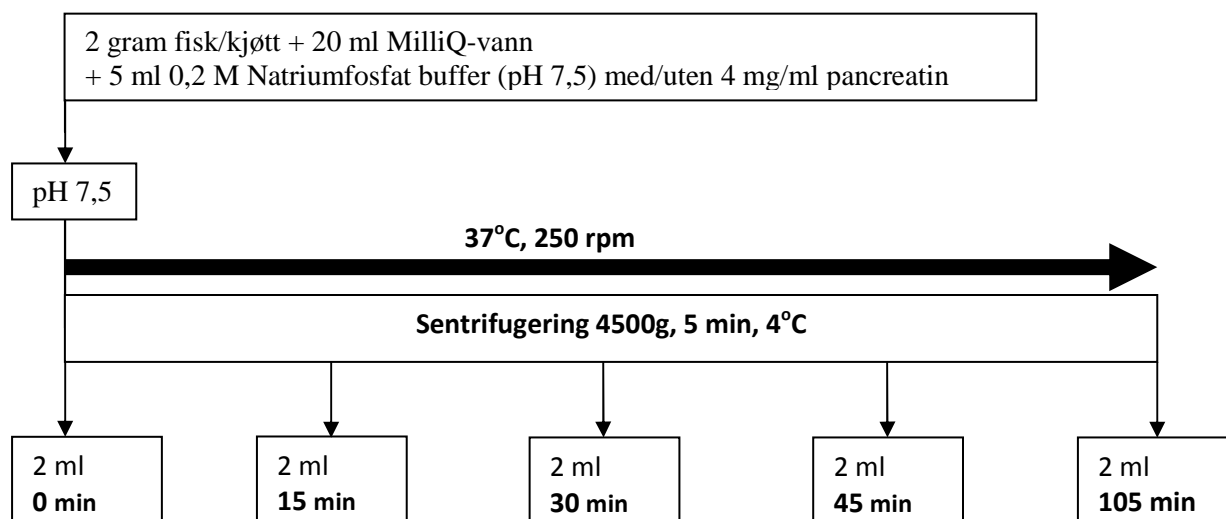
3.3.1 *In vitro* tarmfordøyelse

I et innledende forsøk (Forsøk 1) ble fordøyelsen av kjøtt og fiskemuskel i en *in vitro* tarmfase undersøkt.

Beskrivelse av Forsøk 1 skissert i Figur 9

1. Oppmalt muskelprøve (2 gram) i 50 ml sentrifugerør (Falcom Blue MaxTM Polypropylene Conical Tube, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) ble tilsatt 20 ml MilliQ-vann og 5 ml 0,2 M Natriumfosfat buffer (pH 7,5) med 4 mg/ml pancreatin. Som kontroll ble det benyttet 5 ml buffer uten pancreatin. Et ekstra kontrollforsøk uten tilsatt muskelprøve, men med enzym ble også gjennomført. Surhetsgraden til inkubasjonsløsningen ble 7,3 – 7,4 og ble derfor justert med 1M NaOH til pH 7,5.

- Inkubasjonen ble gjennomført i et varmeskap (Inkubator type 8133, Termaks AS, Bergen, Norge) ved 37°C og konstant røring (Rotamax 120, Heidolph instruments, Schwabach, Germany) ved 250 rpm.
- På hvert uttakstidspunkt (0, 15, 30, 45 og 105 min) ble blandingen sentrifugert (Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Electron corporation, Osterode, Tyskland) ved 4500 g i 5 min (4°C) før 2 ml av supernatant ble overført til 2 ml eppendorfrør (Brand mikrosentrifugerør 780550, BrandTech scientific inc., Essex, USA) og umiddelbart varmet opp i en varmeblokk (Accu Block™ Digital Dry Bath, modell 1100, Labnet International inc., Edison, NJ, USA) ved 95°C i 5 min.
- Supernatantene ble avkjølt på is før sentrifugering (Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) ved 4°C, 20000 RCF i 10 min. De nye supernatantene ble deretter fryst ned (-55°C) før analyse av løselig protein og TCA-løselig protein.

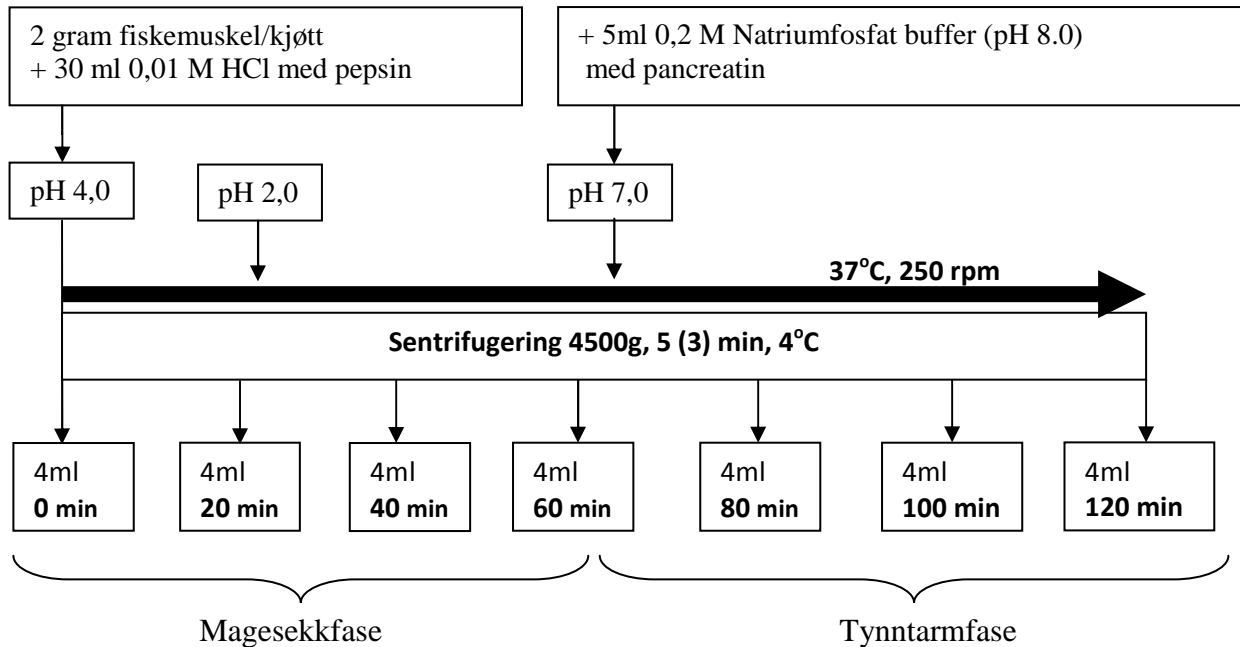


Figur 8. Innledende forsøk med *in vitro* tarmfordøyelse av rå fiskemuskel og kjøtt. Kontrollforsøk ble gjennomført uten tilsats av pancreatin. Et ekstra kontrollforsøk ble gjennomført uten muskelprøve, men med enzym tilsatt.

3.3.2 *In vitro* GI fordøyelse

Flere forsøk ble gjennomført etter oppsettet skissert i Figur 10 med noen modifikasjoner. I Forsøk 2 og 4 ble fordøyelse av rå fiskemuskel og rått kjøtt sammenlignet mens i de andre forsøkene var fokus på å studere effekt av å bruke varmebehandlet råstoff. Varmebehandling ble gjennomført i en veieskål av aluminium i et varmeskap (Inkubator type TS4115, Termaks AS, Bergen, Norge) ved å varme 10 gram muskel fra sei og storfe ved 150°C i henholdsvis 10 og 13 min. Veieskålen ble dekket med en lokk laget av aluminiumsfolie med kanylehuller. I et separat hydrolyseforsøk (Forsøk 3) ble inaktivering av eksogene fordøyelsesenzymet studert

ved å sammenligne mengden av løselig protein (mg/ml) i prøver fra rå fiskemuskel (0, 60, 80 og 100 min) hvor enzymene ble inaktivert ved hjelp av oppvarming til 90 - 95°C og i de prøvene hvor enzyminaktivering ble gjennomført ved å avkjøle prøvene på is.



Figur 9. *In vitro* GI fordøyelse. Som kontroll ble det kun brukt 2 gram muskel, 30 ml 0,01 M HCl og 5 ml 0,2 M Natriumfosfat buffer (pH 8,0).

I Forsøk 2 ble 30 ml 0,01 M HCl med 3 mg/ml pepsin og 5 ml 0,2 M Natriumfosfat buffer (pH 8,0) med 4 mg/ml pancreatin brukt for å imitere henholdsvis magesekke- og tynntarmfase. I de neste forsøkene ble enzymkonsentrasjonen redusert til 0,3 mg/ml pepsin og 0,4 mg/ml pancreatin, samt sentrifugeringstid av inkubasjonsblandingen ble endret fra 5 til 3 min (Figur 10).

Beskrivelse av simulert gastrointestinal fordøyelse skissert i Figur 10

1. Oppmalt muskel (2 gram) i 50 ml sentrifugerør ble tilsatt 30 ml 0,01 M HCl med pepsin. Reaksjonsblandingen med fiskemuskel fikk en pH på cirka 4,0. Kjøttblandingen fikk en pH på cirka 3,6 og ble justert til pH 4,0 med 1 M NaOH. Simulert fordøyelse ble gjennomført i et varmeskap med konstant røring (Rotamax 120) ved 250 rpm. Prøveuttak ble gjort ved 0 og 20 min fordøyelse.
2. Etter 20 min fordøyelse ble pH i inkubasjonsløsning nedjustert til 2,0 med 1 M HCl før nye 4 ml supernatant (40 min) ble tatt ut.

3. Etter totalt 60 min inkubasjon ble det tatt ut en ny prøve før reaksjonsblandingen ble tilsatt 5 ml 0,2 M Natriumfosfat buffer (pH 8,0) med pancreatin. Den endelige pH ble 6,2 – 6,7 avhengig av muskeltype og ble derfor justert til pH 7,0 med 1 M NaOH. Det ble deretter tatt ut prøve etter totalt 80, 100 og 120 min inkubasjon.
4. Kontrollforsøk ble gjennomført uten tilsats av enzymer.
5. Ved hvert prøveuttak (0, 20, 40, 60, 80, 100 og 120 min) ble hele inkubasjonsløsningen sentrifugert (Heraeus Multifuge 1S-R) ved 4°C, 4500 g i 5(3) min. Supernatant (4 ml) ble overført til 2 ml eppendorfrør og deretter ble enzymene inaktivert ved å inkubere i en varmeblokk (Accu Block™ Digital Dry Bath, modell 1100) i 5 min med slutt-temperatur i blandingen cirka 90°C. For å hindre overkoking var det stukket hull i lokkene på eppendorfrørene. Deretter ble supernatantene holdt nedkjølt på is frem til den endelige sentrifugeringen (Centrifuge 5417 R) ved 4°C, 20000 RCF i 10 min.
6. Supernatantene ble fryst ned (-55°) inntil videre analyse.

3.4 Analyser

3.4.1 Konsentrasjon av løselig protein

Proteinkonsentrasjon i supernatantene ble bestemt modifisert etter Lowry *et al.* (1951). I det første trinnet (Biuret) vil kopper danne et purpurfarget kompleks med to eller flere peptidbindinger i nabostillinger. I det andre trinnet vil fargen kraftig forsterkes ved at Folin Ciocalteus fenol reagens reduseres mens aromatiske aminosyrer, hovedsakelig tyrosin og tryptofan, oksideres. Fargeintensiteten vil være avhengig av antallet peptidbindinger og mengden av de nevnte aminosyrene. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å bruke BSA (0,2 mg/ml) som standardprotein.

Følgende løsninger brukes:

Løsning A: 10 g Na₂CO₃, 0,25 g KNaC₄H₄O₆ x 4H₂O og 2 g NaOH løses i MilliQ-vann til 500 ml.

Løsning B: 0,2 g CuSO₄ x 5H₂O løses i MilliQ-vann til 200 ml.

Løsning C ble laget ny hver dag: 5 ml løsning B blandes med 45 ml løsning A.

Prosedyre:

- Fortynnet supernatant (0,2 ml) ble tilsatt 1,0 ml løsning C og blandet med en reagensrørmikser.
- Etter henstand i 10 min ved romtemperatur ble reaksjonsløsning tilsatt 0,1 ml 1N Folin Ciocalteus fenol reagens og blandet med reagensrørmikser.
- Resultatene ble avlest i spektrofotometer (Spekol 2000, Analytic Jena AG, Jena, Tyskland) ved OD 750 etter henstand i 30 min ved romtemperatur. Etter noen proteinanalyser ble bare en konsentrasjon av BSA, 0,2 mg/ml, brukt som standard.

3.4.2 TCA-løselig protein

For å måle mengden TCA-løselig nedbrutt protein ble en modifisert variant av Lowrys metode benyttet.

Følgende løsninger brukes:

Løsning A: 1 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ og 0,5 g $CuSO_4 \times 5H_2O$ ble løst i MilliQ-vann til 100 ml.

Løsning B: 16 g NaOH og 50 g Na_2CO_3 ble løst i MilliQ-vann til 500 ml.

M.A.C.R. (nylaget hver dag): 79 ml MilliQ-vann ble tilsatt 1 ml løsning A og 20 ml løsning B.

Prosedyre:

- Ufortynnet supernatant (0,5 ml) ble tilsatt 0,5 ml 10 % TCA og blandet godt sammen.
- Etter henstand i 30 min i is ble reaksjonsløsninger sentrifugert (Centrifuge 5417 R) ved 4°C, 20000 RCF i 10 min for å fjerne de utfelte proteinene.
- Fortynnet supernatant (0,2 ml) ble tilsatt 0,8 ml M.A.C.R., blandet godt sammen og satt av for henstand i 30 min ved romtemperatur.
- Etter tilsetning av 50 µl 1N Folin Ciocalteus fenol reagens og henstand ved romtemperatur i 30 min var prøvene klar for spektrofotometrisk avlesning ved OD 700 (Spekol 2000).

Som standard ble brukt (0,1 µmol/ml) tyrosin. Konsentrasjonen av TCA-løselig protein ble regnet ut i TE (tyrosin ekvivalenter) i µmol/ml supernatant etter følgende formel:

Formel 1. Beregning av TCA-løselig protein.

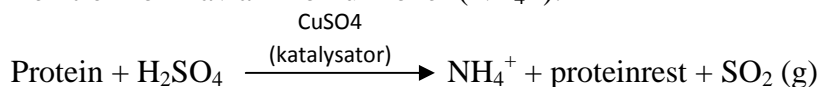
$$\frac{OD700 \text{ supernatant} \times \frac{0,1 \mu\text{mol}}{\text{ml}} \times FF}{OD700 \text{ tyr}} = TE \mu\text{mol/ml supernatant}$$

Hvor *OD 700 supernatant* er supernatantenes lysabsorpsjon ved 700 nm, *FF* er fortynningsfaktor av prøver, *OD700 tyr* er lysabsorpsjon av 0,1mM (0,1 μmol/ml) tyrosin ved 700 nm.

