

Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL)

Delrapport for AP 1

Runar Gjerp Solstad, Birthe Vang, Mari Øvrum Gaarder, Peter Molesworth, Tone Aspevik, Katinka Dankel, Sileshi Wubshet, 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
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL) Delrapport for AP 1</p>	<p>ISBN 978-82-8296-631-3 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 15/2020</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Runar Gjerp Solstad, Birthe Vang, Mari Øvrum Gaarder, Peter Molesworth (SINTEF Industri), Tone Aspevik, Katinka Dankel, Sileshi Wubshet, Wilhelm Glomm (SINTEF Industri), Diana Lindberg</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p> <p><i>Dato:</i> 30.03.2020</p>
<p><i>Avdeling:</i> Råvare og prosess</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 15</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901534</p>
<p><i>Stikkord:</i> Enzymatisk proteinhydrolyse, makrell, verdiøkning, limvann, smaksmaskering, membranfiltrering, pelagisk løft</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 12754</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>I AP1 i prosjektet Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL), finansiert av FHF, ble enzymatisk proteinhydrolyse på makrellrygg utført med 10 forskjellige proteaser. Dette for å finne ut hvilken protease som hadde forutsetninger til å produsere best mulige proteinprodukter av restråstoff fra makrellindustrien. Hydrolysaten ble analysert for sensoriske egenskaper, ved bruk av blant annet Projective Mapping (Napping®) og proteinutbytte. Alcalase og Bromelain ble regnet som lite egnet, da disse var veldig astringent og ga sterkest bittersmak. To proteaser, Endocut 01 og Foodpro PNL, ble selektert for videreføring basert på sensoriske egenskaper og pris. De to proteasene ble så brukt til hydrolyse med to forskjellige konsentrasjoner, og disse hydrolysaten ble deretter membranfiltrert med 1 kDa filter, med det formål å fjerne lavmolekylære smakskomponenter. Opprinnelig hydrolysat, retentat (hovedsakelig molekylvekt over 1 kDa) og permeat (hovedsakelig molekylvekt under 1 kDa) ble sensorisk bedømt ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA) for å evaluere bruk av membranfiltrering på smak. I tillegg ble det produsert hydrolysat basert på Alcalase for å finne mest gunstige parametere til spraytørking og smaksmarkering. Basert på resultater fra AP1, ble FoodPro PNL valgt til bruk i pilotskalaforsøk (AP2).</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>In the FHF-financed project Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL), the goal is to develop a method to produce a taste-neutral protein powder from mackerel by-products for human consumption and petfood. Results from the first work package shows that</p> <ul style="list-style-type: none"> • In protein hydrolysis of mackerel backbones, the choice of protease influences bitterness, and use of the correct protease results in protein hydrolysates exhibiting low bitterness. • Membrane filtration has the potential to reduce negative sensory attributes • The method choice for mixing taste-masking compounds with hydrolysates was successful, but choice of protease will influence yield 	

Forord

Dette er en delleveranse til prosjektet Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL), finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF p.nr. 901534). Denne delleveransen har fokus på arbeidet som er utført i arbeidspakke 1 (AP1), for å ha en mulighet til å snarest mulig oppdatere industrien på de resultater som foreligger etter en første prosessoptimalisering i lab skala. Det er viktig å påpeke at rapporten bare omhandler første trinn i et prosjekt som fortsetter ut 2020, og derfor må delrapporten anses som et foreløpig resultat fra prosjektet.

Innhold

1	Sammendrag (både på norsk og engelsk)	1
2	Innledning	2
3	Problemstilling og formål	3
4	Prosjektgjennomføring	4
4.1	Valg av metodisk tilnærming og mål med oppgavene	4
4.2	Materiale og metode.....	4
4.2.1	Råstoff	4
4.2.2	Enzymatisk proteinhydrolyse	5
4.2.3	Optimalisering og membranfiltrering.....	6
4.2.4	Maskering av smakskomponenter	6
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	8
5.1	Task 1.1. Optimalisering av enzymatisk hydrolyse.....	8
5.2	Task 1.2 Raffinering av hydrolysater og limvann.....	9
5.3	Task 1.3 Maskering av smakskomponenter	11
6	Hovedfunn	13
7	Leveranser	14
8	Referanser	15

1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

I AP1 i prosjektet Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL), finansiert av FHF, ble enzymatisk proteinhydrolyse på makrellrygg utført med 10 forskjellige proteaser. Hensikten var å finne ut hvilken protease som hadde forutsetninger til å produsere best mulige proteinprodukter av restråstoff fra makrellindustrien. Hydrolysaten ble analysert for sensoriske egenskaper, ved bruk av blant annet Projective Mapping (Napping®) og proteinutbytte. Alcalase og Bromelain ble regnet som lite egnet, da disse var veldig astringent og ga sterkest bittersmak. To proteaser, Endocut 01 og Foodpro PNL, ble selektert for videreføring basert på sensoriske egenskaper og pris. De to proteasene ble så brukt til hydrolyse med to forskjellige konsentrasjoner, og disse hydrolysaten ble deretter membranfiltrert med 1 kDa filter, med det formål å fjerne lavmolekylære smakskomponenter. Opprinnelig hydrolysat, retentat (hovedsakelig molekylvekt over 1 kDa) og permeat (hovedsakelig molekylvekt under 1 kDa) ble sensorisk bedømt ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA) for å evaluere bruk av membranfiltrering på smak. I tillegg ble det produsert hydrolysat basert på Alcalase og Bromelain for å finne mest gunstige parametere til spraytørring og smaksmaskering. Basert på resultater fra AP1, ble FoodPro PNL valgt til bruk i pilotskalaforsøk (AP2).

