

## Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL).

Delrapport for AP2, AP3 og AP4

Tone Aspevik, Mari Øvrum Gaarder, Sileshi Wubshet, Peter Molesworth, Katinka Dankel, Ingunn Berget, Lars Thoresen, John-Erik Haugen, Runar Gjerp Solstad, Birthe Vang, Wilhelm Glomm, Diana Lindberg





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

Nofima har om lag 370 ansatte.

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

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

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

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<i>Tittel:</i> <b>Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL). Delrapport for AP2, AP3 og AP4</b>	ISBN 978-82-8296-672-6 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)	<i>Rapportnr.:</i> 8/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> T. Aspevik, M. Ø. Gaarder, S. G. Wubshet, P. Molesworth*, K. Dankel, I. Berget, L. Thoresen, J.-E. Haugen, R.G. Solstad, B. Vang, W. Glomm*, D. Lindberg (PL). * fra SINTEF Industri.	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Avdeling:</i> Råvare og prosess	<i>Dato:</i> 15.februar.2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 47
<i>Stikkord:</i> Enzymatisk proteinhydrolyse, makrell, verdiøkning, limvann, smaksmaskering, membranfiltrering, pelagisk løft	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901534
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Hovedmålet med det FHF-finansierte prosjektet SMELL har vært å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinprodukt basert på proteinhydrolysat og limvann fra makrellavskjær. Prosjektpartnere er Nofima, SINTEF Industri og Pelagia. Denne delrapporten rapporterer arbeid fra arbeidspakke 2-4, inkludert prosessoptimalisering, bioanalytisk og sensoriske forsøk samt smaksmaskering. Fra AP1 ble Foodpro PNL valgt til videre arbeid. Under prosessoptimaliseringen ble både limvann fra Pelagia og hydrolysat produsert i pilotskala, membran- og nanofiltrert for å optimalisere produktene. Resultatene viste at mikrofiltrering er effektiv for å fjerne partikler og fettrester, og at nanofiltrering er gunstig for å redusere askeinnhold, øke proteininnhold og betraktelig redusere innhold av TMA/TMAO i produktene. Sensorisk analyse viste at nanofiltrert hydrolysat hadde en tilsvarende lavere smaksintensitet og redusert fiskesmak. Sensoriske data har også blitt koblet mot biokjemiske data med avansert statistiske metoder. Resultatene viste at det er mulig å forutsi sensoriske attributter, eksempelvis bitterhet og nivåer av bitterhet, samt smaksattributter koblet til fett- og proteinoksidasjon, gjennom statistisk metodikk som kobler sammen sensoriske data med e.g. NMR og GC/MS data. Prosjektet viste at det er mulig å produsere et hydrolysat med akseptabel smak i pilotskala, men at videre arbeid trengs for å nå hovedmålet, et smaksnøytralt proteinprodukt for humant konsum, i industriell skala.	<i>Prosjektnr.:</i> 12754
<i>English summary/recommendation:</i> This is the second report from the project Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL), covering WPs 2-4. SMELL has been an FHF-financed project with project partners Nofima, Pelagia and Sintef Industry, with the main aim to develop a process for producing a taste-neutral protein concentrate, preferably for human consumption. The project has developed and relied on an extensive bioanalytical and sensory platform to solve this task. This report presents results from process optimization (up- and downstream), sensory and bioanalytical data as well as sensory masking. Although we report promising results from small scale production, further work is needed to reach the main aim at an industrial scale.	

## **Forord**

Denne rapporten er en del av FHF prosjekt 901534 – Smaksnøytrale proteiner fra makrell (SMELL) ledet av Nofima med prosjektpartnere fra SINTEF Industri og Pelagia. Prosjektet hadde oppstart våren 2019 og ble avsluttet høsten 2020. Denne rapporten omhandler arbeidet som er utført i arbeidspakke (AP) 2, AP3 (kjemiske analyser) og AP4 (sensoriske analyser). Deler av resultater rapportert for analysepakkene i AP3 og AP4 omhandler forsøk som ble utført i AP1 (Solstad et al. 2020)

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (både på norsk og engelsk)</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b> .....	<b>8</b>
3.1	Leveranse i forhold til resultatmål .....	10
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b> .....	<b>12</b>
4.1	Materiale .....	12
4.2	Pilotskala hydrolyse og behandling av limvann (Task 2.1) .....	12
4.3	Maskering av smakskomponenter (Task 2.2).....	13
4.4	Oppskalering hos Biotep (Task 2.3).....	13
4.5	Analyse av løselige komponenter (Task 3.1) .....	13
4.5.1	Nuclear Magnetic Resonance (NMR) .....	13
4.5.2	Size-Exclusion Chromatography (SEC).....	14
4.5.3	Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	14
4.6	Analyse av flyktige komponenter (Task 3.2) .....	14
4.7	Spesifikk identifisering av smakskomponenter (Task 3.3) .....	14
4.8	Statistiske analyser (Task 3.4).....	14
4.9	Sensoriske analyser .....	15
4.9.1	Sensorisk rangering (Task 4.4).....	16
4.9.2	Sensorisk vurdering av maskerte produkter (Task 4.5).....	16
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b> .....	<b>17</b>
5.1	Kjemiske og sensoriske analyser av hydrolysatfraksjoner produsert i pilot-skala .....	17
5.1.1	Pilot skala hydrolyse (Task 2.1) .....	17
5.1.2	Sensorisk rangering av hydrolysat (Task 4.4) .....	20
5.2	Kjemiske og sensoriske analyser av limvannsfraksjoner produsert i pilot-skala.....	22
5.2.1	Sensorisk rangering av limvann.....	23
5.3	Analyse av flyktige komponenter i hydrolysat- og limvannsfraksjoner (Task 3.2).....	23
5.4	Analyse av flyktige komponenter fra AP1 (Task 3.2).....	26
5.4.1	Flyktige komponenter fra screening forsøk (AP1) 1) .....	<b>Feil! Bokmerke er ikke definert.</b>
5.5	Analyse av løselige komponenter (Task 3.1) .....	31
5.5.1	NMR .....	31
5.5.2	Analyse av størrelsesseparasjonsdata fra SEC .....	33
5.5.3	FTIR (fra protease-screeningforsøk i AP1).....	35
5.6	Kjemisk og sensorisk evaluering av maskerte hydrolysater .....	36
5.6.1	Maskering av smakskomponenter (Task 2.2).....	36
5.6.2	Sensorisk vurdering av maskerte hydrolysater (Task 4.5).....	<b>Feil! Bokmerke er ikke definert.</b>
5.7	Industriell-skala produksjon ved Biotep (Task 2.3) .....	42
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>Vedlegg 1</b> .....	<b>46</b>

## 1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Hovedmålet med det FHF-finansierte prosjektet «Smaksnøytrale proteiner fra makrell» (SMELL) har vært å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinprodukt basert på proteinhydrolysat og limvann fra makrellavskjær, for humant konsum i første omgang, og til *petfood* i andre omgang. Nofima og prosjektpartnere SINTEF Industri og Pelagia har i løpet av prosjektet brukt en avansert bioanalytisk- og sensorisk plattform for prosjektgjennomføring. Denne delrapporten rapporterer arbeid fra arbeidspakke 2-4, inkludert prosessoptimalisering, bioanalytisk og sensoriske forsøk samt smaksmaskering. Fra AP1, rapportert i en tidligere rapport, ble enzymet Foodpro PNL valgt til videre arbeid. Under arbeid i AP2-4 har videre prosessoptimalisering blitt utført på proteinhydrolysat produsert i pilot skala, samt limvann fra Pelagia. Mikro- og nanofiltrering ble gjennomført for å optimalisere produktene. Resultatene viste at mikrofiltrering er effektivt for å fjerne partikler og fettrester, og at nanofiltrering er egnet for å redusere askeinnhold, øke proteininnhold og betraktelig redusere innhold av TMA/TMAO i produktene. Sensorisk analyse viste at nanofiltrerte produkter hadde en tilsvarende lavere smaksintensitet og redusert fiskesmak. Sensoriske data har også blitt koblet mot biokjemiske data med avansert statistiske metoder. Resultatene viser at det er mulig å forutsi sensoriske attributter, eksempelvis bitterhet og nivåer av bitterhet samt smaksattributter koblet til fett- og proteinoksidasjon, gjennom avansert statistisk metodikk som kobler sammen sensoriske data med e.g. NMR og GC/MS data. Prosjektet viser at det er mulig å produsere et hydrolysat med akseptabel smak i pilotskala, men at videre arbeid trengs for å nå hovedmålet, et smaksnøytralt proteinprodukt for humant konsum, i industriell skala.

The main goal of the FHF-financed project “Taste-neutral proteins from mackerel” (SMELL) was to develop a process for production of a taste-neutral protein product, preferably for human consumption and petfood in second hand. During the project, Nofima and project partners SINTEF Industry and Pelagia have used an advanced bioanalytical- and sensory platform to reach this goal. In WP1, reported in a previous report, the enzyme Foodpro PNL was selected for further work. This project report covers WPs 2-4, and includes work in process optimization, bioanalytical and sensory trials, and taste masking. During this work, further process optimization to optimize the products was performed on protein hydrolysate produced in pilot scale and stickwater from Pelagia, using micro- and nanofiltration. Results show that microfiltration can remove particles and remnant lipid, and that nanofiltration of the products reduces ash, increases protein levels and significantly reduces the amount of TMA/TMAO. Sensory evaluations show that the nanofiltrated products exhibit a corresponding reduction in taste intensity and a reduced fishy taste. Using statistical approaches, sensory data has been coupled with bioanalytical data. Results show that it is possible to predict sensory attributes, such as bitterness and level of bitterness as well as sensory attributes associated to fat- and protein oxidation, through statistical analysis of e.g. sensory data to NMR and GC/MS data. Even though work from SMELL shows promising results from small/pilot scale production, further work is needed to be able to reach the main aim, a taste-neutral protein product for human consumption, at industrial scale.

## 2 Innledning

FHF har sammen med industri og forskningsmiljøer i løpet av de siste årene arbeidet systematisk og målrettet med utvikling av kunnskap og teknologi for økt utnyttelse av makrell i satsingen «Pelagisk løft – økt bearbeiding av makrell». En del av satsingen dreier seg om bedre utnyttelse av restråstoffet etter filetering av makrell. I dag foredles bare 2–4 % av landet makrell til filet, og den resterende delen på ca. 350 000 tonn eksporteres ut av landet rundfrosset. Dette innebærer at en stor del av verdiøkningen basert på både råstoff og avskjær (såkalt «restråstoff») fra makrell går tapt for Norge. SMELL er første prosjektet som fokuserer på økt verdiskaping av proteinprodukter til humant konsum fra makrellrestråstoff.

Resultatet fra tradisjonell fiskeolje- og fiskemelproduksjonsprosess er en oljefase, grakse, samt en vannfase kalt limvann. Limvann består hovedsakelig av vannløselige proteiner, frie aminosyrer og andre vannløselige komponenter. Limvannet inneholder proteiner av god ernæringsmessig kvalitet med mange bruksområder, der de høyest betalende er markedene rettet mot humankonsum og *petfood*. Enzymatisk proteinhydrolyse (EPH) gir også olje av god kvalitet og en vannfase, hydrolysat, med delvis nedbrutte proteiner, såkalte peptider. Fordelen med en hydrolyseprosess er et høyere proteinutbytte i vannfasen og mulighet til å produsere peptider av forskjellig størrelse.

Det er mulig å oppnå høy verdiskaping av marine proteinprodukter dersom man produserer peptider med bioaktivitet, slik som blodtrykkshemmere og redusering av kolesterolnivåer. Slike peptider kan selges som verdifulle ingredienser i eksempelvis funksjonell mat og nutraceuticals. Fordelen med EPH er at det er en mildere prosess som kan føre til mindre oksidasjon og bedre prosesskontroll ettersom man bruker kjent enzym og hydrolysetid. Dette kan resultere i proteinprodukter med mer akseptabel smak og lukt sammenlignet med en tradisjonell fiskeolje/mel prosessering. På grunnlag av dette ønsket prosjektgruppen i SMELL å fokusere på bruk av EPH for gjennomføring av prosjektet, men det er også inkludert noe arbeid på limvann.

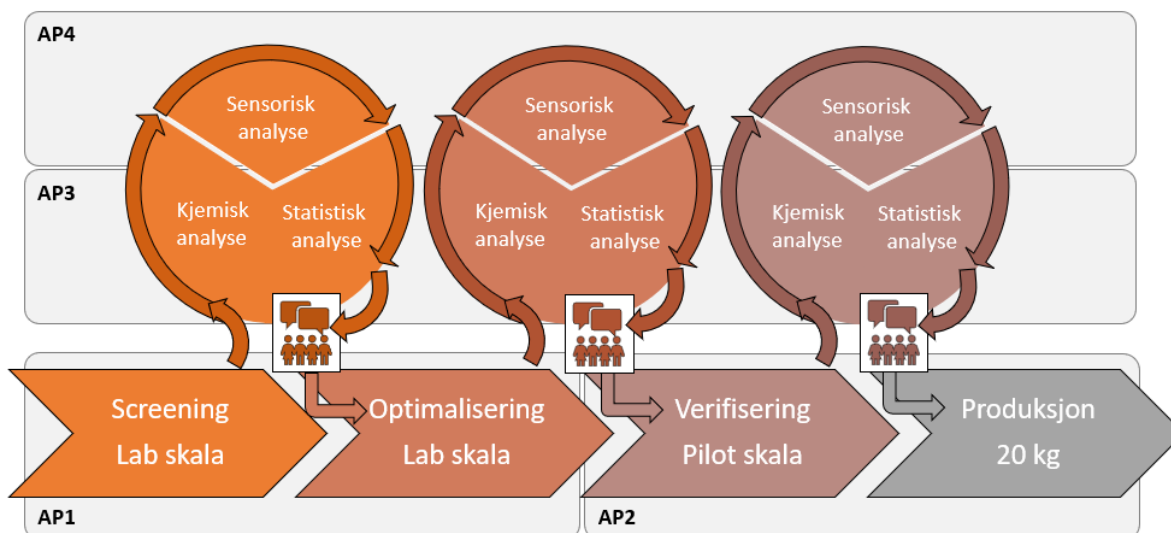
Prosjektgruppen består av forskere og representanter fra Nofima AS, SINTEF Industri og Pelagia. Referansegruppen består i rapporteringsøyeblikket av Lars R. Lovund (FHF), Ola Flesland (tidl. Vedde/999, nå Pelagia), Alexander Krokedal Rønnevik (Pelagia), Jon Vestengen (Pelagia) og Diana Lindberg (Nofima).

### 3 Problemstilling og formål

Det kan forventes smaksutfordringer i proteinfraksjoner fremstilt fra restråstoff av makrell ettersom pelagiske arter er karakterisert av en intens lukt og smak. Makrell er videre en fet fisk, med høyt innhold av flerumettede fettsyrer. Disse fettsyrene er spesielt utsatt for oksidasjon som raskt fører til dannelse av sekundære flyktige komponenter med ubehagelig lukt og smak. I tillegg er makrell ekstra utsatt for autolytisk nedbryting der fiskens egne enzymer bryter ned protein og fett med dannelse av komponenter som kan bidra til negativ smaksopplevelse. Et kjent eksempel er aminosyreoksidasjon (peptid/protein oksidasjon), og bakteriell nedbryting av trimetylaminoksid (TMAO) til trimetylamin (TMA), som fører til en sterk fiskelukt.

Tidligere erfaring viser at valg av protease har stor innvirkning på endelig smak i et hydrolysat (Aspevik et al., 2016a). Samtidig vil valg av enzym påvirke prosesskostnadene (Aspevik et al., 2016b). Det er kjent at små peptider med hydrofobe aminosyrer kan gi bitterhet. Dette er en stor utfordring knyttet til hydrolysater fra både fisk og skalldyr (Kim and Li-Chan, 2006; Aspevik et al., 2016a). En annen kjent utfordring i hydrolysat er oksidasjonsprodukter, både vannløselige og flyktige, som kan dannes av både (gjenværende) fett og aminosyrer.

Det overordnede prosjektmålet i SMELL var å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinkonsentrat fra makrellavskjær for humant konsum i første omgang, og til *petfood* i andre omgang. For å nå dette målet er SMELL bygget opp med en tverrfaglig og iterativ tilnærming. Prosjektet består av fire arbeidspakker, AP 1-4, som jobber sammen i en iterativ prosess for å kunne lære fra tidligere trinn under smaksopptimalisering (Figur 1).



Figur 1. SMELL er bygget opp i en iterativ prosess. Hvert trinn i prosjektet evalueres med hjelp av avansert statistisk analyse, basert på resultater fra en rekke kjemiske og sensoriske teknikker. Resultater evalueres og neste trinn planlegges i samråd mellom alle arbeidspakkeledere med bred fagkompetanse, slik at optimal utnyttelse av tid og ressurser sikres.

Første runde i dette iterative prosjekt ble utført i AP1 (Solstad et al 2020). Målet med AP1 var å finne en eller flere proteaser som ga høyt utbytte, best mulig smak, og dessuten hadde industrielt relevant pris. Dette inkluderte en screening av 10 forskjellige proteaser på makrellavskjær, og en optimalisering av hydrolyseprosessen av noen få utvalgte proteaser. Videre ble det undersøkt om fraksjonering ved



bruk av nanofiltrering kunne gi hydrolysat med bedre smak grunnet fjerning av lavmolekylære forbindelser som bidrar til bitterhet og andre uønskede smakskomponenter. Dette inkluderer også aske som tidligere studier har vist at proteinhydrolysater fra makrellråstoff er særlig rikt på (Aspevik et al 2021). I AP1 ble nanofiltrering med en cut-off på rundt 1000 Da ble testet, og produktene ble sendt til sensorisk og kjemisk vurdering og sammenlignet med produkt uten filtrering. En cut-off på 1000 Da er i mange tilfeller litt stort og det var et ønske om å teste effekten av lavere cut-off i AP2.