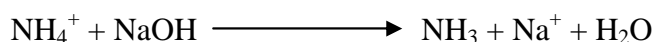
3.5 Næringsinnhold i rå seimuskel og rått ytrefilet av storfe

3.5.1 Proteininnhold

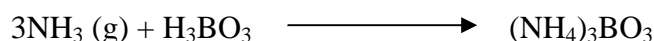
Mengden av protein i fiskemuskel fra sei og ytrefilet av storfe ble bestemt ved hjelp av Kjeldahl's metode i henhold til AOAC 981.10 (1983). Metoden inndeles i tre trinn: oppslutning, destillasjon og titrering. Under det første trinnet blir prøvene fullstendig løst opp ved $420 \pm 3^{\circ}\text{C}$ i konsentrert svovelsyre med katalysator. Nitrogen i proteinet frigjøres og vil fremtre i form av ammoniumioner (NH_4^+):



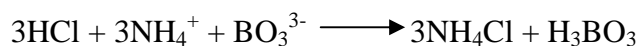
I trinn 2 tilsettes de oppløste prøvene en konsentrert base (NaOH) for å øke pH. Dette fører til omdannelse av ammoniumioner til ammoniakk-gass (NH_3) som blir frigjort under destillasjon:



Ved tilsetning av borsyreløsning med indikator vil ammoniakk-gassen fanges opp:



I trinn 3 bestemmes mengden ammoniakk ved titrering med en standard (0,1N HCl) og fargeindikatorer. Som indikatorer ble det brukt bromkresolgrønt (0,1 % i etanol) og metylrødt (0,1 % i etanol) som gir fargeomslag ved henholdsvis pH 3,8 – 5,5 og 4,4 – 6,2.



Prosedyre:

- Oppmalt muskel (1 gram) i nitrogenfritt veieskip (grade 609 kjeldahl weighing boat, 10313032, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA), 15 ml konsentrert (95-97 %) svovelsyre og 2 stk katalysatortabletter med kopparsulfat (Kjeltabs Cu/3,5,

15270018, Foss Analytical AB, Höganäs, Sverige,) ble overført til oppslutningsrør (Digestion Tubes Straight, 10000158, Foss Analytical, Hillerød, Danmark) for fullstendig oppslutning (420°C, 60 min) i en oppslutningsblokk (Tecator Digestor modell 2020, Foss Analytical, Hillerød, Danmark). I tillegg ble det laget to blankprøver utelatt muskel. Det ble laget tre paralleller fra hver prøve.

- Etter 15 minutters avkjøling i avtrekk ble hver prøve tilsatt 30 ml destillert vann, for å redusere krystalliseringen i prøven, og blandet forsiktig sammen.
- Destillasjon og titrering av hver prøve og beregning av proteininnhold i muskel (%) ble gjennomført i destillasjonsenhet (Distilling unit, 2300, Foss Analytical, Hillerød, Danmark). Proteinprosenten ble beregnet etter følgende formel:

Formel 2. Beregning av proteininnhold i næringsmiddel (%).

$$\% \text{ protein} = \frac{(pr - bl) \cdot 14,01 \cdot N \cdot 6,25 \cdot 100 \%}{1000 \cdot X}$$

Hvor *pr* er mengde (ml) 0,1 N HCl forbrukt ved titrering av prøve, *bl* står for mengde (ml) 0,1N HCl forbrukt ved titrering av blindprøve, *14,01* er molekylvekt for nitrogen, *N* er nøyaktig normalitet av titrervæske (0,1 N HCl), *6,25* er omregningsfaktor fra nitrogen til animalsk protein, *X* er våt vekt av innveid prøve (gram).

3.5.2 Fettinnhold

Fettinnhold i fiskemuskel og kjøtt ble bestemt ved Soxtec ekstraksjon i ekstraksjonsapparat (Tecator Soxtec System Extraction Unit, type HT 1043, Höganäs, Sverige) i henhold til bruksmanual til Tecator HT 1043.

Prosedyre:

- Oppmalt muskel (3 gram) ble veid inn i ekstraksjonshylser (Whatman[®] cellulose extraction thimbles, 26 x 60 mm, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA) og satt av for tørking over natten (103°C ±2°C) i et varmeskap (Binder APT FO 53, Tuttlingen, Tyskland). Det ble laget to paralleller.
- De ferdigtørkede prøvene ble klippet opp i mindre biter, dekket med en liten bomullsbit og plassert i ekstraksjonsapparat (Tecator Soxtec System Extraction Unit, type HT 1043). Under prøvene ble på forhåndsveid metallkopper (med 50 ml petroleumsbensin i hver) plassert.
- Fettekstraksjon fra prøver ble gjennomført automatisk i ekstraksjonsapparatet og inkluderte koking (30 min), skylling (60 min) og fordamping (15 min).

- Prøvene med ekstrahert fett ble ettertørket (103°C, 15 min) i et varmeskap (Binder APT FO 53).
- Etter 30 minutters prøveavkjøling i eksikator ble ekstraksjonskoppene veid på nytt og resultater ble beregnet (Formel 3).

Formel 3. Beregning av fettinnhold i næringsmiddel (%).

$$Fett \% = \frac{(A3 - A2) \cdot 100\%}{A1}$$

Hvor $A3$ er vekt (gram) av metallkopp med ferdig ekstrahert fett, $A2$ er vekt (gram) av metallkopp uten prøve, $A1$ er innveid mengde prøve (gram).

3.5.3 Vann- og askeinnhold

Vann- og askeinnhold ble bestemt gravimetrisk med tre paralleller.

Prosedyre:

- Oppmalt muskel (10 g) ble satt av for tørking (103 ± 2°C) over natten i tørkeskap (Binder APT FO 53).
- Etter 30 minutters avkjøling i eksikator ble prøvene veid på nytt umiddelbart etter at de ble tatt ut fra eksikatorene. Vanninnhold ble beregnet etter følgende formel:

Formel 4. Beregning av vanninnhold i næringsmiddel (%).

$$Vann (\%) = \frac{(Ma - Mb) \cdot 100 \%}{Mc}$$

Hvor Ma er vekt av innveid prøve inkludert skål, Mb er vekt etter tørking inkludert skål og Mc er innveid prøvemengde.

For å bestemme askeinnhold ble resten av prøvene satt i en forbrenningsovn (Carbolite type OAF 11/2, Hope Sheffield, England) for forbrenning ved 550°C over natten. Prøvene ble veid på nytt og askeinnhold ble notert.

3.6 Aminosyreanalyse

Totale og frie aminosyrer ble bestemt med en modifisert metode etter Ytrebø *et al.* (2009). Aminosyreanalyse ble gjennomført på rå fiskemuskel og kjøtt, samt supernatant samlet etter 0, 20, 40, 60, 80, 100 og 120 min under Forsøk 4: *In vitro* GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt

med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer. Alle prøver ble analysert ved bruk av Biochrom B30 aminosyreanalysator (Biochrom Co, Cambridge, UK). Norleucin ble brukt som intern standard. Signalet ble analysert ved hjelp av Chromeleon programvare (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Proteininnholdet ble bestemt basert på målinger av totale aminosyrer etter at molekylvekten til de enkelte aminosyrer var fratrukket molekylvekten av vann.

3.6.1 Totale aminosyrer i oppmalt muskel og supernatant

- Oppmalt muskel (200 mg) ble tilsatt 200 µl 20 mM N-leu og 800 µl MilliQ-vann. Supernatant (400 µl) ble blandet med 100 µl 20 mM N-leu og 700 µl MilliQ-vann.
- Blandingene ble tilsatt 1,2 ml 37 % HCl og spylt med nitrogen i 10-15 sekunder (for å hindre oksidasjon) før de ble satt av for syrehydrolyse i et varmeskap (Inkubator type TS 4115) i cirka 24 timer ved 110°C.
- Etter avkjøling ble 100 µl hydrolysat dampet inn til fullstendig tørrhet under nitrogengass og fortynnet med 1 ml Lithium Citrate Loading buffer (pH 2,2) før aminosyreanalyse.

3.6.2 Frie aminosyrer i oppmalt muskel og supernatant

- Supernatant (360 µl) ble blandet med 40 µl 20 mM N-leu og 40 µl 35 % sulfosalisylysyre. Oppmalt muskel (1 gram) ble tilsatt 9 ml MilliQ-vann og 1 ml 20 mM N-leu.
- Blandingen med muskel ble homogenisert (15 sekunder) i en Ultra Turrax (Type T 25 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland) før og etter tilsetning av 1 ml 35 % sulfosalisylysyre.
- Etter 10 minutters sentrifugering (Heraeus Multifuge 1S-R) ved 4000 g (4°C) ble supernatant fra muskel (1 ml) sentrifugert på nytt (Centrifuge 5417 R) ved 4°C, 20000 RCF i 10 min. Supernatanten (440 µl) ble sentrifugert kun en gang (Centrifuge 5417 R).
- Før aminosyreanalyse ble 200 µl supernatant fra oppmalt muskel og 300 µl supernatant fra hydrolysat fortynnet med henholdsvis 800 µl og 300 µl Lithium Citrate Loading buffer (pH 2,2).

4 Resultater

4.1 Næringsinnhold

Innledningsvis ble næringsinnholdet i seimuskel og ytrefilet av storfe bestemt. Resultatene viste at vanninnholdet var 80,5 og 74,1 % i henholdsvis seimuskelen og ytrefileten. Tilsvarende tall for fettinnhold var 0,4 og 2,9 % mens verdiene for proteininnhold var 17,8 og 20,1 % (Tabell 5). Fiskefileten og storfekjøttet hadde omtrent likt askeinnhold; 1,2 og 1,0 %

Tabell 5. Næringsinnhold i seimuskel og ytrefilet av storfe (% våt vekt). Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle analyser.

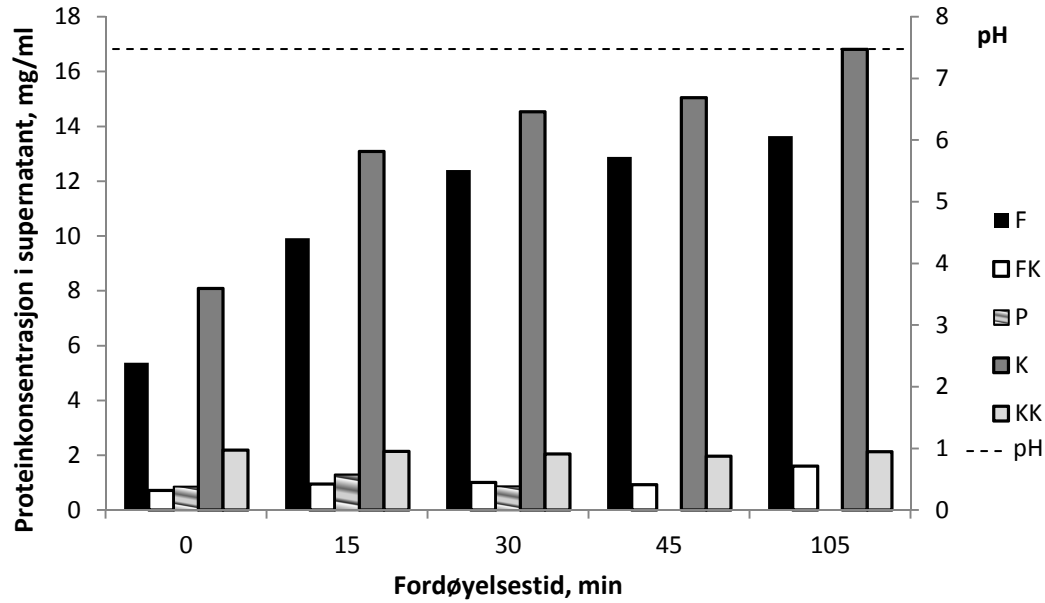
	Sei	Storfekjøtt
Vann	80,5 ± 0,2	74,1 ± 0,1
Protein	17,8 ± 0,8	20,1 ± 0,2
Fett	0,4	2,9 ± 0,3
Aske	1,2	1,0

4.2 *In vitro* tarmfordøyelse av rå fisk og rått kjøtt

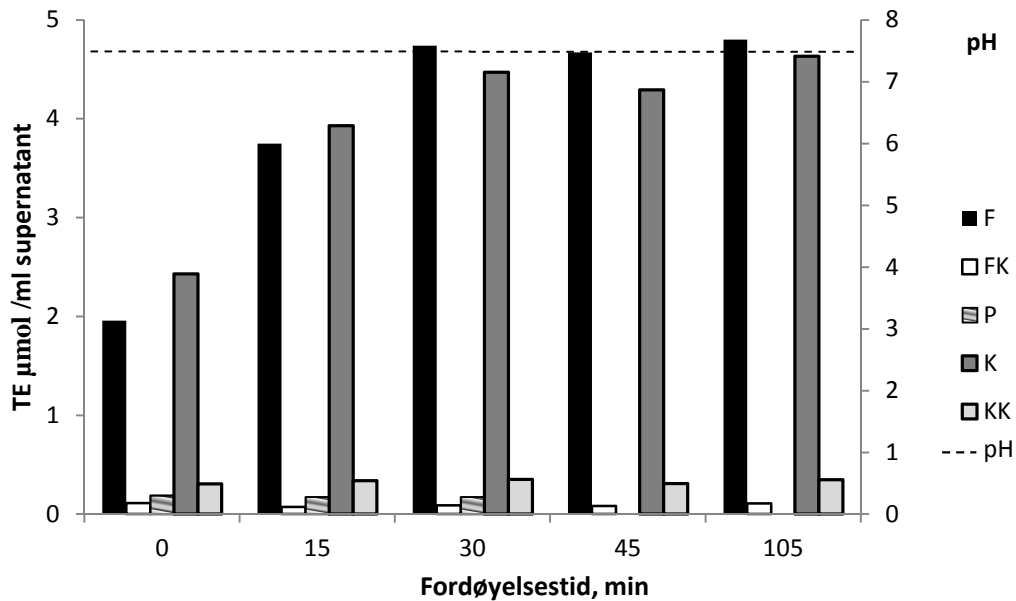
I dette innledende forsøket (Forsøk 1 i Materialer og Metoder) ble *in vitro* tarmfordøyelse studert ved å inkubere oppmalt rå fisk og rått kjøtt med kommersielt pancreatin. Resultatene viste at allerede ved tiden 0 min var proteininnhold 5,4 mg/ml og 8,1 mg/ml i supernatanten fra henholdsvis fiskemuskel og kjøtt tilsatt pancreatin. For kontrollprøvene uten tilsatt enzym var verdiene 0,7 og 2,2 mg/ml. Prøven med bare pancreatin ga en verdi på cirka 0,9 mg/ml og dette forandret seg ikke utover i hydrolysen (Figur 11).