As a first step in Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL), financed by FHF, enzymatic protein hydrolysis was performed on mackerel backs using 10 different proteases. This was done to identify which of these proteases that resulted in the best possible protein product based on by-products from the mackerel industry. The resulting hydrolysates were compared, mainly by use of sensory attributes using Projective mapping (Napping®) and protein yield. Alcalase and Bromelain hydrolysates were considered as unsuitable as these hydrolysates were astringent while also resulting in the highest bitterness. Endocut 01 and Foodpro PNL were selected for further work, based primarily on sensory attributes and prices. In the next round of experiments, two concentrations of the selected proteases were used to produce hydrolysates that were subjected to membrane filtration with the purpose to reduce the level of low-molecular weight taste-eliciting compounds. After filtration, the start hydrolysates, retentates (molecular weights about 1kDa) and permeate (molecular weights below 1kDa) were subjected to a Qualitative Descriptive Analysis (QDA) sensory analysis to evaluate the filtration effects on sensory properties. In addition, hydrolysates based on use of Alcalase and Bromelain were produced to find the most favorable parameters for spray drying and taste masking. Based on results from WP1, Foodpro PNL was selected for use in the pilot scale trials in WP2.

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 av ca. 350 000 tonn eksporteres ut av landet rundfrosset. Dette innebærer at en stor del av verdiskapingen basert på både råstoff og avskjær (såkalt «restråstoff») fra makrell går tapt for Norge. SMELL er det 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. Limvannet 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 med forskjellig størrelse.

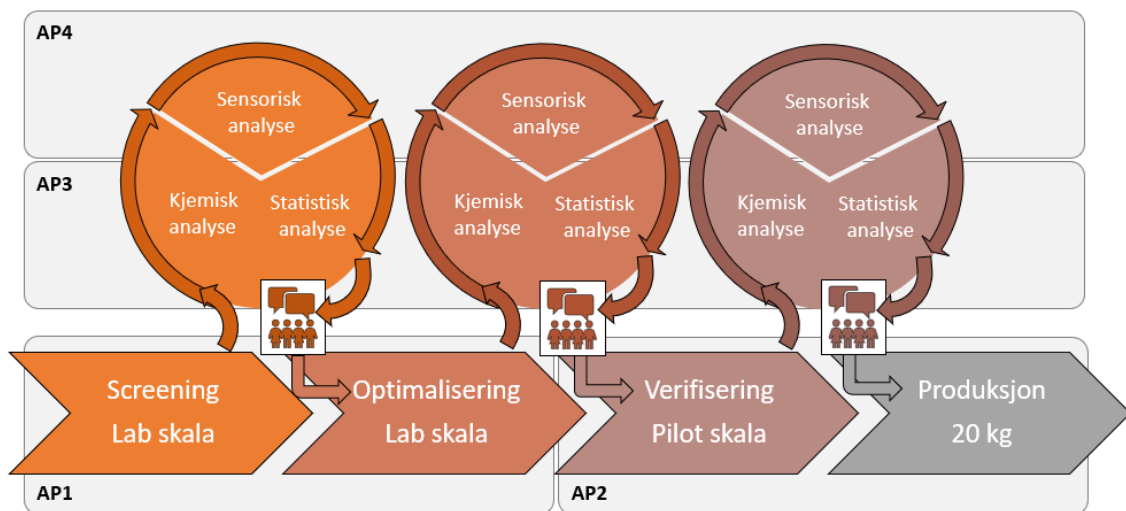
Det er mulig å oppnå høy verdiskaping dersom man produserer peptider med bioaktivitet, slik som blodtrykkshemmere og kolesterolhemmere. Slike peptider kan selges som verdifulle ingredienser i eksempelvis funksjonell mat og nutraceuticals. Fordelen med EPH er at det er en mildere prosess som kan føre 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. Dette er grunnen til at prosjektgruppen i SMELL har valgt å fokusere på bruk av enzymatisk proteinhydrolyse for gjennomføring av prosjektet, men det er også inkludert arbeid med limvann (AP2).

Prosjektgruppen består av forskere og representanter fra Nofima AS, Sintef industri og Pelagia. Styringsgruppen 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 er velkjent faktum at man kan forvente smaksutfordringer i proteinfraksjoner fremstilt fra restråstoff av makrell. Limvann og hydrolysat fra pelagiske arter er karakterisert med en ekstra intens lukt og smak av fisk. Makrell er 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 enzymatisk nedbryting av trimethylaminoksid (TMAO) til trimethylamin (TMA) som fører til en sterk fiskelukt.