Maskering av komponenter som har uønsket smak er et spennende nytt fagfelt som er blitt inkludert i SMELL. I AP1 ble derfor effekten av smaksmaskering evaluert på hydrolysatfraksjonene som både var mest smaksnøytrale, samt de med høyest smaksintensitet, utført. Basert på arbeidet i AP1 ble proteasen FoodPro PNL valgt ut til videre iterative runder i prosjektet. Dette inkluderer pilot og industrielt skala arbeid (AP2) samt arbeid i AP3 og AP4, det vil si kjemisk, statistisk og sensorisk analyse, som beskrevet i denne rapporten.

#### **Delmål for AP2**

- Oppskalere prosessen fra AP1 og bruke membranfiltrering for å fjerne smaks- og luktkomponenter fra hydrolysat og limvann
- Validere maskeringsforsøkene fra AP1
- Fremstille et prøveparti på 20 kg til smaks- og markedstest

#### **Delmål for AP3**

- Utvikle analytiske metoder for å karakterisere flyktige komponenter i proteinhydrolysater fra makrell.
- Utvikle analytiske metoder for å karakterisere løselige komponenter i proteinhydrolysater fra makrell.
- Bruk av statistiske metoder for å korrelere kjemiske karakterisering med sensorisk evaluering

#### **Delmål for AP4**

- Bruke standardiserte sensoriske metoder med trent sensorisk panel for å karakterisere smak og lukt.
- Undersøke enzymatisk proteinhydrolyse samt prosessering av limvann for å få best mulig smak.
- Karakterisere smak og lukt for maskerte hydrolysater.

### 3.1 Leveranse i forhold til resultatmål

#### **AP2. Optimalisering av limvann- og hydrolysatfiltrering i pilotskala og smaksnøytralisering ved spraytørking**

**Pilotskala prosessering av hydrolysat og limvann (T2.1).** Hydrolyse og av makrellrygger ble oppskalert i Nofimas Aquafeed Technology Centre (ATC) pilothall i Bergen. Hydrolysat og limvann ble mikro- og nanofiltrert for å fjerne henholdsvis fett og partikler, og små smaksgivende komponenter.

**Tørking og maskering av limvann og hydrolysatfraksjoner (T2.2).** Effekten av ulike fraksjoner og maskeringsmidler ble evaluert i spraytørking av hydrolysat og limvann. De maskeringskomponentene som ga best resultat i AP1 ble brukt for å evaluere reproduserbarhet i pilotskalaproduksjonen. De sensoriske egenskapene til produktene fra 2.2 ble evaluert i AP4, og utvalgte produkter ble karakterisert nærmere i AP3.

**Semi-industriell produksjon av proteinpulver (T2.3).** Den prosessen som, på bakgrunn av lab- og pilotskalaprosessering (AP1 og AP2), kjemiske og spektrometriske analyser (AP3) og sensorisk evaluering (AP4), ble vurdert som mest lovende ble oppskalert ved Nofimas nasjonale anlegg for marin bioprosessering (Bioteq).

#### **AP3. Analytiske metoder for verifisering av lukt- og smakskomponenter**

**Kjemisk fingeravtrykk av løselige komponenter (T3.1).** Hydrolysatfraksjoner fra AP1 ble analysert ved bruk av eksklusjonskromatografi/gelfiltrering (SEC), infrarød spektroskopi (FTIR) og NMR-spektroskopi. Disse kjemiske fingeravtrykkene ble deretter korrelert med resultatene fra de sensoriske analysene (AP4).

**Kjemisk fingeravtrykk av flyktige komponenter (T3.2).** Sammensetningen av flyktige lukt- og smakforbindelser i de produserte hydrolysatene ble analysert ved bruk av dynamic headspace-gas chromatography mass spectrometry (DHS-GC/MS). Resultatene ble korrelert med data fra de sensoriske analysene i AP4.

**Spesifikk identifisering av smakskomponenter (T3.3).** Fraksjonene fra AP1 ble dybde-karakterisert for å identifisere komponenter som kan korreleres med spesifikke sensoriske egenskaper (f.eks. bitterhet). SEC analyse ble benyttet for å fraksjonere bestanddelene i hydrolysatet etter ulik molekylær størrelse, hvilket bidrar til spesifikk isolering og karakterisering. Ettersom fraksjonene som er blitt analysert ved bruk av LC-MS/MS og MS/MS ikke er brukbare i sensoriske tester er sekvensering av smaksrelevante peptider ikke gjennomført. Dette førte også til at T4.2 (Sensorisk evaluering av fraksjoner) ikke ble gjennomført. En alternativ tilnærming ble i stedet brukt, der molekylvektbasert fraksjonering av SEC diagrammer og multivariat statistikk ble brukt for å korrelere molekylvekten til peptidfraksjoner med smaksattributter.

**Multivariat statistikk (T3.4).** Forsøksdesign, ANOVA og prinsipalkomponentanalyse ble brukt for å forstå hvordan råstoff og prosess variabler påvirker kjemisk og sensorisk karakterisering av protein hydrolysater.

#### **AP4. Sensoriske analyser for kartlegging av best egnet sluttprodukt for humant konsum**

**Sensorisk screening av lab-skala hydrolysater (T4.1).** Hydrolysater fra AP1 ble sensorisk evaluert av trent panel ved bruk av projective mapping for å detektere smaksforskjeller ved bruk av ulike proteaser.

**Sensorisk profilering (T4.3).** Selekterte hydrolysater fra T4.1 ble analysert ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA) for å identifisere effekten av ulike proteaser og filtereringssteg i prosessen.

**Sensorisk rangering, pilotskala (Task 4.4).** Utvalgte kritiske sensoriske egenskaper ble rangert opp mot kommersielt produkt for å gi svar på om vi er på samme nivå i smaksintensitet som tilsvarende produkter som er akseptert på markedet.

**Sensorisk profilering med maskerte hydrolysater, pilotskala (T4.5).** Maskerte hydrolysater ble evaluert for sensorisk profilering.

## 4 Prosjektgjennomføring

### 4.1 Materiale

Makrellrygger ble hentet hos Pelagia, Selje i begynnelsen av oktober 2019 og oppbevart på frys (-22 °C) frem til hydrolyse i midten av februar 2020. Råstoff ble kværnet vha en Comitrol. Limvann ble sendt frosset fra Pelagia, Måløy og oppbevart på frys (-20 °C; ca 1 mnd) før prosessering. Enzymet FoodPro PNL ble fremskaffet fra Dupont Danisco.

### 4.2 Pilotskala hydrolyse og behandling av limvann (Task 2.1)

I hydrolyseprosessen ble kværnet råstoff og vann blandet 1:1 i en 200 liter hydrolysetank. Hydrolysen ble utført ved 55 °C i 60 min, før inaktivering (T>90 °C, 10 min) og deretter separert i en Flottweg trikanter. Råhydrolysat (etter trikanter) og rålimvann (fra Pelagia) ble behandlet likt i nedstrømsprosesseringen. Produktene ble først mikrofiltrert vha et keramisk filter (0,1 µm; MT Separation, Flekkefjord, Norge) og deretter nanofiltrert gjennom en spiralmodul (ca 200 Da; Membranteknikk, Flekkefjord, Norge). Etter prosessen satt vi igjen med «Crude» fraksjon (permeat etter mikrofiltrering) og «Retentat» og «Permeat» fraksjoner (etter nanofiltrering) (Tabell 1).

Tabell 1 Oversikt over hydrolysat- og limvannsprodukter produsert i Task 2.1

Prøvenavn	Prosess	Fryseteknologi	Filtrering
(S)H-Crude	Hydrolyse	Spraytørking	Før nanofiltrering
(S)H-Retentat	Hydrolyse	Spraytørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
(F)H-Crude	Hydrolyse	Frysetørking	Før nanofiltrering
(F)H-Retentat	Hydrolyse	Frysetørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
(F)H-Permeat	Hydrolyse	Frysetørking	Permeat (<200 Da) etter nanofiltrering
L-Crude	Limvann	Frysetørking	Før nanofiltrering
L-Retentat	Limvann	Frysetørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
L-Permeat	Limvann	Frysetørking	Permeat (<200 Da) etter nanofiltrering

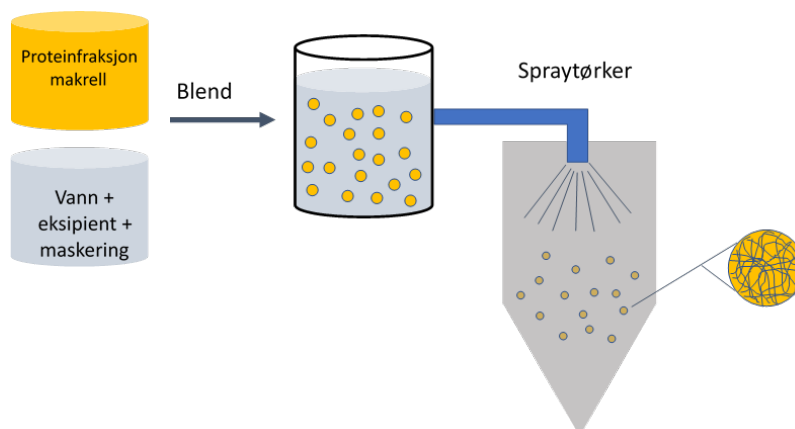
Flytende H-Crude og H-Retentat ble sendt til SINTEF for maskeringsforsøk i Task 2.2. Kjemiske analyser av produktene ble gjennomført av BioLab (Tabell 2). De sensoriske egenskapene til produktene ble evaluert i AP4, og utvalgte produkter ble karakterisert nærmere i AP3.

Tabell 2. Oversikt over kjemiske analyser brukt i prosjektet

Analyse	Referanse
Nitrogen (Kjeldahl)	ISO 5983-2
Fett	Bligh and Dyer (1959)
Aske	ISO 5984-2
Tørrstoff	ISO 6496-2
Molekylvektfordeling	Wang-Andersen & Haugsgjerd (2011)
Aminosyresammensetning	Cohen & Michaud (1993)
Frie aminosyrer	Bidlingmeyer et al. (1987)
TMA/TMAO	Conway & Byrne (1933)
Biogene aminer	Mietz & Karmas (1978)

### 4.3 Maskering av smakskomponenter (Task 2.2)

Smaksmaskering i AP2 bygget videre på arbeid fra AP1 (Solstad et al 2020) og maltodekstrin og myseprotein ble brukt som maskeringsagent (Figur 2). En eksipient, gum arabic ble brukt for å binde sammen maskeringsagent og hydrolysat. I tillegg ble det gjort noen forsøk med pH-justering med sitronsyre for å evaluere effekt på 1) reduksjon av utfordringer med flyktige aminforbindelser og 2) å forbedre bindingen mellom hydrolysat/maskeringskomponent og eksipienter/bindingsmaterialer. To ulike konsentrasjoner av maskeringskomponenter i forhold til hydrolysatet, høyt (4:1) og lavt (1:1), ble benyttet i forsøkene. Konsentrasjonen av materialer til binding og pH-justering ble holdt konstant gjennom forsøkene på henholdsvis 10 wt% og 2,5 wt%.



Figur 2. Oversikt over smaksmaskeringsforsøket, hvor proteinfraksjon (hydrolysat) og maskeringsagent blir blandet sammen og spraytørket.

### 4.4 Oppskalering hos Biotep (Task 2.3)

Nytt råstoff ble fremskaffet oktober 2020 og sendt til Biotep. 1400 kg råstoff og vann ble blandet 1:1 og hydrolysert i 60 min ved 55 °C før inaktivering ( $T > 90$  °C, 10 min) og deretter separert i en trikanter. Hydrolysatet ble deretter mikrofiltrert (0,1  $\mu\text{m}$ ; Alfa-Laval, Danmark) og nanofiltrert (ca 200 Da; Alfa-Laval, Danmark) før spraytørking. Kjemiske analyser ble utført av Nofima Biolab.

Utbytte av spraytørket nanofiltrert produkt ble beregnet fra følgende ligning:

$$\text{Utbytte (\%)} = \frac{\text{Spraytørket hydrolysat (kg)}}{\text{Råstoff (kg)}} \times 100\%$$

### 4.5 Analyse av løselige komponenter (Task 3.1)

#### 4.5.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

$^1\text{H}$  NMR-eksperimentene ble utført med en Bruker Avance 400 MHz-magnet ved 298K.  $^1\text{H}$  kjemiske skift ble beregnet relativt til internstandarder TMSP. NMR-dataene ble prosessert i programvaren Bruker TopSpin versjon 3.2.. Hydrolysatene ble løst i  $\text{D}_2\text{O}$  med TMSP som internstandard, og  $^1\text{H}$  NMR-spektrene ble tatt opp i tre tekniske replikaer. Spektrene ble pre-prosessert ved å fjerne residualvanntoppen og redusere antall datapunkter. En prinsipalkomponentanalyse (PCA) av

spektrene ble utført på normaliserte spektre, og scoreverdiene til de første tre komponentene ble brukt til å kartlegge prøvene.

#### **4.5.2 Size-Exclusion Chromatography (SEC)**

SEC-analyser (*Size Exclusion Chromatography*) ble utført med et Thermo Fischer Scientific Dionex Ultimate 3000 HPLC-instrument utstyrt med en UV-absorpsjonsdetektor med deteksjon ved 214 nm. En SEC BioSep-s2000-kolonne fra Phenomenex ble anvendt med mobilfasen bestående av 30 % acetonitril, 0.05 % trifluoreddiksyre og 70 % vann. Hydrolysatene ble løst i vann og filtrert gjennom 0.45 µm sprøytefiltre før analysene. Kromatogrammene ble brukt som "fingeravtrykk" uten videre preprocessing i multivariate analyser.

#### **4.5.3 Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR)**

FTIR spektra ble tatt opp ved hjelp av et Tensor 27 spectrometer (Bruker Optics, Germany) koblet til en High-Throughput-Screening-Extension (HTS-XT) enhet styrt av OPUS v6.5 programvaren. Spektra ble samlet inn i transmisjon fra 4000 to 400 cm<sup>-1</sup>, 4 cm<sup>-1</sup> oppløsning, en apertur av 5.0 mm og et totalt antall av 40 scans. Før hver prøve ble det tatt et bakgrunnspektrum av den 96-brønn IR-transparente Si-platen. Av hver prøve ble det tatt fem replikat spekter. Spektraene ble pre-prosessert ved 2. derivivering (Savitzky Golay 2. order, 9 pt) og EMSC, og det ble tatt gjennomsnitt over de 5 replikatene før data analyse og sammenligning med de sensoriske egenskapene.

### **4.6 Analyse av flyktige komponenter (Task 3.2)**

Analyse av flyktige komponenter ble utført med HeadsSpace GC/MS. Oppsamling av flyktige forbindelser fra 1 ml hydrolysat ble foretatt automatisk etter inkubering ved 70 °C i 10 minutter på adsorbentør med aktivt kull (Tenax GR, kornstørrelse 60/80 mesh) i 2 minutter med 100 ml/min. Gassprøven ble overført ved termisk desorpsjon til en gasskromatograf (Agilent 6890 GC) med en Agilent 5973 Masseselektiv detektor i elektron ionisasjon (EI) modus med 70 eV ionisasjonsenergi og måling av positive ionefragmenter. Forbindelsene ble separert på en polar DB-WAXetr gasskromatografi kolonne fra J & W Scientific/Agilent (0,25 mm i.d., 0,5 µm film, 30 m). Helium ble brukt som bærergass. Identifikasjon av forbindelsene ble bekreftet ved sammenligning av de målte massespektraene av GC-toppene med de rene standarder i henhold til NIST014 massespektralbiblioteket (versjon 2, 2005, US handelsminister/Agilent).

### **4.7 Spesifikk identifisering av smakskomponenter (Task 3.3)**

SEC-kromatogrammer fra Task 3.1 ble delt inn i 7 forskjellige molekylvektsregioner. Multivariat korrelasjon (iPLS) av disse 7 regionene sammen med sensorisk data ble utført. Molekylvektsregion(er) med høy korrelasjon med sensorisk data ble identifisert som mulige fraksjoner ansvarlig for den relaterte sensoriske attributten.

### **4.8 Statistiske analyser (Task 3.4)**

**Pre-prosessering:** For flyktige komponenter ble bare forbindelser målt i mer enn 75% av prøvene inkludert i statistiske analyser, og 39 forbindelser passerte dette kriteriet. Data for flyktige komponenter og SEC ble sentrert og standardisert før multivariate analyser, sensoriske data kun

sentrert. SEC data ble kuttet i enden slik at bare retensjons tid mellom 8 og 15 minutter ble brukt i analysene da det var ingen variasjon før/etter disse tidene.