Resultatene viste at konsentrasjon av frigjort protein økte både i prøver fra fiskemuskelen og fra ytrefileten under hydrolysen. Den største økningen skjedde i løpet av de første 30 min av hydrolysen. Proteinkonsentrasjon i supernatanten fra fiskeprøven økte 2,3x av sin opprinnelige konsentrasjon, fra 5,4 til 12,4 mg/ml mens tilsvarende for kjøttet var 1,8x, fra 8,1 til 14,5 mg/ml. Deretter var det tilsynelatende bare en svak økning i frigjort protein fra begge typer muskelprøver. Etter 105 minutters inkubasjon var proteinkonsentrasjon i supernatanten økt til 13,6 mg/ml fra fiskeprøven og 16,8 mg/ml fra ytrefileten. Proteininnholdet i supernatantene fra kontrollprøvene uten tilsatt enzym var relativt stabilt under hele forsøket.

RESULTATER



Figur 10. Proteinkonsentrasjon i supernatanter (mg/ml) fra *in vitro* tarmfordøyelse med pancreatin av rå fiskemuskel (F) og rå ytrefilet (K). FK og KK er kontrollforsøk uten tilsatt enzym mens P er kontrollprøve med kun pancreatin. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.



Figur 11. TCA – løselig protein (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatantene fra *in vitro* tarmfordøyelse med pancreatin av rå fiskemuskel (F) og rå ytrefilet (K). FK og KK er kontrollforsøk uten tilsatt enzym mens P er kontrollprøve med kun pancreatin. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

Nedbrutt protein (TCA-løselig protein) ble målt i hver supernatant samlet under *in vitro* tarmfordøyelse. Også økning i TCA-løselig protein skjedde hovedsakelig i de første 30 min av inkubasjonen (Figur 12). Ved tiden 0 min var konsentrasjonen av TCA-løselig protein

høyst i supernatanten fra ytrefiletprøven, 2,4 mot 2,0 TE $\mu\text{mol/ml}$ i fiskeprøven. Den høyere konsentrasjonen av nedbrutt protein i kjøttprøven var også detektert ved fordøyelsestiden 15 min. Ved alle de senere uttak ble det målt høyere innhold i prøvene fra inkubasjonen av fiskemuskel. Konsentrasjonen stabiliserte seg etter 30 min og ble målt til 4,7 og 4,5 TE $\mu\text{mol/ml}$ i henholdsvis fiskeprøven og kjøttprøven. I kontrollprøvene uten tilsatt av eksogent enzym var det et konstant lavt innhold av TCA-løselig protein, 0,1 og 0,3 TE $\mu\text{mol/ml}$ i fisk og kjøtt. Resultatene ble ikke behandlet statistisk fordi hydrolyseforsøket bare ble gjennomført en gang.

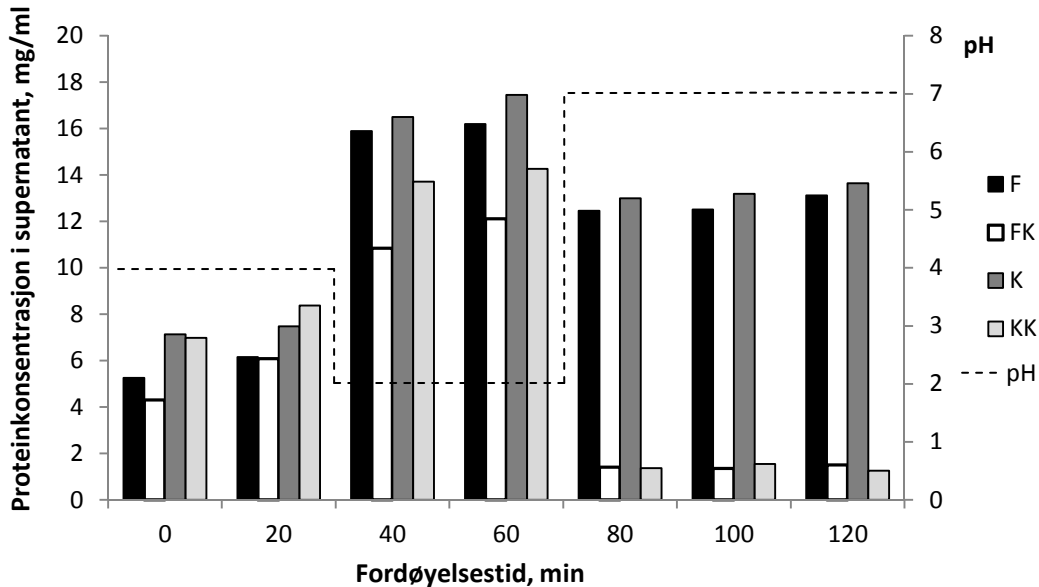
4.3 *In vitro* GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt

I dette forsøket (Forsøk 2 i Materialer og Metoder) ble *in vitro* fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt gjennomført ved først å etterligne magesekkefasen og deretter tynntarmfasen. På grunnlag av resultater fra det innledende forsøket (*In vitro* tarmfordøyelse av rå fisk og rått kjøtt) hvor det bare ble påvist en svak økning i proteininnhold etter 30 minutters inkubasjon, ble tarmfordøyelsen i denne studien redusert fra 105 til 60 min.

Resultatene viste at mengden frigjort protein økte sterkt i andre del av magesekkefasen etter at pH ble forandret fra 4,0 til 2,0 (Figur 13). I tillegg kan en se at proteininnholdet i supernatanter fra enzymatisk hydrolyse av kjøtt var litt høyere enn i fiskemuskel. Startkonsentrasjon i prøver med kjøtt og fisk var henholdsvis 7,1 og 5,3 mg/ml. Bare en liten forskjell ble målt mellom prøver tilsatt enzym og kontrollprøvene i magesfasen ved pH 4,0. Mengden frigjort protein økte med 2,6x, fra 6,2 til 15,9 mg/ml i fiskeprøver og med 2,2x, fra 7,5 til 16,5 mg/ml i kjøttprøver etter 20 minutters hydrolyse ved pH 2,0. Omtrent lik proteinkonsentrasjon ble målt etter totalt 40 og 60 min hydrolyse. Etter passering over til tarmfordøyelse ble proteinkonsentrasjonen redusert. Den minket fra 16,2 til 12,5 mg/ml i prøver med fiskemuskel og fra 17,5 til 13,0 mg/ml med kjøtt. Deretter ble det bare registrert en svak økning og ved inkubasjonstid 120 min var mengden av frigjort protein 13,1 og 13,6 mg/ml henholdsvis i supernatanter fra hydrolyse av fiskemuskel og kjøtt.

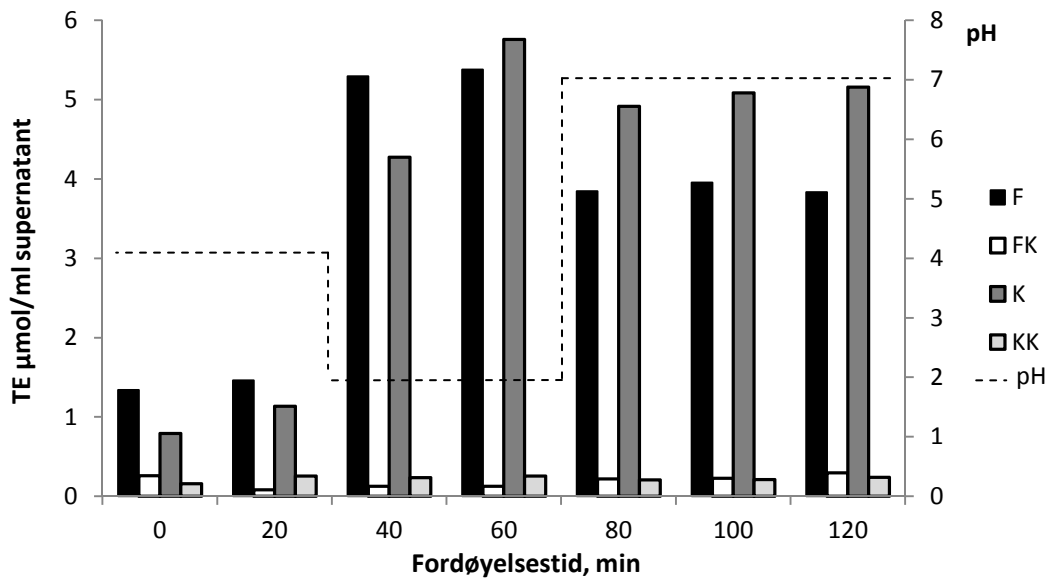
Proteinkonsentrasjon i begge supernatantene fra kontrollforsøkene hadde tilnærmet samme utvikling under magesekkefase som i supernatanter fått fra enzymatisk hydrolyse. I starten var proteinkonsentrasjon i prøver uten eksogent enzym omtrent like høy som i prøver med tilsatt enzym (Figur 13). Etter 20 minutters inkubasjon ved pH 2,0 hadde proteinkonsentrasjonen i begge kontrollprøvene omtrent blitt fordoblet, men var nå litt mindre enn i prøvene tilsatt enzym. Konsentrasjon i begge typer kontrollprøver forble høy helt til pH

ble justert til 7,0. Etter overgangen til tarmfordøyelse ble mengden løselig protein drastisk redusert i begge kontrollprøvene. Nedgangen var fra 12,1 til 1,4 mg/ml i prøver fra fiskemuskel og fra 14,3 til 1,4 mg/ml i supernatanter fra kjøtt.



Figur 12. Proteininnhold i supernatant (mg/ml) ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse av rå fiskemuskel (F) og rått kjøtt (K). FK og KK er kontrollforsøk uten tilsatt enzym. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

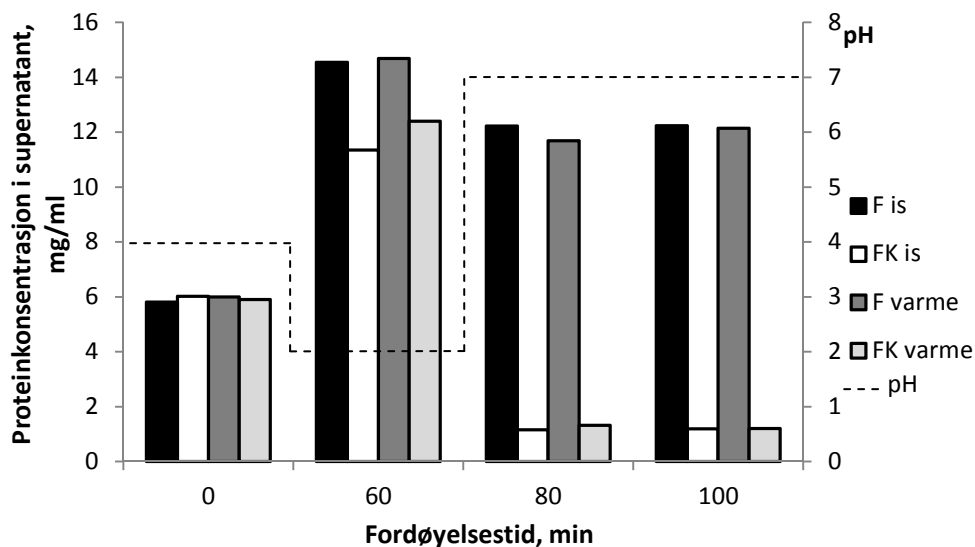
Figur 14 viser mengden nedbrutt protein i prøver fra fiskemuskel og kjøtt ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse. Ved starten (tid 0 min) av *in vitro* GI fordøyelse var TCA-løselig proteininnhold fra fiskeprøven høyere enn fra kjøttprøven, henholdsvis 1,3 og 0,8 TE $\mu\text{mol/ml}$. I tillegg var det tydelig at hydrolysert fisk og kjøtt hadde et høyere innhold av TCA-løselig protein enn kontrollprøvene. Den største økningen i konsentrasjon av nedbrutt protein ble detektert 20 min etter justering av pH til 2,0. Konsentrasjonen i supernatant fra fiskemuskel ble 3,5x høyere og økte fra 1,5 til 5,3 TE $\mu\text{mol/ml}$. Tilsvarende ble mengden TCA-løselig protein i kjøttprøve 3,9x høyere og steg fra 1,1 til 4,3 TE $\mu\text{mol/ml}$. Den høyeste konsentrasjonen var påvist ved inkubasjonstiden 60 min, 5,4 TE $\mu\text{mol/ml}$ i supernatant fra fiskemuskel og 5,8 TE $\mu\text{mol/ml}$ i supernatant fra kjøtt. I tarmfasen ble innholdet av nedbrutt protein redusert til et stabilt nivå på cirka 3,8 og 5,0 TE $\mu\text{mol/ml}$ i supernatantene fra henholdsvis fisk og kjøtt. TCA-løselig proteinkonsentrasjon i begge typer kontrollprøver var lav og relativt stabil under hele inkubasjonen, cirka 0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$ i både supernatanter fra kontroll med fiskemuskel og kjøtt.



Figur 13. TCA-løselig proteinkonsentrasjon i supernatant (TE μmol/ml) ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse. F er enzymatisk hydrolyse av rå fiskemuskel, FK er hydrolyse av rå fiskemuskel uten tilsatt enzym (kontroll), P er kontroll med kommersielt pancreatin (uten muskel), K er enzymatisk hydrolyse av rått kjøtt, KK er kontroll for kjøttforsøk. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

4.4 Inaktivering av enzymer

I hydrolyseforsøkene ble tilsatte fordøyelsesenzymene inaktivert ved å varme opp prøvene til 90 - 95°C. Et alternativt hadde vært å avkjøle prøvene på is før sentrifugering og deretter måle av proteinkonsentrasjon og mengden av TCA-løselig protein i supernatanten.



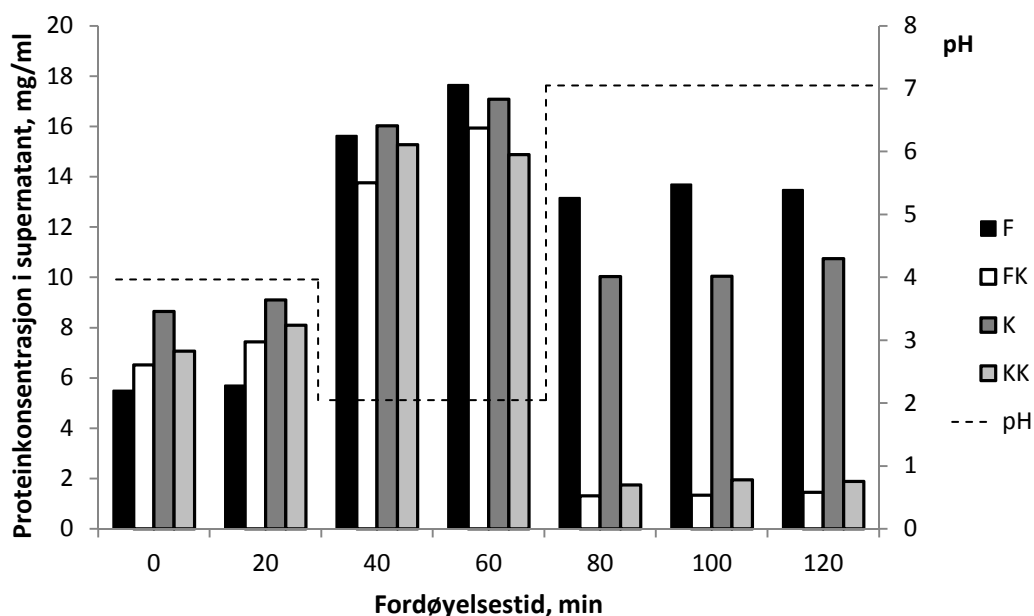
Figur 14. Proteinkonsentrasjon i supernatanter (mg/ml) ved ulike tidspunkter under enzymatisk hydrolyse av rå fiskemuskel hvor fordøyelsesenzymene ble inaktivert ved oppvarming (F varme) til 95°C, og nedkjøling i is (F is). FK is og FK varme er kontrollforsøk uten tilsatt enzym. Resultater er gjennomsnitt av tre parallelle målinger.