Det overordnede prosjektmålet i SMELL er 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 tilnærming. Prosjektet består av fire arbeidspakker, AP 1-4, som jobber sammen i en interaktiv prosess for å kunne lære fra tidligere trinn under smaksoptimalisering (se figur 1).



Figur 1. SMELL er bygget opp i en interaktiv 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.

Denne delrapporten omhandler arbeidet i AP1, «Optimalisert lab skala produksjon av smaksnøytralt limvann og hydrolysat». Det var opprinnelig tenkt at også limvann skulle brukes i både membranfiltrerings- og maskeringsforsøk i AP1, men grunnet problemer med leveranse fra industrien er ikke arbeid med limvann inkludert i denne arbeidspakken, noe som er blitt klarert med styregruppen.

To delmål ble identifisert for arbeidspakken:

- Å bruke enzymatisk proteinhydrolyse samt prosessering av limvann for å få ønsket smaksprofil, kvalitet og proteinutbytte
- Å bruke membranfiltrering for å fjerne uønskede smaks- og luktkomponenter fra limvann samt proteinfraksjonen etter enzymatisk proteinhydrolyse

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Valg av metodisk tilnærming og mål med oppgavene

SMELL er oppbygget på en metodikk der trinnvis input veileder optimalisering og avklaring av kandidater for videre prosessering og oppskalering i AP2, pilot skala forsøk. Arbeidet i AP1 dreier seg om prosessutvikling og er oppdelt i tre forskjellige task'er. For å få gjennomført flest mulig forsøk er disse utført i lab skala.

Task 1.1. Tidligere erfaring viser at valg av protease har stor innvirkning på endelig smak i et hydrolysat (PhD Aspevik (2016)). Den innledende prosessoptimaliseringen bestod derfor av enzymatisk proteinhydrolyse av makrellavskjær med 10 forskjellige proteaser eller blandinger av flere proteaser (Tabell 1) og optimalisering. Målet var å finne en eller flere proteaser som ga høyt utbytte og best mulig smak, kombinert med en rimelig og industrielt relevant pris.

Task. 1.2. 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., 2016). En annen kjent utfordring i hydrolysat er oksidasjonsprodukter, både vannløselige og flyktige, som kan dannes av både (gjenværende) fett og aminosyrer. Derfor var et mål i SMELL å undersøke om fraksjonering ved bruk av membranfiltrering kunne bidra til produksjon av hydrolysat med bedre smak i form av redusert bitterhet og andre uønskede smakskomponenter. Det er derfor brukt filtermembran som fjerner forbindelser med lav molekylvekt, og fraksjoner før og etter filtrering er sendt til sensorisk vurdering for å finne ut om membranfiltreringen ga ønsket resultat.

Task 1.3. Maskering av komponenter som har uønsket smak er et spennende nytt fagfelt som er blitt inkludert i SMELL. Målet var å gjennomføre en maskering av smakskomponenter på de mest smaksnøytrale hydrolysatfraksjonene fra task 1.2. For å finne ut hvilken tilnærming som gir best effekt ble hydrolysatene med høy smaksintensitet og høye negative verdier etter sensoriske evaluering brukt for å undersøke hvor effektiv en maskering kunne være.

Under prosessutvikling er proteinfraksjoner sendt til AP3 og AP4 for kjemisk og sensorisk analyse. Metodebeskrivelser til resultater fra AP3 og AP4 som blir presentert i denne rapporten vil finnes i de respektive delrapportene (ferdige jan. 2021).

4.2 Materiale og metode

4.2.1 Råstoff

Til første runde ble makrell oppbevart fra sesongen 2018 brukt (oppbevart ved -30°C), ettersom rygg fra industrielt prosessert makrell ikke var tilgjengelig (sesong ikke startet). Lagret makrell ble tint, filetert for hånd og homogenisert før hydrolyse (se figur 2).



Figur 2. Råstoffet som inngikk i protease screening forsøk.

Til membranfiltreringsforsøk ble makrellrygg hentet fra prosesseringslinjen til Pelagia i Selje. Makrellryggene ble pakket og fryst ved -30°C , før de ble sendt frosset til Tromsø. I Tromsø ble makrellryggene oppbevart ved -30°C til dagen før kverning da de ble tint ved romtemperatur over natt. Ryggene ble kvernet, porsjonert og vakuumpakket før det ble oppbevart ved -30°C til dagen for hydrolyse.

4.2.2 Enzymatisk proteinhydrolyse

På bakgrunn av tidligere erfaringer ble proteasene i tabell 1 valgt. Samtlige hydrolyser ble kjørt i 1 time med 0,5% protease (w/w), unntatt miksen Alcalase og Flavourzyme der 0,25% (w/w) av begge proteasene ble brukt. Hydrolysereaksjonene ble kjørt i en Distek Dissolution System (Distek Inc., North Brunswick, NJ), og optimal hydrolysetemperatur ble tilpasset hver enkelt protease, se tabell 1.