**Multivariat ANOVA:** Effekt av forsøksfaktorene (enzym, enzymkonsentrasjon og hydrolysatfraksjon) på flyktige komponenter, SEC, FTIR og sensorikk ble undersøkt ved hjelp av multivariat ANOVA; mer spesifikt ASCA (ANOVA simultaneous component analysis, Jansen et al 2005), 50-50 manova (Langsrud 2002) og PC\_ANOVA (Luciano and Næs, 2009). Disse metodene har litt forskjellige egenskaper, og vil i de fleste tilfeller gi sammenlignbare resultat, men kan avvike noe fra hverandre i situasjoner med ubalanserte data og når normalantagelsene ikke er oppfylt, noe som kan være tilfelle her. Mens ASCA gir muligheter for visualisering av resultater, kan 50-50 manova kombineres med rotasjonstester (Langsrud 2005) for å teste effekt på enkelt variables. Data fra screening forsøk i AP1 (Solstad et al 2020) ble delt opp i tre del-analyser der hver del ble sett på som et faktorielt forsøk med faktorer. Oppdelingen var for å sikre balanse i estimering av modellene, noen prøver inngikk i flere analyser.

- Del 1: Enzymer (EndoCut, FoodPro-PNL), konsentrasjon (0.1, 0.5) og fraksjon (AP1-Retentat, AP1-Permeat, AP1-Crude).
- Del 2: Enzymer (EndoCut, FooPro-PNL, Bromelain), og fraksjon (AP1-Retentat, AP1-Permeat, AP1-Crude)
- Del 3: Enzymer (EndoCut, FooPro-PNL, Bromelain, Alcalase) og fraksjoner (AP1-crude, AP1-retentat).

For del 1 ble en modell tilpasset med alle hovedeffekter og toveis interaksjoner, mens for del 2 og 3 kunne bare hovedeffekter tilpasses. Med hovedeffekter ser man på statistiske forskjeller i gjennomsnittsverdier for to ulike enzym, konsentrasjoner eller fraksjoner. Signifikante interaksjoner indikerer at effekten av et enzym avhenger av konsentrasjon eller fraksjon.

**Korrelasjon mellom flyktige komponenter og sensoriske variabler:** Partial least squares regression (PLSR) ble brukt for å relatere flyktige komponenter og sensorikk. Først ble en modell tilpasset basert på alle 39 flyktige komponenter, deretter ble de viktigste VOC valgt ut basert på at FDR (False Discovery Rate) justert p-verdi fra rotasjonstester i 50-50 manova var mindre enn 0.1 for minst en av effektene i minst en analyse, eller dersom PLS-ladningen var stor (absolutt verdi > 0.25).

**Korrelasjon mellom SEC og sensoriske variabler:** Intervall PLS (iPLS, Norgard et al. 2000) ble brukt for å relatere SEC-kromatogrammer og sensoriske variabler. Med iPLS splittes forklaringsvariablene (SEC) i intervaller langs retensjonstidsaksen og en PLS regresjon gjøres for hvert intervall. Med denne metoden, kan man studere hvilke størrelsesfraksjoner som korrelerer mest med de sensoriske egenskapene. Alle statistiske analyser er utført i Matlab (R2018b, Mathworks Inc).

## 4.9 Sensoriske analyser

Alle sensoriske analyser er utført av Nofima sitt trente sensoriske panel. Panelet består av 10 dommere som er valgt ut på grunnlag av sine lukt- og smaksevner som tilfredsstillt krav i ISO 8586 (2012). Det sensoriske panelet blir trent, testet og kontrollert regelmessig.

#### **4.9.1 Sensorisk rangering (Task 4.4)**

Totalt 6 hydrolysater (1 % TS i vandig løsning) og 3 limvann ble rangert for ulike smaksegenskaper av trent sensorisk panel. Hydrolysater og limvann ble vurdert i to ulike sesjoner. De 5 hydrolysatproduktene produsert i T2.1 (Tabell 1) ble vurdert opp mot en kommersiell prøve. Alle ble vurdert på egenskapene total smaksintensitet, bittersmak, fiskesmak og umamismak. De tre limvannprøvene fra T2.1 (Tabell 1) ble kun vurdert på totalsmaksintensitet. Dommerne ble bedt om å rangere prøvene for stigende grad av den angitte egenskapen.

#### **4.9.2 Sensorisk vurdering av maskerte produkter (Task 4.5)**

De maskerte hydrolysatproduktene og tilhørende referanser (totalt 17 prøver) fra T1.2 og T2.2 ble først kjørt igjennom en sensorisk screening i form av en projective mapping ved bruk av sensorisk trent panel. Prøvene ble servert som vandig løsning basert på 1 % TS. I en projective mapping vurderes prøvene i tilfeldig rekkefølge på ulikheter og likheter, deretter plasseres de i et todimensjonalt «kart», og egenskaper som beskriver prøvene settes på. Basert på resultater fra projective mapping ble 10 prøver selektert til en full sensorisk profilering.). En full sensorisk profilering av produktene ble gjennomført ved bruk av en kvantitativ beskrivende analyse (QDA, ISO 13299:2016).. Alle prøver ble servert romtemperert og som vandige løsninger basert på 1 % tørrstoff. Prøvene ble servert i randomisert rekkefølge. Dommerne hadde tilgang på vann og nøytral kjeks for å fjerne smak fra foregående prøve. Det sensoriske panelet evaluerte samtlige prøver på 21 ulike sensoriske egenskaper (smak, lukt og munnfølelse) på en ustrukturert skala fra 1 til 9 der 1 er ingen intensitet, mens 9 er tydelig intensitet av den gitte egenskapen (Vedlegg 1).



## 5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### 5.1 Kjemiske og sensoriske analyser av hydrolysatfraksjoner produsert i pilot-skala

#### 5.1.1 Pilot skala hydrolyse (Task 2.1)

##### 5.1.1.1 Råstoff

Den kjemiske sammensetningen til makrellråstoffet som ble brukt i forsøket (Tabell 3) viser et relativt høyt protein- og fettinnhold på henholdsvis 17,5 % og 14,5 %.

Tabell 3. Kjemisk sammensetning av makrellråstoffet som ble brukt i hydrolyseforsøkene (g/100 g prøve)

Analyse	Råstoff
Protein (N×6,25)	17,5
Tørrstoff	35,1
Aske	3,5
Fett	14,5

Ved utilstrekkelig lagring og behandling av makrellråstoff, kan det dannes illeluktende TMA grunnet bakteriell nedbrytning av TMAO. I tillegg er dannelsen av biogene aminer, grunnet dekarboxylering av frie aminosyrer, en kjent problemstilling ved lagring av makrellråstoff (Sone et al 2019). De kjemiske analysene (Tabell 4) viser imidlertid at nivåene av både biogene aminer og TMA var lav i makrellråstoffet. Det ble detektert noe TMAO, som har potensiale for å omdannes til TMA som har sterk lukt, men disse nivåene var lave.

Tabell 4. Biogene aminer, TMA og TMAO i makrellråstoffet

Kjemisk analyse	Råstoff
Putrescin (mg/kg)	1,5
Kadaverin (mg/kg)	<2
Histamin (mg/kg)	<2
TMA (mg N/100 g)	<1
TMAO (mg N/100 g)	18

##### 5.1.1.2 Tørring og filtrering av hydrolysat

Hydrolysat fra pilotskalaproduksjon ble både frysetørket og spraytørket for å se om dette kunne påvirke den kjemiske sammensetningen og de sensoriske egenskapene til produktene. Den kjemiske sammensetningen til hydrolysatene (Tabell 5) viste små forskjeller mellom frysetørket og spraytørket produkt.

H-Crude (etter mikrofiltrering) hadde en relativt høy andel aske, med verdier over 16%. Vi opplevde makrellbeina som «myke» etter hydrolyse, og dette sammen med høye askenivåer indikerer at en relativt høy andel mineraler fra beina er løst ut i vannfasen. Etter nanofiltrering ble askeinnholdet redusert til omtrent 3%, noe som illustrerer viktigheten av nanofiltrering av slike produkter.

Tabell 5. Kjemisk sammensetning av spraytørket og frysetørket hydrolysat

	Spraytørket		Frysetørket		
	SH-Crude	SH-Retentat	FH-Crude	FH-Retentat	FH-Permeat
<b>Protein</b>	79,8	96,1	83,1	101,3	63,8
<b>Tørrstoff</b>	94,1	94,9	94,7	98,3	96
<b>Aske</b>	16,7	3,1	16,5	3,2	37,2

Aminosyresammensetningen til produktene (Tabell 6) viste også at det var små forskjeller i spraytørket sammenlignet med frysetørket produkt. Sum av aminosyrer på tørrstoffnivå reflekterer sum protein (Tabell 6), og viser at Retentat-produktet var mye mer proteinrikt enn Crude og Permeat. Dette kan forklares fra en reduisering av aske-nivåene mellom de forskjellige produktene (Tabell 5). Hydrolysatet inneholdt mer enn 16 % aske før nanofiltrering. Etter nanofiltrering ble askenivået redusert i Retentatet, noe som samtidig øker proteininnhold, og oppkonsentrert i Permeatet.

Samtlige aminosyrer ble oppkonsentrert i Retentat sammenlignet med Crude, med unntak av histidin (Tabell 6). En stor prosentandel av histidin forelå som fri aminosyre (Tabell 7), hvorav mesteparten ble gjenfunnet i permeatet etter nanofiltrering. Man kunne se en betydelig reduksjon av frie aminosyrer i Retentatet etter nanofiltrering, som tyder på at en stor andel av de frie aminosyrer var gått over i Permeatet. Dette ble også reflektert i analyse av peptidstørrelsesfordeling (Tabell 8).

Tabell 6. Aminosyresammensetning (g/100 g tørrstoff) i spraytørket (S) og frysetørket (F) hydrolysatfraksjoner (H) før (-Crude) og etter nanofiltrering (-Retentat/-Permeat)

Aminosyre	Spraytørket		Frysetørket		
	H-Crude	H-Retentat	H-Crude	H-Retentat	H-Permeat
Aspartat	6,0	10,0	6,2	10,1	0,7
Glutamat	10,8	18,0	10,9	17,3	1,4
Hydroksyprolin	1,3	1,9	1,1	1,5	0,0
Serin	2,9	4,5	3,1	4,4	0,8
Glycin	5,4	8,0	5,3	7,8	1,8
Histidin	5,2	2,3	5,3	2,4	8,1
Arginin	4,6	6,2	4,5	6,2	1,9
Treonin	2,7	4,1	2,9	4,1	0,7
Alanin	4,9	6,8	4,8	6,5	1,9
Prolin	2,9	4,5	3,1	4,8	0,4
Tyrosin	2,0	2,0	1,7	1,8	1,0
Valin	2,8	4,0	2,9	4,3	1,0
Metionin	1,8	2,5	1,9	2,5	0,8
Isoleucin	2,2	3,4	2,2	3,5	0,6
Leucin	4,9	6,6	5,0	6,6	2,2
Fenylalanin	1,8	2,2	1,8	2,2	1,0
Lysine	7,0	9,9	6,9	9,7	2,6
Cystein	0,4	0,6	0,5	0,5	0,4
Tryptofan	0,6	0,7	0,5	0,6	0,3
<b>Sum</b>	<b>70,1</b>	<b>98,4</b>	<b>70,2</b>	<b>96,9</b>	<b>27,5</b>

Tabell 7. Frie aminosyrer (g/100 g tørrstoff) i spraytørket (S) og frysetørket (F) hydrolysatfraksjoner (H) før (-Crude) og etter nanofiltrering (-Retentat/-Permeat)

Aminosyre	MW (Da)	Spraytørket		Frysetørket		
		SH-Crude	SH-Retentat	FH-Crude	FH-Retentat	FH-Permeat
Aspartat	133,1	0,05	0,02	0,06	0,02	0,08
Glutamat	147,1	0,46	0,11	0,51	0,09	0,83
Hydroksyprolin	131,1	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	0,02
Serin	105,1	0,09	<0,01	0,10	<0,01	0,23
Asparagin	132,1	0,01	0,01	0,02	0,01	0,04
Glycin	75,1	0,15	<0,01	0,15	<0,01	0,26
Glutamin	146,2	0,17	0,02	0,18	0,01	0,35
Histidin	155,2	3,6	0,20	3,3	0,17	7,4
Treonin	119,1	0,14	0,01	0,14	<0,01	0,32
Alanin	89,1	0,29	0,01	0,33	0,01	0,76
Arginin	174,2	0,29	0,05	0,27	0,05	0,61
Prolin	115,1	0,07	<0,01	0,06	<0,01	0,17
Tyrosin	181,2	0,19	0,01	0,15	0,01	0,36
Valin	117,1	0,11	0,02	0,10	0,02	0,20
Metionin	149,2	0,32	0,09	0,26	0,08	0,53
Cystein	121,2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Isoleucin	131,2	0,07	0,03	0,08	0,03	0,16
Leucin	131,2	0,38	0,04	0,39	0,04	0,83
Fenylalanin	165,2	0,38	0,16	0,37	0,15	0,65
Tryptofan	204,2	0,07	0,06	0,06	0,05	0,09
Lysin	146,2	0,50	0,17	0,53	0,16	1,15
<b>Sum protein-AA</b>		<b>7,4</b>	<b>1,0</b>	<b>7,0</b>	<b>0,92</b>	<b>15,1</b>
Kreatinin	113,1	1,1	0,13	1,16	<0,01	2,2
β-alanin	89,1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Taurin	125,2	0,96	0,03	0,90	0,02	2,1
4-aminobutansyre	103,1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Citrullin	175,2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Karnosin	226,2	0,05	0,01	0,04	0,01	0,14
Anserin	240,3	0,10	0,04	0,08	0,03	0,16
L-Ornithin	132,2	0,02	0,04	0,02	0,03	0,02
<b>Sum ikke-protein AA</b>		<b>2,2</b>	<b>0,25</b>	<b>2,2</b>	<b>0,09</b>	<b>4,6</b>

Tabell 8. Molekylvektfordeling til peptider i spraytørket (S) og frysetørket (F) hydrolysatfraksjoner (H) før (-Crude) og etter nanofiltrering (-Retentat/-Permeat)

MW (Da)	Spraytørket		Frysetørket		
	SH-Crude	SH-Retentat	FH-Crude	FH-Retentat	FH-Permeat
>20000	0,1	0,2	0,2	0,4	<0,01
20000-15000	0,1	0,2	0,2	0,2	<0,01
15000-10000	0,5	0,8	0,7	1,1	<0,01
10000-8000	0,7	1,2	1,0	1,5	<0,01
8000-6000	1,9	3,0	2,2	3,3	<0,01
6000-4000	4,7	7,2	5,0	7,5	0,1
4000-2000	12,1	18,5	12,6	18,8	0,3
2000-1000	15,4	23,0	15,7	23,0	0,9
1000-500	15,1	21,2	15,1	21,1	3,5
500-200	14,7	15,4	13,9	14,7	12,3
<200	34,8	9,4	33,5	8,5	82,8

Analyse av biogene aminer og TMA/TMAO viste relativt lave nivåer (Tabell 9), og nivået av biogene aminer var godt innenfor grenser satt av FAO/WHO (2012), hvor grensen for histamin er satt til <90 mg/dose. Resultatene viser ingen tydelig reduksjon av de biogene aminene etter nanofiltrering, noe som generelt tyder på at den brukte membranen ikke er ideell for fjerning av disse. Nivåene av TMA og TMAO, på den andre siden, ble betydelig redusert i Retentatet og indikerer at nanofiltrering med denne type membran vil være effektivt for fjerning av disse. Det ble også registrert noe lavere nivå av TMA i spraytørket produkt (SH), sammenlignet med frysetørket (FH), noe som kan tyde på at en del flyktig TMA har blitt blåst ut i spraytørkeprosessen.

Tabell 9. Analyse av biogene aminer og TMA/TMAO i spraytørket (S) og frysetørket (F) hydrolysatfraksjoner (H) før (-Crude) og etter nanofiltrering (-Retentat/-Permeat)

	Spraytørket		Frysetørket		
	SH-Crude	SH-Retentat	FH-Crude	FH-Retentat	FH-Permeat
<b>Putrescin (mg/kg)</b>	40	39	58	49	32
<b>Kadaverin (mg/kg)</b>	<20	<20	27	36	<20
<b>Histamin (mg/kg)</b>	37	66	130	170	36
<b>TMA (mg N/100 g)</b>	11	<1	41	5	95
<b>TMAO (mg N/100 g)</b>	149	<1	155	3	356

### 5.1.2 Sensorisk rangering av hydrolysat (Task 4.4)

Hydrolysatfraksjonene, basert på spraytørking (SH-Crude, SH-Retentat) og frysetørking (FH-Crude, FH-Retentat og FH-Permeat), ble sammenlignet med et kommersielt produkt. Den kjemiske sammensetningen og molekylvektfordelingen til det kommersielle produktet (Tabell 10) viste at produktet hadde en sammensetning og molekylvektfordeling som kan sammenlignes med H-Retentat (Tabell 5 og 8). Alle hydrolysatprøvene ble vurdert på flere sensoriske egenskaper, da vi vet at ulike sensoriske egenskaper påvirkes av forskjellige faktorer. Prøvene ble vurdert på total smaksintensitet, bittersmak, fiskesmak og umamismak, som ble bedømt til å være de mest relevante i denne sammenhengen. De biogene aminene TMAO/TMA er kjent for å gi en karakteristisk smak av fisk, og

selv om alle hydrolysatene hadde lave nivåer av disse, gjorde det likevel utslag i den sensoriske rangeringen (Tabell 11). FH-Permeat hadde de høyeste verdiene av TMAO/TMA, og resultatene fra rangeringen viste at FH-Permeat også hadde signifikant høyere total smaksintensitet og fiskesmak sammenlignet med SH-Retentat, FH-Retentat og den kommersielle prøven. For bittersmak var det ikke så store forskjeller mellom de ulike hydrolysatene. FH-Retentat ble vurdert til å ha den høyeste intensiteten av bittersmak og var signifikant sterkere enn FH-Crude.