I forsøkene med is ble prøvene lagret på is til hele hydrolyseforsøket var gjennomført, dvs. at uttaket ved tiden 0 min hadde vært islagret i cirka 2 timer før måling av proteininnhold. Resultatene viste at det ikke var noen forskjeller i frigjøring av løselig protein avhengig av om enzymene var inaktivert ved varme på uttakstidspunktet eller bare hemmet ved lagring i is (Figur 15).

4.5 *In vitro* GI fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer

I dette forsøket (Forsøk 4 i Materialer og Metoder) ble enzymatisk hydrolyse av rå fiskemuskel og kjøtt gjennomført med 10x lavere konsentrasjon av fordøyelsesenzymer enn det ble brukt i Forsøk 2. I tillegg, for å unngå dannelse av tett pellet som er tidskrevende å resuspendere før videre hydrolyse, ble sentrifugeringstid før prøveuttak redusert fra 5 til 3 min.

Startkonsentrasjon ved tiden 0 min i supernatant fra kjøtt var 8,6 mg/ml og 5,5 mg/ml i fiskeprøver (Figur 16). I løpet av magesekkefasen økte mengden av frigjort protein fra fiskeprøver til 3,2x av sin opprinnelige konsentrasjon. Tilsvarende, etter 60 minutters pepsinfordøyelse inneholdt supernatanter fra kjøtt 2,0x mer enn det var i utgangspunkt (tid 0 min).

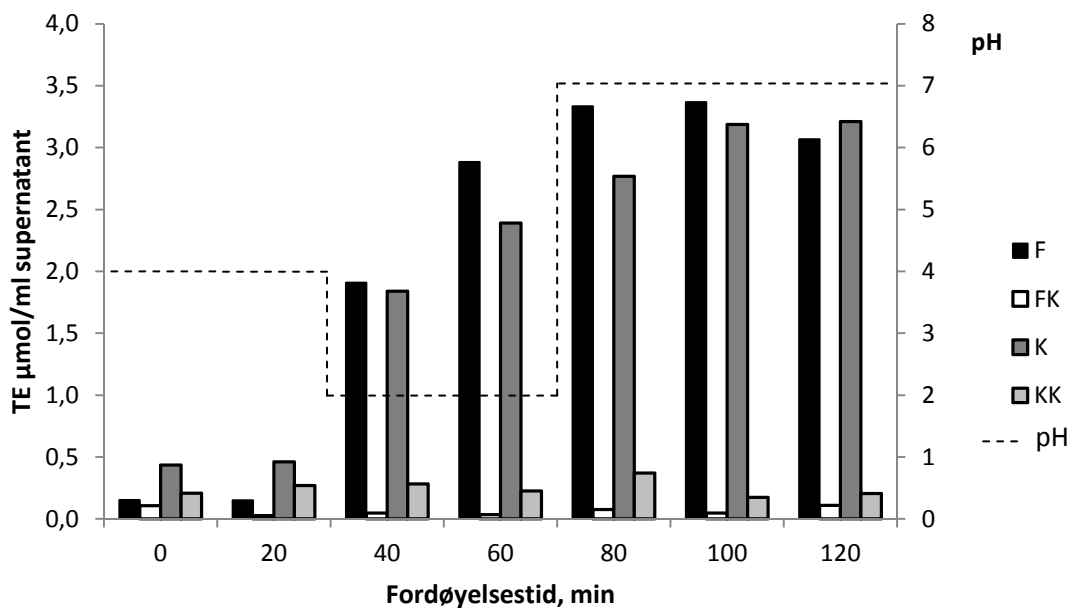


Figur 15. Proteininnhold i supernatant (mg/ml) ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse av rå fiskemuskel (F) og rått kjøtt (K) med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer. FK og KK er kontrollforsøk uten tilsatt enzym. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

RESULTATER

Det totale innholdet av løselig protein var mindre under tarmfasen enn under magefasen (40 – 60 min). Fiskeprøvene synes imidlertid å ha hatt en mindre nedgang enn kjøttprøven. Ved forsøkets avslutning var mengden av frigjort protein 13,5 og 10,7 mg/ml i henholdsvis prøver fra fiskemuskel og kjøtt. Proteininnhold i begge typer kontrollprøver hadde en liknende utvikling under magesekkkfordøyelse som i supernatanter fra enzymatisk hydrolyse av fiskemuskel og kjøtt. Frem til pH ble justert til 2,0 var proteinkonsentrasjon i kontrollprøve med fiskemuskel høyere enn i prøve fra enzymatisk hydrolyse av fisk. I starten av tarmfase ble mengden løselig protein redusert med cirka 89 % i supernatanter fra begge kontrollforsøk, fra 15,9 til cirka 1,3 mg/ml og fra 14,9 til cirka 1,8 mg/ml i supernatanter fra kontrollforsøkene med henholdsvis fisk og kjøtt, og deretter var relativt stabil under hele tynntarmsfasen.

Resultatene fra måling av TCA-løselig protein viste omtrent ingen endring i mengden nedbrutt protein både i fiskeprøver og kjøttprøver ved pH 4,0 (Figur 17). Startkonsentrasjonen i supernatant fra prøve med fiskemuskel var lavere enn i kjøttprøve, henholdsvis cirka 0,2 og 0,4 TE $\mu\text{mol/ml}$. Den største økningen i mengden TCA-løselig protein ble påvist 20 min etter nedjustering av pH til 2,0 og mengden nedbrutt protein økte fortsatt etter overgang til tarmfordøyelse, fra tidspunkt 60 til 80 min. I tillegg, etter senking av pH til 2,0 ble TCA-løselig proteinkonsentrasjon i fiskeprøver høyere enn i supernatanter fra kjøtt og denne forskjellen gjenstod frem til prøveuttaket ved 100 min.



Figur 16. TCA-løselig proteininnhold (TE $\mu\text{mol/ml}$ supernatant) ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse av rå fiskemuskel (F) og rått kjøtt (K) med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer. FK og KK er kontrollforsøk uten tilsatt enzym. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

Etter 80 minutters enzymatisk hydrolyse økte mengden TCA-løselig protein i supernatanter fra fiskemuskel til 3,3 TE $\mu\text{mol/ml}$, og ved neste måling var proteinkonsentrasjon tilnærmet uendret, 3,4 TE $\mu\text{mol/ml}$. Ved tiden 120 min av fordøyelse ble mengden nedbrutt protein redusert til 3,1 TE $\mu\text{mol/ml}$. Til sammenligning økte konsentrasjon av TCA-løselig protein i kjøttprøve frem til 100 min av inkubasjon. Da mengden nedbrutt protein var økt til 3,2 TE $\mu\text{mol/ml}$. Resultater fra den siste måling viste at konsentrasjon i supernatant fra kjøtt forble like høyt etter 20 min av ytterlige hydrolyse.

TCA-løselig protein i begge typer kontrollprøver var betydelig lavere enn i prøver med tilsatt enzymer. I tillegg var mengden nedbrutt protein i supernatant fra kontroll med kjøtt høyere enn i supernatant fra kontroll med fiskemuskel. TCA-løselig proteininnhold var relativt stabilt under hele inkubasjonen, omtrent 0,06 og 0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$ henholdsvis i supernatanter fra kontroll med fiskemuskel og kjøtt.

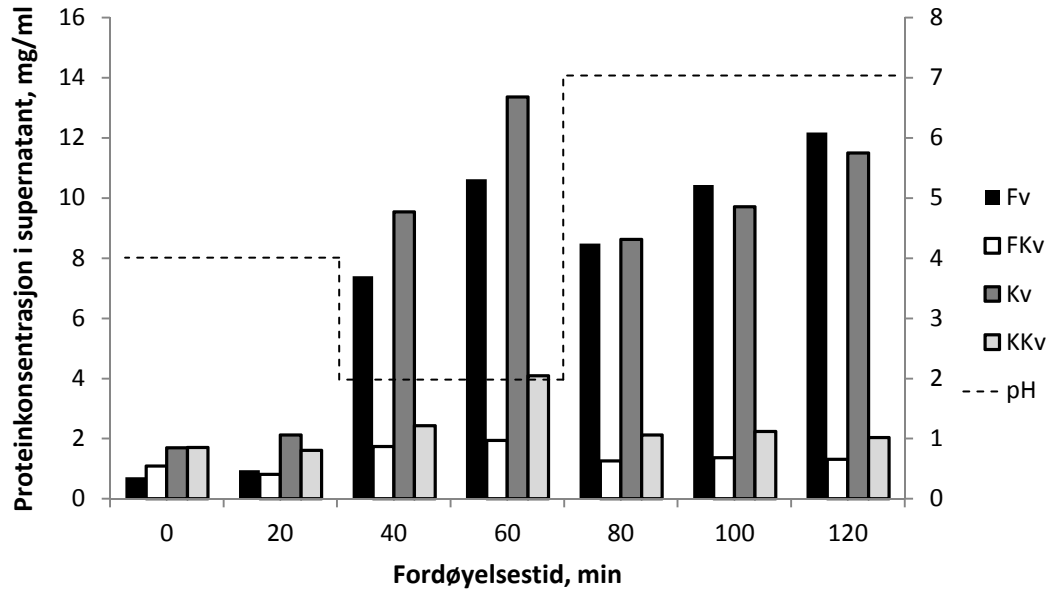
4.6 *In vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede produkter

Formålet med forsøket var å studere *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede produkter og å sammenligne med *in vitro* magetarm fordøyelse av rå produkter. Denne studien ble gjennomført i to trinn. I den første delen ble fordøyelse av kun varmebehandlet fiskemuskel og kjøtt studert. I del to ble sammenlignende *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede og rå fisk og kjøtt gjennomført.

4.6.1 *In vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede fiskemuskel og kjøtt

Figur 18 viser mengde frigjort protein i supernatant (mg/ml) fra varmebehandlede fisk og kjøtt ved ulike tidspunkter av simulert GI fordøyelse. Resultatene viste at proteinkonsentrasjon økte både under magesekkefasen og tarmfasen i prøver fra begge typer varmebehandlet muskel. Også i dette forsøket var proteinfrigjøring svak under magefordøyelse ved pH 4,0 og den største økningen i mengden av frigjort protein skjedde like etter nedjustering av pH til 2,0. Ved tiden 0 min var proteininnhold i supernatant fra varmebehandlet kjøtt høyere enn fra fisk, henholdsvis 1,7 og 0,7 mg/ml. Differansen i proteinkonsentrasjon mellom prøver tilsatt enzym og kontrollprøvene var liten. Etter 40 minutters inkubasjon ved pH 2,0 (fordøyelsestidspunkt 60 min) var mengden løselig protein i supernatantene fra fisk og kjøtt økt til henholdsvis 10,6 og 13,4 mg/ml. Samtidig økte proteinkonsentrasjon i kontrollprøven med fiskemuskel fra 0,8 til 1,9 mg/ml og fra 1,6 til 4,9 mg/ml i kjøttkontroll. Ved første måling av proteinkonsentrasjon under tarmfasen (80 min) ble det påvist en nedgang i mengden løselig protein i alle typer prøver. Også proteinkonsentrasjonen i supernatantene fra kontrollprøvene ble redusert. Resultater fra senere

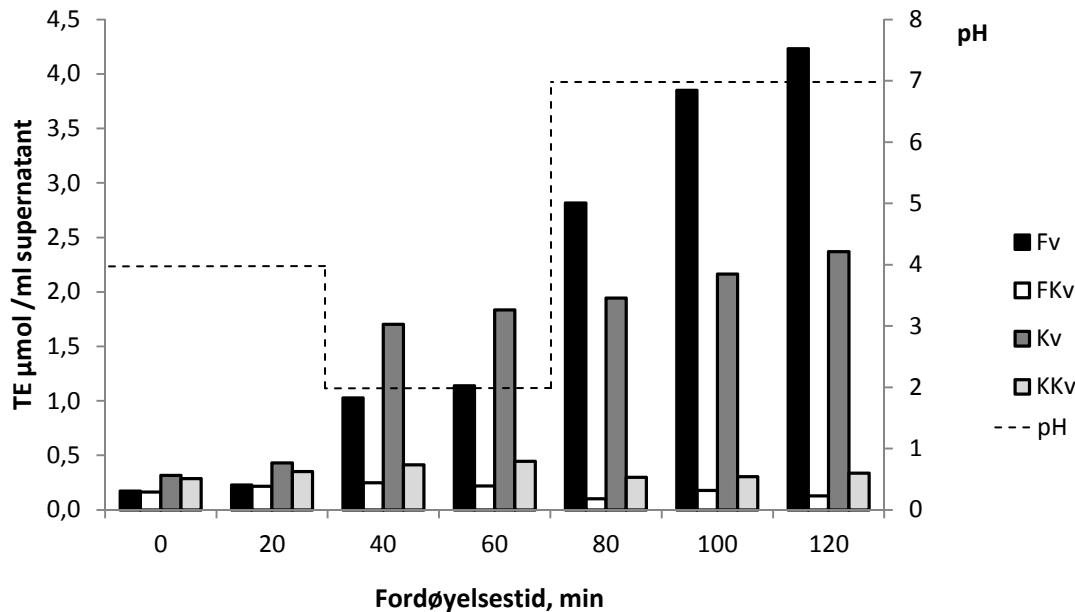
uttak viste en jevn økning i supernatanter fra enzymatisk hydrolyse av varmebehandlede fisk og kjøtt mens proteininnhold i supernatantene fra kontroll for fisk og kjøtt var stabil gjennom hele tarmfasen. I tillegg kan en notere seg at supernatant fra hydrolyse av varmebehandlet fiskemuskel hadde høyere proteininnhold enn i kjøttprøve etter 40 og 60 minutters tarmfordøyelse (Figur 18).