Tabell 1. Oversikt over proteaser som ble brukt i forsøkene, med leverandør og optimal temperatur.

Protease	Leverandør	Optimal temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
Corolase 8000	AB Enzymes, Tyskland	60
Bromelain	Enzybel, Indonesia	55
Alcalase	Novozymes A/S, Danmark	55
Foodpro PNL	Danisco/du Pont, Danmark	60
Endocut 01	Tailorzyme ApS, Danmark	50
Flavourzyme	Novozymes A/S, Danmark	55
Flavourpro 766	Biocatalysts Ltd, UK	50
Foodpro 51 FP	Danisco/du Pont, Danmark	52
Flavourpro 839	Biocatalysts Ltd, UK	50
Promod 950L	Biocatalysts Ltd, UK	55
Miks av Flavourzyme og Alcalase	Novozymes A/S, Danmark	55

Normalt ved enzymatisk hydrolyse tilsettes enzymet når optimal temperatur er oppnådd, men for dette råstoffet ble enzymene tilsatt fra 35-50 °C fordi det ble observert geling ved høyere temperaturer.

Etter hydrolyse ble proteasene inaktivert ved bruk av høy temperatur (90 °C, 10 min). Prøvene ble deretter sentrifugert (7000 rpm, 15 min, rt) for å fjerne sedimentet. Etter dette ble vannfasen skilt fra fettfase ved bruk av en peristaltisk pumpe. Til sist ble partikulært materiale i hydrolysaten fjernet ved hjelp av et papirfilter (Whatman #4). Prøvene ble oppbevart i fryserer ved minst -20 °C frem til frysetørking.

Tørrstoffutbytte ble beregnet på bakgrunn av vekt av tørket materiale og målt tørrstoffinnhold i råstoffet. Proteinutbytte ble beregnet på basis av total mengde protein i hydrolysat ($N \times 6,25$) delt med total mengde protein i råstoff ($N \times 6,25$), ganger 100 %.

Protein, aske og proksimat analyse ble utført ved ALS (Oslo).

4.2.3 Optimalisering og membranfiltrering

Alcalase og Bromelain, samt Foodpro PNL og Endocut 01 (i duplikat) ble hydrolysert ved samme temperatur og tid som i første runde, ved de enzymkonsentrasjoner som er oppgitt i Tabell 2. Hydrolysaten ble inaktivert og separert som i første runde ble sendt videre til membranfiltrering.

Hydrolysaten ble filtrert med 1kDa membranfilter på et tangentielt flow filtreringssystem (Pall Centramate 500 S, Pall, NY). Dette ga til sammen tre fraksjoner; crude – kun filtrert med papirfilter, permeat og retentat med 1 kDa cut-off. Alle fraksjoner ble undersøkt sensorisk, kjemisk og spektroskopisk i AP3. En oversikt over proteaser og konsentrasjon som ble brukt ved hydrolyse finnes i tabell 2.

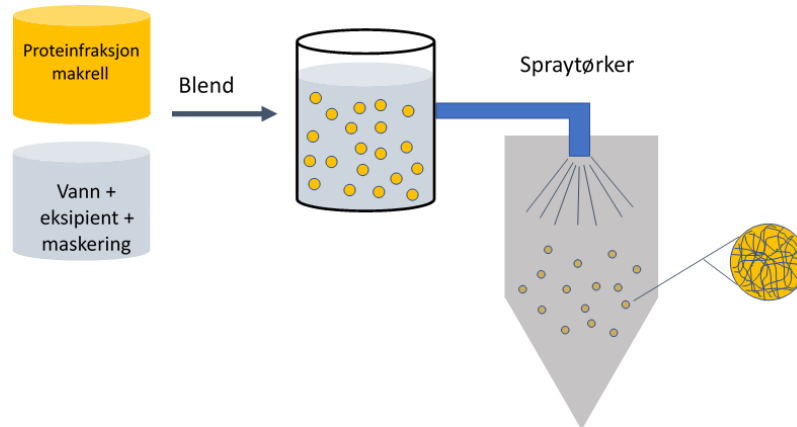
Tabell 2 Oversikt over proteaser, konsentrasjon ved bruk, samt fraksjoner som ble anvendt etter membranfiltrering.

Protease	Konsentrasjon (% (w/w))	Fraksjoner etter membranfiltrering
Endocut 01	0,1, 0,5	Crude, permeat, retentat
FoodPro PNL	0,1, 0,5	Crude, permeat, retentat
Alcalase	0,5	Crude, retentat
Bromelain	0,5	Crude, permeat, retentat

