

Notat

Opsummering af resultater fra screeningsforsøg for bioaktivitet i hydrolysater fra okse og kalv.

Lene Meinert

Baggrund

Der er stigende fokus på bioaktivitet, da flere naturligt forekommende molekyler som f.eks. peptider har vist sig at have forskellige bioaktiviteter herunder sundhedsfremmende aktiviteter (blodtrykssænkende, kræfthæmmende mv.) samt antioxidative – og antimikrobielle aktiviteter. Der mangler dog viden omkring bioaktiviteter for peptider udvundet fra kød og restprodukter. Oprensning af peptider er en ressourcekrævende og dyr proces, og samtidig er oprensning ikke en nødvendighed i forhold til anvendelse. Hydrolysater kan anvendes i sin helhed, dog vides det så ikke, hvilke peptider, der er virksomme i hydrolysater. Dette synes imidlertid mindre væsentligt, da bioaktiviteten kan påvises på hydrolysat-niveau.

Formål

Det er formålet at screene en række hydrolysater baseret på okse- og kalve råvarer med fokus på anvendelse af restprodukter for bioaktivitet: Antioxidativ -, antimikrobiel - samt blodtryksregulerende aktivitet.

Analyser

Hydrolysaterne er blevet analyseret med følgende metoder:

1. Antimikrobiel aktivitet med agar diffusionsassay på *Listeria monocytogenes*, *Salmonella adabraka* og *Escherichia coli*
2. Blodtrykssænkende aktivitet med ACE-assay
3. Antioxidativ aktivitet med hhv. Clark elektrode og DPPH

Hydrolysater

Hydrolysaterne blev fremstillet af DAT-Schaub. Under enzymatisk (alcalase) hydrolyse af kalveråvarer, blev der opsamlet hydrolysat til forskellige hydrolysetider for at undersøge, hvorvidt aktiviteterne ændres i forhold til hydrolysetid.

Resultater

I det følgende vil hovedresultaterne af de forskellige screeninger blive præsenteret. Resultater fra samtlige screeningundersøgelser er vedlagt i Bilag 1-3.

Antimikrobiel aktivitet

Der blev gennemført systematiske screeninger for antimikrobiel aktivitet (Bilag 1) for svinehydrolysater (2011), og ingen af hydrolysaterne udviste antimikrobiel aktivitet. Det samme resultat var også gældende for kommercielle hydrolysater (DAT-Schaub produkter) samt test af hydrolysat af hhv. kalve/okse råvarer og kylling. Da ingen hydrolysater udviste antimikrobiel aktivitet, og da aktiviteten heller ikke kunne påvises i fiskehydrolysater, blev screeningen for antimikrobiel aktivitet afsluttet. Derfor er der ikke gennemført systematiske analyser for okse- og kalvehydrolysater.

Blodtryksregulerende aktivitet

ACE er et centralt enzym i blodtryksregulering, og et aktivt ACE-enzym fører til forhøjet blodtryk. Derfor er det interessant at påvise ACE-hæmmende effekt i hydrolysaterne, hvormed et forhøjet blodtryk vil kunne sænkes.

I tabel 1 er de råvarer vist, som udviste de højeste ACE-inhiberende aktiviteter (se Bilag 2 for alle resultater).

Tabel 1. Udvalgte hydrolysater med de højeste ACE-aktiviteter.

Hydrolysat	IC ₅₀ mg tørstof/ml
<i>Okse (10 timer hydrolyse)</i>	
Nyretapper	4
Lunge	3
Mellemgulv	3
Hjerte	5
Tunge	4

Det skal bemærkes, at der ikke er en fastsat grænseværdi for, hvornår et hydrolysat har høj aktivitet og dermed kan anvendelsespotentialitet ikke vurderes alene på disse værdier og ud fra teoretiske betragtninger. Men der kan være praktiske fordele i at skulle tilsætte en mindre mængde hydrolysat til f.eks. et kødprodukt, dog øger hydrolysaterne også samtidig proteinindholdet af kødproduktet

Antioxidativ aktivitet

Der findes mange forskellige måder at måle antioxidant aktivitet på. DMRI har anvendt følgende assays:

Clark elektrode: Elektroden registrerer iltforbrug over passende intervaller ved oxidation af methyl linoleat (umættet fedtsyre). Det vil sige, at et hydrolysat med antioxidant aktivitet vil bremse oxidationen af methyl linoleat.

DPPH er et stabilt frit radikal, der har en dyb violet farve med absorptionsbånd omkring 520 nm. Blandes DPPH-radikalet med et molekyle, der kan donere et brintatom, dannes den ufarvede, reducerede form. Farvetabet er udtryk for hydrolysatets antioxidative aktivitet. Resultatet sættes i forhold til trolox, som er en velkendt antioxidant.

Tabel 2. Udvalgte hydrolysater med de højeste antioxidative aktiviteter målt med Clark. Alle resultater kan ses i Bilag 3.

Råvare	mM Trolox (100 % tørstof)
<i>Okse (hydrolyse i 10 timer)</i>	
Nyre	204
Lever	79
Yver	53

Det ses umiddelbart af tabel 2, at oksenyre har iøjefaldende høj antioxidativ aktivitet – og også væsentlig højere end de øvrige hydrolysater. Det vides ikke, om der er en sammenhæng med den lange hydrolysetid.