Figur 17. Proteinkonsentrasjon i supernatanter (mg/ml) fra varmebehandlede fiskemuskel (Fv) og kjøtt (Kv) ved ulike tidspunkter av *in vitro* GI fordøyelse. FKv og KKv er kontrollforsøk uten tilsatt enzym. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

Resultatene viste at mengde nedbrutt protein (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatantene fra varmebehandlede fisk og kjøtt øker med inkubasjon (Figur 19). Startkonsentrasjon av TCA-løselig protein i supernatanter fra varmebehandlet kjøtt var tilsynelatende høyere enn fra fisk, henholdsvis 0,3 og 0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$. I tillegg var det ingen forskjell i TCA-løselig proteinkonsentrasjon mellom prøver uten fordøyelsesenzym og prøver tilsatt enzym. Under magesfordøyelse ved pH 4,0 var det ingen store endringer i proteininnhold i prøver fra hydrolyse av varmebehandlet fisk og kjøtt. En stor økning i TCA-løselig konsentrasjon ble registrert like 20 min etter overgang til magesekkefordøyelse ved pH 2,0. Ved tiden 40 min i inkubasjon var TCA-løselig proteinkonsentrasjon økt til 1,7 TE $\mu\text{mol/ml}$ i prøver fra varmebehandlet kjøtt og til 1,0 TE $\mu\text{mol/ml}$ i fiskeprøver. Det ble ikke målt noe økning av TCA-løselig protein i de siste 20 min av magesfasen. Etter totalt 120 minutters hydrolyse var konsentrasjonen av nedbrutt protein i supernatanten fra varmebehandlet fisk og kjøtt, henholdsvis 4,2 og 2,4 TE $\mu\text{mol/ml}$ (Figur 19).

Mengde nedbrutt protein i supernatanter fra begge typer kontrollprøver var lav gjennom hele inkubasjon.

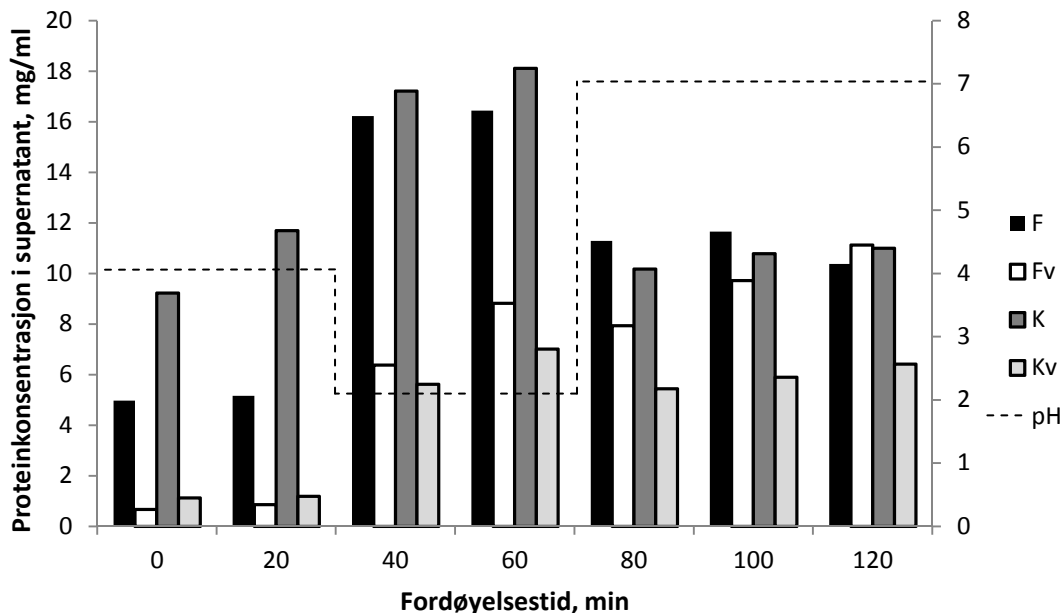


Figur 18. TCA-løselig proteinkonsentrasjon (TE $\mu\text{mol/ml}$ supernatant) ved ulike inkubasjonstid under *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede fiskemuskel (Fv) og kjøtt (Kv). FKv og KKv er kontrollforsøk uten eksogene enzymer. Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

4.6.2 Sammenlignende *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede og rå fiskemuskel og kjøtt

Det ble også gjennomført et forsøk der *in vitro* fordøyelse av rå og varmebehandlede fisk og kjøtt ble sammenlignet. Den laveste mengden løselig protein var ved tiden 0 min. Proteininnhold i prøver fra rå fisk og rått kjøtt var henholdsvis 5,0 og 9,2 mg/ml. For varmebehandlede prøver var de tilsvarende verdiene 0,7 mg/ml for fiskemuskel og 1,1 mg/ml for kjøtt (Figur 20). Proteinkonsentrasjonen i supernatanten fra rå fisk var stabil mens den økte litt for rått kjøtt i magesekkperioden ved pH 4,0. Frigjøringen av protein fra de varmebehandlede prøvene var mye lavere og konstant i den perioden. I inkubasjonsperioden mellom 20 og 40 min (pH 2,0) var proteinfrigjøring på sitt sterkeste og økning i mengde løselig protein var detektert til å være høyere i prøver fra varmebehandlede fiskemuskel (7,1x) og kjøtt (4,7x) enn i prøver fra rå fisk (3,1x) og rått kjøtt (1,3x). Den høyeste proteinkonsentrasjon i supernatanter fra både varmebehandlet og rått kjøtt, henholdsvis 7,0 og 18,1 mg/ml, samt rå fiskemuskel, 16,4 mg/ml, ble detektert etter 60 minutters inkubasjon. Imidlertid, var det høyeste proteininnhold i prøver fra varmebehandlet fiskemuskel registrert ved inkubasjonstid 120 min, 11,1 mg/ml. I starten av tarmfasen ble mengden av frigjort

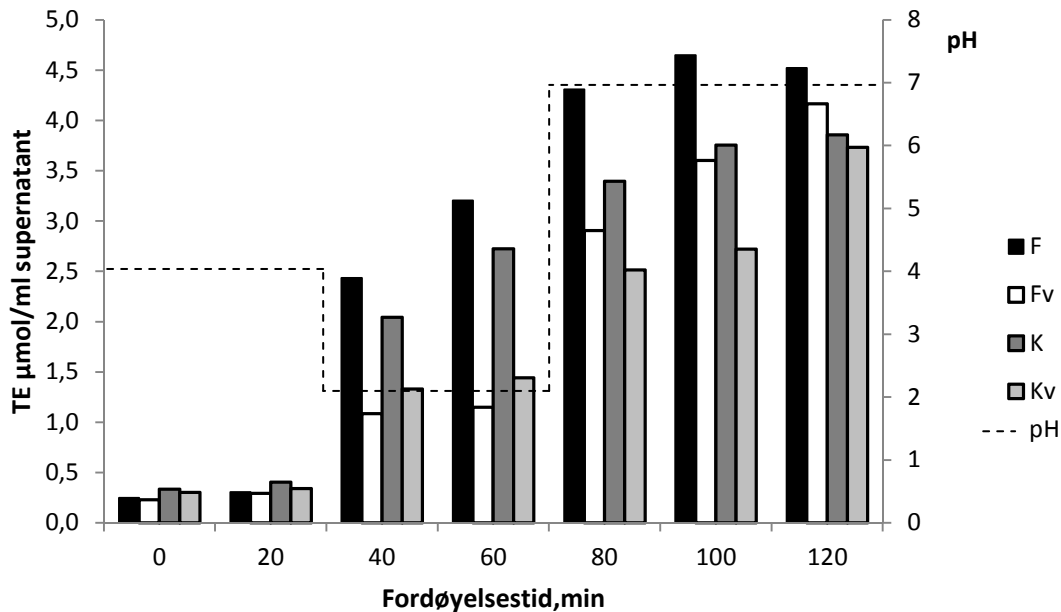
protein redusert til 11,3 og 10,2 mg/ml for henholdsvis rå fisk og rått kjøtt, samt til 7,9 og 5,4 mg/ml for henholdsvis varmebehandlede fisk og kjøtt. En tydelig økning i proteinkonsentrasjon i supernatanter fra varmebehandlet fiskemuskel ble detektert under hydrolyse i tarmfasen. Til sammenligning var proteinkonsentrasjon i prøver fra varmebehandlet og rått kjøtt samt rå fiskemuskel uten store endringer. I dette forsøket var proteinkonsentrasjon i supernatanter fra varmebehandlet fisk under tarmfasen betydelig høyere enn i prøver fra varmebehandlet kjøtt. Ved forsøkets avslutning var differansen i mengde frigjort protein mellom supernatanter fra varmebehandlet og rå fisk mindre enn tilsvarende for kjøtt. Faktisk, var proteinkonsentrasjon i prøver fra varmebehandlet fisk ved slutten av forsøket noe høyere enn i prøver fra rå fisk.



Figur 19. Proteinkonsentrasjon i supernatant (mg/ml) ved ulike tidspunkter av sammenlignende *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede fisk (Fv) og kjøtt (Kv) og rå fisk (F) og rått kjøtt (K). Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

Mengde av TCA-løselig protein ble også målt. Resultatene viste at konsentrasjon av nedbrutt protein øker under enzymatisk hydrolyse i supernatanter fra både varmebehandlet og rått råstoff (Figur 21). Totalt sett var proteinnedbrytning i alle typer prøver høyere under magesekkefase enn tarmfase. Startkonsentrasjon var cirka like høy i alle supernatanter, rundt 0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$ i hver fiskeprøve og 0,3 TE $\mu\text{mol/ml}$ i kjøtt, og slik holdt det seg frem til pH ble justert fra 4,0 til 2,0. Forskjellen i mengden av TCA-løselig protein mellom varmebehandlet og rått råstoff ble først detektert ved inkubasjonstid 40 min da økte mengden

nedbrutt protein betraktelig i alle typer prøver. Økningen var størst i supernatanter fra rå fisk (8x) og rått kjøtt (5x) sammenlignet med varmebehandlede fisk (3,7x) og kjøtt (3,3x).



Figur 20. TCA-løselig proteinkonsentrasjon i supernatant (TE $\mu\text{mol/ml}$) ved ulike tidspunkter av sammenlignende *in vitro* GI fordøyelse av varmebehandlede fisk (Fv) og kjøtt (Kv) og rå fisk (F) og rått kjøtt (K). Resultater er gjennomsnitt av to parallelle målinger.

Etter 60 minutters magesekkefordøyelse var mengden TCA-løselig protein i prøver fra rå fiskemuskel (3,2 TE $\mu\text{mol/ml}$) og rått kjøtt (2,0 TE $\mu\text{mol/ml}$) betydelige høyere enn i supernatanter fra varmebehandlede fisk (1,1 TE $\mu\text{mol/ml}$) og kjøtt (1,3 TE $\mu\text{mol/ml}$). Differansen i TCA-løselig proteininnhold mellom varmebehandlet og rått råstoff ble redusert under tarmfordøyelse og var minst ved det siste prøveuttaket (120 min). Under tarmfasen var økningen i TCA-løselig proteinkonsentrasjon i supernatanter fra rått råstoff (cirka 1,1x) noe svakere enn fra varmebehandlede fiskemuskel (1,4x) og kjøtt (1,5x). Den høyeste mengden av TCA-løselig protein fra rått kjøtt og varmebehandlet kjøtt ble detektert etter 120 minutters inkubasjon, henholdsvis 3,9 og 3,7 TE $\mu\text{mol/ml}$. TCA-løselig protein i supernatant fra rå fiskemuskel var høyest ved inkubasjonstid 100 min (4,6 TE $\mu\text{mol/ml}$) mens i varmebehandlet fiskemuskel ble høyest konsentrasjon oppnådd etter 120 min (4,2 TE $\mu\text{mol/ml}$). Det er verd å merke seg at under tarmfasen har den varmebehandlede fisken hatt den kraftigste økningen i TCA-løselig protein.

4.7 Aminosyreanalyse av muskel

Aminosyresammensetning i rått kjøtt og rå fisk er vist i Tabell 6. Både den totale mengden av aminosyrer og mengden av frie aminosyrer ble bestemt.

Tabell 6. Konsentrasjon av totale aminosyrer (TAA, mg/g) og frie aminosyrer (FAA, mg/g) i analyserte muskelprøvene (mg /g prøve). De essensielle aminosyrene er fremhevet med fet skrift. i.d. = ikke detektert. Asx = Totalt asparagin og asparaginsyre. Glx = Totalt glutamin og glutaminsyre.

AA	Fiskemuskel		Kjøtt	
	FAA	TAA	FAA	TAA
Ala	0,17	9,15	0,37	10,93
Arg	i.d.	11,19	i.d.	9,53
Asx	i.d.	13,07	0,07	14,23
Cys	i.d.	0,91	i.d.	0,52
Phe	0,02	5,66	0,12	6,82
Glx	0,06	20,38	0,54	24,74
Gly	0,09	6,48	0,13	7,37
His	0,03	3,08	0,06	6,9
Hyp	i.d.	0,4	i.d.	1,02
Ile	0,01	6,89	0,08	8,19
Leu	0,03	11,69	0,17	13,94
Lys	0,12	14,11	0,05	16,21
Met	i.d.	4,8	0,07	4,82
Pro	i.d.	5,82	i.d.	7,76
Ser	0,03	6,34	0,13	6,73
Tau	1,1	1,03	0,08	i.d.
Thr	0,08	6,52	0,09	7,76
Tyr	i.d.	5,18	0,02	5,87
Val	0,01	7,93	0,15	9,17
Totalt				
AA	1,75	140,63	2,13	162,5

Mengden av de totale aminosyrene både i prøver fra fiskemuskel og kjøtt var betydelig høyere enn konsentrasjon av de frie aminosyrene, henholdsvis 140,6 og 162,5 mg/g mot 1,8 og 2,1 mg/g (Tabell 6). Dette gjelder også hver enkelt aminosyre med et unntak. Totalt innhold av lysin var for eksempel 14,1 og 16,2 mg/g i henholdsvis fisk og kjøtt. Tilsvarende tall for fritt lysin var 0,12 mg/g og 0,05 mg/g. Innhold av de fleste aminosyrene var høyere i kjøtt enn i fisk. Dette gjelder både de frie aminosyrer og den totale mengden av de enkelte aminosyrer. For eksempel, mengden fritt alanin i kjøtt var 0,4 mg/g og 0,2 mg/g i fisk, mens det totale innholdet av alanin var tilsvarende 11,0 og 9,2 mg/g. Et unntak her er arginin og cystein, som det ble funnet mer av i fiskemuskel, henholdsvis 11,2 og 0,9 mg/g, enn i kjøtt, henholdsvis 9,5 og 0,5 mg/g. Det totale innholdet av aminosyrene metionin, serin og tyrosin var omtrent like

høy i begge typer prøver. Både fiskemuskel og kjøtt inneholdt minst av totalt cystein (0,9 mg/g i supernatant fra fiskemuskel og 0,5 mg/g i kjøttprøve) og mest av totalt glutamin og glutaminsyre (20,4 mg/g i fisk og 24,7 mg/g i kjøtt). Konsentrasjon av iminosyrer, prolin og hydroxyprolin, var høyere i kjøtt enn i fisk. I kjøtt var innholdet av prolin og hydroxyprolin 7,8 og 1,0 mg/g mens tilsvarende i fisk var 5,8 og 0,4 mg/g, til sammen 8,8 mg/g i kjøtt og 6,2 mg/g i fisk. Taurin ble detektert i fiskemuskel som fri aminosyre, 1,1 mg/g, mens bare spormengder, 0,08 mg/g, ble påvist i kjøtt. Den totale mengden av taurin i fisk tilsvarte mengden detektert som fritt taurin.