4.2.4 Maskering av smakskomponenter

Arbeidet med smaksmaskering er basert på at man kan maskere eller redusere uønsket smak og lukt ved hjelp av fysiske innkapslingsmetoder som spraytørking. Oppsettet for maskeringsforsøkene er vist i figur 3 under, der en eksipient (en inaktiv forbindelse som fungerer som bindemiddel for det som skal kapsles inn) og vann tilsettes til makrellkomponentene før blandingen spraytørkes. Justering av pH kan benyttes for å redusere utfordringer med flyktige aminforbindelser som særlig bidrar til uønsket smak og lukt (f.eks. metylamin og andre lav mol. vekt aminer). Maskering og smaksminimalisering kan bli gjort med en tilsatt sterk smak (f.eks. jackfrukt) eller ved bruk av 'smakfrie' materialer som

undertrykker eller minimaliserer smak. 'Smakfri' smaksmaskering kan gjøres med enkle polysakkarider som modifiserte stivelser til næringsmidler (MFS), maltodextrin, proteiner og lipoproteiner. En eksipient (f.eks. gum arabic eller myseprotein) er brukt som binder sammen med smaksmaskering og hydrolyserte produkter for å minimalisere frigivelse av smak i munnhulen.



Figur 3. Flow skjema til smaksmaskering

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Task 1.1. Optimalisering av enzymatisk hydrolyse

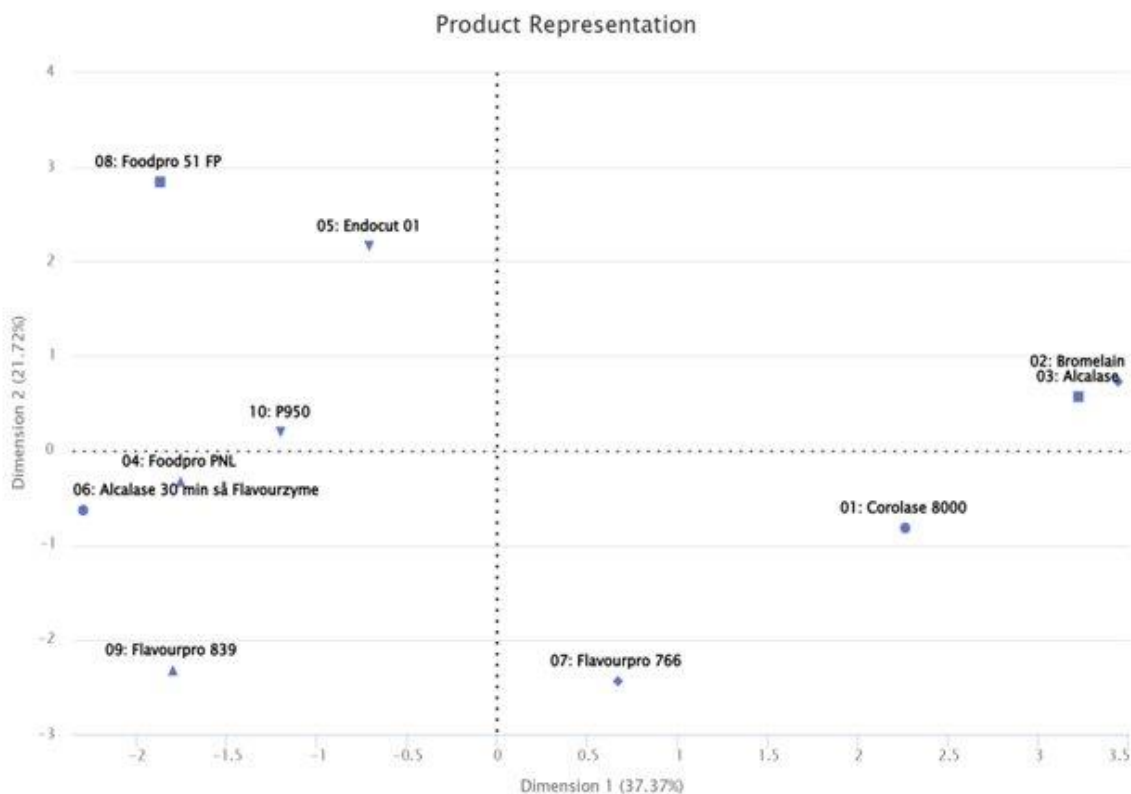
Proksimatanalyser av råstoffet viste følgende innhold: 59,4 % vann, 1,8 % aske, 18,3 % fett, 18,6 % protein og 1,9 % karbohydrater. Tabell 3 viser oppnådd utbytte og pris på de forskjellige enzymene brukt.

Tabell 3. Tørrstoffutbytte, proteinutbytte og pris på proteasene.

Enzym	Utbytte tørrvekt	Utbytte protein	Pris (dato for når pristilbud ble sendt)
Bromelain	27 %	52 %	55,25 \$/kg (mars 2016)
Alcalase	24 %	44 %	397,8 kr/kg (juni 2019)
Flavourpro 839	21 %	37 %	125,2 £/kg (aug 2019)
Corolase 8000	20 %	37 %	28,5 €/kg (mai 2018)
Flavourpro 766	19 %	33 %	62,2 £/kg (aug 2019)
Promod 950L	18 %	32 %	11,04 £/kg (aug 2019)
Endocut 01	17 %	30 %	24 €/kg (aug 2019)
Foodpro 51 FP	16 %	29 %	1106,00 DKK/kg (juli 2019)
Foodpro PNL	15 %	27 %	152,5 DKK/kg (juli 2019)
Alcalase 30 min + Flavourzyme	15 %	26 %	1069 kr/kg (fl.z) (juni 2019)

Tabell 3 viser godt samsvar mellom tørrvekstutbytte og proteinutbytte. Proteasene som ga høyest utbytte er Bromelain og Alcalase. De er to kjente effektive proteaser som i henhold til våre resultater også yter godt i hydrolyse av makrellrygg. Miksen Alcalase og Flavourzyme er den reaksjon med dårligst utbytte, trolig fordi Flavourzyme hovedsakelig består av eksopeptidaser og at Alcalase ble tilsatt med halv mengde. En interessant observasjon er at det er ingen samsvar mellom oppnådd utbytte og kostnad av enzym.