De andre prøvene fordelte seg imellom, men også SH-Retentat ble oppfattet som mer bitter enn SH-Crude. Dette kan muligens forklares ut fra en oppkonsentrering av protein på tørrstoffnivå i SH-Retentatprøvene (Tabell 5), sammenlignet med SH-Crudeprøvene. For umamismak var det større forskjeller, der den kommersielle hadde signifikant lavere intensitet av umamismak etterfulgt av de to retentat-prøvene. FH-Permeat, FH-Crude og SH-Crude hadde høyere intensitet av umamismak. De tre sistnevnte prøvene hadde også et høyere nivå av aminosyren glutamat (Tabell 6) som kan forklare en mer intens smak av umami.

Tabell 10. *Kjemisk sammensetning og molekylvektfordeling av et kommersielt produkt, basert på laks. som ble bruk som referanse i sensorisk analyse*

Analyse	Kommersielt produkt
Protein	100,4
Tørrstoff	96,2
Aske	2,7
>20000 Da	0,1
20000-15000 Da	0,1
15000-10000 Da	0,6
10000-8000 Da	1,1
8000-6000 Da	3,1
6000-4000 Da	8,2
4000-2000 Da	20,5
2000-1000 Da	22,8
1000-500 Da	18,8
500-200 Da	13,7
<200 Da	10,9

Tabell 11. *Sensorisk rangering av hydrolysatfraksjonene etter spraytørking (SH-Crude, SH-Retentat), eller frysetørking (FH-Crude, FH-Retentat og FH-Permeat). Disse ble sammenlignet med et kommersielt produkt basert på laks.*

	Svakest intensitet					Sterkest intensitet
<b>Total smaksintensitet</b>	SH-Retentat	Kommersiell (laksbasert)	FH-Retentat	SH-Crude	FH-Crude	FH-Permeat
<b>Bittersmak</b>	FH-Crude	FH-Permeat	SH-Crude	SH-Retentat	Kommersiell (laksbasert)	FH-Retentat
<b>Fiskesmak</b>	SH-Retentat	FH-Retentat	Kommersiell (laksbasert)	FH-Crude	SH-Crude	FH-Permeat
<b>Umamismak</b>	Kommersiell (laksbasert)	FH-Retentat	SH-Retentat	FH-Crude	FH-Permeat	SH-Crude

## 5.2 Kjemiske og sensoriske analyser av limvannsfraksjoner produsert i pilot-skala

Den kjemiske sammensetningen til limvannet før behandling (Tabell 12) viste at produktet inneholdt hovedsakelig protein og aske, og en del fett på tørrstoffbasis. Molekylvektfordelingen til det vannløselige proteinet er gitt i Tabell 13. Resultatene viser en forventet molekylvektfordeling for limvannsprodukter, med hovedsakelig store peptider/protein >20000 Da og små molekyler <200. De store molekylene er hovedsakelig vannløselige proteiner og gelatinprodukter, mens de små molekylene er for det meste frie aminosyrer. Basert på de kjemiske analysene (Tabell 12) ble det besluttet å behandle limvannet med samme fremgangsmåte som hydrolysatet, ved først å membranfiltrere for å fjerne fett og partikler, og deretter nanofiltrere for å fjerne aske. Produktene ble kun frysetørket og den kjemiske sammensetningen til limvannet etter mikrofiltrering (L-Crude) og etter nanofiltrering (L-Retentat og L-Permeat) viste samme trend som for hydrolysatet, med at aske ble redusert og protein oppkonsentrert i L-Retentat sammenlignet med L-Crude. Det relativt lave proteininnholdet i L-Crude var uventet og analyse av molekylvektfordeling (Tabell 13) viste at fraksjonen av peptider > 20000 Da var betydelig redusert etter mikrofiltrering. Det ble benyttet et filter med MWCO 0,1 µm (≈1.000.000 Da) og et så stort proteintap var derfor ikke forventet. Man bør derfor øke størrelsen på membranen ved filtrering av limvann ved videre forsøk.

Tabell 12. Kjemisk sammensetning av limvann før og etter behandling med mikrofiltrering (L-Crude) og nanofiltrering (L-Retentat og L-Permeat)

	Rålimvann	L-Crude	L-Retentat	L-Permeat
<b>Protein</b>	3,4	34,4	67,5	25,0
<b>Tørrstoff</b>	6,4	95,8	94,2	96,0
<b>Aske</b>	2,6	62,7	24,1	70,5
<b>Fett</b>	0,4	33,3	65,9	25,1

Tabell 13. Molekylvektfordeling til peptider i limvann før behandling (limvann), etter mikrofiltrering (L-Crude) og etter nanofiltrering (L-retentat og L-permeat).

MW (Da)	Limvann	L-Crude	L-Retentat	L-Permeat
>20000	41,4	6,5	8,1	0
20000-15000	5,1	1,5	2,4	0
15000-10000	5,8	2,4	5	0
10000-8000	2,6	1,7	4	0
8000-6000	2,7	2,2	5,4	0
6000-4000	2,5	2,5	6,2	0
4000-2000	2,7	3,2	8,1	0
2000-1000	1,6	2,1	5,3	0,1
1000-500	1,2	1,7	4,1	0,1
500-200	2,6	4,5	6,2	3,4
<200	31,7	71,6	45,1	96,3

Analyse av kvalitetsparametere i limvannet viste at limvannet før nanofiltrering (L-Crude), hadde lave nivåer av biogene aminer, men noe høyt nivå av TMAO og TMA (Tabell 14). Etter nanofiltrering ble nivåene av TMAO og TMA betydelig redusert i L-Retentat, noe som indikerer at nanofiltrering kan være en effektiv metode for å fjerne disse uønskede metabolittene, som også vist for hydrolysatet.

Tabell 14 Kvalitetsparametere i limvann etter mikrofiltrering (crude) og etter nanofiltrering (retentat og permeat)

	L-Crude	L-Retentat	L-Permeat
Putrescin (mg/kg)	120	95	120
Kadaverin (mg/kg)	<20	31	<20
Histamin (mg/kg)	<20	<20	<20
TMA (mg N/100 g)	40	6	45
TMAO (mg N/100 g)	236	102	258

### 5.2.1 Sensorisk rangering av limvann

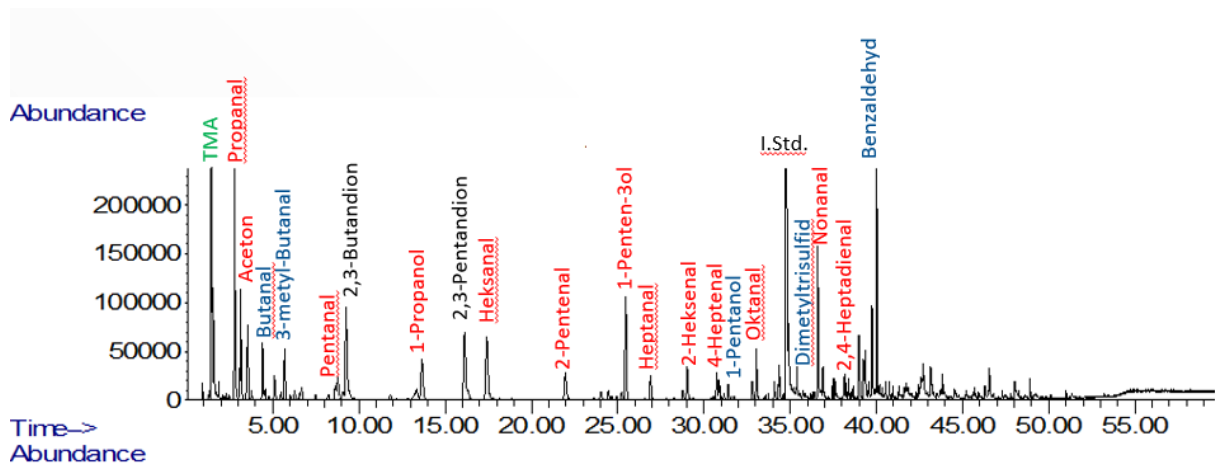
Rangeringen av de tre limvannfraksjonene viste at L-Retentat hadde lavest total smaksintensitet, mens L-Permeat hadde den høyeste intensiteten av de tre (Tabell 15). Dette kan muligens forklares fra både det høyere askenivået (Tabell 12) og TMA-nivået (Tabell 14) i L-Permeat sammenlignet med L-Crude og L-Retentat.

Tabell 15 Rangering på total smaksintensitet for limvann etter mikrofiltrering (crude) og etter nanofiltrering (retentat og permeat)

	Svakest intensitet		Sterkest intensitet
Total smaksintensitet	L-Retentat	L-Crude	L-Permeat

## 5.3 Analyse av flyktige komponenter i hydrolysat- og limvannsfraksjoner (Task 3.2)

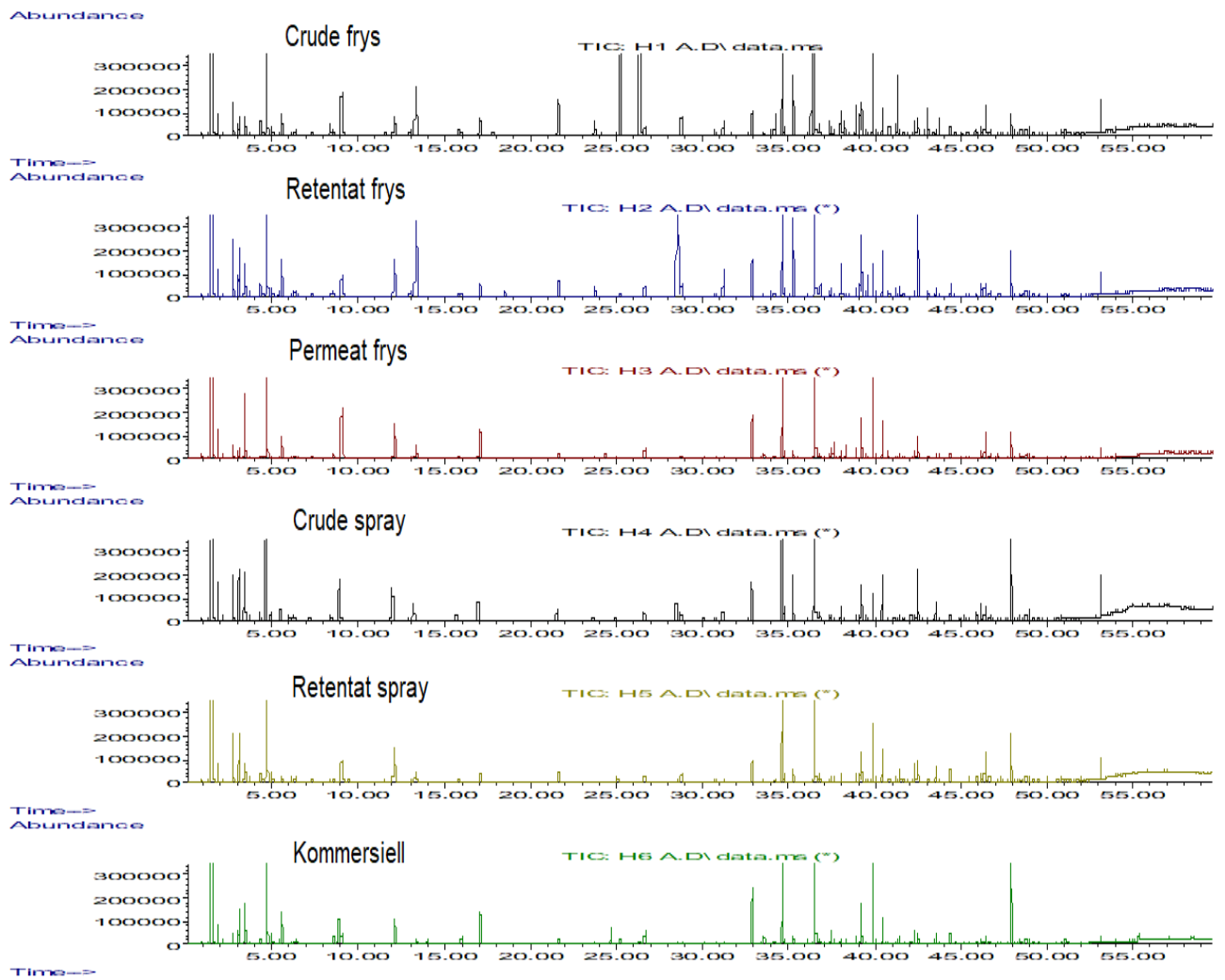
Et typisk gasskromatogram av H-Crude er vist i Figur 3. Det ble funnet over 100 ulike flyktige forbindelser. Hydrolysatet var karakterisert ved lipid oksidasjonsprodukter (heksanal, 2-pentenal, 1-penten-3-ol, 2-heksenal, nonanal, 2,4-heptadienal, 2,6-nonadienal, 3,5-oktadien-2-onm.fl.), protein oksidasjonsprodukter (butanal-2 og 3-metylbutanal, 2-propenal, benzaldehyd) og bakteriemetabolitter (2,3-butandion, 2,3-pentandion). Det ble også observert store forskjeller i både sammensetning og mengde av flyktige komponenter i ferdig tørket hydrolysat sammenlignet med 1 % vandig hydrolysat som ble benyttet til sensorisk bedømmelse (Solstad et al, 2020).



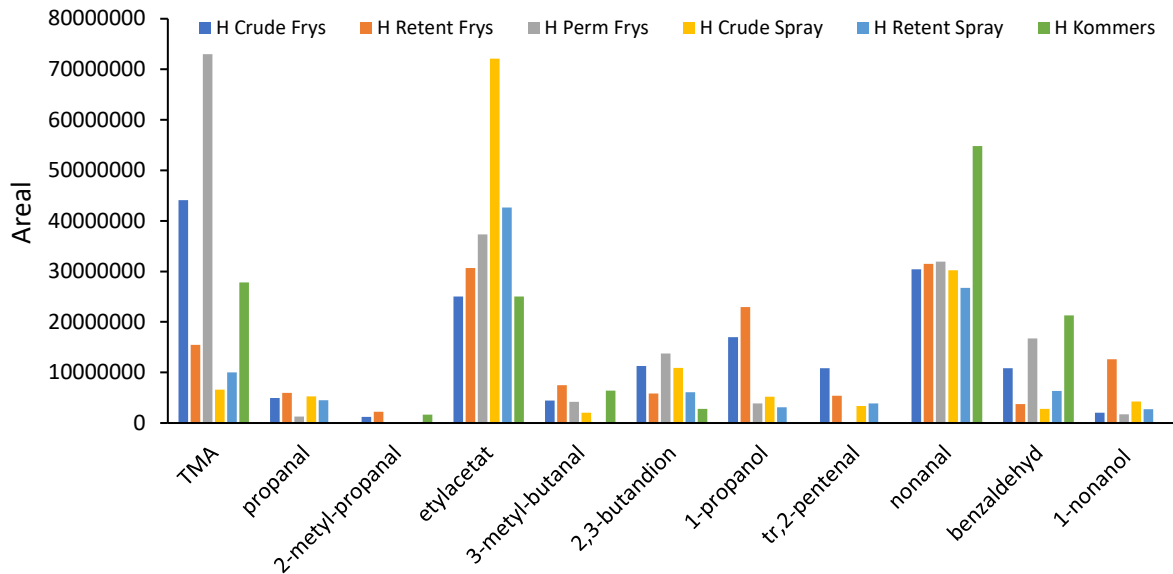
Figur 3. Typisk gasskromatogram av Crude hydrolysat som viser de dominerende forbindelsene: trimetylammin (TMA, i grønt), lipid oksidasjonsprodukter (i rødt), protein oksidasjonsprodukter (i blått), bakteriemetabolitter (sort) og tilsatt kvantifiseringsstandard (I.St.).

Spraytørket Crude (SH-Crude) og Retentat (SH-Retentat), og frysetørket Crude (FH-Crude), Retentat (FH-Retentat) og Permeat (FH-Permeat) ble analysert for flyktige komponenter, basert på samme konsentrasjon som ble benyttet i den sensoriske evalueringen. Gasskromatogram av prøvene er vist i Figur 4. GC-areal av utvalgte forbindelser (Figur 5 og 6) viser effekten for de ulike fraksjonene i hhv hydrolysat og limvann. Det ble funnet betydelig lavere mengder av flyktige komponenter, opptil 90 % reduksjon, i H-Retentat sammenlignet med H-Crude, noe som viser at flere lavmolekylære komponenter kan reduseres ved nanofiltrering. Små forskjeller ble observert ved sammenligning av spraytørket og frysetørket hydrolysat, men noe mer flyktige komponenter ble observert i frysetørket produkt. Selv om analyser av flyktige komponenter viste at det er mulig å redusere disse vha nanofiltrering, var det fortsatt en rekke flyktige og lukt/smaksaktive komponenter i retentatet som med fordel kan reduseres ytterligere. Den kommersielle sammenligningsprøven (Tabell 10), som ble brukt i sensorikkforsøkene, er også tatt med og viser at denne har en relativt lik profil som SH-Retentat.