Tabel 3. Udvalgte hydrolysater med de højeste antioxidative aktiviteter målt med DPPH. Resultatet er korrigeret til 20 mg. Tørstof og angivet som et gennemsnit af trippelbestemmelse. Alle resultater er vist i Bilag 3.

Råvare	% inhibering
Trolox	13,9
<i>Okse (hydrolyse i 10 timer)</i>	
Pancreas	54,9
Yver	16,2
Milt	15,8

Det kan ses af tabel 3, at hydrolysatet af pancreas er væsentlig mere effektivt end den kendte antioxidant (standard) Trolox, mens yver og milt ligger på niveau med Trolox.

Antimikrobiel aktivitet af hydrolysater af svineråvarer

Råvare	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella adabraka</i>	<i>Escherichia coli</i>	Bemærkning
Pancreas	-	-	-	pH=7,73
Krustarm	-	-	-	pH=7,81 lugt af gris
Fedtende	-	-	-	pH=7,62
Mucosa	-	-	-	pH=7,89
Bundende	-	-	-	pH=8,04 lugt af gris
Svinekoteletter	-	-	-	pH=5,0
Svinelever	-	-	-	pH=6,1
Hjerne	-	-	-	pH=6,78
Hjerte	-	-	-	pH=6,58
Testikler	-	-	-	pH=7,32
Lunge	-	-	-	pH=6,94
Tunge	-	-	-	pH=6,45
Blodigt halsrens	-	-	-	pH=7,36
Milt	-	-	-	pH=7,48
Nyre	-	-	-	pH=8,0
Lever	-	-	-	pH=7,24
Strube	-	-	-	pH=7,68

Antimikrobiel aktivitet af hydrolysat af andre råvarer

Råvare	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella adabraka</i>	<i>Escherichia coli</i>	Bemærkning
Kalvelever	-	-	-	pH=5,8
Oksebøffer	-	-	-	pH=5,0
Kyllingelever	-	-	-	pH=6,1
Kyllingefilet	-	-	-	pH=5,8

Blodtryksregulerende aktivitet (ACE) for **oksehydrolysater** (hydrolyseret i 10 timer / 600 min). Resultatet angiver den mængde hydrolysat, der skal anvendes til at inhibere ACE enzymet med 50 % (IC₅₀). Aktiviteten er omregnet i forhold til tørstof, da dette mål er mere præcist (jo lavere værdi desto højere aktivitet). Aktiviteten for nyretapper, lunge, mellemgulv, hjerte og tunge er fremhævet med rødt, da disse hydrolysater udviser højest aktivitet.

Hydrolysat	TS w/w%	ACE IC₅₀, mg hydrolysat/ml	IC₅₀ omregnet til tørstof, mg/ml
Nyretapper	10,1	40	4
Livmoder	9,0	165	15
Lunge	11,4	22	3
Mellemgulv	9,4	35	3
Struber	10,0	97	10
Morløse	7,3	196	14
Nyre	7,8	752	59
Lever	14,2	47	7
Yver	7,0	105	7
Penis	9,1	154	14
Hjerte	8,9	55	5
Pancreas	15,1	72	11
Tunge	9,2	48	4
Milt	13,7	Kunne ikke analyseres	

Antioxidativ effekt for **oksehydrolysater** (hydrolyseret i 10 timer) målt med Clark. Resultatet er korrigeret for indhold af tørstof i hydrolysaterne. Jo højere værdi desto højere aktivitet.

Råvare	Clark				
	% tørstof (TS)	Omregnet til mM Trolox	korrigeret til 100% TS, mM trolox	min	max
Nyretapper	10,1	2,4	24	21	28
Morløse	7,3	3,2	44	22	50
Mellemgulv	9,4	2,7	29	26	33
Strube	10,0	3,5	35	31	39
Livmoder	9,0	1,8	20	16	24
Lunge	11,4	4,0	35	29	42
Nyre	7,8	15,9	204	162	258
Lever	14,2	11,2	79	63	99
Yver	7,0	3,7	53	44	63
Penis	9,1	1,6	18	11	25
Hjerte	8,9	1,0	11	8	17
Pancreas	15,1	2,2	15	10	21
Tunge	9,2	2,5	27	23	35
Milt	13,7	2,7	20	16	26

Antioxidativ effekt for **okse-** og **kalvehydrolysater** (hydrolyseret i 10 timer) målt med **DPPH**. Resultatet er korrigeret for indhold af tørstof i hydrolysaterne (pr. 20 mg tørstof) og er et gennemsnit af en trippelbestemmelse. Jo højere værdi desto højere aktivitet. Oksepancreas udviste en særlig høj aktivitet efterfulgt af yver og milt. Aktivitet i kalveprøverne lå på et generelt lavere niveau.

Hydrolysat	% inhibering	Std.afv.
Okse		
Nyretapper	11,0	0,1
Mørløse	9,4	0,3
Mellemgulv	9,7	0,6
Strube	8,3	0,2
Livmoder	8,8	0,1
Lunge	12,7	0,3
Nyre	9,2	0,3
Lever	14,7	0,3
Yver	16,2	0,0
Penis	10,4	0,2
Hjerte	10,0	0,1
Pancreas	54,9	0,6
Tunge	10,2	0,5
Milt	15,8	0,1
Kalv		
Hjerte	8,9	0,3
Lever	9,4	0,1
Tunge	12,6	0,2
Nyretapper	13,3	0,2
Pancreas	9,1	0,27