To innledende sensoriske screeninger av de 10 hydrolysatene ble utført av prosjektdeltagere og av sensorisk panel i juni 2019. De viste at det var stor variasjon i smaksprofilen til de ulike hydrolysatene. Alcalase, Bromelain og Corolase 8000 ble alle beskrevet som astringent og bitter, negative egenskaper som ikke er ønskelig å ha i et hydrolysat. I den andre enden av skalaen ligger hydrolysatene FoodPro 51FP og Endocut 01. Disse beskrives som nøytrale, syrlige og med mild smaksintensitet (Figur 4). FoodPro PNL beskrives også som mild, men også med smak av kjøtt og noe fermentert. Disse proteasene gir dårlig utbytte, men ettersom fokus i prosjektet er å få produsert et proteinprodukt med mest mulig nøytral smak, ble FoodPro PNL og Endocut 01 valgt som kandidater for videre sensorisk analyse fordi disse hadde mest nøytral smaksprofil og forholdsvis lav kostnad.



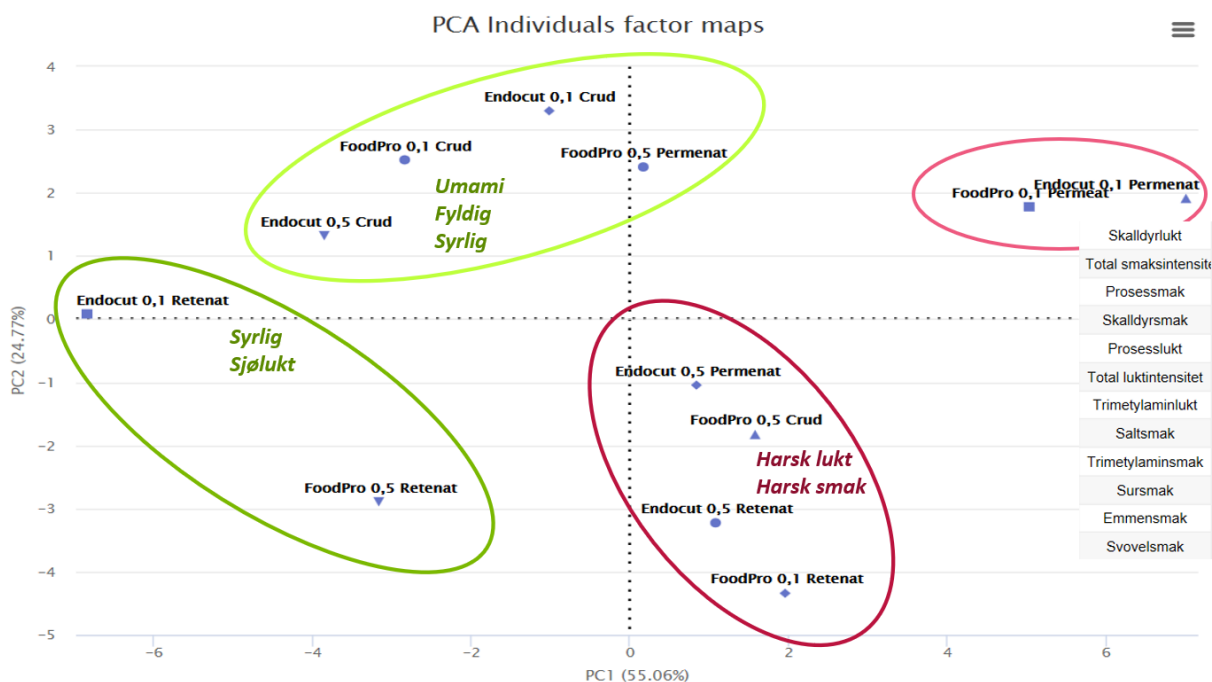
Figur 4. Resultater fra Multiple Factor Analysis (MFA) fra sensorisk screening (Napping) med trent sensorisk panel. Prøve 01 til 10 er det ulike hydrolysatene basert på 10 ulike enzymer.

For å sjekke om det er mulig å få en optimalisering av smak ble Foodpro PNL og Endocut 01 i et oppfølgende hydrolyseforsøk hydrolysert i duplikat ved to forskjellige enzymkonsentrasjoner, 0,1 % og 0,5 %. I tillegg ble Alcalase og Bromelain hydrolysert for å ha en negativ smaksreferanse i både sensorisk og kjemisk analyse.