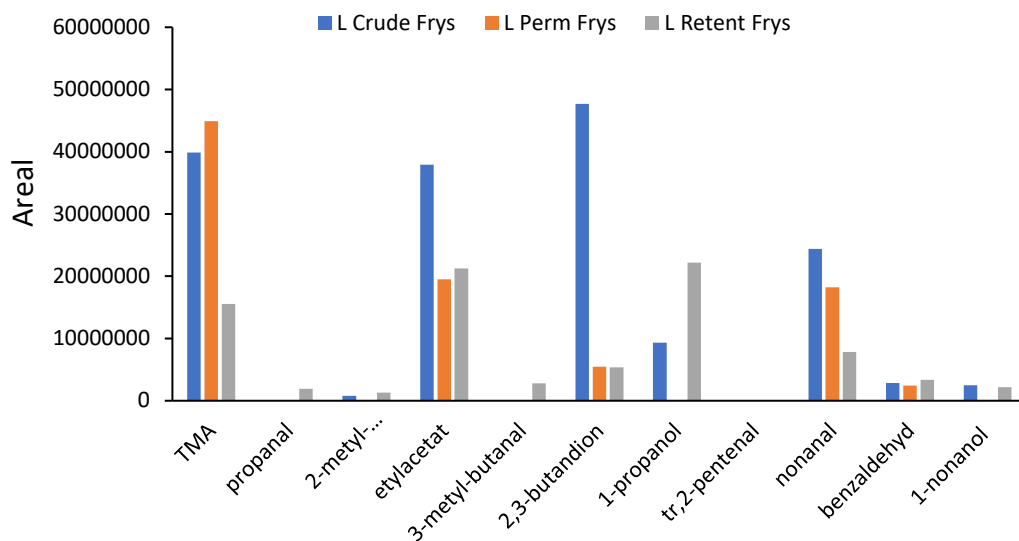




Figur 4. Gasskromatogram av frysetørkede og spraytørkede fraksjoner av hydrolysat.



Figur 5. GC-areal (middelverdier for 2 parallelle analyser) av utvalgte forbindelser for de ulike hydrolysatfraksjonene.



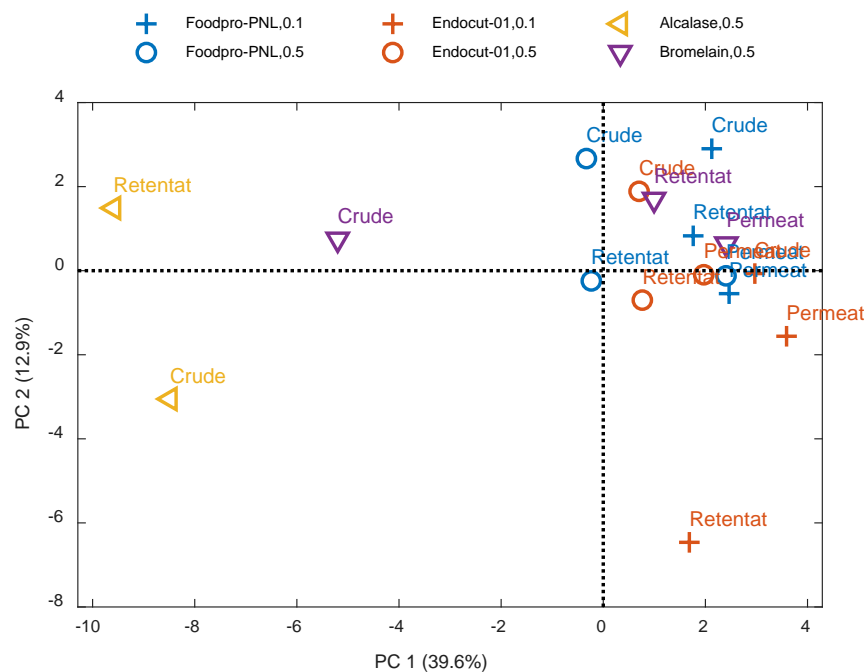
Figur 6. GC-areal (middelverdier for 2 parallelle analyser) av utvalgte forbindelser for de ulike limvannfraksjonene.

#### 5.4 Analyse av flyktige komponenter fra screeningforsøk (AP1) (Task 3.2)

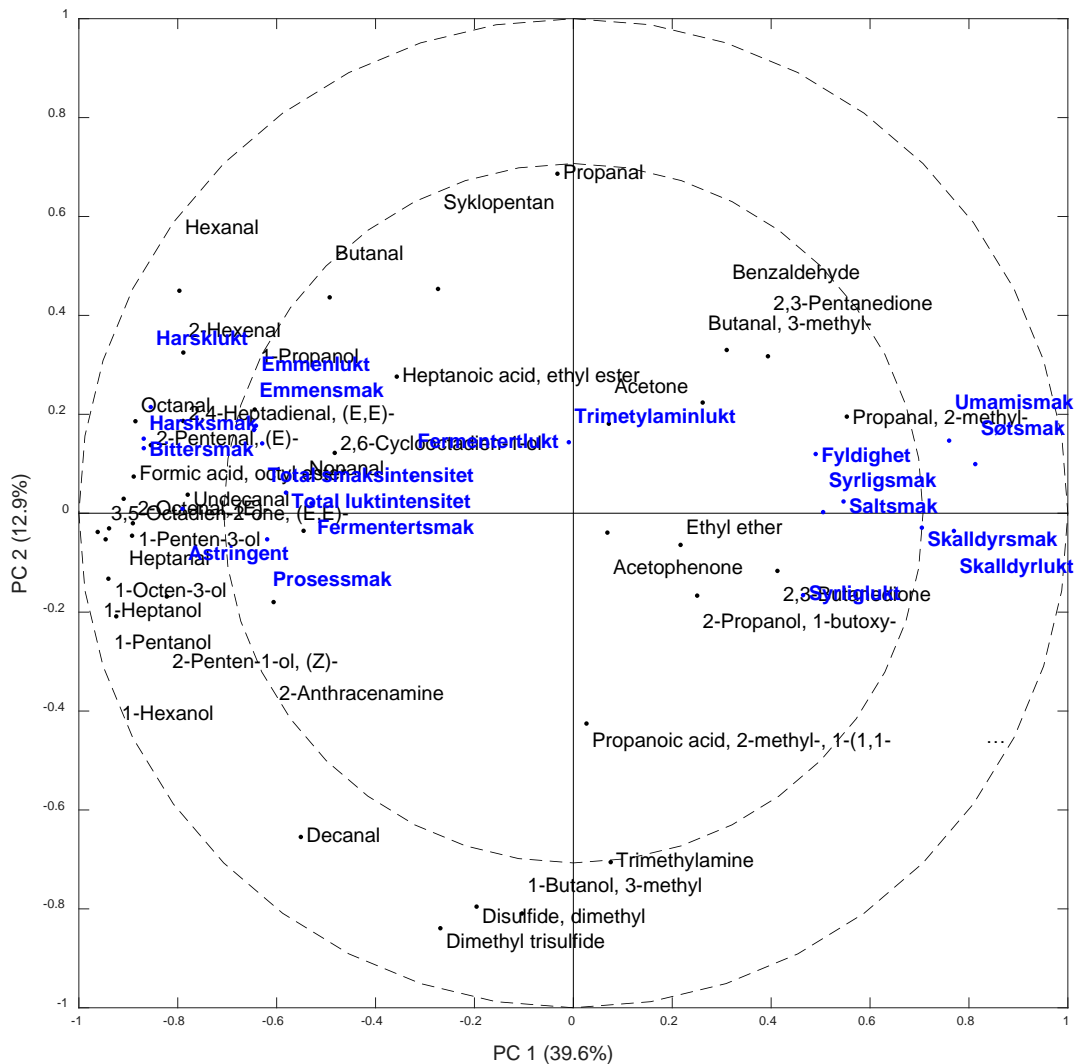
En PCA av de flyktige komponentene fra hydrolysater produsert i AP1 (Solstad et al 2020) viste at protease og til dels hvilken konsentrasjon som ble brukt i hydrolysen, er av stor betydning for sammensetningen i det ferdige produktet. Alcalase og den laveste konsentrasjonen av Endocut-01 (0,1%) skilte seg ut fra de øvrige (Figur 7). Hydrolysater produsert med Alcalase hadde høyere

konsentrasjoner av for eksempel heksanal, butanal, 1-Hexanol, Decalan og 2-Hexanal, mens hydrolysater produsert med Endocut-01 hadde mer TMA. Den sensoriske variasjonen er best korrelert med PC1 fra flyktige komponenter, altså Alcalase.

Resultatene fra multivariat ANOVA er oppsummert i Tabell 16. Disse bekrefter signifikante effekt eller nær signifikant effekt av proteasevalg i flere del-analyser, men dette er litt avhengig av hvilken metode som er brukt for å analysere dataene. Dette skyldes at i screening forsøk vil det være få observasjoner og dermed stor usikkerhet i analysene. Fraksjon etter filtrering har signifikant effekt i analyser med 50-50 manova, men ikke de andre analysene. Fraksjonseffekten er ikke veldig tydelig i PCA plottet (Figur 8). Basert på resultatene fra 50-50 manova ser det ut til at det er interaksjoner mellom fraksjonsvalg og type protease, og mellom protease og konsentrasjon. Dette kompliserer tolkningen, men ASCA for de ulike del-analysene viser at crude skiller seg fra de øvrige fraksjonene (resultater ikke vist).



Figur 7. PCA for flyktige komponenter. Score plot av produktene i screening forsøk fra AP1. Farge indikerer de ulike proteasene mens symbol indikerer konsentrasjon av enzym brukt i hydrolysen. Fraksjon etter filtrering navngis i plottet.

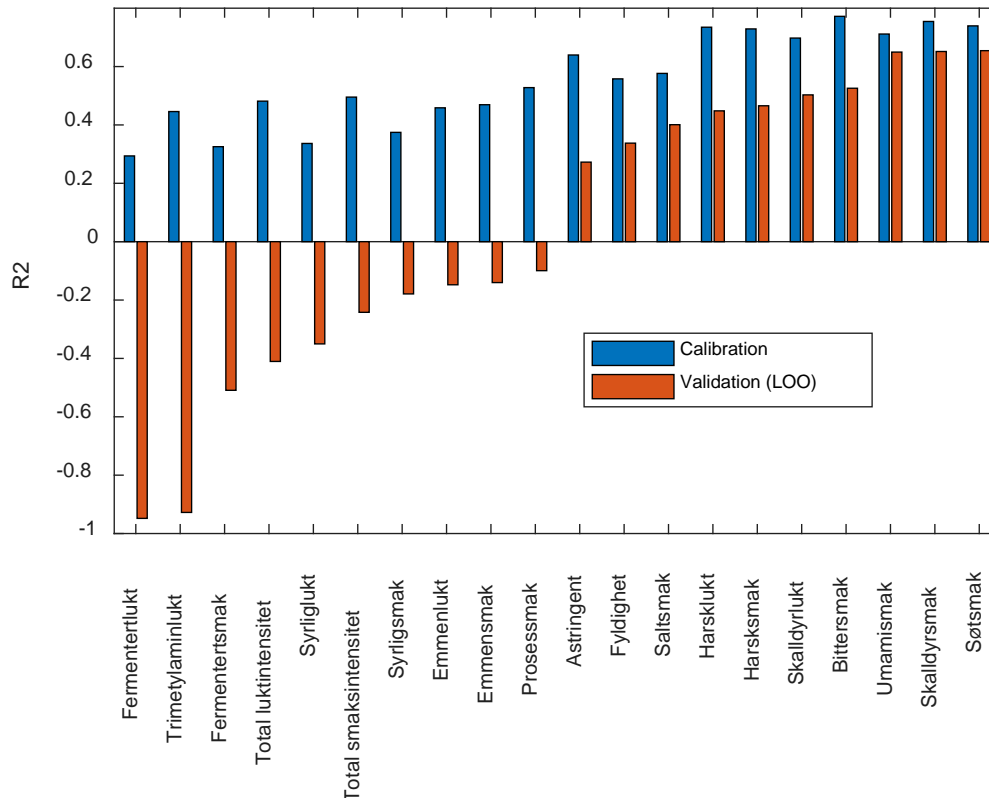


Figur 8. PCA for flyktige komponenter. Korrelasjonsladninger av de flyktige forbindelsene, med sensoriske variabler inkludert som supplementære variabler. Dette vil si at de ikke bidrar i beregning av PCA, men vi ser hvordan de sensoriske egenskapene korrelerer med prinsippal komponentene basert på de flyktige komponentene. Forbindelser på høyre side er relatert til produkter med Alcalase. Forbindelser langt ned er relatert til Endocut-01 0,5%.

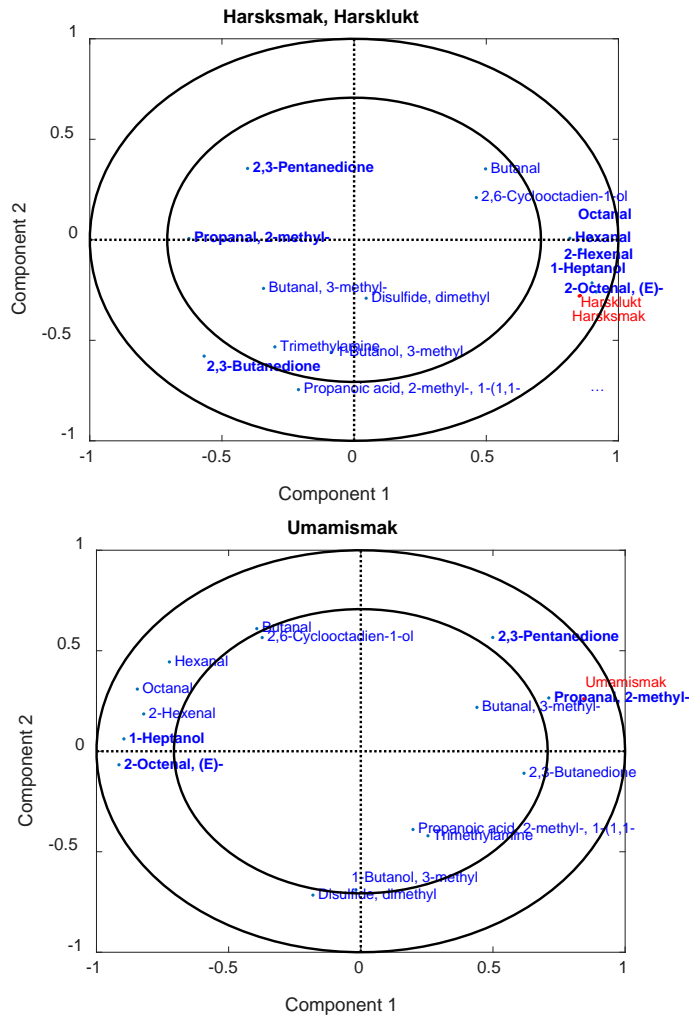
Tabell 16. Resultater fra multivariat anova for flyktige komponenter. P-verdier < 0.1 er markert med fet skrift, p-verdier < 0.05 har i tillegg en stjerne. ExplVar = Forklart Varians, Pval = Pvalue

		ASCA		5050-manova		ANOVA PC1		ANOVA PC2	
DATA	Term	ExplVar	pVal	ExplVar	pVal	ExplVar	Pval	ExplVa	Pval
<b>Del1</b>	Enzyme	12.08	0.13	12.1	<b>0.03</b>	13.12	<b>0.06</b>	1.33	0.55
	Conc	15.39	<b>0.09</b>	15.4	<b>0.01</b>	43.05	<b>0.02</b>	6.54	0.26
	Fraction	29.17	<b>0.07</b>	29.2	<b>0.05</b>	35.89	<b>0.04</b>	71.93	<b>0.07</b>
	Enzyme*Conc	7.57	0.24	7.6	0.13	0.06	0.81	0.50	0.71
	Enzyme*Fraction	11.97	0.27	12.0	<b>0.02</b>	2.24	0.42	3.99	0.57
	Conc*Fraction	15.90	0.16	15.9	<b>0.04</b>	4.05	0.28	10.44	0.34
<b>Del2</b>	Enzyme	26.76	0.20	26.8	0.71	14.91	0.44	8.99	0.75
	Fraction	35.06	<b>0.07</b>	35.1	0.17	55.36	0.12	34.03	0.39
<b>Del3</b>	Enzyme	56.32	0.12	56.3	<b>0.06</b>	85.84	<b>0.05</b>	2.17	0.98
	Fraction	15.20	0.17	15.2	<b>0.01</b>	4.63	0.31	50.23	0.17

**Korrelasjon mellom flyktige komponenter og sensoriske variabler:** De sensoriske egenskapene som ble best predikert fra flyktige komponenter var søtssmak, skalldyrsmak, umamismak, harsksmak og harsklukt (Figur 9) Det var til dels stor forskjell mellom kalibrering og validering av modellene, noe som skyldtes at det er stor variasjon mellom ulike prøver og at enkeltprøver kan påvirke modellene mye. Analysene indikerer derfor hvordan sensoriske variabler korrelerer med flyktige komponenter, men kan ikke brukes til prediksjon. Figur 10 viser korrelasjonsladninger for harsksmak/harsklukt og for umamismak.



Figur 9. PLS for flyktige komponenter og smaksegenskaper. R² er korrelasjon mellom predikert og observert verdi for hver smaksegenskap, kalibrert og med leave one out cross validation (LOCV).