Totalt proteininnhold i oppmalt muskel ble beregnet basert på målinger av totalt aminosyreinnhold, og funnet til å være 140,3 mg/g for kjøtt og 118,2 mg/g for fisk (Tabell 7).

Tabell 7. Totalt proteininnhold (mg/g prøve) basert på målinger av de totale aminosyrene.

	Fiskemuskel	Kjøtt
Total protein	118,18	140,28

4.8 Aminosyreanalyse av supernatant

Det totale innholdet av frie aminosyrer i supernatant fra både rå fisk og rått kjøtt var relativt stabil under den første timen med fordøyelse, dvs. i magefasen (Tabell 8). Først etter overgangen til tynntarmsfase økte konsentrasjonen, og var økende frem til forsøkets avslutning. Den laveste konsentrasjonen av frie aminosyrer både i fiskeprøver og kjøttprøver ble detektert ved tiden 0 min, henholdsvis 104 og 136 µg/ml supernatant. Ved prøveuttakstid 80 min var konsentrasjon av frie aminosyrer 199 µg/ml i supernatant fra fisk og 209 µg/ml i supernatant fra kjøtt. Den høyeste totale konsentrasjonen var detektert ved tiden 120 min både for rå fisk og rått kjøtt. Samme utviklingstrend ble også påvist for arginin, tyrosin og de essensielle aminosyrene fenylalanin, leucin og lysin. I starten var mengden av fenylalanin i supernatant fra fiskemuskel 0,8 µg/ml. Ved tiden 60 min økte konsentrasjon til 2,0 µg/ml og etter ytterligere 20 min var mengden fenylalanin 26,1 µg/ml. Innhold av fenylalanin var høyest ved prøvetidsuttak 120 min, 42,4 µg/ml. Imidlertid, var resultatene annerledes for de resterende frie aminosyrene. Konsentrasjon av histidin var relativt stabil gjennom hele fordøyelses forsøk, og var rundt 1,0 og 3,6 µg/ml henholdsvis i supernatanter fra fisk og kjøtt. Samme konsentrasjonsutvikling ble detektert for serin i fiskeprøver hvor mengden av serin var cirka 2,0 µg/ml. Til sammenligning var mengden av serin i kjøttprøve relativt stabil (rundt 8,0 µg/ml) frem til 40 min av fordøyelse. Ved tiden 60 min var mengden økt til 9,0 µg/ml, og

RESULTATER

etter ytterlige 20 minutter med inkubasjon ble den redusert til 6,5 µg/ml. Konsentrasjon av flertallet av de frie aminosyrene både i supernatant fra fisk og kjøtt ble redusert etter overgang til tarmfasen og forble omtrent like lav frem til forsøkets avslutning.

Tabell 8. Innhold av de frie aminosyrene (FAA, µg/ml) i supernatant ved hver prøveuttakstid under *in vitro* GI fordøyelse av rå fiskemuskel og rått kjøtt med redusert konsentrasjon av fordøyelsesenzymer (Forsøk 4). De essensielle aminosyrene er fremhevet med fet skrift. i.d. = ikke detektert. Asx = Totalt asparagin og asparaginsyre. Glx = Totalt glutamin og glutaminsyre.

FAA	Type råstoff og fordøyelsestid													
	0 min		20 min		40 min		60 min		80 min		100 min		120 min	
	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K
Ala	12,2	26,9	12,5	26,1	12,6	26,8	12,3	24,2	9,7	18,8	9,6	21,0	10,0	20,5
Arg	0,9	2,8	1,7	2,9	1,5	3,1	1,7	2,5	57,5	46,3	79,5	66,4	98,9	84,6
Asx	1,8	4,5	2,2	5,1	2,7	7,7	2,7	7,4	2,0	5,0	1,9	5,4	1,8	4,9
Cys	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
Phe	0,8	6,0	1,2	7,8	1,7	6,3	2,0	8,2	26,1	27,4	32,7	37,0	38,3	42,4
Glx	5,0	30,6	5,0	30,9	5,5	29,8	6,3	31,1	3,9	26,6	4,5	25,9	3,7	26,4
Gly	5,6	9,3	5,6	8,8	5,3	9,1	5,5	8,2	4,6	6,6	4,1	7,2	4,4	7,4
His	1,2	3,9	1,2	4,1	0,9	3,6	1,2	4,1	1,1	2,9	0,8	3,3	1,0	3,3
Hyp	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
Ile	0,8	6,1	0,6	7,3	0,2	6,3	0,7	5,8	0,2	3,9	0,1	4,5	0,1	4,5
Leu	3,0	12,8	4,0	14,4	4,5	13,3	5,8	13,3	15,2	21,9	19,4	25,4	23,2	29,1
Lys	2,5	2,5	2,4	2,7	2,9	2,3	2,9	1,9	14,2	10,6	19,4	16,9	26,0	22,6
Met	1,0	4,5	1,7	4,8	1,4	5,0	1,6	4,6	1,8	4,3	2,4	4,8	2,7	4,8
Pro	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
Ser	1,8	7,9	1,8	7,9	1,7	8,4	2,2	8,9	1,7	6,5	1,7	6,6	1,6	6,5
Tau	61,3	5,0	59,7	4,9	59,7	4,9	58,3	5,0	43,9	3,3	42,6	3,6	41,9	3,5
Thr	2,8	5,1	2,4	5,6	2,7	5,2	2,5	6,0	2,1	4,2	2,0	4,3	2,4	4,3
Tyr	0,5	i.d.	1,4	i.d.	0,9	i.d.	1,6	i.d.	13,8	13,9	18,6	18,1	23,0	21,4
Val	2,3	8,3	2,1	9,1	2,2	7,8	2,1	8,6	1,6	6,5	1,5	6,5	2,0	7,1
Totalt														
FAA	104	136	106	142	106	140	109	140	199	209	241	257	281	293

Generelt, hadde supernatanten fra kjøtt en høyere mengde av frie aminosyrer enn fisk gjennom hele fordøyelsesforsøk (Tabell 8). Et unntak her er taurin, arginin og lysin. Ved tiden 0 min var mengden av taurin i supernatanten fra fiskemuskel 61,3 µg/ml mot tilsvarende i kjøtt 5,0 µg/ml. I tillegg var mengden av taurin høyest sammenlignet med de resterende aminosyrene ved hver prøveuttakstid. Mengden av fritt arginin var høyere i fiskeprøver enn i kjøtt under hele tarmfasen. Konsentrasjon av lysin var omtrent lik i begge typer prøver under første delen av magefasen mens ved alle de senere uttak (40 – 120 min) var

RESULTATER

lysinkonsentrasjon høyere i supernatanten fra fisk enn fra kjøtt. Cystein, hydroksyprolin og prolin ble ikke detektert.

Tabell 9. Innhold av de totale aminosyrene (TAA, mg/ml) i supernatant ved hver prøveuttakstid under *in vitro* GI fordøyelse av rå fiskemuskel og rått kjøtt med redusert konsentrasjon av fordøyesesenzymmer (Forsøk 4). De essensielle aminosyrene er fremhevet med fet skrift. i.d. = ikke detektert. Asx = Totalt asparagin og asparaginsyre. Glx = Totalt glutamin og glutaminsyre.

TAA	Type råstoff og fordøyelsestid													
	0 min		20 min		40 min		60 min		80 min		100 min		120 min	
	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K
Ala	0,15	0,37	0,16	0,38	0,43	0,58	0,49	0,6	0,36	0,33	0,38	0,35	0,39	0,35
Arg	0,13	0,36	0,13	0,35	0,43	0,57	0,5	0,59	0,37	0,31	0,38	0,31	0,39	0,32
Asx	0,21	0,49	0,2	0,51	0,61	0,78	0,72	0,81	0,52	0,46	0,54	0,47	0,55	0,48
Cys	i.d.	0,06	i.d.	0,06	0,05	0,09	0,06	0,1	0,04	0,06	0,03	0,04	0,04	0,06
Phe	0,08	0,2	0,08	0,21	0,24	0,34	0,27	0,35	0,18	0,19	0,18	0,19	0,19	0,2
Glx	0,28	0,87	0,26	0,89	0,96	1,36	1,11	1,4	0,83	0,74	0,86	0,74	0,87	0,77
Gly	0,14	0,22	0,14	0,23	0,3	0,35	0,35	0,37	0,26	0,22	0,26	0,23	0,27	0,23
His	0,04	0,26	0,04	0,27	0,13	0,36	0,15	0,37	0,11	0,23	0,11	0,23	0,11	0,24
Hyp	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
Ile	0,07	0,26	0,07	0,28	0,31	0,38	0,34	0,4	0,2	0,19	0,25	0,2	0,26	0,2
Leu	0,19	0,51	0,17	0,54	0,58	0,75	0,65	0,78	0,45	0,41	0,49	0,42	0,5	0,43
Lys	0,22	0,57	0,22	0,59	0,66	0,87	0,76	0,91	0,56	0,51	0,59	0,52	0,61	0,52
Met	0,06	i.d.	0,05	0,03	0,19	0,08	0,23	0,09	0,15	0,01	0,15	i.d.	0,16	i.d.
Pro	0,08	0,18	0,08	0,18	0,23	0,3	0,27	0,33	0,22	0,19	0,2	0,21	0,2	0,21
Ser	0,1	0,22	0,09	0,23	0,30	0,36	0,35	0,38	0,25	0,22	0,26	0,21	0,26	0,23
Tau	0,06	i.d.	0,06	i.d.	0,05	i.d.	0,06	i.d.	0,05	i.d.	0,04	i.d.	0,05	i.d.
Thr	0,1	0,32	0,09	0,31	0,3	0,48	0,35	0,48	0,25	0,29	0,26	0,30	0,27	0,32
Tyr	0,07	0,19	0,07	0,21	0,24	0,31	0,28	0,32	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17
Val	0,11	0,28	0,1	0,29	0,34	0,47	0,39	0,49	0,28	0,27	0,28	0,28	0,29	0,28
Totalt														
TAA	2,09	5,36	2,01	5,56	6,35	8,43	7,33	8,77	5,24	4,79	5,42	4,87	5,06	5,01

Under *in vitro* fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt med redusert enzymkonsentrasjon var utviklingstrend i det totale innholdet av aminosyrer likt i begge typer prøver (Tabell 9). Den totale mengden av aminosyrer var lavest ved tiden 0 min, 2,1 og 5,4 mg/ml i prøver fra henholdsvis fiskemuskel og kjøtt, og forble omtrent like lav frem til og med inkubasjonstid 20 min. Ved dette tidspunktet ble pH justert til 2,0 og ved inkubasjonstid 40 min var den totale konsentrasjonen økt til 6,4 og 8,8 mg/ml henholdsvis i supernatant fra rå fiskemuskel og rått kjøtt. Den høyeste totale mengden av aminosyrer var oppnådd ved tiden 60 min i begge typer prøver. Deretter ble pH hevet til 7,0 og etter ytterlige 20 min med inkubasjon var konsentrasjonen redusert til 4,8 mg/ml i supernatant fra kjøtt og til 5,2 mg/ml i supernatant fra

fisk. Deretter var mengden av de totale aminosyrene omtrent like lav frem til forsøkets avslutning. Tilsvarende utviklingstrend ble registrert for hver enkelt total aminosyre. Mengden totalt lysin var lavest frem til prøveuttakstiden 20 min. Ved fordøyelsestid 40 min var konsentrasjon økt til 0,7 mg/ml i fiskeprøve og til 0,9 mg/ml i supernatant fra kjøtt. Den høyeste mengden lysin var detektert ved tiden 60 min, 0,8 og 0,9 mg/ml henholdsvis i supernatanter fra fisk og kjøtt. I starten av tynntarmsfase ble konsentrasjonen redusert til 0,6 mg/ml i fiskeprøve og 0,5 mg/ml i kjøttprøve og var cirka like lav frem til den siste prøveuttakstiden.

Under magefasen hadde kjøtt en høyere mengde av hver enkel aminosyre. Et unntak her er taurin som ble kun registrert i fiskeprøve gjennom hele fordøyelsesforsøk. Supernatanter fra fisk samlet under tarmfasen inneholdt større mengder av de fleste aminosyrer (utenom histidin og threonin) sammenlignet med kjøtt. Mengden av de totale fenylalanin, prolin, tyrosin og valin var omtrent like høyt i begge typer prøver gjennom hele tarmfasen.

5 Diskusjon

Innledningsvis ble næringsinnhold i seimuskel og ytrefilet av storfe bestemt. Innholdet i de analyserte prøvene stemte godt overens med verdier for sei og storfe publisert tidligere (Huss, 1995; Ruxton, 2011; Jensen *et al.*, 2014). Resultatene viste at seimuskel hadde høyere vanninnhold og lavere fettinnhold enn ytrefilet. Det er velkjent at vann og fettinnhold i muskel vanligvis til sammen utgjør 80 %, dvs. når fettinnhold øker så minker vanninnholdet. Det lave fettinnholdet i seimuskel har sin årsak i at sei er en mager fiskeart som lagrer fett hovedsakelig i leveren. Fett i muskel består i hovedsak av membranlipider, hvor mestepart utgjøres av fosfolipider. I tillegg, inneholder muskelbindevev fettceller, spesielt i mørk muskel, slik at små mengder av triglyserider kan også forekomme, særlig i muskel hos fisk med god fødetilgang. Blant torskefisker har sei mest pelagisk livsstil og har størst andel av mørk muskel.

Flere *in vitro* fordøyelsesforsøk ble gjennomført for å sammenligne hastigheten av proteinnedbrytning av sei- og storfemuskel. Både mengden frigjort protein og mengden TCA-løselig protein ble analysert. TCA-løselig protein er delvis nedbrutt protein med molekylvekt mindre enn cirka 10 kDa. I det innledende *in vitro* tarmfordøyelsesforsøket ble oppmalt muskel fra rå fisk og rått kjøtt hydrolysert med kommersielt pancreatin. Allerede ved det såkalt "0 - tidspunkt" (fordøyelsestid 0 min) ble det registrert en betydelig økning i mengden frigjort protein og nedbrutt protein (TCA-løselig protein). For førstnevnte var det 3 – 4x økning for både fisk og kjøtt når mengden tilsatt pancreatin tas hensyn til (Figur 11). For TCA-løselig protein var det en cirka 10x gang økning for begge typer prøver sammenlignet med kontroll (Figur 12). En årsak til denne forskjellen er at det antakelig er relativt lite lavmolekylære proteiner (MW < 10000 Da) i kontrollprøvene med kjøtt og fisk. Grunnen til at det har skjedd en betydelig hydrolyse av muskelprøvene ved tid 0 min er at det tar noen minutter før inaktiveringstemperatur for proteasene i pancreatin blir oppnådd. Et alternativ, med en mye mer omfattende metode for enzyminaktivering, kunne ha vært å tilsette en blanding (cocktail) av proteasehemmere på de forskjellige uttakspunktene. Med 5 uttakspunkt måtte 5 hydrolyseforsøk med for eksempel fisk ha blitt satt i gang. Ved tidspunkt 0 min måtte blandingen av proteasehemmere ha blitt tilsatt før enzym. Et alternativ til proteasehemmere kunne vært å inaktivere enzymene og felle protein med trikloreddisyre (TCA). En annen mindre tidskrevende metode som reduserer proteaseaktivitet betydelig er å avkjøle prøvene på is som vist senere i oppgaven (Forsøk 3).