5.2 Task 1.2 Raffinering av hydrolysater og limvann

Hydrolysater fra Alcalase, Bromelain, Foodpro PNL og Endocut 01, ble filtrert med et 1kDa membranfilter. Permeat og retentat ble sammen med opprinnelig hydrolysat, totalt 18 fraksjoner, sendt til sensorisk analyse ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA) (figur 5), samtidig som proteininnhold og askeinnhold ble analysert (tabell 4 og 5).

Resultatene fra PCA og cluster-analysen av QDA for alle prøver med Foodpro PNL og Endocut 01 er presentert i figur 5. Generelt fordeles prøvene inn i 4 grupper (cluster-analyse). To av disse clusterene karakteriseres av positive egenskaper «syrlig, sjøluft» og «umami, fyldig», mens to av clusterene hadde dårligere karakteristikk: «harsk lukt og smak» og «TMA, svovel, emmen, intens, sur, prosess, salt». For begge proteaser ved lav konsentrasjon ser vi en positiv effekt fra membranfiltrering, ettersom permeatene i begge tilfeller er beskrevet med negative egenskaper. Ikke uventet er permeatene (< 1kDa) mest assosiert med TMA, salt og andre sensoriske egenskaper som mest sannsynlig skyldes lavmolekylære forbindelser.



Figur 5. PCA plott over hydrolysater fra Endocut 01 og Foodpro PNL med både 0,1 % og 0,5 %, crud (før filtrering), permeat og retenat. Sensoriske egenskaper som skiller prøvene mest basert på cluster-analyse, er skrevet inn i PCA-plottet og tilhørende prøver er ringet rundt.

Det er nødvendig å tolke de sensoriske resultatene med forsiktighet, da både permeatene og crude-prøvene hadde et høyt askeinnhold (tabell 5), som fører til at proteininnholdet (tabell 4) i prøvene til sensorisk testing var forskjellige, ettersom sensorisk analyse er basert på vannfase mikset med 1 % tørrstoff. Prøvene skiller seg lite på egenskapen bitter. Alle prøvene beskrives som noe bitre og skiller lite i sensorisk score, det er kun 0,5 % Foodpro PNL retenat som er signifikant mer bitter enn 0,1 % Foodpro PNL crude, 0,1 % Endocut 01 crude og retenat. Når det gjelder egenskapene harsk smak og lukt, var det forventet at crude og/eller retenat ville ha høy forekomst av disse egenskapene. Men her er ikke resultatene entydige. Alle prøvene har forekomst av harsk smak, men sensoriske verdier er relativt lave. Vi ser dog at 0,1 % Foodpro PNL retenat og 0,5 % Endocut 01 retenat har de høyeste verdiene av harsk smak, og er de prøvene som trekker i PC2 retning sammen med harsk smak.

Tabell 4. Proteininnhold i de ulike hydrolysatfraksjonene

	Crude	Retenat	Permeat
Foodpro PNL 0,1 %	81 %	88 %	65 %
Foodpro PNL 0,5 %	82 %	92 %	65 %
Endocut 01 0,1 %	74 %	91 %	59 %
Endocut 01 0,5 %	84 %	86 %	79 %
Alcalase 0,5 %	84 %	88 %	-
Bromelain 0,5 %	86 %	87 %	78 %

Tabell 5. Askeinnhold i de ulike hydrolysatfraksjonene

	Crude	Retentat	Permeat
Foodpro PNL 0,1 %	18 %	8 %	33 %
Foodpro PNL 0,5 %	14 %	8 %	24 %
Endocut 01 0,1 %	20 %	9 %	34 %
Endocut 01 0,5 %	18 %	10 %	20 %
Alcalase 0,5 %	12 %	7 %	-
Bromelain 0,5 %	11 %	9 %	17 %

Det er viktig å huske på at analysene i en sensorisk profilering som denne, sammenligner kun prøver som bedømmes i samme forsøk. Det vil si at de sensoriske verdiene ikke kan sammenlignes med andre hydrolysater som finnes på markedet. Det er derfor viktig at neste steg i de sensoriske analysene også må inneholde kommersielle hydrolysater i tillegg til optimaliserte hydrolysater. Kun på den måten vil vi kunne vurdere om det optimaliserte hydrolysatet fra dette prosjektet har en mer nøytral smak enn andre kommersielle hydrolysater.

Det kommer også til å bli klart fra delrapporten fra sensorikarbeidspakken at det i realiteten ikke foreligger forskjell mellom smaksintensitet mellom de opprinnelige hydrolysatene Endocut 01 0,5 % og Foodpro PNL 0,5 %. Der det statistisk sett er forskjell mellom de opprinnelige 0,5 % hydrolysatene var det generelt sett små forskjeller i smaks- og lukt karakteristikk. Basert på resultater fra innledende tester, både mtp kjemisk sammensetning, pris og sensorikk, ble 0,1 % FoodPro PNL valgt videre til oppskaleringforsøk (AP2). Til sist, i EU-prosjektet Aquabiopro-fit (www.aquabioprofit.eu) har makrellrygger, slo og hoder blitt hydrolysert ved bruk av blant annet FoodPro PNL. Lovende resultater fra dette prosjektet har også bidratt til valg av dette enzymet til videre bruk i oppskalering.