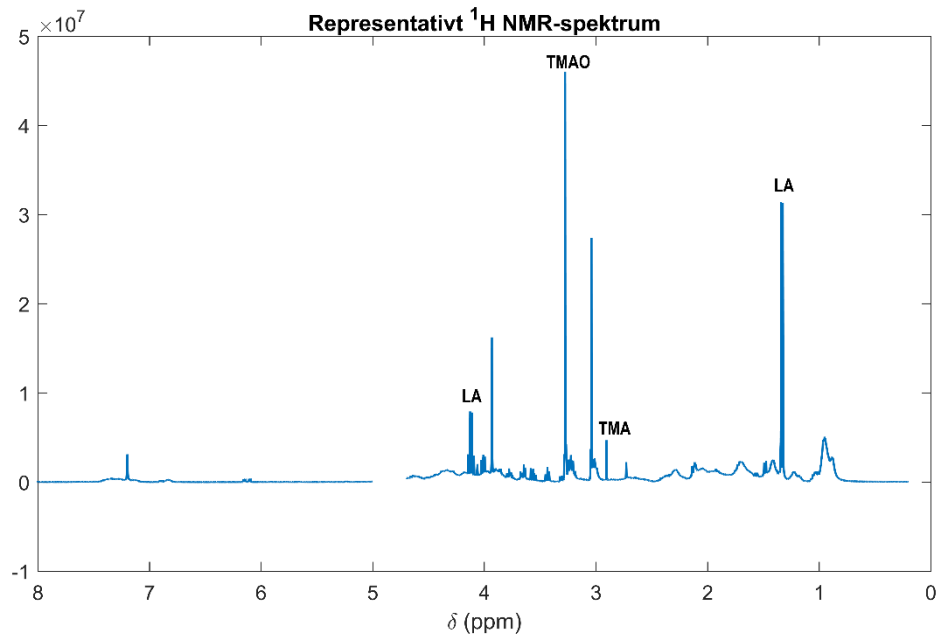


Figur 10. Korrelasjonsladninger for PLS mellom flyktige komponenter og harsksmak og harsklukt (øverst, PLS2 modell) og for umamismak (nederst, PLS1 modell).

## 5.5 Analyse av løselige komponenter (Task 3.1)

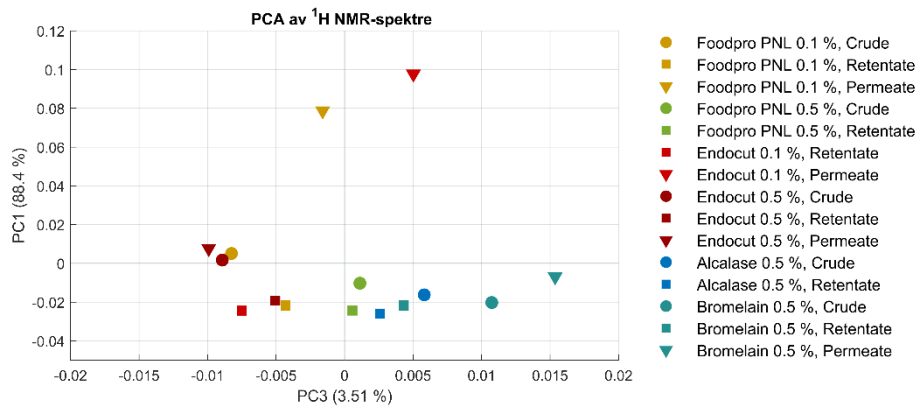
### 5.5.1 NMR

$^1\text{H}$  NMR-analyser ble utført på 15 forskjellige hydrolysater fra screeningeksperimentet i AP1 (Solstad et al. 2020) med ulike prosessbetingelser (ulike enzymer, enzymkonsentrasjoner og filtreringsfraksjoner). Et representativt  $^1\text{H}$  NMR-spekter er presentert i Figur 11. I alle spektrene dominerer topper som kan tilordnes metabolitter som melkesyre (LA), TMA og TMAO.

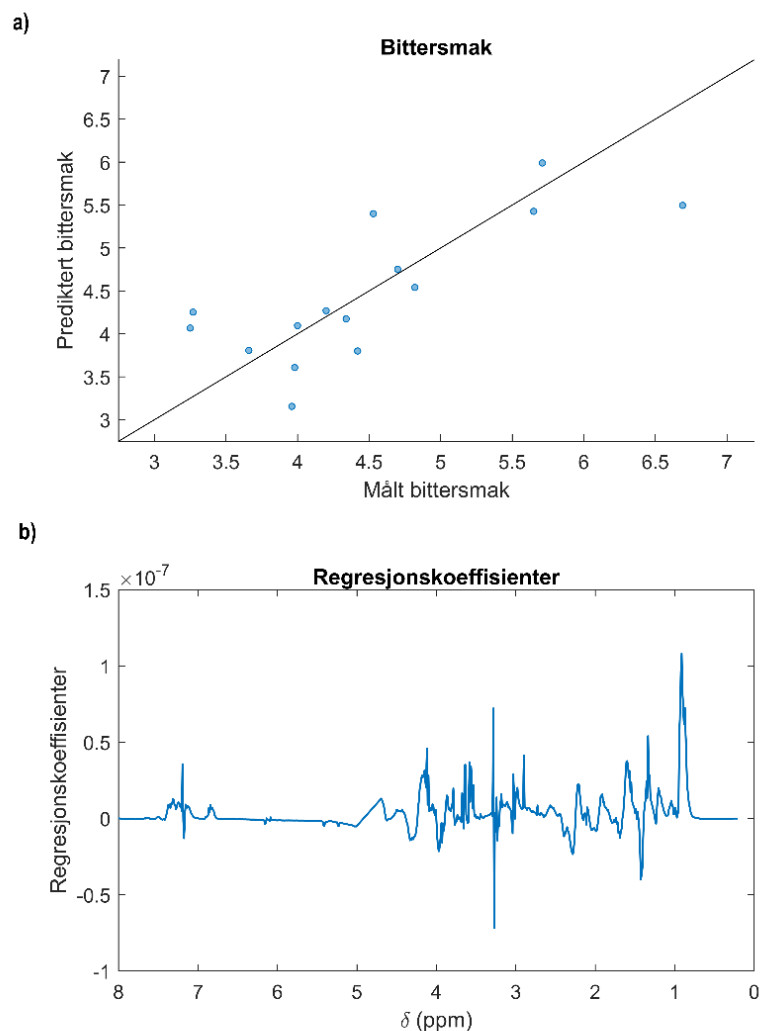


Figur 11. Representativt  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av hydrolysat fra makrell. Signalene fra melkesyre (LA), trimetylamin (TMA) og trimetylaminoksid (TMAO) er angitt i figuren.

En PCA av  $^1\text{H}$  NMR-spektrene ble utført for å kartlegge likheter og ulikheter mellom prøvene. Interessant nok, observeres lignende grupperinger som i den sensoriske vurderingen (Solstad et al 2020) (Figur 12). En PLS regresjonsmodell ble kalibrert for å kvantitativt korrelere sensoriske data og NMR-fingeravtrykk. Dette ga en moderat god modell for prediksjon av bitterhet fra NMR-spektre med en kryssvalidert root mean square error (RMSECV) lik 0.592 % og forklaringsgrad ( $R^2$ ) = 0.59 (Figur 13a). Regresjonskoeffisienten vektet særlig de laveste kjemisk skiftene (Figur 13b). Disse kan tilordnes alifatiske sidekjerder i lipofile aminosyrer. Dette stemmer overens med tidligere studier hvor bitter smak tilskrives alifatiske sidekjerder i peptider (Ney, 1971; Kim & Li-Chan 2006).



Figur 12. Resultater fra PCA analyse av NMR-data. Scoreverdier til første vs. tredje prinsipalkomponent. Basert på hydrolysater produsert i AP1 (Solstad et al. 2020)

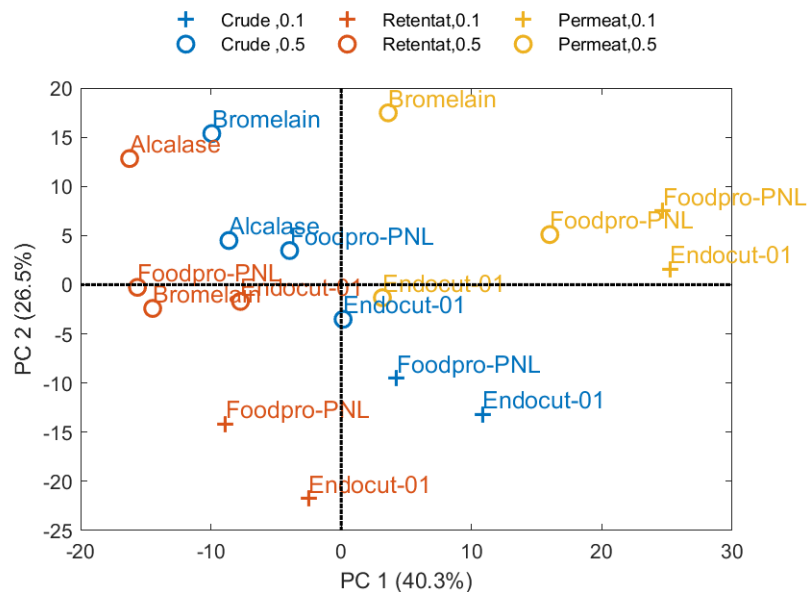


Figur 13. PLS regresjonsmodell for prediksjon av bittersmak fra  $^1\text{H}$  NMR-spektre. a) Sensorisk gradering av bittersmak plottet mot modellens kryssvaliderte prediksjoner av bittersmak. b) Modellens regresjonskoeffisienter.



### 5.5.2 Analyse av størrelsesseparasjonsdata fra SEC

Den viktigste variasjonen i SEC data var relatert til forskjell mellom fraksjonene etter filtrering, som sees i PCA plottet i Figur 14, der de ulike fraksjonene er separert i hovedsak langs den første prinsipalkomponent (PC1, 40,3%) men også med noe bidrag fra prinsipalkomponent 2 (PC2, 26,5%). PC2 er også relatert til konsentrasjon av protease siden produkter fra hydrolyse med lav konsentrasjon av en protease i hovedsak ligger på negativ side av PC2. Det ser også ut til at PC2 kan relateres til type protease, og spesielt skiller produkter fra Bromelain og Alcalase seg fra de to andre.



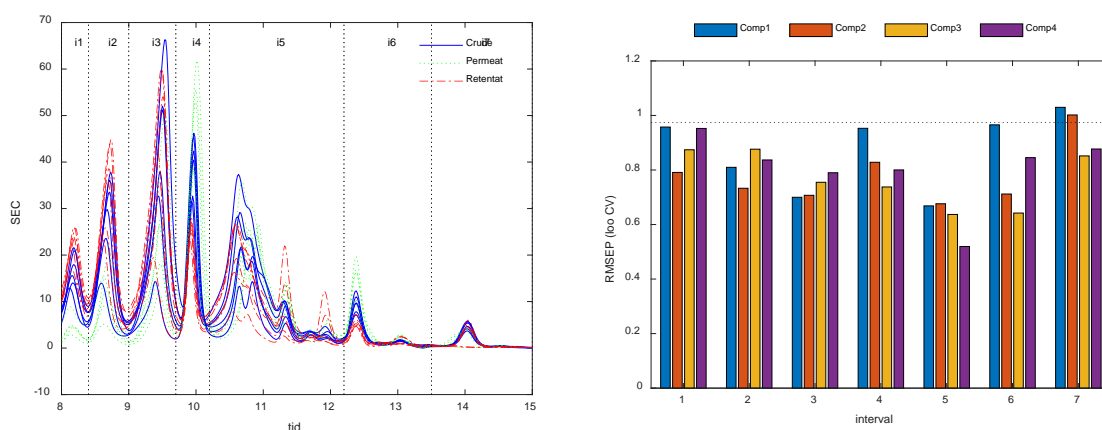
Figur 14. PCA basert på SEC data. Farge er relatert til fraksjon, mens symbol relateres til enzym konsentrasjon. Resultater er basert på funn i AP1 (Solstad et al 2020)

Multivariat ANOVA (Tabell 17) bekreftet effekt av fraksjonering, med signifikant eller nær signifikant p-verdi i alle delanalysene og for alle tre valgte metoder. Med 50-50 manova var effekten av type protease signifikant i alle delanalysene, mens det er noe mer usikkert med de andre metodene. Igjen var det interaksjoner mellom forsøksfaktorene som kompliserer resultatene.

Tabell 17. Resultater multivariat ANOVA for SEC. P-verdier < 0.1 er markert med fet skrift, p-verdier < 0.05 har i tillegg en stjerne. ExplVar = Forklart Varians, Pval = Pvalue

		ASCA		50-50 manova		ANOVA PC1		ANOVA PC2	
DATA	Term	ExplVar	pVal	ExplVar	pVal	ExplVar	Pval	ExplVa	Pval
<b>Del1</b>	Enzyme	11.08	<b>0.06</b>	11.08	<b>0.02</b>	0.56	0.51	21.05	<b>0.01</b>
	Conc	18.55	<b>0.04</b>	18.55	<b>0.01</b>	9.52	<b>0.08</b>	47.32	<b>0.00</b>
	Fraction	41.02	<b>0.03</b>	41.02	<b>0.03</b>	79.49	<b>0.02</b>	4.35	<b>0.07</b>
	Enzyme*Conc	4.99	0.16	4.99	0.11	0.17	0.70	0.06	0.62
	Enzyme*Fraction	7.63	0.17	7.63	0.26	5.57	0.24	1.04	0.25
	Conc*Fraction	13.29	<b>0.07</b>	13.29	<b>0.01</b>	2.95	0.37	25.84	<b>0.01</b>
<b>Del2</b>	Enzyme	30.80	<b>0.07</b>	30.80	<b>0.02</b>	8.46	0.39	57.23	<b>0.05</b>
	Fraction	42.39	<b>0.03</b>	42.39	<b>0.02</b>	77.55	<b>0.02</b>	25.89	0.16
<b>Del3</b>	Enzyme	42.59	0.20	42.59	<b>0.06</b>	26.70	0.24	80.91	0.11
	Fraction	28.97	<b>0.05</b>	28.97	<b>0.00</b>	62.25	<b>0.03</b>	2.73	0.53

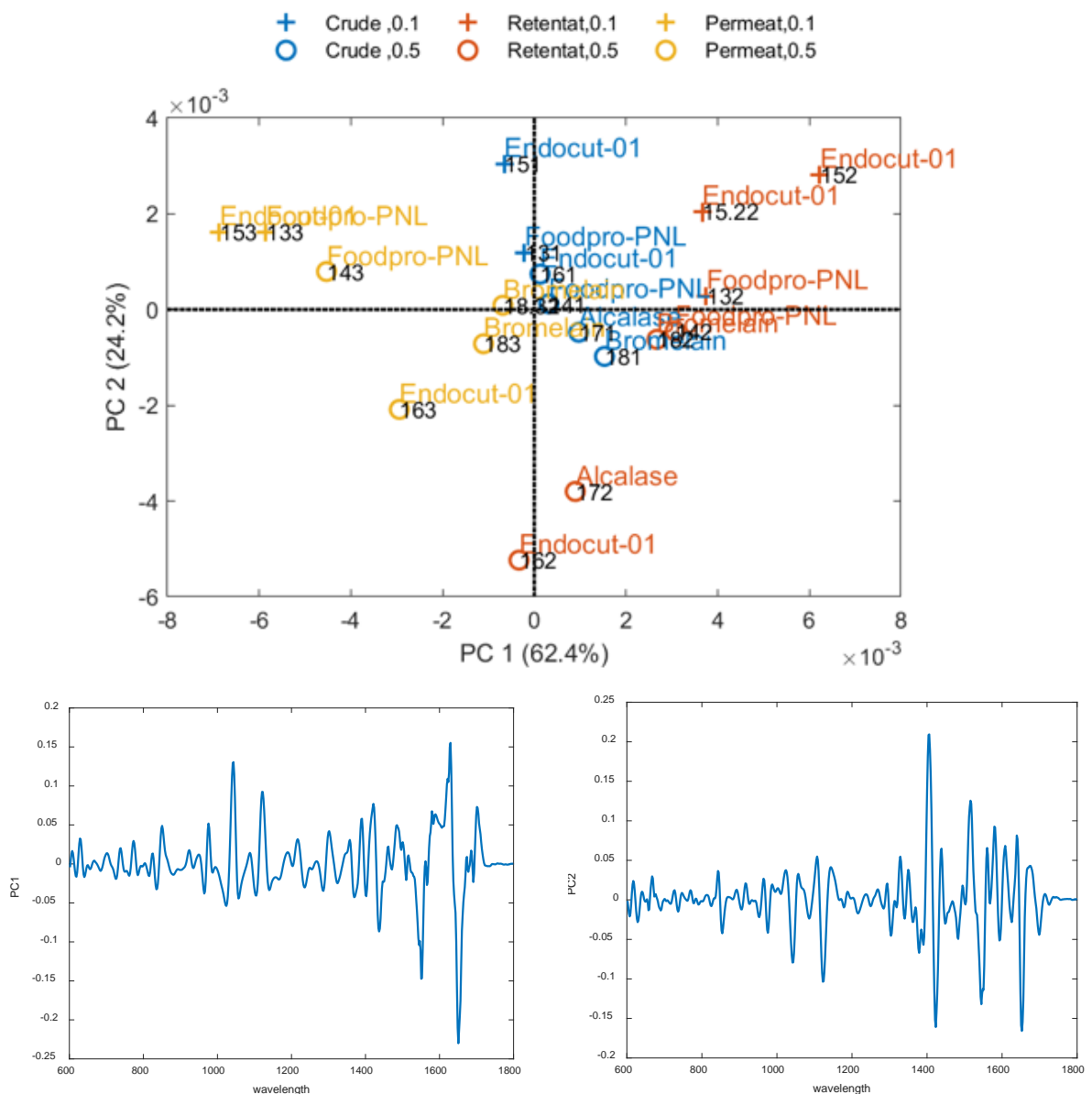
Bittersmak ble modellert med iPLS ved at kromatogrammene fra SEC ble delt i 7 regioner manuelt ved å splitte opp mellom topper. Molekylvektsfraksjoner som var sent eluert i region 5 (relativt små peptider) korrelerte best med bittersmak (Figur 15). Med PCA var det tydelig at hovedforskjellen i kromatogrammene var mellom regioner for sensoriske data (Solstad et al 2020), hvor PC1 er relatert til protease, mens PC2 er relatert til prosessering og skilte permeat fra de andre produktene. Sensoriske egenskaper med høy ladning på PC1 var harsk, bitter, astringent, mens egenskaper i motsatt retning var syrlig lukt og syrlig smak. Skalldyrsmak, skalldyrlukt og søttsmak var viktige for PC2 i de sensoriske dataene. Det er usikkert om prediksjonen er relatert til en reell korrelasjon mellom sensoriske egenskaper, eller er et resultat av at både SEC og sensoriske data til stor grad skiller mellom molekylvektsfraksjonene.