Mengden frigjort protein målt med Lowrys metode vil ikke bare måle inntakt protein, men også hydrolysert protein. Som beskrevet i materialer og metoder vil kopper i Biuretreaksjon danne et purpurfarget kompleks med peptidbindinger i nabostillinger mens Folin Ciocalteus fenol reagensen reagerer med mengden aromatiske aminosyrer, hovedsakelig tyrosin og tryptofan.

Supernatant fra kjøtt hadde høyere konsentrasjon av løselig protein sammenlignet med fisk utover i hydrolyse (Figur 11). Tilsvarende ble også funnet for kontrollprøvene med bare muskel. Dette kan ha sin årsak i at kjøttet har i utgangspunkt høyere proteininnhold enn fiskemuskel. I tillegg har kjøtt generelt et noe høyere innhold av sarkoplasmatiske proteiner (de vannløselige proteiner) enn fiskekjøtt (Tabell 2). Hydrolyseforsøkene i denne oppgaven ble gjennomført på en statisk måte, dvs. etter en viss reaksjonstid oppstår det en likevekt mellom substratmengden og produkt (nedbrutt protein/aminosyrer) dannet. Dette kan være årsaken til at mengden TCA-løselig protein stabiliserer seg allerede etter 30 minutters hydrolyse (Figur 12). Når det gjelder frigjøring av protein fra muskelvev så ble det observert en svak økning også i perioden etter 30 minutters inkubasjon. Antakelig er dette et tegn på at mer og mer protein blir frigjort fra det oppmalte vevet etter hvert som inkubasjonen med røring blir lengere i tid.

Dynamiske *in vitro* fordøyelsesmodeller som etterligner mer *in vivo* situasjon har blitt utviklet (Guerra *et al.*, 2012). Disse kan til dels være kompliserte (Ménard *et al.*, 2014), men et hovedpoeng er at lavmolekylære stoffer, for eksempel aminosyrer, fjernes kontinuerlig fra inkubasjonsblandingen gjennom en membran. Derved vil produkthemming av fordøyelsesenzymene unngås. Det enkleste systemet vil være å la hydrolysen foregå i en dialyseslange med "cut – off" på MW 10000 Da, dvs. nedbrutt protein med molekylvekt på mindre enn 10000 Da vil fjernes fra reaksjonsblanding og mer inntakt protein vil bli brutt ned.

I Forsøk 2 ble *in vitro* fordøyelse av rå fisk og rått kjøtt gjennomført ved først å simulere magesfasen og deretter tynntarmfase. I første del av magesekkefasen (pH 4,0) ble det ikke detektert noen forskjell i frigjort protein mellom pepsinbehandlede prøver og de respektive kontrollprøvene (Figur 13). Årsaken til dette er at pepsin har lav aktivitet ved denne pH (Barret *et al.*, 1998). Samtidig ble det observert en svak økning i prøvene tilsatt enzym og i kontrollprøvene utover i denne delen av magesekkefasen. Dette er antakelig på grunn av at mer protein frigjøres fra den oppmalte muskelen etter hvert som røringen pågår.

Forandringene i frigjort protein fra kontrollprøvene gjennom hele fordøyelsesforsøk kan sannsynligvis forklares med isoelektrisk punkt til de sarkoplasmatiske proteinene (pI). Murray (1995) har rapportert at pI til disse proteinene i kjøtt er pH 6,0 – 7,0. Det er kjent at

løseligheten til proteiner er lavest ved pH lik det pI og at den øker jo større avstand det blir mellom pH i kjøttet og pI til proteinene i kjøttet. Ved ekstrem sur pH (pH 1,0) vil imidlertid intakte proteiner denatureres og felle ut.

Når pH reduseres fra 4,0 til 2,0 ved tidspunkt 20 min, skjer en betydelig økning i mengden frigjort protein. Den største økningen er i de pepsinbehandlede prøvene. Årsaken er at pepsin bryter ned vevsproteiner, inkludert sannsynligvis også myofibrillproteiner, og fører til frigjøring av delvis nedbrutte proteiner eller intakte proteiner. Ved å sammenligne økningen i oppløst protein fra fiskeprøven og fra kjøttprøven fra tidspunkt 20 min til 60 min, så kan det synes som at prosessen skjer raskere hos førstnevnte. Forklaringen kan være at fisk inneholder mindre tungt nedbrytbart kollagen.

I tynntarmfasen, fra 60 min til 120 min, skjer det tilsynelatende ingen økning i mengden oppløst protein. Faktisk reduseres konsentrasjonen og dette forklares med tilsatt mengde fosfatbuffer for å øke pH. At det nå er blitt en stor forskjell mellom pepsinprøvene og kontrollprøvene kan forklares med at de førstnevnte er delvis nedbrutt, noe som gjør at de ikke felles så ut når pH er i nærheten av pI.

Resultatene fra måling av TCA-løselig protein for hele hydrolyseforøket (Figur 14) lignet i stor grad resultatene oppnådd ved måling av total proteinkonsentrasjon. Disse målingene viste imidlertid at det skjer en nedbrytning av protein til peptider i magesekkefasen ved pH 4,0. Det mest interessante imidlertid at nedbrytningen av protein målt som TCA-løselig protein skjer raskere i første del av fordøyelsen (tid: 0 - 40 min) i fisk enn i kjøtt. Som tidligere nevnt så kan forskjellen i mengden i bindevev være med å forklare dette.

Flere faktorer slik som konsentrasjon, temperatur, pH, stabilitet, aktivatorer, inhibitorer og inkubasjonstid, vil påvirke aktiviteten til enzymer (Boisen & Eggum, 1991). En viktig faktor er også forholdet mellom substrat og enzym. I Forsøk 2 ble det detektert at proteinhydrolyse i fiskeprøver var noe stagnert allerede i den andre delen av magefasen (Figur 14). For en bedre sammenligning av frigjøring og nedbrytning av protein fra fisk og kjøtt ble konsentrasjon av tilsatte enzymer redusert. I tillegg ble det målt en høy mengde frigjort og nedbrutt protein allerede i starten av Forsøk 1 og 2 (tid 0 min). Det er ikke sikkert at enzymkonsentrasjon brukt innledningsvis er av fysiologisk mengde. Mindre mengder enzym vil antakelig lettere kunne påvise forskjeller i hydrolysehastighet.

En tidskrevende oppvarming av prøver ble benyttet for inaktivering av de tilsatte enzymene. Et mindre hydrolyseforsøk (Forsøk 3 i Metoder og resultater) med 10x redusert enzymkonsentrasjon samt en ekstra og enklere enzyminaktiveringsmetode ble gjennomført. Hver prøve fra rå fiskemuskel ble avkjølt på is umiddelbart etter prøveuttak. Mengden frigjort

protein ble målt og resultater viste at det ikke var forskjeller i frigjort protein mellom de to metodene (Figur 15). Det ble imidlertid ikke målt mengden nedbrutt protein. I de neste forsøkene ble det valgt å bruke den lavere enzymkonsentrasjonen og oppvarming for inaktivering av enzymer.

Frigjøring av protein ved lavere konsentrasjon (Figur 16) lignet i stor grad proteinfrigjøringen detektert ved 10x høyere konsentrasjon. Dette gjelder både enzymbehandlede prøver og kontrollprøver. Imidlertid var økningen etter nedjustering av pH til 2,0 noe større i fiskeprøver (3,2x) i dette forsøket enn det som ble detektert (2,6x) ved hydrolyse med høyere enzymkonsentrasjon (Figur 13). Det førte til et høyere innhold av oppløst protein i fisk enn i kjøtt i slutten av magesekkefasen og forskjellen var mer tydelig også under tarmfasen. Det høyere proteininnholdet i fiskeprøver i slutten av magefasen ble også registrert i form av TCA-løselig protein (Figur 17). Faktisk så økte mengden nedbrutt protein også etter overgang til tarmfasen både i prøver fra hydrolysert fisk og kjøtt. Hydrolysen i fiskeprøver var tilsynelatende stagnert først etter 100 minutters inkubasjon mens tilsvarende for kjøtt var registrert ved forsøkets avslutning (120 min). Når hele fordøyelsesforsøket vurderes så er det tydelig at fisk brytes raskere enn kjøtt. Årsaken til dette ble ikke studert nærmere, men som det ble nevnt tidligere kan bindevevsinnhold i muskel ha sin skyld i det. Som antatt førte den reduserte enzymkonsentrasjonen til et mer tydelig skille i fordøyeshastighet av fisk og kjøtt.

Det er sjelden at man spiser rå fisk eller rått kjøtt til middag. Om det er lettere å fordøye varmebehandlet fisk enn kjøtt ble fokusert i neste forsøk (Forsøk 5). Innledende ble et hydrolyseforsøk gjennomført med kun varmebehandlede fisk og kjøtt. Resultatene viste at generelt hydrolysemønster var lik det som ble funnet i de forrige forsøkene. Ved pH 4,0 var konsentrasjon av løselig protein omtrent like høy i prøver tilsatt pepsin og de respektive kontrollprøvene (Figur 18). Imidlertid var mengden frigjort protein i alle typer prøver mye lavere enn det var målt i det forrige forsøket. Den sannsynlige årsaken til redusert løselighet er denaturering av proteinene gjennom varmebehandlingen.

I motsetning til de forrige forsøkene ble frigjøring av proteiner i dette forsøket detektert både ved pH 2,0 og pH 7,0. Imidlertid var proteinfrigjøring i den andre delen av magesekkefasen mer intensiv enn det ble registrert utover i tarmfasen. Totalt under magefasen var konsentrasjonsøkning av oppløst protein høyere i fiskeprøver (15x) enn i kjøttprøver (8x). Økningen var også større i begge typer prøver i dette forsøket enn det var under hydrolyse av rå fisk og rått kjøtt (Figur 16). Den sterke økningen i mengde frigjort protein i begge typer prøver kan sannsynligvis forklares ved at denaturering fører til en åpnere proteinstruktur som

gjør det lettere for fordøyelsesenzymer hydrolysere peptidbindinger. I tillegg kan man også anta at etter lengre røring under inkubasjon økte proteinløselighet, noe som var tilsynelatende i begge typer kontrollprøver (tid: 20 – 60 min).

Resultatene for TCA-løselig protein viste at nedbrytning av det denaturerte proteinet øker med inkubasjonstid både i prøver fra hydrolysert fisk og kjøtt (Figur 19). Den største økningen i nedbrutt protein skjedde under pepsinhydrolyse etter nedjustering av pH til det optimale for pepsin (pH 2,0) i begge typer prøver. Økningen var noe høyere i prøver fra varmebehandlet kjøtt enn fra fisk, sannsynligvis som et resultat fra det høyere proteininnholdet i utgangspunktet i kjøtt enn i fisk. Imidlertid var ytterligere konsentrasjonsøkning i kjøttprøver svakere enn i fiskeprøver (tid: 80 – 120 min). Faktisk var proteininnholdet i fiskeprøver 2,5x høyere 20 min etter overgang til tarmfasen enn det var registrert i slutten av pepsinhydrolyse. Dette førte til et godt tydelig skille mellom prøvene, hvor mengden nedbrutt protein var høyere i fiskeprøver enn i kjøttprøver. Basert på disse resultatene kan en anta at proteiner fra varmebehandlet fisk er lettere nedbrytbar enn denaturerte kjøttproteiner og nedbrytning skjer også i høyere grad i tarmfasen.

Forsøket med fordøyelse av varmebehandlede og ikke-varmebehandlede produkter ble gjentatt og fisk og kjøtt ble sammenlignet direkte (Figur 20 og 21). Allerede ved tiden 0 min kunne man se en skille mellom varmebehandlede og rå produkter. Nemlig inneholdt prøver fra varmebehandlede fisk og kjøtt cirka 8x mindre frigjort protein enn korresponderende prøver fra rå produkter (Figur 20). Årsaken er som nevnt tidligere at proteinløselighet ble redusert etter proteindenaturering forårsaket av varmebehandling. Mengden nedbrutt protein var omtrent like lav i både prøver fra rå produkter og prøver fra varmebehandlet råstoff i første del av magefase (Figur 21). Dette bekrefter at pepsin virker like dårlig på både rå og varmebehandlede prøver ved pH 4,0.

Det som er mest interessant at for de varmebehandlede prøvene så øker både mengden frigjort protein som også inneholder nedbrutt protein, og mengden TCA-løselig protein i tarmfasen. Ved forsøkets avslutning var mengden frigjort protein høyst i prøve fra varmebehandlet fisk sammenlignet med de resterende prøver (Figur 20). Økningen i mengde nedbrutt protein var størst for fiskeprøver og ved tiden 80 min var konsentrasjon av TCA-løselig protein større i fiskeprøven enn i kjøtt (Figur 21).

Som oppsummering kan en si at *in vitro* fordøyelse av rå og varmebehandlede prøver viser et forskjellig forløp. De rå prøvene inneholder vannløselige proteiner og disse bryter hurtigere ned til peptider i magefasen. De varmebehandlede prøver brytes også ned i tarmfasen. Som tidligere observert så brytes fiskeprøvene lettere enn kjøttprøvene.

Som det framgår av resultatene (Tabell 6) fra aminosyreanalyse så foreligger mesteparten av aminosyrene bundet i protein, bare 1 % finnes i fri form. Unntaket er taurin som ikke finnes bundet i protein. Det bekreftes også at fisk er en god kilde for denne aminosyren sammenlignet med kjøtt. Denne aminosyren har som nevnt blitt foreslått å ha positive helseeffekter (Militante & Lombardini, 2004; Bouckennooghe *et al.*, 2006).

Den høyere konsentrasjonen av prolin og hydroxyprolin i kjøtt kan forklares ut fra et høyere innhold av bindevev sammenlignet med fisk. Det totale innholdet av aminosyrer i kjøtt sammenlignet med fisk forklares ut fra et litt høyere innhold av protein i førstnevnte produkt. Det relative innholdet av de essensielle aminosyrene er likt i begge typer produkt.