5.3 Task 1.3 Maskering av smakskomponenter

Relevante næringsmiddelsbaserte hjelpestoffer/bærere for formulering eller innkapsling av fraksjonene ble benyttet i emulsjonsbasert innkapslingsteknologi i en spraytørker med fokus på betingelser som kunne bevare proteiner og peptider.

Det ble produsert 2×15 liter hydrolysat med Alcalase og Bromelain, ihht tabell 2, som inngikk i maskeringsforsøkene. Disse fraksjonene utmerket seg sensorisk med lite attraktive smaksattributter. Det leverte materialet hadde en tørrvekt på 1.25 % (Alcalase) og 4.25 % (Bromelain) etter fjerning av fettfraksjonen.

Resultater fra første forsøk er oppsummert i tabell 6. Til tross for den lave tørrstoffmengden lot det Alcalase-deriverte hydrolysatet seg lett spraytørke til et tørt pulver, i motsetning til det Bromelain-deriverte hydrolysatet (se figur 6). Merk også at blanding av hydrolysat med enten en smaksmaskerende agent (maltodextrin) eller eksipienten gum Arabic muliggjorde isolering av aggregerte tørre pulver. Det er interessant at Bromelain hydrolysat konsekvent gir vesentlig lavere utbytte i spraytørking, hvilket er en betraktning som også bør tas hensyn til i valg av protease og prosessparametere under pilotskalaforsøk. Dette indikerer at strategien fungerer som planlagt, lar seg gjennomføre og at vi kan levere prøver til smakspanelet.

Tabell 6. Oversikt av første forsøk med spraytørking

	Prøvebeskrivelser	SD utbytte (%)	Vannmengde (%)	Resultat
1	Alcalase	90	4.0	Tørrpulver
2	Bromelain	5	NA	Granulat
3	1:1 Alcalase:maltodextrin	90	4.0	Tørrpulver
4	1:1 Alcalase:Gum arabic	88	4.2	Tørrpulver
5	1:1 Bromelain:maltodextrin	42	4.0	Tørrpulver
6	1:1 Bromelain:Gum arabic	45	4.0	Tørrpulver



Figur 6. Eksempel på resultat fra spraytørking; venstre Bromelain hydrolysat pulver uten eksipient og smaksmaskering, høyre Bromelain 1:1 med gum arabic.

6 Hovedfunn

Hovedfunnene i AP1 i SMELL er:

- Valg av protease påvirker bittersmaken til proteinfraksjonene fra hydrolyse og det er mulig å få produsert hydrolysat med lav bitterhet fra makrellrygg.
- Membranfiltrering har vist potensiale for å redusere uønskede sensoriske smaksattributter.
- Metodevalg for å blande smaksmaskerende forbindelser med hydrolysater er vellykket, men valg av protease kan påvirke utbyttegraden.

7 Leveranser

Populærvitenskapelige artikler:

Avskjær fra makrell skal bli proteinpulver uten lukt og smak. Fiskeribladet.no. 27. juni 2019.
<https://fiskeribladet.no/teknisk/nyheter/?artikkel=67710>

Smaksprosjekt med smell – for makrell. Nofima.no 27 juni 2019.
<https://nofima.no/nyhet/2019/06/smaksprosjekt-med-smell-for-makrell/>

Skal lage lukt- og smakfritt proteinpulver av makrell-rester. Forskning.no 27 juni 2019.
<https://forskning.no/nofima/skal-lage-lukt--og-smakfritt-proteinpulver-av-makrell-rester/1351716>

Postere:

WEFTA: Vang, B., Gaarder, M.Ø., Wubshet, S.G., Solstad, R.G., Dankel, K., Aspevik, T., Kousoulaki, K., Steinsholm, S., Lindberg, D. **2019**. Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)

MR2020: Dankel, K., Gaarder, M.Ø., Lindberg, D., Vang, B., Solstad, R.G., Aspevik, T., Wubshet, S.W. **2020**. The “magnetic tongue” concept revisited: ¹H NMR-based multivariate statistics for unraveling sensory attributes of fish protein hydrolysates

8 Referanser

- Aspevik, T., 2016. Fish protein hydrolysates based on Atlantic salmon by-products - enzyme cost-efficiency and characterization of sensory, surface-active and nutritional properties, PhD thesis, University of Bergen.
- Aspevik, T. et al., 2016a. A Systematic Approach to the Comparison of Cost Efficiency of Endopeptidases for the Hydrolysis of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) By-Products. Food Tech and Biotech Vol 54, No. 4, 2016.
- Aspevik, T., et al., 2016b. Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. Process Biochem 51, 1006-1014.
- Kim H.-O. & Li-Chan, E.C.Y., 2006. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. J Agric Food Chem 54, 10102-10111.