Figur 15. iPLS for SEC og sensoriske data—Høyre side: SEC data med intervaller, venstre side: Root Mean Squared Error of Prediksjon for prediksjon av bittersmak.

### 5.5.3 FTIR (fra protease-screeningforsøk i AP1)

De ulike hydrolysatfraksjonene var i hovedsak separert langs PC1 (62,4%), med Crude mellom Permeat og Retentat (Figur 16). Ladningsplottet til PC1 tyder på at denne forskjellen er hovedsakelig basert på forskjeller i protein sekundærstrukturer og proteinenes ryggrad, med noe bidrag av karboksylgrupper fra mindre peptider og frie aminosyre som trer enda mer tydelig frem i PC2. Multivariat ANOVA (Tabell 18) bekrefter at det er fraksjonering og ikke type protease eller konsentrasjon som har størst betydning basert på FTIR data.



Figur 16. PCA fra IR data øverst: Scoreplot, deretter ladninger fra henholdsvis PC1 og PC2.

Tabell 18. Oversikt over multivariat ANOVA IR screening forsøk AP1.

		ASCA		5050-manova		ANOVA PC1		ANOVA PC2	
DATA	Term	ExplVar	pVal	ExplVar	pVal	ExplVar	Pval	ExplVa	Pval
<b>Del1</b>	Enzyme	4.61	0.33	4.61	0.42	0.03	0.93	2.31	0.55
	Conc	9.84	0.17	9.84	0.15	0.04	0.92	38.93	0.10
	Fraction	58.63	0.07	58.63	0.06	81.34	0.07	14.70	0.39
	Enzyme*Conc	5.11	0.36	5.11	0.32	0.50	0.72	19.42	0.18
	Enzyme*Fraction	3.92	0.76	3.92	0.87	0.15	0.97	7.77	0.55
	Conc*Fraction	11.06	0.37	11.06	0.37	12.19	0.32	7.52	0.55
<b>Del2</b>	Enzyme	27.89	0.12	27.89	0.20	23.55	0.19	30.31	0.27
	Fraction	46.17	0.03*	46.17	0.02*	58.00	0.06	36.41	0.23
<b>Del3</b>	Enzyme	39.31	0.49	39.31	0.48	36.81	0.53	43.73	0.12
	Fraction	25.31	0.20	25.32	0.22	22.56	0.29	46.76	0.03*

## 5.6 Kjemisk og sensorisk evaluering av maskerte hydrolysater

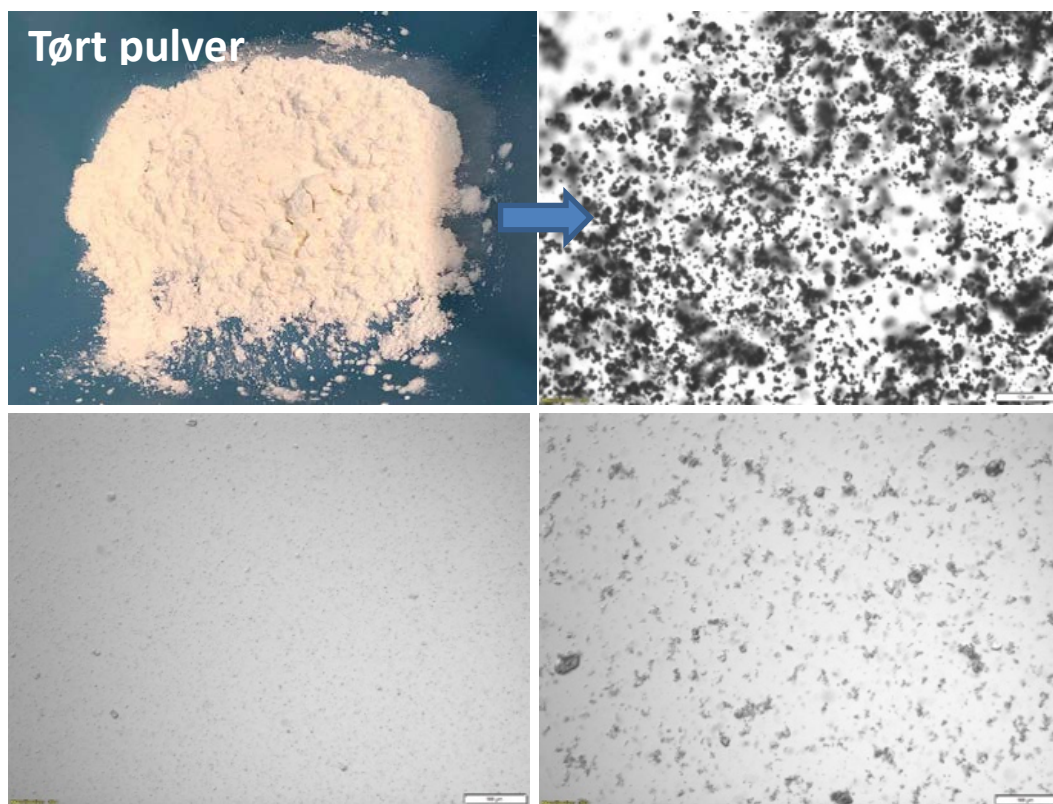
### 5.6.1 Maskering av smakskomponenter (Task 2.2)

Hydrolysat før (H-Crude) og etter nanofiltrering (H-Retentat) ble testet i maskeringsforsøkene. Startmaterialet hadde en tørrvekt på 3,0% (H-Crude) og 6,0% (H-Retentat). Resultater fra forsøk er oppsummert i Tabell 19. De fleste av forsøkene var vellykket og ga tørt pulver med høyt utbytte (63-84%) og lav restfuktighet (5-7%), se også Figur 17. To av prøvene viste seg å være problematiske. Det var umulig å lage en kontroll (tørt pulver) fra H-crude (nr. 26), og H-crude med maltodekstrin (1:1, nr. 15) hadde lavt utbytte (23%). Disse resultatene er i samsvar med den lavere tørrvekten og innhold av lavmolekylære aminosyrer og peptider i dette produktet sammenlignet med H-Retentat (Tabell 8). Prøver maskert med maltodekstrin besto av løselig aggregert pulver med en gjennomsnittlig partikkelstørrelse på 2-5 µm (estimert fra optisk mikroskopi), mens prøver maskert med myse ga større (5-10 µm) og mindre aggregerte partikler.

Tabell 19. Oversikt over maskeringsforsøk utført på H-Crude og H-Retentat

No.	Hydrolysat	Ratio H:M	Mask	pH justering?	Utbytte (%)	Vann (%)	Resultat
25	Retentat	n/a	Ingen		70	6,81	Tørt pulver
26	Crude	n/a	Ingen		n/a	n/a	Fungerte ikke
15	Crude	1:1	Malto		23	n/a	Tørt pulver
16	Crude	1:4	Malto		81	5,53	Tørt pulver
17	Crude	1:1	Myse		78	6,00	Tørt pulver
18	Crude	1:4	Myse		78	5,83	Tørt pulver
19	Retentat	1:1	Malto		78	5,98	Tørt pulver
20	Retentat	1:4	Malto		74	6,47	Tørt pulver
21	Retentat	1:1	Myse		64	7,11	Tørt pulver
22	Retentat	1:4	Myse		63	7,69	Tørt pulver
29	Retentat	1:4	Malto	Ja	76	4,50	Tørt pulver
30	Retentat	1:4	Myse	Ja	84	5,80	Tørt pulver

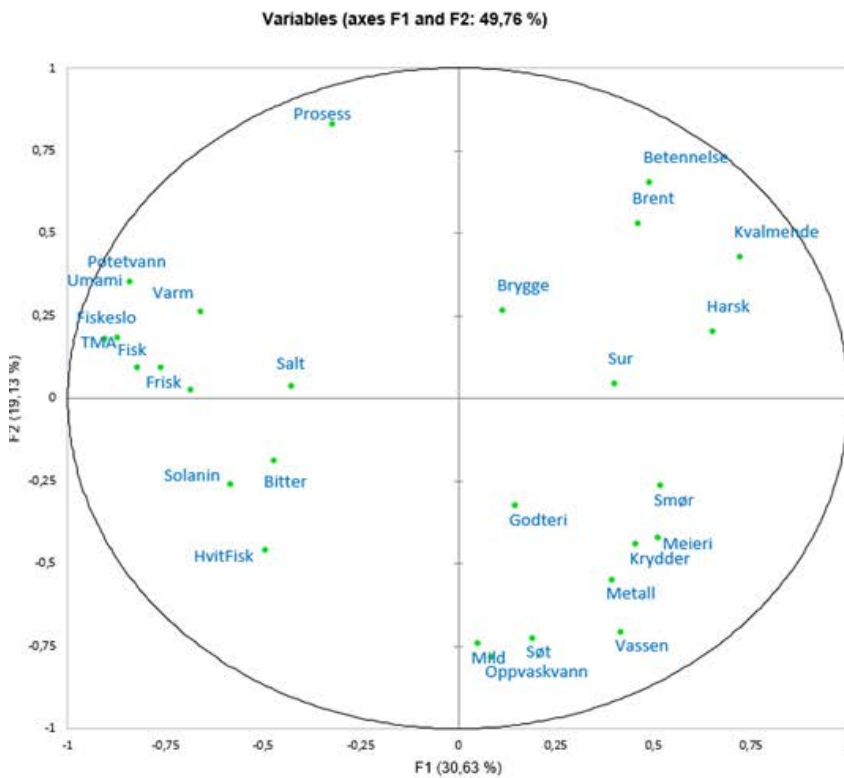
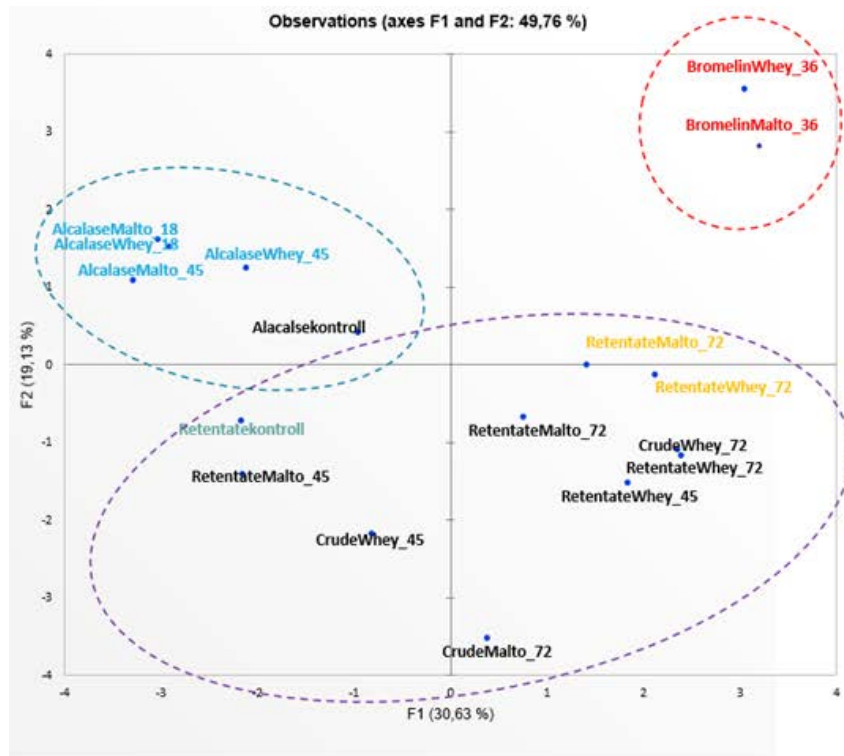
Ved undersøkelse av løselighet/dispergerbarhet for de maskerte hydrolysatene ble det funnet at alle de maskerte hydrolysatene kunne dispergeres raskt i vann med et minimum av påført skjær (risting), og resulterte i lysegule suspensjoner. Etter redispersering i vann ga prøver med maltodekstrin ikke små restpartikler, mens prøver maskert med myse fortsatt hadde små mengder av 1-2  $\mu\text{m}$  partikler (Figur 17, nederst til venstre). Justering av pH med sitronsyre resulterte i større partikler med mer kompleks struktur (se Figur 17, nederst til høyre). Dette er konsistent med attraktive elektrostatiske interaksjoner som blir mer fremtredende ved pH-justering og gir en sterkere binding mellom maskeringsagent og hydrolysat. Vår arbeidshypotese er at proteinhydrolysater som er sterkere bundet vil resultere i mindre smak, ettersom hydrolysatene da ikke er tilgjengelig for binding til smaksløker i munnen.



Figur 17. Eksempel på resultat fra spraytørrking: Øverst til venstre; bulk pulver, Øverst til høyre; optisk mikroskopi av bulk pulver. Nedre panel, redispersert pulver, retentat: myse 1:4, venstre uten pH justering (# 20), Nederst til høyre; med pH justering (# 30). Målestokk: 100  $\mu\text{m}$

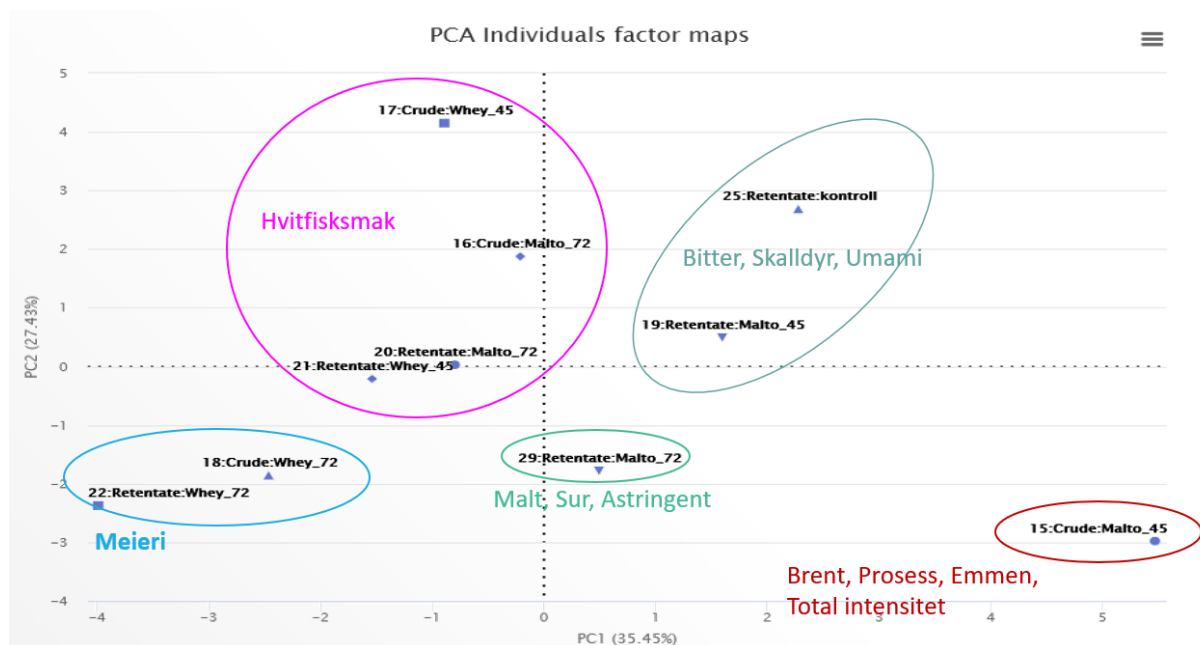
### 5.6.2 Sensorisk vurdering av maskerte hydrolysater fra AP1 og AP2 (Task 4.5)

Projective mapping ble brukt på maskerte hydrolysater fra AP1 (Alcalase og Bromelain) og viste at produktene i all hovedsak skilte seg fra hverandre basert på den proteasen som ble benyttet i hydrolyseprosessen (Figur 18). Hydrolysater basert på Bromelain, uavhengig maskeringskomponent, lå begge sammen øverst til høyre i observasjonsplottet og ble beskrevet som kvalmende, brent smak, harsk og med smak av betennelse. Det samme gjaldt for hydrolysater der Alcalase var benyttet, de lå samlet, men i motsatt side av plottet for Bromelain. Hydrolysatene basert på Alcalase hadde kraftig smak/lukt av fisk, fiskeslo, TMA, umami og potetvann. De resterende hydrolysatene fra AP2 fordelte seg i nedre halvdel av plottet uten noen form for gruppering. Hydrolysatene basert på Alcalase og Bromelain ble ikke tatt med i den videre profileringen.



Figur 18. Projective mapping med trent sensorisk panel basert på maskerte hydrolysater produsert i AP1 (Solstad et al 2020) og AP2. Totalt 17 maskerte hydrolysater ble vurdert og presentert i observasjonsplottet (øverst). Tilhørende sensoriske egenskaper er presentert i variabelplottet (nederst). Hydrolysaterne var enten maskert med myseprotein (whey) eller maltodekstrin (Malto) i to ulike nivåer (45=lav, 72=høy). I tillegg var to prøver (i gult) tilsatt sitronsyre.