Proteininnholdet i både kjøtt og fisk beregnet ut fra det totale aminosyreinnhold ble funnet å være betydelig lavere enn ved Kjeldals metode. Det er flere årsaker til dette. Med Kjeldals metode måler man det totale innholdet av nitrogen. Man antar at protein inneholder 16 % nitrogen og dermed multipliserer man mengden nitrogen med 6,25 for å få mengden protein. Det blir en overestimering fordi andre molekyler enn aminosyrer inneholder også nitrogen. Eksempler er nukleinsyrer og fosfolipider. Nitrogeninnholdet i ulike proteiner vil også variere og Mariotti *et al.* (2008) har foreslått at en faktor på 5,6 er mer riktig å bruke på kjøtt og fisk.

Det er også kjent at aminosyre tryptofan ødelegges helt under hydrolysen med 6 M HCl. Andre aminosyrer som serin, cystein og treonin reduseres noe (Creighton, 1984). Det betyr at proteininnholdet beregnet ut fra det totale innholdet av aminosyrer blir for lavt.

Innholdet av frie og totale aminosyrer ble analysert i supernatantene fra hydrolyseforsøket beskrevet i punkt 4.2.4 i Resultatene (Forsøk 4). Mengden frie aminosyrer var lav og konstant for både kjøtt og fisk frem til pH ble justert til 7,0 (tidspunkt 60 min). I tarmfasen var det en generell økning av frie aminosyrer. Resultatene viste at ikke alle aminosyrer økte i konsentrasjon i tarmfasen. Dette kan være forårsaket av ulik spesifisitet til tarmenzymene. For eksempel kan noen aminosyrer først bli spaltet av peptider i tarmveggen og derfor vil ikke de bli detektert i vårt *In vitro* system med pancreatin. Resultatene tyder også på at fiskekjøttet hydrolyserer lettere enn kjøtt. Forholdet mellom frie aminosyrer i fisk og kjøttprøvene er ved starten av forsøket (tid 0 min) lik 0,76 mens ved 120 min er det 0,96.

Det totale aminosyreinnholdet i supernatantene under hydrolysen (tidspunkt 0, 20, 40, 60, 80, 100 og 120 min) er vist i tabell 9. Disse stemmer godt overens med det som observeres ved å måle proteinkonsentrasjon med Lowrys metode (Figur 16).

Økning i det totale aminosyreinnholdet skjer først når pH blir justert til 2,0. Dette registreres ved tidspunkt 40 min. Ved overgang til tarmfasen ble konsentrasjon av totale

aminosyrer redusert på grunn av fortynning akkurat som observert ved måling med Lowrys metode.

6 Konklusjon

Flere interessante resultater ble funnet i oppgaven. I magesekkkfasen med bruk av pepsin ved pH 4,0 var liten eller ingen frigjøring av protein eller nedbrytning av protein. Først når pH ble senket til 2,0 økte løseligheten av protein samtidig med at mengden TCA-løselig protein økte kraftig. Dette skjedde i hovedsak i løpet av de første 20 min etter at pH var blitt redusert. Det ble ikke dannet frie aminosyrer i løpet av pepsinhydrolysen verken ved pH 4,0 eller 2,0.

Ved høy konsentrasjon av fordøyelsesenzymer foregikk nedbrytningen av rå produkter i hovedsak i magesekkkfasen. Ved lavere konsentrasjon foregikk nedbrytning av protein i større grad også i tarmfasen. Dersom man ønsker å studere nedbrytningshastighet av forskjellige typer mat vil bruk av redusert enzymkonsentrasjon anbefales.

Resultatene viste at rå produkter ble brutt ned raskere enn varmebehandlede produkter. Årsaken er antakelig at proteinene denatureres ved varmebehandling og derved er de mindre tilgjengelig for hydrolyse tidlig i fordøyelsen. De varmebehandlede produktene brytes i større grad ned i tarmfasen enn de rå produktene. Analyse av frie aminosyrer ble bare gjennomført på rå produkter og resultatene viste at disse dannes i tarmfasen.

Forsøkene i oppgaven både med bruk av rå og varmebehandlede produkter viste at proteinene i seimuskel ble lettere brutt ned enn proteiner i storfekjøttet. Sannsynligvis skyldes dette et høyere innhold av bindevev i kjøtt enn i fisk. Dette ble også bekreftet ved analyse av aminosyreinnholdet i kjøtt og fisk. Resultatene fra aminosyreanalysene bekreftet at fisk er en god kilde for taurin sammenlignet med kjøtt.

Dannelsen av TCA-løselig protein vil antakelig kunne gi et mer presist bilde av hydrolyseforløpet enn endring av mengde frigjort protein i denne typen *in vitro* fordøyelsesforsøk.

6.1 Videre studier

I videre *in vitro* studier av gastrointestinal fordøyelse bør bruk av triklorediksyre benyttes for å stoppe reaksjon på ønskede tidspunkt. Ved bruk av en slik teknikk vil resultater for tidspunkt 0 min og andre uttakstidspunkt blir mer presist. Måle metodene for nedbrytning av protein vil kunne være TCA-løselig protein og frie aminosyrer. Bruk av en dynamisk hydrolysemodell hvor frie aminosyrer og lavmolekylære peptider fjernes fra likevekten bør også vurderes.

7 Referanseliste

- Alexander, J., Frøyland, L., Hemre, G., Jacobsen, B. K., Lund, E., Meltzer, H. & Skåre, J. U. (2006). Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk kosthold. *Vitenskapskomiteen for mattrygghet*.
- AOAC (1983). *Crude protein in meat. Block digestion method*. Metode 981.10.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.-F. & Alpérovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia. The Three-City cohort study. *Neurology*, **69**, 1921-1930.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, F. J. (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic press, London, England.
- Bernstein, A. M., Pan, A., Rexrode, K. M., Stampfer, M., Hu, F. B., Mozaffarian, D. & Willett, W. C. (2012). Dietary protein sources and the risk of stroke in men and women. *Stroke*, **43**, 637-644.
- Berr, C., Akbaraly, T., Arnaud, J., Hininger, I., Roussel, A.-M. & Gateau, P. B. (2009). Increased selenium intake in elderly high fish consumers may account for health benefits previously ascribed to omega-3 fatty acids. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, **13**, 14-18.
- Boisen, S. & Eggum, B. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, **4**, 141-162.
- Bouckenooghe, T., Remacle, C. & Reusens, B. (2006). Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **9**, 728-733.
- Bourre, J.-M. (2007). Dietary omega-3 fatty acids for women. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **61**, 105-112.
- Coulter, T. P. (2009). *Food. The Chemistry of its Components. 5th Edition*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Creighton, T. E. (1984). *Proteins. Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Damodaran, S. (2008). Amino Acids, Peptides, and Proteins. I: S. Damodaran, K. L. Parkin & O. R. Fennema (red.). *Fennema's Food Chemistry. 4th Edition*. Kap. 5, CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
- De Caterina, R. (2011). n-3 Fatty acids in cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, **364**, 2439-2450.
- Dressman, J. B. (1986). Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharmaceutical Research*, **3**, 123-131.
- Dunajski, E. (1980). Texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*, **10**, 301-318.
- Dyerberg, J., Bang, H., Stoffersen, E., Moncada, S. & Vane, J. (1978). Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *The Lancet*, **312**, 117-119.
- Elvevoll, E. O., Eilertsen, K.-E., Brox, J., Dragnes, B. T., Falkenberg, P., Olsen, J. O., Kirkhus, B., Lamglait, A. & Østerud, B. (2008). Seafood diets: Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids. *Atherosclerosis*, **200**, 396-402.
- Eskin, N. M., Aliani, M. & Shahidi, F. (2013). Meat and fish. I: N. M. Eskin & F. Shahidi (red.). *Biochemistry of Foods. 3rd Edition*. Kap. 3, Academic Press, San Diego, USA.
- Espe, M. & Lie, Ø. (2001). Kvalitet. I: R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre & Ø. Lie (red.). *Fiskeernæring*. Kap. 16, Kystnæringen Forlag og Bokklubb AS, Bergen, 270-283.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C. & Hultin, H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. I: O. R. Fennema (red.). *Food Chemistry. 3rd Edition*. Kap.15, Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- Fox, T., Van Den Heuvel, E., Atherton, C., Dainty, J., Lewis, D., Langford, N., Crews, H., Luten, J., Lorentzen, M. & Sieling, F. (2004). Bioavailability of selenium from fish,

- yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 343-349.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, **30**, 591-600.
- Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M. & Harris, K. A. (2008). Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Current Atherosclerosis Reports*, **10**, 503-509.
- Hendriksen, S. R., Wekre, L. L. & Paus, B. (2006). Ehlers-Danlos' syndrom-diagnostikk og subklassifisering. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, **126**, 1903-1907.
- Hibbeln, J. R., Davis, J. M., Steer, C., Emmett, P., Rogers, I., Williams, C. & Golding, J. (2007). Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *The Lancet*, **369**, 578-585.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper. no. 348*
- Jensen, I.-J., Abrahamsen, H., Maehre, H. K. & Elvevoll, E. O. (2009). Changes in antioxidative capacity of saithe (*Pollachius virens*) and shrimp (*Pandalus borealis*) during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 10928-10932.
- Jensen, I.-J., Dort, J. & Eilertsen, K.-E. (2014). Proximate composition, antihypertensive and antioxidative properties of the semimembranosus muscle from pork and beef after cooking and in vitro digestion. *Meat Science*, **96**, 916-921.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. & Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, **23**, 165-176.
- Kong, F. & Singh, R. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, **73**, R67-R80.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A. & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**, 99-104.
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A., Seppola, M. A. & Olsen, R. L. (2006). Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, **37**, 1556-1564.
- Krogdahl, Å. (2001). Fordøyelsessystemet hos kaldvannfisk - oppbygging og funksjon. I: R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre & Ø. Lie (red.). *Fiskeernæring*. Kap. 1, Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS, Bergen.
- Kromhout, D. (2012). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease. The final verdict? *Current opinion in lipidology*, **23**, 554-559.
- Landmark, K. & Alm, C. S. (2012). Fisk og omega-3-fettsyrer ved hjertesvikt. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, **132**, 2281-2284.
- Lawrie, R. A. & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's meat science. 7th Edition*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265.
- Lund, E. K. (2013). Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? *Food Chemistry*, **140**, 413-420.
- Lynum, L. (2005). *Fisk som råstoff. 2.utgave*. Tapir Akademisk Forlag, Trondheim.
- Mariotti, F., Tomé, D. & Mirand, P. P. (2008). Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**, 177-184.

- McClements, D. J. & Decker, E. (2009). *Designing functional foods: Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*. Woodhead Publishing LTD, Cambridge, England.
- McClements, D. J. & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, **1**, 32-59.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D. & Picque, D. (2014). Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, **145**, 1039-1045.
- Militante, J. D. & Lombardini, J. B. (2004). Dietary taurine supplementation: hypolipidemic and antiatherogenic effects. *Nutrition Research*, **24**, 787-801.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L. & Wilson, R. S. (2005). Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Archives of Neurology*, **62**, 1849-1853.
- Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Journal of the American Medical Association*, **296**, 1885-1899.
- Mozaffarian, D. & Wu, J. H. (2011). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, **58**, 2047-2067.
- Nasjonal Råd for Ernæring. (2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer*. Helsedirektoratet, Oslo.
- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., Boutron-Ruault, M.-C., Kesse, E., Boeing, H., Bergmann, M. M., Nieters, A., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tountas, Y., Berrino, F., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H. M., Engeset, D., Lund, E., Skeie, G., Ardanaz, E., Gonzales, C., Navarro, C., Quiros, J. R., Sanchez, M.-J., Berglund, G., Palmqvist, R., Day, N. E., Khaw, K.-T., Key, T. J., San Joaquin, M., Hemon, B., Saracci, R., Kaaks, R. & Riboli, E. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, **97**, 906-916.
- Oken, E., Østerdal, M. L., Gillman, M. W., Knudsen, V. K., Halldorsson, T. I., Strøm, M., Bellinger, D. C., Hadders-Algra, M., Michaelsen, K. F. & Olsen, S. F. (2008). Associations of maternal fish intake during pregnancy and breastfeeding duration with attainment of developmental milestones in early childhood: a study from the Danish National Birth Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **88**, 789-796.
- Ouellet, V., Marois, J., Weisnagel, S. J. & Jacques, H. (2007). Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, **30**, 2816-2821.
- Pedersen, J. I., Müller, H., Hjartåker, A. & Andersen, S. A. (2012). *Grunnleggende ernæringslære*. Gyldendal Norsk Forlag AS, Oslo.
- Roos, N., Wahab, M. A., Chamnan, C. & Thilsted, S. H. (2007). The role of fish in food-based strategies to combat vitamin A and mineral deficiencies in developing countries. *The Journal of Nutrition*, **137**, 1106-1109.
- Ruxton, C. (2011). The benefits of fish consumption. *Nutrition Bulletin*, **36**, 6-19.
- Rylander, C., Sandanger, T. M., Engeset, D. & Lund, E. (2014). Consumption of lean fish reduces the risk of type 2 diabetes Mellitus: A prospective population based cohort study of norwegian women. *PloS One*, **9**, e89845.

- Sala-Vila, A. & Calder, P. C. (2011). Update on the relationship of fish intake with prostate, breast, and colorectal cancers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**, 855-871.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy & physiology: the unity of form and function. 5th Edition*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Schiepers, O., De Groot, R., Jolles, J. & Van Boxtel, M. (2010). Fish consumption, not fatty acid status, is related to quality of life in a healthy population. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **83**, 31-35.
- Sinha, R., Cross, A. J., Graubard, B. I., Leitzmann, M. F. & Schatzkin, A. (2009). Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people. *Archives of Internal Medicine*, **169**, 562-571.
- Strasburg, G., Xiong, Y. L. & Chiang, W. (2008). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. I: S. Damodaran, K. L. Parkin & O. R. Fennema (red.). *Fennema's food chemistry. 4th Edition*. Kap. 16, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Terry, P., Lichtenstein, P., Feychting, M., Ahlbom, A. & Wolk, A. (2001). Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *The Lancet*, **357**, 1764-1766.
- Torfadottir, J. E., Valdimarsdottir, U. A., Mucci, L. A., Kasperzyk, J. L., Fall, K., Tryggvadottir, L., Aspelund, T., Olafsson, O., Harris, T. B., Jonsson, E., Tulinius, H., Gudnason, V., Adami, H.-O., Stampfer, M. & Steingrimsdottir, L. (2013). Consumption of fish products across the lifespan and prostate cancer risk. *PloS One*, **8**, e59799.
- Vikøren, L. A., Nygård, O. K., Lied, E., Rostrup, E. & Gudbrandsen, O. A. (2013). A randomised study on the effects of fish protein supplement on glucose tolerance, lipids and body composition in overweight adults. *British Journal of Nutrition*, **109**, 648-657.
- Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (2006). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. 10th Edition*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Ytrebø, L. M., Kristiansen, R. G., Mæhre, H., Fuskevåg, O. M., Kalstad, T., Revhaug, A., Cobos, M. J., Jalan, R. & Rose, C. F. (2009). L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology*, **50**, 165-174.