PCA-plott av resultater fra den beskrivende sensoriske analysen (Figur 19) viste at Retentat uten maskering (kontroll) og Retentat med lav maskering av maltodekstrin (25:Retentat:Malto:45) ble beskrevet som bitre, med smak av umami og skalldyr. Også lavt nivå av maltodekstrin på Crude (15:Crude:Malto:45) hadde liten effekt av maskering og ble beskrevet med egenskaper som brent, prosess, emmen og høy total intensitet. Derimot hadde maskering med høyt nivå av myseprotein effekt på smaken, og disse ble oppfattet som meierismak. Resultater viste at både Crude og Retentat maskert med myseprotein fikk en tydelig smak av meieri, og signifikant lavere bittersmak og TMA-smak enn Retentat kontroll (uten maskering) (Tabell 20). Også maskering med lavt nivå av myseprotein førte til en reduksjon av bittersmak, uten at meierismaken ble særlig fremtredende. Myseprotein som maskeringskomponent ga en sterkere egensmak enn det maltodekstrin gjorde, men så ut til å være mer effektiv til å maskere de negative smaksegenskapene i større grad. Ved bruk av ulike maskeringskomponenter kan det være hensiktsmessig å tilpasse smaksprofilen med tanke på hvilket produkt hydrolysatene eventuelt skal tilsettes i.



Figur 19. Maskerte hydrolysater fra AP2. PCA med klusteranalyse for de maskerte hydrolysatene for dimensjon 1 (35,45%) og dimensjon 2 (27,43%). Sensoriske egenskaper som er vesentlig forskjellig for de fem klusterene er angitt i plottet.



Tabell 20. Maskerte hydrolysater fra AP2. Multivariat ANOVA med Tukeys test for sensorisk profilering med QDA for hydrolysater (Crude og Retentat) maskert med to nivåer (lavt=45, høyt=72) av maltodekstrin (Malto) eller myseprotein (Whey), i tillegg til en prøve som også var tilsatt sitronsyre

Egenskaper	Crude				Retentat						P-verdi
	Malto_45	Malto_72	Whey_45	Whey_72	Retentate kontroll	Malto_45	Malto_72	Whey_45	Whey_72	Malto_72 sitronsyre	
Syrligsmak	1.53 B	2.38 AB	2.86 A	1.57 B	2.06 AB	1.73 B	2.09 AB	1.92 AB	1.45 B	2.31 AB	<0.001
Søtsmak	1.84 A	2.27 A	2.34 A	2.08 A	2.35 A	2.12 A	2.21 A	1.88 A	2.20 A	1.90 A	0,668
Saltsmak	2.29 AB	1.90 ABCD	2.23 ABC	1.82 BCD	2.35 A	2.06 ABCD	1.75 CD	1.84 ABCD	1.60 D	1.56 D	<0.001
Sursmak	4.35 B	2.08 C	2.02 C	1.78 C	2.10 C	2.21 C	2.02 C	2.17 C	1.98 C	5.66 A	<0.001
Bittersmak	3.06 ABC	2.42 C	2.42 C	2.27 C	<b>3.54 A</b>	3.37 AB	2.72 ABC	2.60 BC	2.56 BC	2.54 BC	<0.001
Umamismak	2.04 C	2.01 C	2.89 AB	1.90 C	3.48 A	2.35 BC	1.86 C	2.04 C	1.70 C	1.52 C	<0.001
Trimetylaminsmak	<b>3.79 A</b>	3.21 ABC	2.81 ABCD	2.04 CD	3.32 ABC	3.40 AB	2.79 ABCD	2.45 BCD	<b>1.52 D</b>	2.30 BCD	<0.001
Metallsmak	3.02 A	2.87 A	2.72 A	3.02 A	2.94 A	2.96 A	2.96 A	3.02 A	2.89 A	2.85 A	0,997
Emmensmak	<b>4.74 A</b>	2.58 B	2.06 B	3.21 B	2.68 B	3.02 B	2.85 B	2.29 B	3.28 B	2.33 B	<0.001
Hvit fiskesmak	2.02 B	3.02 A	3.23 A	2.01 B	2.42 AB	2.40 AB	2.42 AB	2.67 AB	1.70 B	1.92 B	<0.001
Skalldyrsmak	1.66 AB	1.90 AB	1.91 AB	1.49 AB	2.02 A	2.04 A	1.43 AB	1.36 AB	1.20 B	1.32 AB	<0.001
Bryggesmak	2.35 A	2.01 AB	1.56 AB	1.25 B	1.89 AB	2.17 AB	1.94 AB	1.45 AB	1.21 B	1.53 AB	0,004
Vassensmak	2.20 BC	2.99 B	2.61 BC	3.13 AB	<b>1.72 C</b>	2.95 B	3.10 AB	3.29 AB	4.20 A	2.15 BC	<0.001
Meierismak	1.28 B	1.10 B	1.80 B	<b>3.39 A</b>	1.19 B	1.36 B	1.18 B	1.50 B	<b>3.66 A</b>	1.08 B	<0.001
Maltekstraktsmak	1.04 A	1.06 A	1.00 A	1.00 A	1.00 A	1.01 A	1.01 A	1.02 A	1.00 A	1.12 A	0,46
Prosessmak	2.73 A	1.38 B	1.18 B	1.10 B	1.52 B	1.75 B	1.77 AB	1.36 B	1.13 B	1.41 B	<0.001
Brentsmak	<b>2.37 A</b>	1.20 B	1.17 B	1.06 B	1.27 B	1.28 B	1.14 B	1.17 B	1.03 B	1.10 B	0,002
Harsksmak	2.02 A	1.68 A	1.25 A	2.19 A	1.52 A	2.02 A	1.93 A	1.40 A	2.18 A	1.27 A	0,006
<b>Total</b>											
smaksintensitet	<b>5.80 A</b>	3.92 CD	4.03 CD	4.13 BCD	4.95 ABC	4.54 BCD	<b>3.69 D</b>	<b>3.52 D</b>	<b>3.66 D</b>	5.20 AB	<0.001
Adstringens	3.86 AB	3.01 BC	2.98 C	3.17 ABC	3.17 ABC	3.17 ABC	2.88 C	3.06 BC	2.94 C	4.00 A	<0.001

## 5.7 Industriell-skala produksjon ved Biotep (Task 2.3)

Hydrolyse av makrellråstoff ved Biotep ble utført i november 2020. Det ble fremskaffet 1400 kg råstoff til denne prosessen og 19 kg ferdig, spraytørket produkt ble produsert, noe som tilsa et prosessutbytte på 1,36 %.

Den kjemiske sammensetningen til hydrolysatet (Tabell 21) viste at produktet inneholdt en relativt høy andel av de lavmolekylære forbindelsene <200 Da, noe som tyder på at nanofiltreringsprosessen på Biotep ikke har vært like effektiv som i pilotskala. Hydrolysatet ble ikke diafiltrert, men det bør man gjøre ved nanofiltrering av makrellhydrolysat, grunnet det store askeinnholdet. Produktet ble i tillegg vurdert som noe mer smaksrikt enn produktet som ble produsert i AP2.1, av utrente prosjektdeltagere. Selv om det endelige sluttproduktet ikke møtte et ønskelig nøytralt smakskriterium, har det muligens et potensiale innen *petfood*.

Tabell 21. Kjemisk sammensetning og peptidstørrelsesfordeling av proteinproduktet

Analyse	Hydrolysat
Protein	91,9
Tørrstoff	96,8
Aske	8,7
>20000 Da	0,1
20000-15000 Da	0,1
15000-10000 Da	0,2
10000-8000 Da	0,2
8000-6000 Da	0,6
6000-4000 Da	1,5
4000-2000 Da	6,3
2000-1000 Da	13,5
1000-500 Da	17,6
500-200 Da	21
<200 Da	38,9

## 6 Hovedfunn

- Det er mulig å fremstille et makrellhydrolysat som har lavere smaksintensitet enn et kommersielt relevant produkt (basert på laks) i pilotskala. Ranging mot det kommersielle hydrolysatet viste at Retentat-fraksjonen fra nanofiltrering av makrellhydrolysatet hadde lik, eller noe lavere nivå, av total smaksintensitet, bittersmak og fiskesmak som det kommersielle produktet.
- Nanofiltrering er effektivt for å fjerne aske, små molekyler og TMA fra makrellhydrolysat og makrellimvann.
- Lipofile peptider og/eller aminosyrer korrelerer med intensitet av bittersmak i makrellhydrolysater, og utvikling og implementering av metodikk for å fjerne disse kan bidra til enda bedre smak.
- De flyktige komponentene i hydrolysatene inkluderer både fett- og proteinoksidasjonsprodukter, i tillegg til andre kjente metabolitter som trimetylamin (TMA). Til tross for svært lave nivåer av fett i hydrolysatene viser prosjektet at fettoksidasjonsprodukter, som heksanal, ser ut til å forårsake uønskede lukt- og smaksegenskaper i sluttproduktene. Dette viser at det er nødvendig å utvikle verktøy for å kontrollere protein- og fettoksidasjon under prosesseringen.
- Det er mulig å produsere maskert spraytørket hydrolysat med bindemidler til testing i smakspaneler og det er mulig å kontrollere binding mellom myseprotein, hydrolysat og gum arabic med pH.
- Det er vanskelig å oppskalere pilotskala-prosessen til industriell skala, og ytterligere forsøk trengs før videre implementering i industrien.

## 7 Leveranser

### Populærvitenskapelig artikkel:

Vil knekke makrellkoden med et SMELL. Kyst og fjord, 08.02.21

<https://www.kystogfjord.no/nyheter/forsiden/Vil-knekke-makrellkoden-med-et-SMELer>

## 8 Referanser

- Aspevik T., Totland C., Lea P., Oterhals Å. 2016a. Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. *Process Biochem.* 51(8): 1006-1014.
- Aspevik, T., Egede-Nissen, H., Oterhals, A. 2016b. A Systematic Approach to the Comparison of Cost Efficiency of Endopeptidases for the Hydrolysis of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) By-Products. *Food Technol Biotechnol* 54(4), 421-431.
- Aspevik, T., Thoresen, L., Steinsholm, S., Carlehög, M., Kousoulaki, K. 2021. Sensory and chemical properties of protein hydrolysates based on mackerel (*Scomber scombrus*) and salmon (*Salmo salar*) side stream materials. *J Aquat Food Prod Technol.*
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L. & Frost, B. (1987). A New, Rapid, High-Sensitivity Analysis of Amino-Acids in Food Type Samples. *J Assoc Off Ana Chem* 70(2): 241-247.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Phys* 37(8): 911-917.
- Cohen, S. A. & Michaud, D. P. 1993. Synthesis of a fluorescent derivatization reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography. *Analytical Biochemistry* 211(2): 279-287.
- Conway, E. J. & Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *Biochemical Journal* 27(2): 419-429.
- FAO/WHO. 2012. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Joint FAO/WHO expert meeting report. Rome, Italy.
- ISO 13299. 2016. Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile. International Organization for Standardization, Genève, Sveits.
- ISO Official Method 5983-2. 2009. Animal feeding stuffs - Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. International Organization for Standardization, Genève, Sveits.
- ISO Official Method 5984-2. 2002. Animal feeding stuffs - Determination of crude ash. International Organization for Standardization, Genève, Sveits.
- ISO Official Method 6496-2. 1999. Animal feeding stuffs - Determination of moisture and other volatile matter content. International Organization for Standardization, Genève, Sveits
- ISO 8586. 2012. Sensory Analysis - General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. International Organization for Standardization, Genève, Sveits
- Jansen, J. J., Hoefsloot, H. C. J., van der Greef, J., Timmerman, M. E., Westerhuis, J. A., & Smilde, A. K. 2005. SCA: analysis of multivariate data obtained from an experimental design. *J. Chemom*, 19(9), 469-481.
- Kim H.-O. & Li-Chan, E.C.Y., 2006. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J Agric Food Chem* 54, 10102-10111.
- Langsrud, O. 2002. 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *Journal of the Royal Statistical Society Series D-the Statistician*, 51, 305-317.
- Langsrud, O. (2005). Rotation tests. *Statistics and Computing*, 15(1), 53-60.
- Luciano, G., & Næs, T. 2009. Interpreting sensory data by combining principal component analysis and analysis of variance. *Food Quality and Preference*, 20(3), 167-175.
- Mietz, J. L., Karmas, E. 1978. Polyamine and Histamine Content of Rockfish, Salmon, Lobster, and Shrimp as an Indicator of Decomposition. *J Assoc Off Ana Chem* 61(1): 139-145.
- Ney, K. H. 1971. Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 147:64
- Norgaard, L., Saudland, A., Wagner, J., Nielsen, J. P., Munck, L., & Engelsen, S. B. 2000. Interval Partial Least Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy *Applied Spec.*, 54(3), 413-419.
- Solstad, R.G, Vang, B., Gaarder, M.Ø, Molesworth, P. et al. 2000. Smaksnytrale protein fra makrell (SMELL). Delrapport for AP1. Nofima rapport 15/2020. ISBN 978-82-8296-631-3
- Sone I., Skara T., Olsen S.H. 2019. Factors influencing post-mortem quality, safety and storage stability of mackerel species: A review. *Eur Food Res Technol.* 245(4): 775-791.
- Steinsholm S., Oterhals Å., Underhaug J., Måge I., Malmendal A., Aspevik T. 2020. Sensory assessment of fish and chicken protein hydrolysates. Evaluation of NMR metabolomics profiling as a new prediction tool. *J Agric Food Chem.* 68(12):3881-3890.
- Wang-Andersen, J., Haugsgjerd, B. O. 2011. Forbedret analysemetodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater. Nofima-rapport 43/2011. ISBN: 978-82-7251-926-0

## 9 Vedlegg 1

Sensoriske egenskaper benyttet i QDA på maskerte hydrolysater

### BEDØMMELSE AV HYDROLYSAT

egenskapsforklaring

#### **SMAK**

<b>Syrligsmak</b>	Relateres til en frisk, balansert smak som skyldes organiske syrer Ingen intensitet = ingen syrligsmak Tydelig intensitet = tydelig syrligsmak
<b>Søtsmak</b>	Relateres til grunnsmaken søt (sukrose) Ingen intensitet = ingen søtsmak Tydelig intensitet = tydelig søtsmak
<b>Saltsmak</b>	Relateres til grunnsmaken salt (natriumklorid) Ingen intensitet = ingen saltsmak Tydelig intensitet = tydelig saltsmak
<b>Sursmak</b>	Relateres til grunnsmaken sur Ingen intensitet = ingen sursmak Tydelig intensitet = tydelig sursmak
<b>Bittersmak</b>	Relateres til alle bitre smaker Ingen intensitet = ingen bittersmak Tydelig intensitet = tydelig bittersmak
<b>Umamismak</b>	Relateres til grunnsmaken umami Ingen intensitet = ingen umamismak Tydelig intensitet = tydelig umamismak
<b>Trimetylaminsmak</b>	Smak av trimetylamin (TMA), ammonniakk og stikkende Ingen intensitet = ingen trimetylamin smak Tydelig intensitet = tydelig trimetylamin smak
<b>Metallsmak</b>	Relateres til en smak av metall Ingen intensitet = ingen metallsmak Tydelig intensitet = tydelig metallsmak
<b>Emmen smak</b>	En ufrisk / kvalmende smak Ingen intensitet = ingen emmen smak Tydelig intensitet = tydelig emmen smak
<b>Hvit fiskesmak</b>	Relateres til smaker av fersk hvit fisk

Ingen intensitet = ingen fiskesmak  
Tydelig intensitet = tydelig fiskesmak

**Skalldyrsmak** Smak av skalldyr, (kreps, krabbe, reker)  
Ingen intensitet = ingen skalldyrsmak  
Tydelig intensitet = tydelig skalldyrsmak

**Bryggesmak** Relateres til en smak av brygge, fiskeslo, gamle fiskekasser  
Ingen intensitet = ingen bryggesmak  
Tydelig intensitet = tydelig bryggesmak

**Vassen smak** Relateres til en vassen smak (avkok av poteter, tam)  
Ingen intensitet = ingen potetvannsmak  
Tydelig intensitet = tydelig potetvannsmak

**Meierismak** Relateres til en smak av meieri (smør, melk, myse)  
Ingen intensitet = ingen meierismak  
Tydelig intensitet = tydelig meierismak

**Maltekstraktsmak** Relateres til smak av maltekstrakt, malt  
Ingen intensitet = ingen maltekstraktsmak  
Tydelig intensitet = tydelig maltekstraktsmak

**Prosess smak** Relateres til en kjemikalie, mekanisk, eksos smak.  
Ingen intensitet = ingen prosess smak  
Tydelig intensitet = tydelig prosess smak

**Brentsmak** Relateres til en brent smak, svidd  
Ingen intensitet = ingen brent smak  
Tydelig intensitet = tydelig brent smak

**Harsksmak** Styrken av alle harske smaker (gress, høy, stearin, maling)  
Ingen intensitet = ingen harsk smak  
Tydelig intensitet = tydelig harsk smak

**Total smaksintensitet** Styrken av alle smaker i prøven  
Ingen intensitet = ingen smak  
Tydelig intensitet = tydelig smak

## **MUNNFØLELSE**

**Astringent** En kompleks følelse, etterfulgt av sammentreknings, tørrhetsfølelse, snurping av huden eller slimhinner i munnen  
Ingen intensitet = ingen astringens  
Tydelig intensitet = tydelig astringens

